

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO
NA REGIÃO CENTRO-OESTE**

LUANA BERNARDI

**EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN
REFRATÁRIA ASSOCIADA A FÍSTULAS PERIANAIS**

CAMPO GRANDE – MS

2021

LUANA BERNARDI

**EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN
REFRATÁRIA ASSOCIADA A FÍSTULAS PERIANAIS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul para obter o título de Doutor, pelo
programa de pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Área de concentração: Tecnologia e Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Conceição
Milan Brochado Antonioli da Silva

CAMPO GRANDE – MS

2021

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre ouvir minhas orações, meus pedidos e agradecimentos. Obrigada por todo o caminho que iluminou nos momentos difíceis, e por estar comigo nos momentos alegres.

À minha família, Sérgio João Bernardi (pai), Marília Teresinha Boza Bernardi (mãe) e Emanuela Bernardi (irmã), que mesmo distantes, foram meus principais alicerces durante estes quatro anos. Obrigada por todo amor, força e amizade de sempre.

À minha orientadora, professora Dra. Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva, que sempre foi excelente como pessoa, professora, amiga. Obrigada por todo acolhimento, aprendizado, paciência, empatia e por ter aceitado abraçar meu sonho. Sou extremamente grata à Sra.

Ao professor Dr. Rodrigo Juliano Oliveira, que me acolheu desde o início. Obrigada por todos os ensinamentos, por toda paciência, pela empatia e por não ter medido esforços em me ajudar sempre que necessário. Sou extremamente grata ao Sr.

Ao Dr. Carlos Henrique Marques dos Santos, profissional e pessoa exemplar. Com muito conhecimento sempre me ajudou, me ouviu, me orientou e foi essencial para todo o meu crescimento profissional e como pessoa. Sou extremamente grata ao Sr.

Ao Dr. Thiago Franchi Nunes, ótimo profissional. Sempre preocupado em contribuir com a pesquisa da melhor forma. Sou extremamente grata ao Sr.

Ao Dr. Jovino Nogueira da Silva Menezes, profissional e pessoa exemplar. Sempre ajudou da melhor forma, com muita dedicação, preocupação e empatia durante toda a pesquisa. Sou extremamente grata ao Sr.

Ao meu companheiro, Leonardo Lopes Coelho e aos meus amigos e amigas, que realmente me apoiaram e estiveram comigo nos momentos difíceis e alegres. Só tenho a agradecer por toda a força que me deram durante este período. Obrigada por tudo.

A todos os demais profissionais que de alguma forma me deram apoio e auxílio durante a pesquisa: médicos, técnicos de enfermagem, biólogos, meu muito obrigada!

À UFMS, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste e à Capes, pela oportunidade e pela bolsa concedida durante um período do meu doutorado.

RESUMO

Introdução: A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória do intestino, que se caracteriza pela inflamação da mucosa e complicações perianais, como as fístulas, que podem afetar cerca de um terço dos pacientes. Apesar da existência de terapias para melhora dos sintomas, alguns indivíduos não respondem aos tratamentos médicos convencionais, necessitando de terapias alternativas. Neste contexto, a terapia celular, por meio do transplante de células-tronco mesenquimais (CTM) é promissora para o controle do processo inflamatório de fístulas perianais na DC refratária. **Objetivo:** Avaliou-se a eficácia e a segurança do transplante autólogo de CTM derivadas do tecido adiposo em pacientes com DC fistulizante perianal refratária. **Métodos:** Foram recrutados 6 pacientes adultos, com diagnóstico comprovado de DC fistulizante perianal refratária e a intervenção proposta foram três aplicações de CTM ($1,6 \times 10^6$ células/mL em cada aplicação). As células foram isoladas do tecido adiposo, da região dos flancos, por lipoaspiração e cultivadas com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium, soro bovino fetal e antibiótico/antimicótico. Antes das aplicações, foram analisados os parâmetros de morfologia, ausência de contaminação, viabilidade, capacidade de aderência à superfície plástica, imunofenotipagem e potencial de diferenciação das células. A avaliação dos transplantes ocorreu na 12ª e 24ª semana após a primeira aplicação, considerando aspectos de segurança e de eficácia, que foram comparados aos dados do início da intervenção. **Resultados:** Três pacientes concluíram o estudo e foram inoculadas CTM nas passagens 4, 5 e 6 em oito fístulas no total. Em quatro fístulas ocorreu o fechamento da abertura externa, com reepitelização local, sendo que duas destas fecharam ainda na 12ª semana. No entanto, na 24ª semana o exame de ressonância magnética de pelve indicou melhora de somente um dos pacientes. Por outro lado, no mesmo período, o índice clínico de atividade da doença perianal e a avaliação da qualidade de vida indicaram progresso para os três pacientes e, por meio da análise do escore endoscópico simples da DC, dois pacientes apresentaram a doença endoscopicamente inativa ao final do acompanhamento. Quanto às medidas antropométricas, a maioria se mostrou adequada e os alimentos que tiveram baixo consumo ao longo do estudo, em conformidade para os três avaliados, foram aqueles que pertencem ao grupo dos feijões. **Conclusão:** As CTM autólogas do tecido adiposo apresentam potencial clínico para tratar as fístulas perianais na DC refratária e de forma segura.

Palavras-chave: Doença de Crohn. Células-tronco derivadas do tecido adiposo. Transplante de células-tronco mesenquimais.

ABSTRACT

Introduction: Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowel disease, which is characterized by inflammation of the mucosa and perianal complications, such as fistulas, which can affect about one third of patients. Despite the existence of therapies to improve symptoms, some individuals do not respond to conventional medical treatments, requiring alternative therapies. In this context, cell therapy, through transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) is promising for the control of the inflammatory process of perianal fistulas in refractory CD. **Objective:** We evaluated the efficacy and safety of autologous transplantation of adipose tissue-derived MSC in patients with refractory perianal fistulizing CD. **Methods:** Six adult patients were recruited, with a proven diagnosis of refractory perianal fistulizing CD, and the proposed intervention was three applications of MSC (1.6×10^6 cells / mL in each application). The cells were isolated from the adipose tissue, from the flanks, by liposuction and cultured with Dulbecco's Modified Eagle's Medium, fetal bovine serum and antibiotic / antimycotic. Before applications, the parameters of morphology, absence of contamination, viability, ability to adhere to the plastic surface, immunophenotyping and differentiation potential of the cells were analyzed. The evaluation of transplants occurred in the 12th and 24th weeks after the first application, considering aspects of safety and efficacy, which were compared to the data at the beginning of the intervention. **Results:** Three patients completed the study and MSC were inoculated in passages 4, 5 and 6 in eight fistulas in total. In four fistulas, the external opening was closed, with local re-epithelialization, two of which closed in the 12th week. However, in the 24th week, the pelvic MRI exam indicated improvement in only one of the patients. On the other hand, in the same period, the clinical index of activity of the perianal disease and the evaluation of the quality of life indicated progress for the three patients and, through the analysis of the simple endoscopic score of CD, two patients presented the endoscopically inactive disease to the end of follow-up. As for anthropometric measurements, most were shown to be adequate and the foods that had low consumption throughout the study, in accordance for the three evaluated, were those that belong to the group of beans. **Conclusion:** Autologous MSCs from adipose tissue have clinical potential to safely and safely treat perianal fistulas in refractory CD.

Keywords: Crohn's disease. Stem cells derived from adipose tissue. Mesenchymal stem cell transplantation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E QUADROS

Quadro 1. Características dos estudos de transplante das células-tronco mesenquimais nas fístulas perianais e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária.....	70
Quadro 2. Avaliação do transplante das células-tronco mesenquimais nas fístulas perianais e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária.....	72
Figura 1. Protocolos testados para detecção de danos no DNA de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos.....	43
Figura 2. Caracterização da multipotência e imunofenotipagem das células tronco mesenquimais.....	47
Figura 3. Avaliação da genotoxicidade (momento da cauda) em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos usando 4 protocolos de ensaio cometa.....	48
Figura 4. Ensaio de expressão gênica por qPCR. Os genes analisados estão envolvidos no processo de danos e reparo do DNA.....	49
Figura 5. Caracterização da multipotência e imunofenotipagem das células tronco mesenquimais.....	58
Figura 6. Avaliação da genotoxicidade (momento da cauda) de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos da 1 ^a à 10 ^a passagem pelo ensaio cometa usando média e desvio-padrão.....	59
Figura 7. Avaliação da viabilidade e da formação de esferoides de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos usando média e desvio-padrão.....	60
Figura 8. Fluxograma relacionado ao processo de seleção dos artigos com os temas “doença de Crohn luminal” e “doença de Crohn fistulizante perianal”, respectivamente	
Figura 9. Visão geral do protocolo do estudo.....	83
Figura 10. Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido adiposo.....	88
Figura 11. Representação da evolução do processo de cicatrização das fístulas perianais após injeções locais de células-tronco mesenquimais autólogas do tecido adiposo no momento da primeira injeção (A-C), 12 semanas após a primeira injeção (D-F) e 24 semanas após a primeira injeção (G-I)	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers (5'– 3') usados nas reações de PCR em tempo real.....	46
Tabela 2. Características da doença de Crohn dos pacientes no momento de pré e pós-intervenção com as células-tronco mesenquimais.....	91
Tabela 3. Características antropométricas dos pacientes nos momentos de pré-intervenção (T0) e seis meses após a intervenção (T2) com as células-tronco mesenquimais.....	93
Tabela 4. Frequência de consumo alimentar dos pacientes nos momentos de pré-intervenção (T0) e seis meses após a intervenção (T2) com as células-tronco mesenquimais.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTM – células-tronco mesenquimais
DII – doenças inflamatórias do intestino
DC – Doença de Crohn
CD - Cluster of Differentiation
MHC-I – Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade classe II
HLA – Sistema antígeno leucocitário humano
IL – Interleucina
TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa
EA – Eventos adversos
IFN- γ – Interferon-gama
TGF- β – Fator de transformação do crescimento-beta
HGF – Fator de crescimento de hepatócitos
PGE2 – Prostaglandina E2
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
TCLE – Termo de Consentimento Livre
IBDQ - Inflammatory Bowel Disease Questionnaire
PDAI - Perianal Disease Activity Index
SES-CD - Simple endoscopic score for Crohn's disease
QFA - Questionário de Frequência Alimentar
CC – Circunferência da cintura
CB – Circunferência do braço
GC - Gordura corporal
MME – massa muscular esquelética
BIA - balança de bioimpedância
IMC – índice de massa corporal
HUMAP - Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian
UFMS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
HRMS - Hospital Regional de Mato Grosso do Sul
GEP - Gerência de Ensino e Pesquisa
CONEP - Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

OMS – Organização Mundial da Saúde

WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral:	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3.REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 DOENÇA DE CROHN	15
3.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CROHN.....	16
3.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DE CROHN.....	18
3.4 COMPLICAÇÕES DA DOENÇA DE CROHN	20
3.5 ALIMENTAÇÃO NA DOENÇA DE CROHN	22
3.6 EPIGENÉTICA E DOENÇA DE CROHN.....	24
3.7 DOENÇA DE CROHN FISTULIZANTE	25
3.8 DOENÇA DE CROHN: TERAPIAS EXISTENTES	27
3.9 CÉLULAS-TRONCO	29
4.0 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	30
4.1 INTEGRIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	33
4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	35
4.3 DOENÇA DE CROHN FISTULIZANTE: EFICÁCIA E SEGURANÇA DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	37
4. Artigo 1: Influência do consultivo celular, tempo de lise e do pH do tampão de eletroforese sobre a integridade genômica de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo utilizando ensaio cometa	40
5. Artigo 2: Efeito da criopreservação sobre a viabilidade, integridade genômica, formação de esferoides, diferenciação e fenótipo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.....	53
6. Artigo 3: Transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo na doença de Crohn refratária: revisão sistemática	64

7. Artigo 4: Células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido adiposo no tratamento da doença de Crohn fistulizante refratária.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO 1.....	143
ANEXO 2.....	147
ANEXO 3.....	148
ANEXO 4.....	149
ANEXO 5.....	156
ANEXO 6.....	160
ANEXO 7.....	161
ANEXO 8.....	162

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias do intestino (DII) são caracterizadas pela inflamação crônica e recidivante do trato gastrointestinal, que decorre de um distúrbio imunitário multifatorial (PODOLSKY, 1991). A Doença de Crohn (DC) é considerada uma das formas destas doenças, podendo acometer qualquer parte do trato gastrointestinal (BUCHMAN et al., 2006), sendo as regiões do íleo terminal e perianal as mais recorrentes (KHOR et al., 2011). O curso da DC pode se enquadrar tanto em períodos de remissão quanto de exacerbação, sendo o último a fase em que a doença está ativa, podendo variar de um indivíduo para outro quanto ao seu grau de duração e gravidade (PINSON et al., 2017). Assim, durante a fase de recidiva da doença, a qualidade de vida dos pacientes diminui, devido aos procedimentos cirúrgicos, recaídas da doença, efeitos colaterais dos medicamentos e às manifestações extra intestinais (DUIJVESTEN et al., 2010).

O processo inflamatório da DC se caracteriza por uma inflamação transmural e segmentar da mucosa, pelo espessamento desta, além da formação frequente de granulomas, ulceração de fissuras (KHOR et al., 2011) e complicações perianais, como fístulas e abscessos (BAUMGART, 2012). Sua fisiopatologia está associada a distintas condições que podem contribuir para o desenvolvimento e piora do quadro clínico. Tem-se fatores genéticos; relacionados à síntese de citocinas pró-inflamatórias no local e; ainda, a relação com disbiose intestinal. Ademais, pode-se compreender que as DII resultam de um desequilíbrio entre os sistemas imunes inato, adaptativo e os microorganismos intestinais (KIM; CHEON, 2017). Ou seja, há uma resposta inflamatória intensa e constante no local, frente a estes micróbios comensais, ocasionando uma desproporção entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (O'SHEA et al., 2002), associado à suscetibilidade genética do indivíduo (KHOR et al., 2011). Embora nenhuma dessas alterações isoladas pode acarretar no desenvolvimento da doença, a explicação mais aceita gira em torno de mudanças na resposta imune do hospedeiro sobre a microbiota intestinal de indivíduos geneticamente suscetíveis, as quais são muitas vezes desencadeadas por estímulos ambientais (GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2015).

A prevalência e a incidência da DC variam conforme a localização geográfica. O maior número de casos é observado em países da Ásia, Europa e América do Norte, porém com tendência ao aumento em países em desenvolvimento, principalmente devido às progressões industriais. Assim, entre os países da América Latina, apenas o Brasil é

considerado com alta incidência de casos da DC (BEHZADI et al., 2015). Ressalta-se ainda que as fístulas perianais podem afetar cerca de 28% dos pacientes com DC dentro de 20 anos após o diagnóstico (EGLINTON et al., 2012). Além disso, estima-se que as fístulas perianais podem afetar cerca de um terço dos pacientes durante a evolução da doença (SCHWARTZ et al., 2002; LAPIDUS, 2006; INGLE; LOFTUS, 2007), e que 40% dos pacientes apresentam recidiva mesmo após cirurgias complexas e terapia médica avançada (BISLENGHI et al., 2019). Embora existam poucos estudos realizados a nível nacional que se referem à ascensão desta doença, o interesse pelo estudo das manifestações clínicas, dos aspectos etiológicos e das opções alternativas de tratamento vêm ganhando interesse de pesquisadores.

Barbalho et al. (2016) afirmam que devido à natureza heterogênea da doença e da falta de consenso, em muitas áreas, quanto a forma mais eficaz que estes pacientes devem ser abordados, diferentes formas de acompanhamento devem ser adotadas, procurando ultrapassar as terapias convencionais, para verificar melhora na qualidade de vida destes indivíduos. Hoje, o tratamento com agentes biológicos é abrangente, como através do uso de aminosalicilatos, antibióticos, corticosteroides, medicamentos imunossupressores e, principalmente, o uso de inibidores de fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF- α) (STROBER et al., 2007). Estes, associam-se à indicação de cirurgias para ressecção intestinal, que também é necessária em alguns casos (GARCÍA-BOSCH et al., 2010), mesmo apresentando a necessidade de novo procedimento cirúrgico, devido as recorrências do distúrbio (FAZIO et al., 1993). No entanto, explorar uma nova alternativa de tratamento se faz importante, visto que ainda há uma percentagem significativa de pacientes que não respondem aos tratamentos médicos convencionais, ou que desenvolvem uma resposta parcial a estes (LA PORTILLA et al., 2016).

Estima-se que um terço de todos os pacientes com DC não respondem à terapia com anti-TNF- α e 10% não respondem a nenhum dos medicamentos indicados para tratar a DC (KOPYLOV et al., 2014; BEN-HORIN et al., 2014). Em trabalho de Steenholdt et al. (2011) os autores verificaram que os pacientes com DC refratários ao tratamento com infliximab apresentavam baixos níveis séricos do medicamento, além de altos níveis de anticorpos anti-infliximab, o que resultou na perda da resposta à terapia. Em vista da necessidade de novas opções de tratamento, o Grupo Europeu de Transplante de Sangue e Medula Óssea (EBMT) indica a terapia celular, com células-tronco hematopoiéticas, para pacientes com doença ativa, refratária ou descontrolada por terapias farmacológicas convencionais (COLOMBEL et al., 2012).

O tratamento através do transplante autólogo com células-tronco mesenquimais (CTM) extraídas de diferentes tecidos é promissor tanto para a melhora do processo inflamatório quanto para fístulas perianais na DC. Estudos vêm sendo realizados com o intuito de elucidar os mecanismos terapêuticos pelos quais estas células exercem no local que estão sendo implantadas (DUIJVESTEIN et al., 2010; CHO et al., 2013; FORBES et al., 2014; MOLENDIJK et al., 2015; WAINSTEIN et al., 2018; AVIVAR-VALDERAS et al., 2019), demonstrando resultados promissores em relação às terapias convencionais. Sabe-se da capacidade desta terapia celular em modular as respostas imunológicas e na regeneração de tecidos (DUIJVESTEIN et al., 2008). Assim, os efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores das CTM (GARCIA-OLMO et al., 2015), vêm sendo investigados com o objetivo de promover um período de remissão maior na DC (FORBES et al., 2014), e também para provocar o fechamento completo das fístulas perianais (DIETZ et al., 2017). Além disso, embora as CTM possam ser isoladas de vários tecidos, acredita-se que o tecido adiposo humano é uma fonte adequada, por ser de fácil acesso (FRANCIS et al., 2016), e por apresentar quantidade superior de células tronco comparado aos demais locais do corpo (ZUK et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia e a segurança do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em pacientes com doença de Crohn fistulizante perianal refratária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a eficácia e a segurança do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em pacientes com doença de Crohn fistulizante perianal refratária.

2.2 Objetivos Específicos:

Avaliar se o processo de cultivo de células-tronco mesenquimais causa danos no DNA e se variações no tempo de lise e no pH da solução tampão de eletroforese do ensaio cometa interferem nos resultados de genotoxicidade.

Analisar a influência da criopreservação de células-tronco mesenquimais por 12 semanas sobre a viabilidade celular e integridade genômica.

Avaliar o estado nutricional, a composição corporal e a qualidade da alimentação de pacientes com fístulas perianais associadas à doença de Crohn antes e após o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais.

Avaliar o processo inflamatório através do escore endoscópico de atividade da doença de Crohn e do índice de Van Assche em pacientes com fístulas perianais associadas à doença de Crohn antes e após o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais.

Analisar o índice clínico de atividade da doença perianal em pacientes com fístulas perianais associadas à doença de Crohn antes e após o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais.

Verificar o *status* de qualidade de vida em pacientes com fístulas perianais associadas à doença de Crohn, medido pelo questionário “Inflammatory Bowel Disease Questionnaire”, versão em português-Brasil, antes e após o transplante autólogo de células-tronco mesenquimais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DOENÇA DE CROHN

A doença de Crohn (DC) é considerada um tipo de doença inflamatória intestinal (DII) que pode acometer qualquer parte do trato gastrointestinal, do esôfago à região anal (DAILEY et al., 2018). Caracteriza-se como uma condição crônica, que envolve principalmente o intestino, de forma transmural, segmentar e com a presença, muitas vezes, de grânulos (STROBER et al., 2007). A doença cursa com oscilações entre períodos ativos do processo inflamatório e períodos de remissão, com o ressurgimento dos sintomas após este último momento (SERENA et al., 2017). Assim, as manifestações mais comuns incluem dor abdominal, diarreia com ou sem sangue e muco nas fezes (dependendo do grau da inflamação), perda de peso, anorexia e tenesmo. Algumas manifestações extra intestinais podem ocorrer, como eritema nodoso, pioderma gangrenoso, episclerite, uveíte e irite. Com o maior descontrole da doença, podem ser notadas complicações como anemia, náuseas, perda de apetite, febre, erupções cutâneas, artrite e fadiga crônica (MISHRA et al., 2017).

Há uma variação na incidência e prevalência da DC com base na região geográfica, ambiente, presença de população imigrante e de grupos étnicos (GAJENDRAN et al., 2018). Assim, tem-se observado maior incidência entre judeus Asquenazes (Europa Central e Oriental), na população urbana e em países do hemisfério Norte, além de apresentar seu pico entre a 2ª e 4ª década de vida, sem grandes diferenças entre homens e mulheres (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Embora a DC continue a ser incomum entre os países da África e América do Sul (GAJENDRAN et al., 2018), a sua ocorrência tem aumentado em países em desenvolvimento (LOFTUS, 2004; FROLKIS et al., 2013; BEHZADI et al., 2015). Em recente revisão sistemática de literatura (NG et al., 2017), observou-se variação percentual anual estável ou decrescente da DC na América do Norte e Europa, enquanto esta tendência permanece estável ou crescente em países recentemente industrializados como os da Ásia e América do Sul. No Brasil, a prevalência da doença passou de 0.60 (ano de 1990) para 6.75 (ano de 2016), e a incidência variou de 0.81 (ano de 1990) para 1.94 (ano de 2016). Do mesmo modo, outros trabalhos recentes indicam uma tendência crescente na ocorrência das DII no Brasil, principalmente nas regiões mais desenvolvidas (GASPARINI et al., 2018; QUARESMA

et al., 2019), acreditando que, futuramente, os dados de prevalência possam se igualar às regiões desenvolvidas do globo (GASPARINI et al., 2018).

Os dados de incidência e prevalência das DII no Brasil são obtidos a partir de estudos epidemiológicos, uma vez que no país ainda não há um sistema integrado de notificação diagnóstica para as mesmas (GASPARINI et al., 2018), ao contrário de países ocidentais (KAPLAN et al., 2015). Esta falta de um sistema de vigilância de registros confiáveis permanece obscura, até porque as DII não são consideradas doenças de notificação obrigatória, e podem ter seu diagnóstico incorreto, declarando-as muitas vezes como doenças infecciosas (QUARESMA et al., 2019). De todo o modo, a mudança de cenário epidemiológico das DII a nível mundial, iniciou-se na virada do século 21 e está associada principalmente ao estilo de vida ocidentalizado adotado cada vez mais pela população (KAPLAN, 2015^a; 2017^b). Corroborando, os estudos nacionais, embora escassos, indicam maior número de casos na região Sudeste, que é considerada mais desenvolvida comparada às demais, e que apresenta uma população com integração genética e cultural ocidentalizada de povos europeus e seus descendentes. Entretanto, ainda não há estudos que indicam as razões reais para o aumento de casos no Brasil (QUARESMA et al., 2019).

3.2 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE CROHN

A compreensão da etiologia exata da DC ainda permanece elusiva. No entanto, é uma doença de caráter multifatorial que está relacionada à suscetibilidade genética do indivíduo, a diversos fatores ambientais e à composição de uma microbiota intestinal específica, que promovem alterações na função do sistema imunológico, e uma disfunção da barreira epitelial do intestino (MISHRA et al., 2017). Assim, fatores como microbiota intestinal, condição genética, poluição ambiental, aspectos de higiene, meio ambiente, urbanização, fatores dietéticos/nutricionais e resposta imune (KHALILI et al., 2018; TURPIN et al., 2018), podem estar atribuídos à causa.

Há três diferentes estágios que podem explicar a ocorrência da imunopatogênese das doenças inflamatórias do intestino: (I) entrada do conteúdo luminal em tecidos suscetíveis, o que pode ser facilitado por defeitos inerentes na barreira epitelial ou por infecções; (II) secreção defeituosa de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos devido a depuração de materiais estranhos na parede intestinal e; (III) uma reação imunológica compensatória adaptativa que resulta em uma resposta inflamatória crônica e dá origem a abrasões específicas das inflamações intestinais (MATRICON et al., 2010). Acrescenta-

se também que durante o processo de ativação inadequado e crônico do sistema imune adaptativo, são vistos no intestino de pacientes com DC, aumento da secreção de IFN- γ a partir de células Th1, e de citocinas pelas células Th17, como IL-17A/F, IL-21, IL-22 e CXCL8 (CADER; KASER, 2013; NEURATH et al., 2014).

Mais do que 160 locos genéticos de risco foram associados com a ocorrência de DII (JOSTINS et al., 2012). No entanto, na DC, os genes identificados até o momento representam menos do que 20% do risco genético total (BARRETT et al., 2008). Muitos destes aumentam a suscetibilidade de indivíduos por estarem envolvidos com disfunções da barreira do epitélio intestinal, com o estado de imunodeficiência inata, e com respostas imunes à microorganismos e antígenos externos, o que contribui com a propagação da inflamação crônica (SEWELL et al., 2009). Além disso, o polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes, esteve associado ao menor tempo para ocorrência de cirurgia abdominal em pacientes com DC (O'DONNELL et al., 2019), demonstrando que alterações genéticas também estão relacionadas à complicações da doença.

Fatores ambientais estão relacionados à aspectos culturais, demográficos, físicos, econômicos, tecnológicos ou políticos, podendo impactar na doença (VAN DER SLOOT et al., 2017). Alguns fatores de risco ambientais têm sido investigados para DII, incluindo tabagismo, ocorrência de apendicite, hábitos dietéticos e influências culturais na dieta, presença de infecções/vacinações, contraceptivos orais, uso de antibióticos, presença de helmintos, estresse psicológico, poluição do ar e higiene infantil, estilo de vida urbanizado, amamentação, entre outros (LEREBOURS et al., 2007; KAPLAN et al., 2010; LEE et al., 2015; BENCHIMOL et al., 2017; ANANTHAKRISHNAN et al., 2018). A maioria destes fatores estabelece uma relação de risco entre a ocorrência de DII com a cultura da ocidentalização-urbanização (M'KOMA et al., 2019).

A disbiose, que se caracteriza por alterações na microbiota, que ocorrem devido a mudanças no microambiente intestinal, pode aumentar a suscetibilidade à inflamação do intestino (CHOW et al., 2011). Assim, indivíduos com doenças inflamatórias intestinais apresentam um estado disfuncional da sua microbiota, com uma diversidade reduzida de microorganismos e uma quantidade maior de proteobactérias e bacteroidetes patogênicas (FRANK et al., 2007; MARCHUKOV; MISSELWITZ, 2019). No entanto, ainda se busca esclarecer se o microbioma alterado é uma fonte causadora da doença ou um efeito da resposta intestinal local à lesão celular (inflamação) (GOETHEL et al., 2018). O comprometimento da permeabilidade intestinal está associado ao aumento de bactérias patogênicas com capacidade de aderir à mucosa do intestino, além de regular a expressão

de genes inflamatórios, levando, consequentemente, à inflamação intestinal (AHMED et al., 2016).

Tem-se investigado um aumento principalmente da proteobactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) em pacientes com DC. A *E. coli* aderente-invasiva associada à doença, apresenta propriedades pró-inflamatórias (PETERSON et al., 2008). Sua presença aumenta em cerca de 38% nos pacientes com DC ativa, comparado com apenas 6% em indivíduos saudáveis (DARFEUILLE-MICHAUD et al., 2004). Em contrapartida, *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*), *Blautia faecis*, *Roseburia inulinivorans*, *Ruminococcus torques* e *Clostridium lavalense*, apresentam-se reduzidas na DC, comparado à indivíduos sem a doença (FUJIMOTO et al., 2013; TAKAHASHI et al., 2016). Juntamente a isso, bactérias produtoras do ácido graxo de cadeia curta butirato, como *F. prausnitzii* e *Clostridium* dos grupos IV, XIVa e XVIII, estão diminuídas nas doenças inflamatórias intestinais (TAKAHASHI et al., 2016), o que prejudica a diferenciação e expansão de células T reguladoras, o crescimento de células da mucosa (ATARASHI et al., 2013) e a conservação da homeostase intestinal.

3.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DE CROHN

Entre os diferentes fatores etiológicos apontados nas DII, a inflamação crônica e excessiva do trato gastrointestinal, levando ao sangramento retal e perda de peso, tem sido o foco de grande parte das pesquisas sobre a patogênese destas doenças (LEE et al., 2018). A reação imunológica observada no intestino destes pacientes pode ocorrer em três estágios: (1) defeitos na barreira do epitélio intestinal ou processo infeccioso que facilitam a entrada do conteúdo interno do lúmen em tecidos suscetíveis; (2) secreção abundante de citocinas pró-inflamatórias, devido ao processo de remoção de materiais estranhos da parede intestinal e; (3) resposta imunológica compensatória adaptativa que resulta em reação inflamatória crônica (KIM; CHEON, 2017). Assim, a imunidade é uma causa bem aceita da DC, visto que a terapia hormonal pode causar remissão; no entanto, os mecanismos específicos que levam a esse desequilíbrio imunológico, que causam danos persistentes na mucosa intestinal, e a fonte da reação da cascata inflamatória permanecem incertos (LI; SHI et al., 2018).

Lesões no cólon de pacientes com DII provocam infiltração excessiva de células imunes. Por consequência, estas secretam produtos, como as citocinas e quimiocinas, que desencadeiam e prolongam a inflamação, levando à danificação tecidual do intestino (LEE et al., 2018). A secreção de certas citocinas, como o TNF- α , TGF- β e INF- γ

(SANDBORN et al., 2008), bem como a quebra da tolerância de autoantígenos na mucosa intestinal, por lesão ou predisposição genética (FARIA; WEINER, 2005^a; 2006^b), são fatores imunes relacionados à DC. Além disso, no caso do paciente ter fístulas, mediadores inflamatórios, como o TGF- β , IL-13 e TNF- α , são secretados em resposta ao contato com antígenos bacterianos como consequência da impaction fecal no trato da fístula, sugerindo que a microbiota intestinal também pode ter uma contribuição patogênica (WEST et al., 2005; VAN ONKELEN et al., 2013; TOZER et al., 2015). A DC, em específico, está muito relacionada às células Th1, aumento da expressão de interferon- γ (FUSS et al., 1996), IL-12 (MONTELEONE et al., 1997), IL-18 (PIZARRO et al., 1999) e granuloma da mucosa (característica histológica de uma resposta imune Th1) (FUSS et al., 1996). Além disso, reitera-se que este desequilíbrio imunológico da mucosa intestinal é principalmente associado às células do sistema imune adaptativo (DE MATTOS et al., 2015).

Os linfócitos T, principalmente T CD4⁺, são os principais efetores do tecido inflamatório intestinal (LI; SHI, 2018). Entre os subtipos de T CD4⁺, as células Th17 liberam a interleucina-17 (IL-17), que é um forte fator pró-inflamatório nas DII (FUJINO et al., 2003), e aumentam o recrutamento de células T para a lâmina própria durante a resposta inflamatória crônica (STROBER et al., 2010). Além disso, juntamente com a IL-6, estas interleucinas ativam o transdutor de sinal e o ativador de transcrição 3 (STAT3), o qual promove a diferenciação de células T virgens em células Th17 e, por consequência, sua proliferação (YANG et al., 2007), por isso estimula uma forte resposta inflamatória imune crônica (GU et al., 2011; WRUCK et al., 2011).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzido e secretado por macrófagos ativados, monócitos e linfócitos T, é uma das principais citocinas pró-inflamatórias encontrada no organismo de pacientes com DII (REIMUND et al., 1996; HORIUCHI et al., 2010). A produção aumentada e constante dessa citocina, associada à permeabilidade intestinal aumentada devido a uma função reduzida das junções apertadas e apoptose das células epiteliais, leva à destruição da barreira intestinal (ZEISSIG et al., 2007; GARCIA-CARBONELL et al., 2018). Além disso, citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-33, têm sua expressão aumentada pelo TNF- α (MURCH et al., 1993; SANCHEZ-MUNOZ et al., 2008). Em contrapartida, outro subgrupo de células T CD4⁺, os linfócitos T reguladores, têm efeitos imunossupressores e são deficientes na DC, notando-se um desequilíbrio entre estas e as células T efectoras, o que desempenha um papel fundamental na patogênese da doença (SAKAGUCHI, 2005; MAYNE; WILLIAMS, 2013). Eles secretam uma pequena

quantidade de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), o qual melhora a inflamação intestinal, reduzindo a expressão de IL-33 (RANI et al., 2011), e restringem a inflamação intestinal por meio de regulação negativa de IL-1- (MITSUYAMA et al., 2006). No entanto, na presença de IL-6 e IL-23, o TGF- β promove a diferenciação de linfócitos T virgens para células Th17, que secretam grandes quantidades de IL-17 (DEL ZOTTO et al., 2003; LI; FLAVELL, 2008).

Outra classe de células, as células linfoides inatas (ILCs), vêm sendo investigadas por produzirem citocinas relevantes para as DII, desempenhando um papel importante na regulação da homeostase da mucosa intestinal. Entre as subclasses destas células, as ILC3 podem inibir a inflamação intestinal via secreção de IL-17 e IL-22, que levam à produção de peptídeos antimicrobianos, os quais bloqueiam o contato entre bactérias e células epiteliais (SPITS et al., 2012). Além disso, a deficiência de IL-22 está relacionada à ocorrência de DII, pois como esta citocina promove a proliferação de células do epitélio intestinal, preservando a integridade da barreira epitelial e dificultando, assim, a invasão microbiana no intestino (GUO et al., 2014), em baixas concentrações, ocorre crescimento descontrolado de bactérias patogênicas, predispondo à inflamação no cólon (CELLA et al., 2009; GOTO et al., 2014; PHAM et al., 2014). Sonnenberg et al. (2011) verificaram a disseminação de bactérias do gênero *Alcaligenes sp.* após depleção de ILCs, o que resultou em inflamação sistêmica, e esteve associada à ocorrência da DC em pacientes pediátricos.

3.4 COMPLICAÇÕES DA DOENÇA DE CROHN

A DC impacta negativamente na qualidade de vida do paciente, com um comprometimento em domínios que envolvem aspectos físicos, emocionais e sociais, na sua vitalidade, saúde mental, sensação de dor intensificada, bem como a implicação no seu estado geral de saúde (SOUZA et al., 2011). Por conta disso, muitos indivíduos sentem a necessidade de alterar o seu projeto de vida, com mudanças de hábitos, costumes e comportamentos à longo prazo, devido à característica crônica da doença. Estima-se que 50% dos pacientes irá desenvolver uma complicação ao longo do tempo, necessitando de procedimento cirúrgico nos 10 anos seguintes ao diagnóstico (PEYRIN-BIROULET et al., 2010; KRUIS et al., 2013; DANESE et al., 2017). Uma das principais mudanças giram em torno da alimentação, que devido ao medo de provocar mais dores, passam a se alimentar de uma forma mais saudável, praticar esportes e prevenir outras complicações (SARLO et al., 2008). Ademais, a condição debilitante provocada pela doença também

pode aumentar o risco de desenvolvimento de câncer colorretal (OWCZAREK et al., 2016).

Compreende-se que as DII provocam alterações que não se restringem ao trato intestinal, visto que há uma série de manifestações extra intestinais observadas em aproximadamente 6-47% dos pacientes (GREENSTEIN et al., 1976; RANKIN et al., 1979; VELOSO et al., 1996; BERNSTEIN et al., 2001; SU et al., 2002; RICART et al., 2004; DANESE et al., 2005; MENDOZA et al., 2005). Estas manifestações podem resultar do próprio processo inflamatório do intestino, ou como consequência de uma alteração genética que leva a respostas imunes disfuncionais frente à estímulos ambientais (GREUTER; VAVRICKA, 2019). Assim, elas podem acometer os olhos (episclerite, uveíte), sistema músculo-esquelético (artrite, espondiloartropatia), sistema hepatobiliar (colangite esclerosante primária) e pele (eritema nodoso, pioderma gangrenoso, estomatite), podendo-se manifestar após o diagnóstico das DII ou até mesmo antes (VAVRICKA et al., 2015).

Entre os sintomas clínicos mais comuns da DC ativa, pode-se citar dor abdominal, diarreia, fístulas, lesões anais e sintomas sistêmicos de diferentes gravidades no corpo (LI; SHI et al., 2018). A diarreia decorre da diminuição da absorção de água e aumento da secreção de eletrólitos, além da interferência do supercrescimento bacteriano no intestino delgado. Pacientes com ileocolite tendem a apresentar dor abdominal no quadrante inferior direito, febre e diarreia. O processo inflamatório, por si só, pode resultar em febre baixa, enquanto que a febre alta geralmente sugere abscesso intra-abdominal ou processo infeccioso. Além disso, quando a doença se caracteriza por ser extensa, ou seja, quando o envolvimento dos intestinos excede 100 cm, pode-se ter má-absorção de nutrientes e esteatorreia. Como consequência, a perda de peso irá resultar tanto da má-absorção quanto da diminuição da ingestão oral (GAJENDRAN et al., 2018). Já entre as complicações perianais, estima-se que 26% dos pacientes com DC desenvolvam fístulas perianais nas duas décadas após o diagnóstico da doença (SCHWARTZ et al., 2002).

As repercussões sociais, psicológicas e financeiras dos pacientes com doenças inflamatórias intestinais também são significativas, e acabam resultando em uma qualidade de vida prejudicada (PALLIS et al., 2002; GRAFF et al., 2006). Além disso, nota-se um impacto econômico crescente sobre o sistema de saúde e na economia mundial, gerando custos também ao indivíduo e/ou à família relacionada (M'KOMA, 2013; MISHRA et al., 2017). Isto se deve principalmente à natureza crônica da doença,

que exige cuidados contínuos e prolongados dos pacientes (PARK; BASS, 2011; DAMLE et al., 2014) e à necessidade do desenvolvimento de novas propostas terapêuticas, visto que há indivíduos refratários às já existentes (KOPYLOV et al., 2014; BEN-HORIN et al., 2014). Como exemplo, cita-se a necessidade de consultas emergenciais, hospitalizações e intervenções cirúrgicas mais frequentes, comparado àqueles que não têm doenças inflamatórias intestinais (LONGOBARDI et al., 2004). Tem-se também o fato de que os países em desenvolvimento, que vem apresentando número crescente de casos, constituem três quartos de todos os seres humanos da Terra, o que aumenta a necessidade de uma terapia biológica de baixo custo (M'KOMA, 2013).

3.5 ALIMENTAÇÃO NA DOENÇA DE CROHN

A intervenção dietética é uma estratégia utilizada tanto para a prevenção da doença, mas também para a manutenção da remissão, e durante o seu estado agudo (CHAN et al., 2015). Exposição ao tabagismo, ingestão frequente de *fast foods* (NIEWIADOMSKI et al., 2016), uso frequente de antibióticos (BISCHOFF et al., 2020), maior consumo de gordura animal, carnes vermelhas e processadas, baixos níveis de vitamina D (AMRE et al., 2007; ANANTHAKRISHNAN et al., 2014), alimentação rica em ácidos graxos ômega-6 e pobre em ômega-3 (BISCHOFF et al., 2020), baixo consumo de frutas e vegetais (AMRE et al., 2007; BISCHOFF et al., 2020) e fibras (BISCHOFF et al., 2020), são alguns dos fatores de risco reversíveis para o desenvolvimento das DII. Quanto à dieta, está relacionada a um estilo de vida ocidental, que se associa à ocorrência de uma inflamação sistêmica de baixo grau no organismo (MANZEL et al., 2014), além de menor diversidade microbiana no intestino (GUPTA et al., 2017). Ademais, o aumento da adiposidade corporal (KHALILI et al., 2013), e um peso corpóreo extremamente baixo (MENDALL et al., 2011), também estão relacionados ao maior risco de ter DC.

Embora muitas possibilidades vem sendo estudadas para compreender como a alimentação interfere no comportamento da DC ou como pode aumentar o risco de desenvolvê-la, um mecanismo importante diz respeito sobre os efeitos da dieta na integridade do epitélio intestinal e alterações na microbiota do intestino destes pacientes (CHAN et al., 2015). Isto decorre da relação causal que existe entre dieta, microbiota e o desenvolvimento das DII (KELSEN; WU, 2012), bem como da disbiose observada durante o curso da doença e sua implicação na patogênese (HOOPER et al., 2002; KANAUCHI et al., 2003).

Dietas ricas em gorduras apresentam evidências sólidas quanto ao aumento da permeabilidade intestinal, bem como do processo inflamatório (JI et al., 2011; DEVKOTA et al., 2012; SHEN et al., 2014). Aditivos alimentares, presentes em produtos processados e ultraprocessados, também podem agravar o estado da doença, visto que danificam o epitélio intestinal e a sua permeabilidade (PFEFFER-GIK; LEVINE, 2013). Por outro lado, fibras alimentares desempenham um papel protetor para a saúde da mucosa intestinal e para o equilíbrio imunológico, devido à ação importante dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos a partir da fermentação deste nutriente no cólon (SCHEPPACH et al., 1994; SEGAIN et al., 2000). Além destes, ácidos graxos ômega-3, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido decosaheptaenóico (DHA), reduzem a permeabilidade intestinal devido ao aumento da expressão de proteínas que compõem as junções epiteliais, e inibem genes pró-inflamatórios contribuindo para a melhor integridade da barreira do intestino (NOVAK et al., 2003; WILLEMSSEN et al., 2008; CHAN et al., 2014).

Corroborando com os achados da literatura, a diretriz sobre nutrição clínica nas DII, recentemente publicada (BISCHOFF et al., 2020), descreve que as necessidades de nutrientes para os pacientes com DII variam conforme a atividade da doença. Como exemplo, tem-se a necessidade aumentada de proteína, ácido fólico, selênio, zinco, ferro, cálcio e vitamina D durante a fase de inflamação ativa. Além disso, para promover o estado de remissão não há uma dieta específica que possa ser recomendada, devendo-se trabalhar com uma abordagem nutricional individual. Do mesmo modo, ao atingir esta fase de remissão, também não há uma dieta padrão, embora as intolerâncias alimentares individuais precisem ser consideradas. Assim, a eliminação específica de lactose, laticínios em geral, especiarias, ervas, frituras, alimentos flatulentos e ricos em fibras, pode ser considerada, mas apenas quando são mal tolerados pelo indivíduo (JONES et al., 1985; BISCHOFF et al., 2020).

De fato, após o diagnóstico da doença e no decorrer desta, alguns pacientes mudam seus hábitos devido à percepção que estes têm quanto aos sintomas associados à ingestão alimentar, o que provoca a redução da ingestão ou até a exclusão de alguns alimentos que podem agravar a sintomatologia (COHEN et al., 2013). Assim, a atenção à adequação nutricional frente às restrições alimentares é essencial, bem como o aconselhamento dietético fornecido pelo nutricionista. Em condições em que a desnutrição é comum nas DII, manter, primeiro, a ingestão calórica adequada se faz

importante juntamente com o monitoramento regular da deficiência de micronutrientes e oligoelementos (PIGNEUR; RUEMMELE, 2019; BISCHOFF et al., 2020).

3.6 EPIGENÉTICA E DOENÇA DE CROHN

A DC, bem como outras DII, resulta da relação complexa entre a predisposição genética, fatores ambientais e resposta imunes descontroladas (KASER et al., 2010; ZHANG et al., 2018). Entre estes fatores, a interferência de aspectos ambientais vem ganhando bastante atenção devido ao papel da interação genoma-ambiente na ocorrência e desenvolvimento de DII (KAPLAN; NG, 2017), ou seja, devido à descoberta de que mudanças ambientais podem moldar a expressão patológica de genes por meio de mecanismos epigenéticos (ALEKSANDROVA et al., 2017). Estas modificações epigenéticas são alterações que ocorrem na estrutura do gene e no fenótipo hereditário que não podem ser explicadas por sequências alteradas de DNA (VENTHAM et al., 2013; HUANG et al., 2019).

Os dois mecanismos epigenéticos mais estudados em DII são a metilação do DNA e os RNAs não-codificantes. O primeiro se refere à adição de um grupo metil no carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (citosina-fosfato-guanina, CpG), resultando na formação de 5-metilcitosina (JELTSCH et al., 2018; LI et al., 2019). Já o segundo, se refere à um grupo de moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, mas que são responsáveis por outros processos celulares (GUTSCHNER DIEDERICH, 2012). Assim, estudos indicam tanto alterações aberrantes da metilação do DNA (TAHARA et al., 2009a; COOKE et al., 2012; KANG et al., 2016; MCDERMOTT et al., 2016), quanto a ação de microRNAs (miRNAs) regulando a expressão gênica, e modificando mecanismos de diferenciação de células T, vias de sinalização de IL23/Th17 e de autofagia celular (WILUSZ et al., 2009; WINTER et al., 2009; GUTSCHNER; DIEDERICH, 2012; KALLA et al., 2015; DONG et al., 2018), afetando o início e a progressão da doença.

Assim, considerando que a sequência genética explica apenas 20-25%, aproximadamente, do risco de DII, e que está bem claro que a exposição ambiental pode causar alterações epigenéticas no DNA, sugere-se o uso de novos biomarcadores epigenéticos para melhorar o diagnóstico, bem como o diagnóstico diferencial, prognóstico e resposta à medicamentos para DII (MATEOS et al., 2019). Como exemplo, pacientes com DC, quando comparados à controles saudáveis, apresentaram diferentes perfis de metilação de leucócitos circulantes (ADAMS et al., 2014), ou quatro regiões

diferencialmente metiladas (VMP1, ITGB2, WDR8 e CDC42BPB) (VENTHAM et al., 2016), níveis aumentados de um tipo de miRNA (miR-340*) no sangue periférico (WU et al., 2011), indicando que podem apresentar seus próprios locais de suscetibilidade específicos do genoma (VENTHAM et al., 2016).

Entre os fatores ambientais que influenciam as alterações epigenéticas, a alimentação parece exercer papel importante. Como exemplo, dietas pobres em fibras levam a uma supressão na produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microbiota, e alterações em mecanismos epigenéticos (KRAUTKRAMER et al., 2016). Ou ainda, a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados pode estar relacionada com CpGs diferentemente metiladas, as quais estariam associadas à inflamação (ARPÓN et al., 2017). Ademais, o tabagismo é apontado como um possível modulador da expressão e função de RNA mensageiro (RNAm) de *NOD2*, podendo conferir um risco aumentado à DC (HELBIG et al., 2012). Mas, apesar das informações já descritas em estudos, ainda há falta de consistência entre os mesmos, o que dificulta a reprodutibilidade. Nota-se heterogeneidade da população analisada, no tipo de tecido (células mononucleares do sangue periférico, células epiteliais, biópsias da mucosa colônica) e na população de referência de controle (controles saudáveis, tecido não afetado do mesmo paciente) (MATEOS et al., 2019), embora não se possa negar que a epigenética desempenha um papel crítico na patogênese das DII, sendo importante para o diagnóstico, vigilância da doença, previsão de riscos e inovação terapêutica (ZENG et al., 2019).

3.7 DOENÇA DE CROHN FISTULIZANTE

A DC envolve principalmente a última porção do intestino delgado, cólon e região perianal (SEIFARTH et al., 2015). Cerca de 25% dos pacientes tem apenas colite, 25% apenas ileíte e 50% ileocolite. O envolvimento da região perianal acomete um terço dos pacientes e, 5-15% têm o comprometimento gastroduodenal (GAJENDRAN et al., 2018). Assim, a doença perianal, incluindo fístulas, abscessos, fissuras e estenoses, é uma das manifestações mais comuns da DC (DAILEY et al., 2018). As fístulas podem ser compreendidas como um trajeto anormal entre duas superfícies epiteliais (MORRIS et al., 2000; HALLIGAN; STOKER, 2006), sendo os trajetos fistulosos semelhantes a estruturas tubuliformes com características parecidas à de um abscesso (LIMA et al., 2010). Apresentam aumento gradativo da sua incidência (ARDIZZONE; PORRO, 2007), acarretando em outros problemas que impactam na qualidade de vida, como a presença

de dor, secreção inflamatória, formação de abscesso e incontinência anal (MARZO et al., 2015).

A maioria das fístulas iniciam como um trajeto primário simples, porém se o processo infeccioso não for tratado pode resultar em trajetos secundários (ramificações das fístulas), que normalmente se localizam na fossa isquioanal. Além disso, se houver extensão destas ramificações para o espaço interesfincteriano da região anal, passam a ser descritas como “em ferradura” (HALLIGAN; STOKER, 2006). No entanto, existem diferentes sistemas de classificação das fístulas, podendo-se citar como exemplo: classificação baseada na anatomia das fístulas (PARKS et al., 1976), baseada em planos axiais e coronais (MORRIS et al., 2000) e a classificação das fístulas em baixas ou altas e simples ou complexas (AGA, 2003; SCHWARTZ; HERDMAN, 2004).

As fístulas perianais são as de maior prevalência entre os pacientes (50-87% de todas as lesões perianais) (GRAY et al., 1965; EGLINTON et al., 2012), sendo em grande parte fístulas perianais complexas (70 a 80% dos casos) (PANES et al., 2016). Estas podem ser definidas como aquelas que envolvem a parte superior do complexo esfinteriano (exemplo, fístula interesfinteriana alta, transesfinteriana alta, supraesfinteriana, ou extraesfinteriana com origem no trato da fístula), apresentam vários tratos, estão associadas com dor ou flutuações sugerindo abscesso perianal, e/ou estão associadas com fístula retovaginal ou estenose anorretal (AGA, 2003).

O processo de avaliação das fístulas requer um método de imagem eficaz, sendo a ressonância magnética (RM) o mais indicado para diagnóstico e classificação destas lesões, devido a sua capacidade de aquisição de imagens multiplanares (LIMA et al., 2010). Este exame permite a avaliação de toda a região pélvica (WEDEMEYER et al., 2004), sendo capaz de identificar ainda sepse (BELL et al., 2003), abscessos, tratos secundários e lesões esfinterianas (DWARDKASING et al., 2004). Desta forma, foi criado um sistema de pontuação baseado no exame de RM, que avalia a gravidade da DC perianal, o escore de Van Assche (VAN ASSCHE et al., 2003). Este sistema avalia tanto parâmetros anatômicos (número de tratos fistulosos, localização anatômica e extensão das fístulas), quanto de inflamação ativa (imagem ponderada em T2, presença de cavidades/abscessos e envolvimento da parede retal), sendo aplicado em estudos de avaliação clínica da DC perianal (LA PORTILLA et al., 2013; PANÉS et al., 2016; PANÉS et al., 2018; DIETZ et al., 2017; DOZOIS et al., 2019; ZHOU et al., 2020).

3.8 DOENÇA DE CROHN: TERAPIAS EXISTENTES

Considerando que a DC está relacionada a efeitos sistêmicos e causas ainda não muito bem definidas, o seu tratamento torna-se dificultado (MISHRA et al., 2017) e uma terapia curativa ainda não está disponível (GOMOLLÓN et al., 2017). O seu controle ocorre pela combinação de medicamentos imunossupressores, procedimentos cirúrgicos e mudanças na alimentação (LIU et al., 2014). Desta forma, Sohrabpour et al. (2010) ressaltam que os principais objetivos da terapêutica são: (1) induzir e manter a remissão da doença, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e tratando as crises e sintomas; (2) prever e prevenir as complicações da doença; (3) prevenir e tratar deficiências nutricionais, bem como manter a nutrição ideal; (4) fornecer apoio psicossocial adequado e; (5) modificar o curso da doença, naqueles com patologia mais agressiva, a fim de aumentar a qualidade de vida dos pacientes (SEIFARTH et al., 2015) e evitar efeitos colaterais relacionados à terapia, como o câncer e infecções (MAASER et al., 2019).

As terapias medicamentosas buscam inibir o processo inflamatório por meio da atenuação da via inflamatória, por exemplo. Esta ação ocorre pela neutralização de uma ou outra molécula envolvida na cascata inflamatória ou pela redução da resposta imunológica através da imunossupressão. Para esta abordagem, o ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment (2020) recomenda o uso de budesonida para induzir remissão clínica em pacientes com DC ativa leve à moderada, mas limitada ao íleo e/ou cólon ascendente; e para aqueles com a doença ativa moderada à grave, sugere-se o uso de corticosteroides sistêmicos. No mesmo documento, considera-se os indivíduos com DC moderada à grave que não respondem à terapia convencional, sendo recomendado nestes casos o uso de inibidores do fator de necrose tumoral (TNF) (infliximabe, adalimumabe e certolizumabe pegol), ou a combinação com tiopurina, ao iniciar o infliximabe, para induzir estado de remissão clínica. Para os pacientes, nesta categoria de gravidade da doença, que também apresentam uma resposta inadequada à terapia anti-TNF, são recomendados o ustequinumabe e vedolizumabe (TORRES et al., 2020). No entanto, deve-se considerar que o tratamento médico ideal das DII é multifacetado e individualizado, ou seja, nem sempre se estabelecem regras para iniciar com um medicamento ou outro (SOHRABPOUR et al., 2010).

Se o tratamento médico falhar, a cirurgia é necessária (SEIFARTH et al., 2015). A ressecção cirúrgica da parte afetada do intestino, tem como objetivos remover o bloqueio parcial ou a perfuração intestinal, sendo indicada para pacientes que apresentam diversas recorrências da doença (FAZIO et al., 1993). Além da intratabilidade clínica, a

indicação contempla outros casos específicos, como manifestações extraintestinais, displasia de alto grau, presença de adenocarcinoma, obstrução intestinal, suboclusão intestinal refratária, fístulas internas e externas, massa abdominal palpável e doença perianal (BRAZILIAN STUDY GROUP OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES, 2010). Assim, este procedimento nem sempre é sugerido, visto que é mais custoso, pode levar à obstrução intestinal e estenose, além de ser capaz de aliviar os sintomas temporariamente (FAZIO et al., 1993), pois muitos pacientes podem necessitar de novo procedimento cirúrgico após cinco anos da primeira cirurgia (SEIFARTH et al., 2015), já que o processo inflamatório pode reaparecer no local da ressecção ou em outros sítios (FAZIO et al., 1993). Também se considera que os pacientes muitas vezes não gostam do pensamento de uma operação, o que pode resultar em uma cirurgia tardia, e piora da condição do mesmo (BEMELMAN; ALLEZ, 2014).

A intervenção dietética é indicada tanto nos casos da DC na fase ativa, quanto para manutenção da remissão da doença (CHAN et al., 2015). Assim, as recomendações precisam ser prescritas de forma individual, dependendo de alguns fatores, como a fase em que o distúrbio se encontra, realização de procedimentos cirúrgicos anteriores e tipo de farmacologia adotada (OWCZAREK et al., 2016). Com a doença instalada, os indivíduos podem reagir de formas diferentes à exposição ou exclusão de vários alimentos, sendo que as sensibilidades alimentares comumente identificadas são em relação aos cereais, leite, ovos, vegetais e frutas cítricas (RAJENDRAN; KUMAR, 2010). De forma geral, tanto no período de exacerbação como de remissão das DII, deve-se ter cuidado com os seguintes alimentos: alimentos à base de trigo, leite e derivados, carnes vermelhas, alimentos ricos em fibras insolúveis e gorduras, alimentos processados, açúcar, bebidas alcoólicas, cafeína, e produtos que contenham sorbitol, xilitol e manitol (FLORES et al., 2016).

Compostos com efeitos nutricionais que auxiliam no controle da inflamação intestinal, bem como na disbiose intestinal observada na doença, vem sendo estudados como terapias adjuvantes. A curcumina, um polifenol derivado da planta da cúrcuma (*Curcuma longa*) (GUPTA et al., 2013), tem seus mecanismos antiinflamatórios investigados visto que atua na inibição da via inflamatória NF- κ B, bloqueando a quinase I κ B e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, e TNF- α) (SREEDHAR et al., 2016). Entretanto, embora seu estudo seja promissor para a doença de Crohn (YANG et al., 2020), merece maiores investigações, pois nem sempre seu efeito pode ser eficaz na prevenção da recorrência após estes pacientes serem submetidos à cirurgia, mesmo

fazendo uso de medicação (BOMMELAER et al., 2020). Do mesmo modo a pesquisa com probióticos sobre a melhora na DC ainda parece um pouco controversa. Estudos indicam que eles podem conferir poucos benefícios aos pacientes, não sendo estes significativos (LICHTENSTEIN et al., 2016; GANJI-ARJENAKI et al., 2018; COQUEIRO et al., 2019), embora combinações de cepas específicas, como *Saccharomyces boulardii*, *Lactobacillus* e os probióticos VSL#3 (nome comercial Visbiome®), apresentam tendência de eficiência (GANJI-ARJENAKI et al., 2018). Já a vitamina D, a qual normalmente se mostra deficiente ou insuficiente nestes pacientes, deve ter seus níveis corrigidos, visto que tanto a atividade da doença quanto a qualidade de vida do indivíduo se correlacionam inversamente com os níveis deste hormônio no organismo (HAM et al., 2014; DE CASTRO et al., 2015).

3.9 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco consistem em um grupo de células que têm a capacidade de auto-renovação, e que sob certas condições fisiológicas ou experimentais podem se tornar células maduras específicas de órgãos ou tecidos com função diferenciada (WEISSMAN, 2000; MULLER et al., 2008). Os estudos com células-tronco iniciaram com Friedenstein e colaboradores entre as décadas de 1960 e 1970. Os pesquisadores observaram que o transplante de medula óssea resultava na geração de novo tecido ósseo em animais devido à existência de um grupo menor de células de origem estromal da medula que apresentavam características específicas em cultura, como a aparência semelhante à fibroblastos, rápida aderência aos tecidos dos vasos em cultivo e capacidade de formar colônias a partir de uma única célula (unidades formadoras de colônias fibroblásticas, do inglês forming unit fibroblastic, CFU-Fs) (FRIEDENSTEIN et al., 1970). Com a continuidade das investigações, estas células passaram a ser chamadas de células-tronco osteogênicas (FRIEDENSTEIN et al., 1987) ou de células-tronco estromais da medula óssea (OWEN; FRIEDENSTEIN, 1988).

No início dos anos 90, uma subpopulação de células-tronco não-hematopoiéticas da medula óssea humana adulta, as células-tronco mesenquimais (CTM), foram propostas, sendo que inicialmente eram referidas como uma alternativa para as células-tronco “estromais” ou “osteogênicas”, ganhando bastante popularidade a partir deste momento (CAPLAN, 1991). Ademais, em 1995, Hillard Lazarus testou pela primeira vez as CTM como um medicamento celular em seres humanos (LAZARUS et al., 1995) e, em março de 2018, foi aprovado o Alofisel® pela Comissão Europeia, sendo este o

primeiro medicamento feito a partir de CTM para tratar fístulas na DC (GALIPEAU; SENSÉBÉ, 2018).

As células-tronco podem ser subdivididas em células-tronco embrionárias e adultas ou somáticas. As primeiras são células primitivas, pois resultam do isolamento e cultivo das células da fase de blastocisto do embrião (EDWARDS, 2001), além de serem pluripotentes, pois apresentam capacidade de se dividir e de se desenvolver em células e tecidos das três camadas germinativas primárias que levam à formação de um organismo, ou seja, podem produzir todos os tipos de células do organismo adulto (KORBLING; ESTROV, 2003; CHAGASTELLES; NARDI, 2011). Durante seu desenvolvimento, diferenciam-se em algum tecido especializado e desaparecem; no entanto, um pequeno número de células-tronco adultas permanecem retidas nestes tecidos (KORBLING; ESTROV, 2003). As células-tronco adultas, diferente das primeiras, apresentam capacidade limitada de auto-renovação e diferenciação, processo que geralmente se limita ao órgão de origem destas células (DAVE et al., 2015). Em um organismo adulto, os tecidos têm seu próprio nicho de células-tronco somáticas, as quais terão a função de reabastecer as células que morrem dentro do próprio órgão (CHAGASTELLES; NARDI, 2011). Entre as células-tronco adultas, tem-se as células-tronco hematopoiéticas, células-tronco intestinais e CTM (DAVE et al., 2015).

4.0 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As CTM são células multipotentes, não-hematopoiéticas, que têm a capacidade de se diferenciar em outros tipos de células da linhagem mesodérmica, sob determinadas condições micro ambientais, meios de cultura e suplementos para o seu crescimento (CAPLAN, 2007). Em cultura, elas apresentam morfologia semelhante a fibroblastos e formam colônias (PITTENGER et al., 1999; DOMINICI et al., 2006; GONZALEZ-REY et al., 2009). No entanto, já foi documentado que elas têm a capacidade de se diferenciar *in vitro* também em células não mesodérmicas, como células semelhantes à neurônios (CHEN et al., 2008; BROWN et al., 2019), hepatócitos (CHEN et al., 2008), células semelhantes a ilhotas pancreáticas (BAI et al., 2015), mioblastos e células epiteliais (CHEN et al., 2008; BROWN et al., 2019). Além disso, buscando padronizar as diferentes fontes de CTM, bem como possíveis divergências em seu real conceito, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e de Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) definiu critérios mínimos para caracterizar células-tronco mesenquimais: (1) aderir ao plástico sob condições padrão de

cultura, (2) expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90, mas não expressar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 ou moléculas HLA-classe II na sua superfície e, (3) ter potencial de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006; ROBEY et al., 2017).

As CTM podem ser isoladas de diferentes tecidos, como a medula óssea, que foi a primeira fonte descoberta (AYALA-CUELLAR et al., 2019) e é a fonte mais prevalente de CTM em ensaios clínicos (GALIPEAU; SENSÉBÉ, 2018), seguido de outros, como o tecido adiposo adulto (BOQUEST et al., 2006; BIANCO et al., 2008; ZHU et al., 2013; GALIPEAU; SENSÉBÉ, 2018), cordão umbilical humano e placenta (ARUTYUNYAN et al., 2016; BEERAVOLU et al., 2017), sangue do cordão umbilical (SCHUH et al., 2009), tecido hepático e muscular, pulmões, tecido sinovial (DE et al., 2001), sangue periférico (ZVAIFLER et al., 2000), etc. No entanto, o tecido adiposo tem recebido destaque, sendo a fonte preferida de CTM adultas para aplicações clínicas, por ser dispensável, isolado de forma relativamente fácil, fornecer quantidades de CTM suficientes para aplicações e sua fácil acessibilidade em comparação com a medula óssea (STRIOGA et al., 2012). Aproximadamente $3-15 \times 10^6$ CTM podem ser isoladas em 100 ml de tecido lipoaspirado (JAMES et al., 2012^a; 2012^b), embora a quantidade obtida sofra influência da região do corpo na qual estas células foram obtidas, como por exemplo, nota-se maior proliferação quando derivadas da região da gordura subcutânea do que da região da gordura visceral (VAN HARMELEN et al., 2004). Assim, obtêm-se estas células em quantidades suficientes a partir de procedimentos que acarretam em morbidade e desconforto reduzidos ao paciente (MISHRA et al., 2017).

Após serem isoladas de um tecido e cultivadas em laboratório, as células-tronco podem ser enxertadas no mesmo indivíduo doador, caracterizando um procedimento autólogo, ou podem ser enxertadas em outros indivíduos, caracterizando um procedimento alogênico. A partir disto, a primeira opção ainda deve ser prioridade, visto que as chances de incitar uma resposta imunológica no organismo do receptor são eliminadas (MISHRA et al., 2017). No entanto, as CTM são reconhecidas por apresentarem baixa propriedade imunogênica, visto que expressam baixos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I) e classe II (MHC-II), e nenhuma molécula co-estimuladora de linfócitos T (ANKRUM et al., 2014), propriedades que estimulam também o enxerto alogênico em indivíduos que, embora tenham células-tronco, apresentam sua saúde muito debilitada (MISHRA et al., 2017).

O interesse pela aplicação clínica das células-tronco se dá por alguns fatores, como: capacidade de auto-renovação, proliferação e de diferenciação em outros tipos de células (SRIVASTAVA et al., 2006; HOSSEINI et al., 2018), inclusive em células que se localizam ao entorno de áreas de tecidos danificados (SRIVASTAVA et al., 2006), visto que são capazes de migrar até estes tecidos e permanecer no local (MISHRA et al., 2017). Além disso, são notáveis suas propriedades imunomoduladoras, tanto sobre o sistema imunológico inato quanto sobre o adaptativo (ASMA et al., 2014; SILVA-CARVALHO et al., 2019). Sabe-se que as CTM secretam moléculas que são capazes de suprimir a função de células imunes, como os neutrófilos, células dendríticas, células *natural killers* e os linfócitos T e B (WILLIAMS; HARE, 2011; SILVA-CARVALHO et al., 2019). Estas moléculas incluem vesículas extracelulares, como os exossomas, citocinas e fatores de crescimento que suprimem as respostas imunitárias, inibindo a proliferação dos linfócitos T e B, a maturação de monócitos imaturos em células dendríticas, além de promover o recrutamento e a geração de células T reguladoras e macrófagos M2 (JIANG et al., 2005; BERNARDO; FIBBE, 2013; FRANÇOIS et al., 2012; PROCKOP, 2013). Além disso, as CTM reduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (AGGARWAL; PITTENGER, 2005) e IFN- γ (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; SPAGGIARI et al., 2008), aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-6 (RAFFAGHELLO et al., 2008) e IL-4 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005), e são imunoprivilegiadas por não expressarem em sua superfície as moléculas de MHC-I e II, CD80 e CD86, as quais são detectadas por linfócitos T como antígenos, levando à uma reação inflamatória (AYALA-CUELLAR et al., 2019).

O destaque que as CTM recebem no campo da medicina regenerativa também deve ser evidenciado. Devido às suas características imunológicas, facilidade de expansão em cultura e de diferenciação multilinhagem *in vitro*, tornam-se fonte promissora para o reparo tecidual (LAW; CHAUDHURI, 2013). No entanto, ainda se procura elucidar o comportamento *in vivo* das CTM transplantadas. Sabe-se que elas ativam processos de regeneração tecidual ou de redução de danos no tecido de maneira parácrina, via secreção de citocinas e quimiocinas (ex. TGF- β , HGF, PGE2, IL-6, 7, 8, 11, VEGF, HGF, IGF-1, TNF- α) (SALGADO et al., 2010; KIM et al., 2013), as quais exercerão seus efeitos sob as células residentes (BROWN et al., 2019). Assim, há moléculas que desempenham funções imunomoduladoras, de hematopoiese, regeneração, vascularização, neuroproteção (SALGADO et al., 2010) e de angiogênese (STERODIMAS et al., 2010;

GIR et al., 2012), podendo aumentar a formação de granulomação em feridas, além de proliferarem nestas ao serem enxertadas topicamente (HONG et al., 2015). Além disso, também desempenham funções antiapoptóticas, antimicrobianas (SILVA-CARVALHO et al., 2019), e podem recrutar células estaminais progenitoras para o tecido lesionado, estimulando-as a se diferenciar nos tipos de células requeridas (HONG et al., 2015). Diante de todas estas funções, há interesse em aumentar o potencial terapêutico das CTM; no entanto, as condições para isso variam de uma doença para outra (SILVA-CARVALHO et al., 2019), visto que conforme os estímulos que elas recebem do microambiente que se localizam, podem secretar uma quantidade maior ou menor destas proteínas (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006; MURPHY et al., 2013).

4.1 INTEGRIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A terapia com CTM derivadas do tecido adiposo é considerada uma opção promissora para tratamento de várias condições regenerativas e inflamatórias (SENSEBÉ et al., 2013). Porém, o seu uso *in vivo* depende do período de expansão em cultura a longo prazo, pois somente o processo de isolamento proporciona um rendimento celular baixo (ALVES et al., 2010) e aplicações terapêuticas exigem um grande número de células (TURINETTO et al., 2016). A relação entre a senescência, que ocorre devido o cultivo de CTM por um longo período, e a instabilidade genética (SENSEBÉ et al., 2013), ainda é discutida na literatura. Alguns trabalhos comprovam que a senescência celular está associada a alterações, como exacerbação da resposta inflamatória sistêmica corporal por estas células, diminuição da capacidade de diferenciação celular (TURINETTO et al., 2016), migração celular (GEIßLER et al., 2012) e a diminuição do potencial de proliferação e encurtamento dos seus telômeros (FUCHS et al., 2011). Por outro lado, há relatos de que as CTM senescentes podem estimular o crescimento de células de câncer de cólon (LI et al., 2015) e desempenhar mecanismos autócrinos ou parácrinos que podem afetar o comportamento de células vizinhas (CAMPISI et al., 2019). Assim, considera-se importante investigar a presença de danos no DNA em células, uma vez que estes são considerados evento primário para posterior transformação neoplásica (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2012).

Para evitar riscos durante o uso de CTM em terapias clínicas, danos no DNA podem ser detectados previamente por diferentes ensaios. Um exemplo é o ensaio do cometa (eletroforese em gel de célula única), considerado ótima ferramenta de triagem para detectar estes danos (quebras de fita dupla, quebras de fita simples, sítios alcalinos

lábeis, o reparo incompleto de sítios básicos e ligações cruzadas), como um parâmetro de senescência em CTM humanas cultivadas *in vitro* (FUCHS et al., 2012; MOLLER et al., 2020). Collins (2014) descreve o ensaio do cometa como um teste no qual as células são embebidas em agarose, lisadas e submetidas à eletroforese a um pH elevado, sendo que o DNA contendo quebras é atraído em direção ao ânodo da cuba de eletroforese, formando a cauda do cometa que pode ser vista por microscopia de fluorescência. O tamanho da cauda, conseqüentemente, reflete a frequência de quebras do material genético (COLLINS et al., 2014) e, os cometas que apresentam uma pequena cabeça de nucleóide e uma cauda larga e grande, muitas vezes referidos como cometas “ouriço”, representam células em apoptose (LORENZO et al., 2013).

De fato, muitos estudos fazem uso do ensaio do cometa para detectar danos no DNA de células-tronco mesenquimais (OMIDKHODA et al., 2007; FUCHS et al., 2012; BELLAGAMBA et al., 2016), mas ainda seu protocolo de aplicação varia entre laboratórios, e estas diferenças nem sempre são possíveis de serem identificadas porque os procedimentos deste ensaio, em alguns estudos, são publicados de forma não detalhada ou clara (MOLLER et al., 2020a). Além disso, esta variação interlaboratorial pode acarretar em variações nos níveis de danos observados no material genético (AZQUETA et al., 2019) e a falta de dados sobre controles positivos também indica uma falha, visto que são necessários para avaliar o desempenho do ensaio (MOLLER et al., 2018; 2020b).

Recentemente, Moller et al. (2020a) apresentaram uma declaração de consenso para as informações mínimas necessárias para descrição do ensaio do cometa (MIRCA - Consensus Statement for the Minimum Information for Reporting Comet Assay), principalmente das etapas que podem afetar o nível de migração do DNA ou detectar danos induzidos ao DNA. Destacando algumas, como a duração da lise (etapa 3 do ensaio do cometa), esta pode variar dependendo do tipo de célula, mas as recomendações são: (i) usar a mesma duração da lise em todos os experimentos; (ii) não pode ser muito longa, pois pode afetar certos tipos de lesões no DNA, e nem muito curta, pois a lise pode ser incompleta e; (iii) deve ser informada a composição da solução de lise, seu tempo de duração e temperatura. Já em relação à eletroforese (etapa 6 do ensaio do cometa), as recomendações são que deve ser informado: (i) composição do buffer de eletroforese; (ii) intensidade da eletroforese (gradiente de voltagem); (iii) duração; (iv) temperatura e; (v) pH da solução de eletroforese.

A solução de eletroforese do ensaio do cometa corresponde à uma solução de pH alcalino. Na literatura, encontram-se valores de pH diferentes sendo testados, como

soluções com pH igual a 12 e com $\text{pH} \geq 13$. Enquanto a primeira detecta quebras de fitas duplas (DSB) e simples (SSB) do DNA, sítios incompletos de reparo e ligações cruzadas, a segunda é sensível também a lesões de sítios alcalinos lábeis e sítios abásicos (SINGH et al., 1989; FAIRBAIRN et al., 1995; KLAUDE et al., 1996; MIYAMAE et al., 1997; TICE et al., 2000). Ressalva-se que as SSB podem se transformar em DSB, consideradas mutagênicas e/ou letais, se não forem reparadas (CALDECOTT, 2007). Assim, enquanto SSB são rapidamente reparadas, sendo, portanto, consideradas de menor relevância (NIKOLOVA et al., 2013), as DSB acarretam em danos críticos no material genético, por estarem relacionadas a danos cromossômicos, instabilidade do genoma, apoptose, entre outros (MCMILLAN et al., 2001).

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O interesse pelo uso das CTM do tecido adiposo em terapia celular para tratamento de diversas condições clinicopatológicas tem aumentado devido às suas inúmeras funções, como capacidade de renovação celular, reparo de lesões teciduais (QIU et al. 2020), secreção de fatores de crescimento (MARQUEZ-CURTIS et al. 2015), proliferação e diferenciação celular e efeitos imunossupressores (Al-Ghadban; Bunnell, 2020; Zou et al., 2020). Assim, o interesse pela criação de um banco de células-tronco, no qual estas células permaneçam criopreservadas para que possam ser utilizadas em pesquisas e tratamentos futuros, ganha atenção especial de pesquisadores (IRDANI et al. 2019) evitando a necessidade constante de tecidos frescos, e permite o controle de qualidade e a padronização da mesma preparação de células em momentos diferentes quando o produto celular for necessário (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015).

Quanto ao método convencional de criopreservação de CTM, a recomendação é que a taxa de congelamento seja de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até aproximadamente -100°C , ponto em que as células são colocadas em nitrogênio líquido (-196°C) (HAACK-SORENSEN; KASTRUP, 2011). Nesta temperatura, as células passam a diminuir muito suas demandas metabólicas, evitando sua variação biológica enquanto são armazenadas por longos períodos, são mantidas protegidas de contaminações (ROWLEY, 1992) e as funções e características genéticas da passagem celular que fora congelada podem ser preservadas (STUBBAN et al., 2007). Assim, para garantir a manutenção da sua condição e funções, alguns parâmetros podem ser avaliados após as CTM terem sido criopreservadas, como a capacidade imunomodulatória e de diferenciação, viabilidade celular, estabilidade genética e potencial tumorigênico (YONG et al., 2015).

As células são congeladas com agentes crioprotetores, podendo ser o dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, trealose, polietilenoglicol, polivinilpirrolidona ou a sacarose, por exemplo, juntamente com uma proteína, como soro bovino fetal (SBF), para manter a viabilidade celular (THIRUMALA et al., 2010; LIU et al., 2010; ANTEBI et al., 2019). O ensaio de viabilidade celular, que avalia a taxa de sobrevivência das células ao longo do processo de congelamento e descongelamento, pode sofrer influência do tempo despendido entre um processo e outro, duração do armazenamento refrigerado e dos reagentes utilizados (ANTEBI et al., 2019). Por isso, alguns estudos realizam comparações de eficácia entre agentes crioprotetores, indicando que o DMSO garante um crescimento mais rápido em cultura de CTM do que a trealose (ROATO et al., 2016), e que a viabilidade celular que ele proporciona é superior (> 80%) comparado ao glicerol (70-80%), trealose (30-40%) e sacarose (20-30%) (JANZ FDE et al., 2012). Além disso, em estudo de Antebi et al. (2019) as CTM de humanos foram congeladas por 7 semanas e as células que eram descongeladas e usadas imediatamente apresentaram viabilidade significativa menor (69%), em comparação com as CTM que eram descongeladas mas que permaneciam 24 horas em período de aclimação após o descongelamento antes de serem usadas (82%), e com CTM frescas (não congeladas) (77%), indicando que um curto período de recuperação após o descongelamento em cultura pode facilitar a recuperação da função celular.

A avaliação de alterações genéticas nas células também é importante para determinar se elas são seguras para serem usadas em aplicações clínicas, isso porque estas alterações podem resultar na formação de um tumor ou na rejeição do enxerto. Assim, ensaios como o do cometa é considerado um dos mais sensíveis para a detecção de instabilidade genômica, já que ele é capaz detectar baixos níveis de danos no DNA (TICE et al., 2000; DEL BO' et al., 2014). Alguns estudos já revelaram aumento nos danos ao DNA de diferentes tipos de células após o período de armazenamento comparado com células frescas (PU et al., 2016; MARINO et al., 2021), enquanto outros não encontraram esta diferença (DUTHIE et al., 2002; HO et al., 2011). Com base nisso, a literatura levanta a hipótese da interferência tanto do protocolo usado do ensaio cometa sobre os resultados (FORCHHAMMER et al., 2010; ERSSON et al., 2013), mas também de fatores relacionados à criopreservação celular sobre danos ao DNA, como o tempo de armazenamento e o tipo de crioprotetor (AZQUETA et al., 2020).

Em virtude da necessidade de criação de um banco de células-tronco, outro ponto a ser observado é a capacidade das CTM criopreservadas em formar esferoides após seu

período de armazenamento. Os esferoides são agregados multicelulares e representam uma cultura tridimensional (3D) de células. Comparado ao método tradicional de cultura celular (cultura de células 2D), os esferoides exibem características histológicas e fisiológicas mais semelhantes ao ambiente *in vivo*. Ou seja, eles preservam mais estas características sendo, portanto, considerado um ambiente menos artificial (MUELLER-KLIESER, 1997). Em estudo de revisão (CESARZ; TAMAMA, 2016) os autores esclarecem que uma forma de melhorar ou otimizar a eficácia terapêutica com CTM é prepará-las como esferoides, isso porque os benefícios clínicos por meio destes se baseiam em aumento dos efeitos anti-inflamatórios, regenerativos e reparadores do tecido, devido à angiogênese aprimorada. Além disso, esferoides de CTM facilitam os potenciais de diferenciação, aumentam a sobrevivência pós-transplante destas células, atrasam os processos senescentes replicativos *in vitro* e melhoram sua capacidade de autorrenovação. Mas, apesar do potencial promissor que os esferoides de CTM tem na medicina regenerativa, ainda são limitadas as pesquisas que buscam compreender os seus mecanismos moleculares quando implantados em organismos vivos (pesquisas *in vivo* e ensaios clínicos), além de ainda não terem sido desenvolvidos estudos com transplante deste agrupamento de células em humanos.

4.3 DOENÇA DE CROHN FISTULIZANTE: EFICÁCIA E SEGURANÇA DA TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O tratamento das fístulas representa um desafio, visto que a maioria dos pacientes passam por terapias cirúrgicas e médicas que muitas vezes são falhas (DAILEY et al., 2018; BISLENGHI et al., 2019). Não é incomum que o processo de cicatrização das fístulas demore meses ou anos para ocorrer (GELTZEILER et al., 2014), e que as recorrências sejam frequentes, com altas proporções de pacientes que experimentam falta ou resposta inadequada aos tratamentos, mesmo com a prática da terapia medicamentosa e cirúrgica (PANES et al., 2018). Assim, há necessidade de desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da DC fistulizante, visto que as altas necessidades da população refratária aos tratamentos ainda são pouco atendidas (PANES et al., 2018), e por existir poucos medicamentos direcionados ao tratamento de fístulas perianais complexas na DC, com os antagonistas do TNF- α sendo a única classe de drogas comprovada para induzir e manter a resposta e a remissão das fístulas (LEE et al., 2018), como o infliximabe (KORNBLUTH et al., 1998) e o adalimumabe (PANES et al., 2007; COLOMBEL et al., 2009).

O número de ensaios clínicos com CTM em distúrbios inflamatórios e imunológicos tem aumentado. No entanto, a resposta individual ao tratamento com estas células ainda é muito heterogênea, além de ser necessário um grande número de CTM para tornar a terapia efetiva (SILVA-CARVALHO et al., 2019). Assim, os estudos avaliam a eficácia e segurança do transplante de CTM em pacientes com fístulas perianais refratárias associadas à DC. O primeiro relato descrevendo injeções de CTM derivadas do tecido adiposo no trato de uma fístula retovaginal produziu resultados promissores, alcançando a cicatrização sete dias após (GARCIA-OLMO et al., 2003). Garcia-Olmo et al. (2005; 2009) desenvolveram mais dois estudos obtendo boa eficácia a partir da terapia com células-tronco. No primeiro, o reparo tecidual foi relatado em três de quatro pacientes com fístulas após oito semanas; e no segundo, a cicatrização ocorreu aos 12 meses em cinco dos sete pacientes que receberam CTM mais cola de fibrina. Estes resultados iniciais estabeleceram bases para trabalhos futuros.

Em estudo multicêntrico (HERREROS et al., 2012), a cura das fístulas após 26 semanas, ocorreu em 57,1% dos pacientes tratados só com CTM (n total = 64), e em 52,4% tratados com CTM mais cola de fibrina (n total = 60). Cho et al. (2013; 2015), durante o primeiro estudo (Fase I), observaram cicatrização parcial em um paciente e cura completa em três pacientes (n total = 10) após 8 semanas da injeção, os quais mantiveram esse efeito por até 8 meses. Já no segundo estudo (Fase II), os participantes foram acompanhados por um tempo maior, sendo que vinte e sete mantiveram o fechamento completo das fístulas até 8 semanas após a injeção. Destes, vinte mantiveram o fechamento completo por 2 anos.

Em trabalhos recentes a eficácia continua a ser garantida a longo prazo. Em estudo de Panés et al. (2018), 59,2% dos pacientes tratados com CTM (n total = 103) tiveram remissão clínica comparado com 41,6% que receberam placebo (n total = 105) durante 52 semanas de acompanhamento. Dozois et al. (2019) avaliaram 15 pacientes, 3 tiveram cura clínica completa, 8 tiveram cicatrização parcial e apenas 4 não apresentaram melhora clínica aos 6 meses de acompanhamento. Além disso, a melhora radiográfica foi comprovada em 11 dos 15 pacientes. Já Zhou et al. (2020) acompanharam 22 pacientes com fístula anal durante 12 meses. Do total de pacientes que receberam infusões com CTM autólogas do tecido adiposo (n = 11), a taxa de cura foi observada em 7 dos mesmos ao final do estudo.

A partir de estudos de revisão sistemática com metanálise (DAVE et al., 2015; CICCOCIOPPO et al., 2018), verificou-se que a injeção local de CTM também é segura,

pois a ocorrência nos pacientes de eventos adversos (EA) relacionados ao tratamento celular é baixa. No entanto, alguns EA já observados e que apresentam relação com este tratamento podem ser citados, como: infecção e abscesso perianal, proctalgia, febre, diarreia, ansiedade e leiomioma de útero, por exemplo. No geral, os estudos demonstram que a administração de CTM pode levar a reações adversas menores, como a sepse perianal; mas as reações adversas graves que levam à hospitalização são menos comuns e podem estar relacionadas à atividade subjacente da DC (DAVE et al., 2015).

A decisão em utilizar CTM autólogas ou alogênicas é uma decisão clínica fundamental para a DC fistulizante, mas considerando que pacientes com DII apresentam uma desregulação imunológica em seu organismo, o transplante autólogo parece ser uma boa opção, visto que após infusões repetidas de CTM alogênicas em fístulas perianais complexas, anticorpos anti-MHC (anti complexo principal de histocompatibilidade) específicos para células de doadores, podem se desenvolver (PANES et al., 2016), particularmente em pacientes com DC (LOHAN et al., 2017), embora se considere que as CTM careçam de imunogenicidade devido à baixa expressão do MHC e nenhuma molécula coestimuladora de linfócitos T (ANKRUM et al., 2014). Entretanto, ainda poucos ensaios clínicos avaliam a geração destes anticorpos em pacientes com DC recebendo CTM alogênicas.

4. Artigo 1: O cultivo celular, as variações do tempo de lise e do pH do tampão de eletroforese do ensaio do cometa não influenciam na integridade genômica de células-tronco mesenquimais

Luana Bernardi^{1,2}

Laynna de Carvalho Schweich-Adami^{1,2}

Edwin José Torres de Oliveira^{1,3}

Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,3}

Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva^{1,2}

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS.

³Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas - CCB, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil.

Resumo

A aplicação de testes de controle de qualidade, como o ensaio cometa, são essenciais quando células-tronco mesenquimais são cultivadas para fins terapêuticos. No entanto, deve-se investigar os passos envolvidos no desenvolvimento deste ensaio, buscando diminuir a influência destes sobre danos genômicos nas células. Foram avaliados quatro diferentes protocolos de ensaio cometa, testando os efeitos do tempo de lise e condições de pH da solução tampão de eletroforese: 2 horas e pH 12; 24 horas e pH 12; 2 horas e pH ≥ 13 e 24 horas e pH ≥ 13 . Os resultados indicaram que os valores de momento da cauda não apresentaram diferenças significativas entre os quatro protocolos avaliados ($p < 0,05$), não havendo indicativo de danos quando comparados ao controle positivo ($p < 0,001$). Assim, qualquer protocolo testado pode ser aplicado em ensaios de genotoxicidade com células-tronco mesenquimais de lipoaspirado de humanos, sem causar danos à estas.

Palavras-chaves: Dano ao DNA. Expressão gênica. Reação em cadeia de polimerase.

Introdução

A medicina regenerativa e a terapia celular são as novas promessas de tratamento de diferentes doenças para as quais indivíduos não respondem adequadamente aos tratamentos conservadores da medicina convencional (NAWAB et al., 2019). As terapias baseadas em células-tronco mesenquimais, derivadas do tecido adiposo, são cada vez mais documentadas na literatura da área e apresentam resultados que indicam o uso com eficiência e segurança (NTEGE et al., 2020). Dentre as doenças tratadas citam-se a doença de Crohn (PANÉS et al., 2018), osteoartrite (LU et al., 2019), incontinência urinária de esforço (CHOI et al., 2016), lesão da medula espinhal (SAHARA et al., 2015), pneumonia decorrente da COVID-19 (SANCHEZ-GUIJO et al., 2020), entre outras.

Uma condição *sine qua non* para a utilização de células-tronco mesenquimais é que as mesmas sejam submetidas a um processo de cultivo celular (expansão *in vitro*) para atingir a quantidade suficiente para o transplante (WU et al., 2017). O cultivo celular trata-se de manipulação extensa visto que pode alterar características biológicas da célula, como o estado de diferenciação, o potencial de proliferação e atividades metabólicas, por exemplo (ANVISA, 2020). A segurança da expansão, continua sendo uma das principais preocupações quando ela precede a aplicação clínica (NERI et al., 2013). Já é comprovado que modificações em nível molecular podem ser observadas quando o tempo de cultura é prolongado ($\geq$ passagem 30) (GEIßLER et al., 2012). Além disso, ocorre declínio do potencial de diferenciação, alteração morfológica, aumento da suscetibilidade à senescência, potencial de migração reduzido e redução das defesas antioxidantes (GEIßLER et al., 2012). Segundo Alves et al. (2010), o aumento dos níveis de estresse oxidativo gera acúmulo progressivo de danos no DNA. Em vista disso, testes de controle de qualidade, como os testes de estabilidade genética, precisam ser realizados quando células-tronco mesenquimais são cultivadas para fins terapêuticos (SENSEBÉ et al., 2013).

Um dos ensaios mais sensíveis para a detecção de instabilidade genômica é o ensaio cometa já que ele é capaz detectar baixos níveis de danos no DNA (TICE et al., 2000). No entanto, segundo Hermeto et al. (2015) o pH do tampão de eletroforese pode alterar a frequência de danos observados (tail intensity e tail moment) em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de coelhos; no entanto, encontram-se valores de pH diferentes sendo testados, como com soluções com pH igual a 12 e com pH $\geq$ 13. Do mesmo modo, o tempo que as células permanecem sendo lisadas durante o ensaio também

varia entre protocolos (TICE et al., 2000; VILLELA et al., 2007). Assim, devido à variação do seu protocolo de aplicação entre laboratório (MOLLER et al., 2020a), Moller et al. (2018) suscitam a necessidade de se investigar os passos envolvidos no desenvolvimento deste ensaio na intenção de diminuir a influência destes sobre os danos genéticos observados nas células.

Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar se o processo de cultivo celular causa danos no DNA e se variações no tempo de lise e pH do tampão de eletroforese interferem nos resultados de genotoxicidade.

Métodos

Dados sobre amostragem

Três indivíduos saudáveis do sexo feminino, com idade entre 20 e 50 anos, submetidos a procedimentos eletivos de lipoaspiração do ambulatório de Cirurgia Plástica do Hospital da Plástica de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, com consentimento informado por escrito participaram deste estudo. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aprovado sob número de parecer 3.070.576.

Procedimentos de lipoaspiração, isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais

O tecido adiposo foi isolado pelo procedimento de lipoaspiração abdominal realizado de acordo com Pesarini et al. (2017). Para o processamento de cada uma das três amostras lipoaspiradas e isolamento das CTM, utilizou-se collagenase para digestão enzimática, conforme descrito por Markarian et al. (2014) com modificações. O meio de cultura foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Sigma®; número do catálogo D5523-10L) – low glucose, HEPES 10 mM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco™, número do catálogo 10091148) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina, Sigma®, A5955).

A imunofenotipagem das células foi caracterizada por citometria de fluxo conforme Schweich et al. (2017), utilizando anticorpos para os seguintes marcadores: CD105, CD90, CD34 e CD133 (Pharmingen BD, San Diego, CA. EUA). As células foram avaliadas em citômetro ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA). Foram adquiridos 10^4 eventos utilizando o programa padrão do equipamento (CellQuest software).

Ensaio de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica

As células na terceira passagem foram diferenciadas em linhagens de adipócitos, osteócitos e condrócitos para avaliar sua multipotência. Para induzir a diferenciação, foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 10^5 células/poço. Após a adesão celular (24 horas), o DMEM foi descartado e, em seguida, foram cultivadas com o meio específico, conforme descrito por Schweich et al. (2017). Os procedimentos foram realizados em triplicatas.

Ensaio Cometa

As células-tronco mesenquimais (quinta passagem) foram tripsinizadas como descrito anteriormente (MARKARIAN et al., 2014), e o ensaio do cometa foi realizado de acordo com Singh et al. (1988), com algumas modificações propostas por Navarro et al. (2014). Uma alíquota (40 μ L) foi ressuspensa em agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (120 μ L) (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) a 37° C, e distribuídas em lâminas previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal 1,5% (Invitrogen Co, Carlsbad, CA), sendo cobertas com lamínula. As lâminas foram imediatamente colocadas no refrigerador (4°C) durante 20 minutos. Após ocorrer a solidificação da agarose, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO a 10% e Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%), sendo mantidas no escuro a 4° C, por 2 ou 24h, segundo cada protocolo. Após a lise celular, as lâminas permaneceram em cuba de eletroforese, cobertas com tampão alcalino (pH de 12 ou $\geq$ 13, específico de cada protocolo), durante 20 minutos (NaOH 10N, EDTA titriplex 200 mM) para desnaturação do DNA. A eletroforese foi realizada com o mesmo tampão durante mais 20 minutos (300 mA e 25 V). Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4M, pH 7,5, por 15 minutos (3 vezes durante 5 minutos cada), fixadas em etanol absoluto durante 10 minutos, deixadas secar durante a noite em temperatura ambiente e armazenadas até o momento de análise.

O material foi corado (100 μ l de brometo de etídio, 20 mg/mL) e os nucleóides foram fotografados em microscópio de fluorescência (Leica, DMI8) com uma ampliação de 200X. Posteriormente, foram analisados mais de 200 nucleóides por repetição utilizando o programa CometScore 2.0.0.38 TriTek (CometScore Comet Scoring Software, 2004), e foi avaliado o parâmetro de momento da cauda (% DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para os diferentes grupos de estudo a solução de lise foi a mesma. No entanto, o tempo de lise variou (2 ou 24h). Para detecção de danos no DNA, para cada um desses tempos foram avaliados dois tipos de tampão de eletroforese, sendo um deles com pH 12 (VILLELA et al., 2007) e outro com pH ≥ 13 (TICE et al., 2000). Assim, os grupos analisados foram: Protocolo 1 - tempo de lise de 2 horas e solução tampão de eletroforese com pH 12; Protocolo 2 - tempo de lise de 24 horas e solução tampão de eletroforese com pH 12; Protocolo 3 - tempo de lise de 2 horas e solução tampão de eletroforese com pH ≥ 13 ; e Protocolo 4 - tempo de lise de 24 horas e solução tampão de eletroforese com pH ≥ 13 (Figura 1).

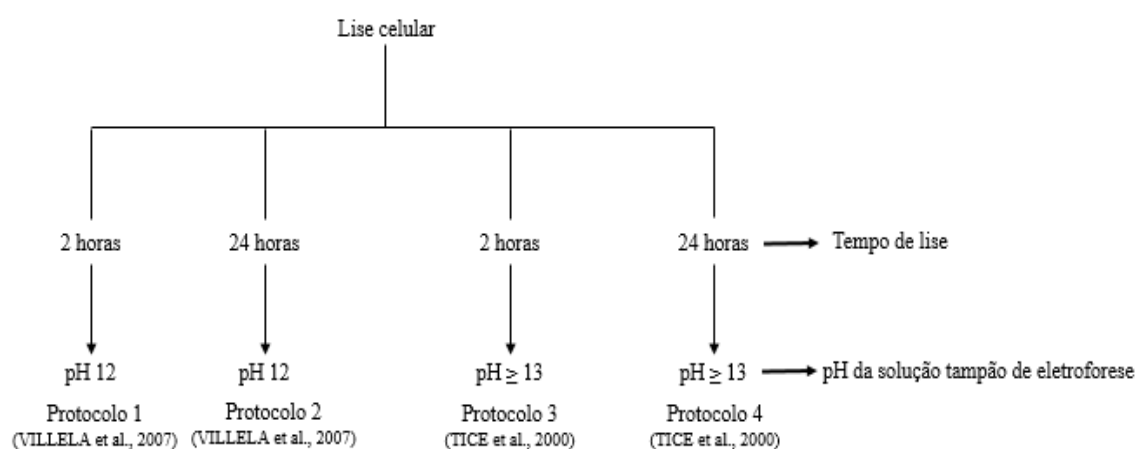


Figura 1. Protocolos testados para detecção de danos no DNA de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos.

Para validação do teste, três amostras, independentes, de CTM foram tratadas com doxorrubicina (DXR) (Libbs®, número do catálogo 734079) na concentração 5 μ M em pH 13 por 3 horas. As lâminas deste controle positivo foram submetidas à lise e à eletroforese juntamente com as lâminas dos protocolos de estudo.

Expressão Gênica

Para a avaliação de expressão gênica, 2 x 10⁵ CTM/poço na quinta passagem, foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços; e como controle negativo, utilizou-se CTM recém extraídas (passagem 0). As células foram coletadas e o RNA total foi extraído por método *in house*. Para tanto, utilizou-se tampão de lise a base de tiocianato de guanidina (Tiocianato de guanidina 5 mols/L, Tris Hidroclorato (HCL) 11,2 g/L (pH 6,4), ácido etilenodiaminnetretetracético (EDTA) NaOH 7,43 g/L, Triton X-100 7,8 mL). Para cada 200 μ L da suspensão celular foi acrescentado 200 μ L de tampão de lise (1:1). Após

homogeneização com duração de 10 minutos, foi adicionado 50 µL de *bead* magnética (Nuclisens®, easyMag®, bioMérieux®, número do catálogo 280133) com posterior repouso por 10 minutos. As impurezas (restos celulares) foram removidas por duas lavagens com tampão de lise (NaCl 2,5M, EDTA titriplex 100 mM, Tris 10 mM (pH 10), Triton X-100 a 1% e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%). O excesso de tiocianato de guanidina e sais foram retirados com duas lavagens de álcool 70%. As *beads* foram lavadas com acetona PA, aquecidas por um minuto à 60° C em equipamento de banho seco Dry Bath Heat & Cool Control™ (DB-HC, Loccus®) e o material genético foi eluído com 30 µL de solução TE (NucliSENS®, número do catálogo 280132). Após extração, foi realizado tratamento com RQ1 RNase-Free DNase (Promega®, número do catálogo M6101,) de acordo com as especificações do fabricante. Após a etapa de degradação do DNA, a qualidade do material extraído foi analisada por meio: (I) do quociente A260/A280 e A230/A260 em espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare – Life Sciences®); e (II) a integridade em gel de agarose desnaturante (1%). Somente amostras com quociente entre 1,8 a 2,1 foram utilizadas para síntese do DNA complementar (cDNA).

A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100™ (Thermal Cycler, Bio-Rad™) utilizando 250 ng de RNA no kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega®, número do catálogo A5001) seguindo protocolo do fabricante, onde 5µL GoScript™ Tampão 5X, 3,8 mM MgCl₂, 0.5 mM DNTPs, 20 unidades do inibidor de RNase e 1 µL de GoScript™ Reverse foram utilizadas. A mistura foi incubada por 5 minutos à 25° C, seguido de 60 minutos à 42° C e por 15 minutos à 70° C.

A qualidade da etapa de transcrição reversa foi analisada pelo quociente A260/A280 e A230/A260 em espectrofotômetro NanoVue™ Plus (GE Healthcare – Life Sciences ®) e admitiu-se amostras com quociente entre 1.8 e 2.1. A quantificação do cDNA foi realizada no mesmo equipamento.

As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas no aparelho Rotor Gene® (Qiagen). Os genes analisados estão descritos na Tabela 1. Foram testados genes envolvidos no processo de danos e reparo do DNA. Para a reação foram utilizados 10 µL de master mix GoTaq®, 2 pmol de cada oligonucleotídeo, 500 ng de cDNA e água livre de ribonuclease q.s.p. (Promega®, número do catálogo A6002) totalizando 20 µl. A mistura foi submetida a 95° C por 5 minutos e 40 ciclos de 95° C por 2 segundos e 60° C por 30 segundos. Ao final a curva de *melting* foi realizada para avaliar a especificidade dos produtos formados. O gene da β-actina (*ACTB*) foi utilizado como normalizador

(*housekeeping*) e os resultados foram analisados em programa Rotor Gene® (Qiagen) v2.3.1.

Tabela 1. Sequência de primers (5'– 3') usados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Forward	Reverse	Size (pb)	Genbank
<i>ACTB</i>	GGAAATCGTGCGTGACAT	AGGAAGGAAGGCTGGAAG	183	NM_001101.3
<i>ATM</i>	ACCATTGTAGAGGTCCTTC	GTCTCATTAAGACACCGTTCAG	148	NM_002519.2
<i>ATR</i>	CCTTCAGATTTCCCTTGAATAC	GCAGTTCATGTTTTGATGAG	137	NM_001184.3
<i>GADD45</i>	TCAGCGCACGATCACTGTC	CCAGCAGGCACAACACCAC	82	NM_001924.3
<i>P21</i>	TAGCAGCGGAACAAGGAG	AAACGGGAACCAGGACAC	249	NM_001220778.1
<i>TP53</i>	TACCACCATCCACTACAAC	GACAGGCACAAACACGCAC	145	NM_001126112.2

Legenda – ACTB: gene da β -actina (*ACTB*); ATM: gene serina/treonina quinase; ATR: gene serina/treonina-proteína quinase; GADD45: gene indutível por dano; P21: proteína P21; TP53: proteína relacionada à Transformação 53

Análise estatística

A análise estatística dos cometas foi realizada por ANOVA/Tukey, considerando diferenças estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$ (GraphPad InStat). A análise estatística dos dados obtidos na RT-qPCR foi realizada utilizando o programa REST e a diferença foi considerada significativa quando o nível de expressão relativa foi igual ou inferior a -2 ou igual ou superior 2.

Resultados

Número de células, caracterização e comprovação da multipotência das células-tronco mesenquimais

As células indiferenciadas (controle) (Figura 1A) e a confirmação da diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica foram observadas pelas alterações morfológicas das CTM (Figura 2). Os depósitos de cálcio corados com vermelho de Alizarina confirmam a diferenciação osteogênica (Figura 2B). Os vacúolos de lipídios corados com Oil Red O confirmam a diferenciação adipogênica (Figura 2C). Já a matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos corada com Alcian Blue comprova a diferenciação condrogênica (Figura 2D).

As CTMs expressaram os marcadores CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133. Assim, a análise deste perfil imunofenotípico demonstra que estas são células-tronco mesenquimais (Figura 2E).

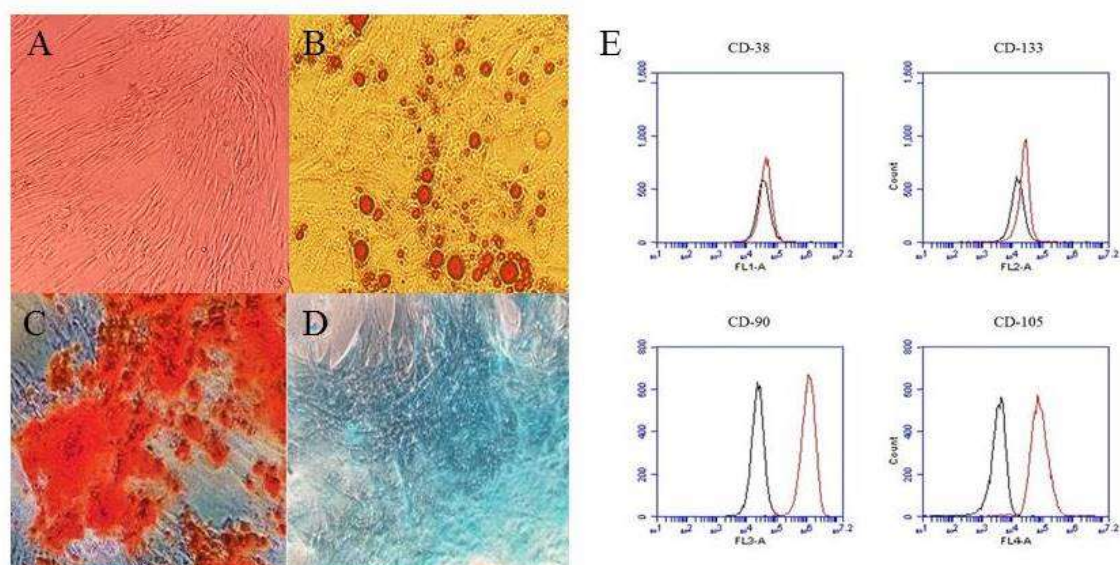


Figura 2. Caracterização da multipotência e imunofenotipagem das células tronco mesenquimais. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais indiferenciadas com aspecto fibroblástico (A); diferenciação adipogênica confirmada pela coloração de *Oil Red* (B); diferenciação osteogênica confirmada pela coloração de *Alizarin Red* (C); e diferenciação condrogênica confirmada pela coloração

de *Alcian Blue* (D) (Aumento 400x). Perfil imunofenotípico das células tronco mesenquimais que expressaram os marcadores CD90 e CD105 e não expressaram os marcadores CD38 e CD133 (E).

Avaliação da genotoxicidade em CTM

O ensaio do cometa demonstrou que independentemente do tempo de lise e do pH da solução tampão de eletroforese, as CTM não apresentaram danos no DNA ($p > 0,05$) (Figura 3A-E). O tratamento com a DXR demonstrou que o ensaio do cometa foi adequadamente realizado e houve danos no DNA ($p < 0,001$) das CTM (Figura 3A e 3F).

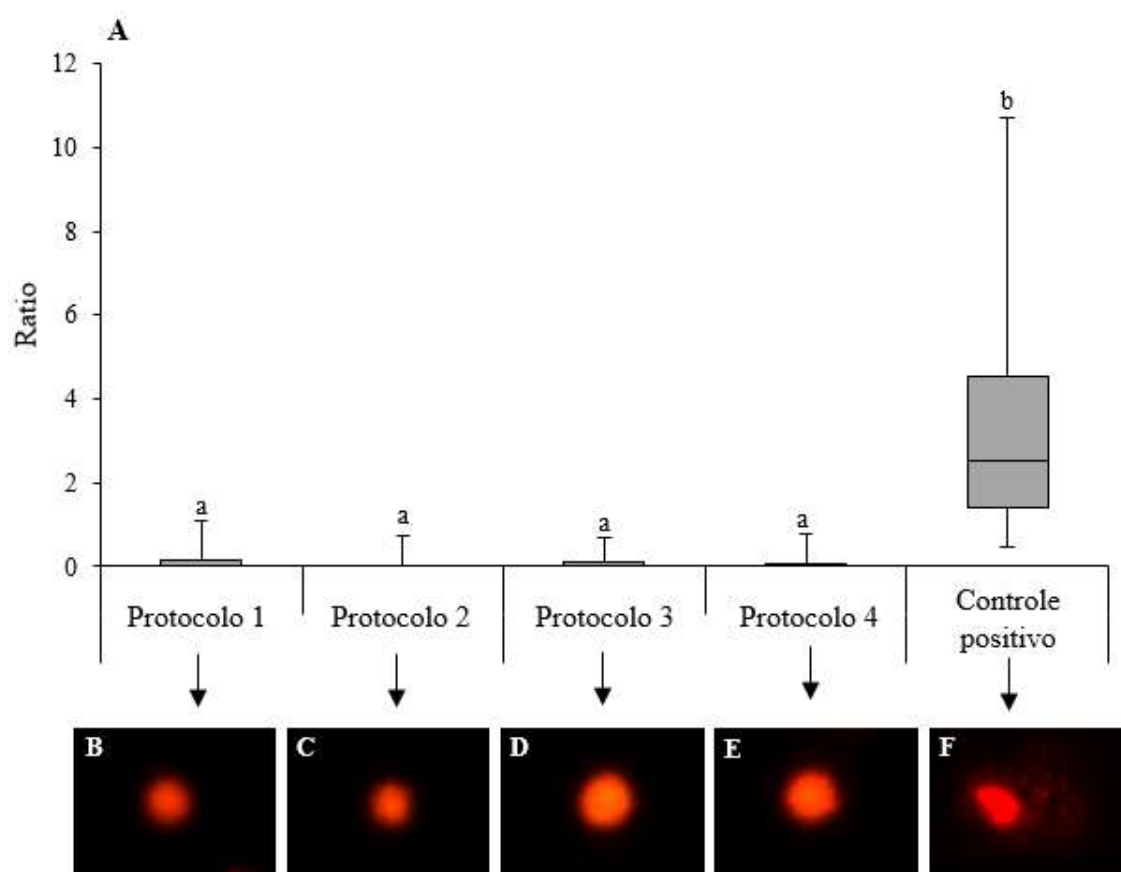


Figura 3. Avaliação da genotoxicidade (momento da cauda) em células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos usando 4 protocolos de ensaio cometa. (A) Box plot demonstrando a média e desvio padrão da frequência de danos no DNA para cada um dos protocolos de cometa e para o controle positivo (Doxorrubicina - 5 μ M); (B) nucleóide de células-tronco mesenquimais submetidas ao protocolo 1 (tempo de lise de 2 horas e eletroforese em tampão pH 12), (C) nucleóide de células-tronco mesenquimais submetidas ao protocolo 2 (tempo de lise de 24 horas e eletroforese em tampão pH 12), (D) nucleóide de células-tronco mesenquimais submetidas ao protocolo 3 (tempo de lise de 2 horas e eletroforese em tampão pH ≥ 13); (E) nucleóide de células-tronco mesenquimais submetidas ao protocolo 4 (tempo de lise de 24 horas e eletroforese em tampão pH ≥ 13); (F) nucleóide de células-tronco mesenquimais tratadas com Doxorrubicina e submetidas à eletroforese em pH ≥ 13 . Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

Expressão Gênica

Os resultados do ensaio de expressão gênica, realizado por qPCR, demonstraram que não houve aumento significativo ($p > 0,05$) na expressão dos genes analisados. O gene *ATM* foi expresso em 1,54x, *ATR* em 1,32x, *CDKN1A* em 1,48x, *TP53* em 1,71 e *GADD45A* em 1,97x (Figura 4).

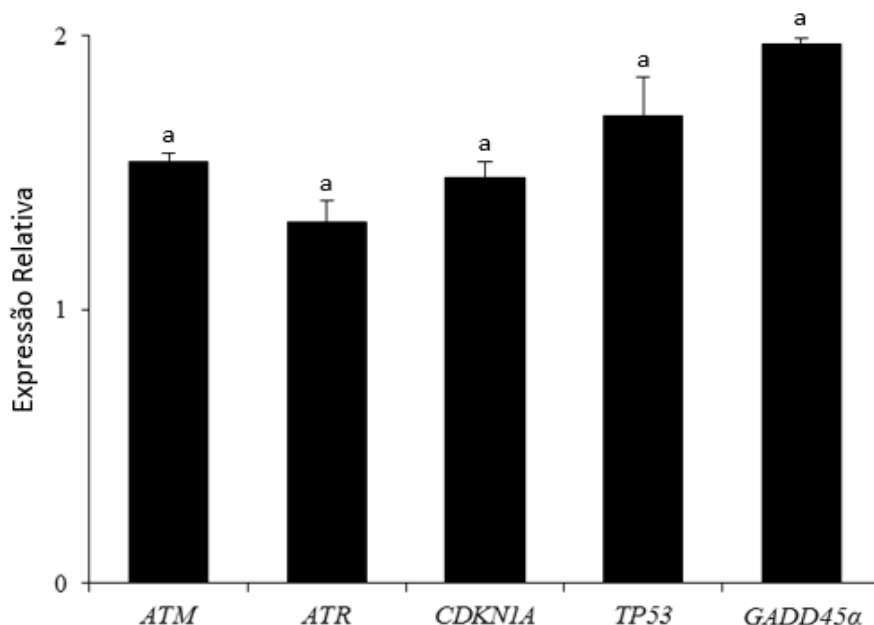


Figura 4. Ensaio de expressão gênica por qPCR. Os genes analisados estão envolvidos no processo de danos e reparo do DNA. Como controle foram utilizadas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo obtidas, imediatamente, após o processo de extração (células que não foram submetidas ao processo de cultivo celular). Já a amostra-teste era composta por células-tronco mesenquimais, derivadas de tecido adiposo, que estavam na quinta passagem de cultivo. O gene *ACTB* foi utilizado como normalizador. Não houve diferença significativas na expressão dos genes analisados ($p < 0,05$, REST).

Discussão

Alguns países, tais como a China, Japão, Índia, Estados Unidos da América (EUA), Canadá, Itália, Austrália, Eslovênia, Singapura, entre outros, já possuem legislação que permite o uso de tratamentos com células-tronco (SLEEBOOM-FAULKNER et al., 2016). Outros, como por exemplo o Brasil, Arábia Saudita, Egito, Tunísia e Argélia, a legislação se mantém ainda na regulação do uso de células-tronco para fins de pesquisas (UNESCO Cairo Office, 2011; ZORZANELLI et al., 2017). No entanto, não se deve negar que ainda existem muitas dificuldades que os países com poucos recursos devem vencer para se adequar aos padrões “globais” impostos por países com instituições científicas avançadas, como EUA e países membro da União Europeia (SLEEBOOM-FAULKNER et al., 2016).

Revisões recentes da literatura indicam o tratamento promissor de diversas condições clínicas a partir de células-tronco mesenquimais (XU; YANG, 2019;

THOMPSON et al., 2020; CHENG et al., 2020), indicando que o uso destas células não somente ajudará médicos e cientistas a aumentar seus conhecimentos, mas também pode ajudar a salvar muitas vidas em todo o mundo (JAYARAJ et al., 2019). A literatura indica que a terapia com células-tronco mesenquimais é segura tanto para uso autólogo quanto halogênico, visto que essas células apresentam baixa propriedade imunogênica (ANKRUM et al., 2014). No entanto, ainda há uma grande dúvida se a manipulação extensa delas não induz alterações que possam correlacionar ao desenvolvimento de doenças nos indivíduos que recebem o transplante (MANI et al., 2020).

A literatura consultada demonstra que não há padronização de como avaliar a segurança de uso e se as células transplantadas possuem a qualidade necessária. Na tentativa de contribuir com o conhecimento da área, demonstrou-se que o protocolo de extração e cultivo, padronizado no Centro de Estudos e Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), não induz danos no DNA e nem causa aumento da instabilidade genômica quando as células são cultivadas até a décima passagem.

O primeiro ensaio utilizado para demonstrar a ausência de danos foi o teste do cometa. Este é considerado uma ótima ferramenta de triagem para detectar danos no DNA. Isso é de grande importância já que lesões no material genético podem ser utilizadas como um parâmetro de senescência em CTM humanas cultivadas *in vitro* (FUCHS et al., 2012). Apesar de boa aplicabilidade, há uma grande variabilidade (uso de diferentes protocolos) e baixa confiabilidade dos resultados entre trabalhos e entre laboratórios (MØLLER et al., 2010; ENCISO et al., 2018) o que dificulta a comparação entre estudos. No entanto, estudos multicêntricos já foram realizados para a padronização desse protocolo e aumentar a confiabilidade nos resultados (BAUCH et al., 1999). Assim, optou-se por desenvolver protocolos já bem estabelecidos na literatura e em nosso centro.

Sabe-se que o resultado do cometa pode sofrer influência da concentração de agarose, da densidade dos cometas formados, do período de incubação alcalina das células antes da eletroforese, do pH da solução tampão de eletroforese, do tempo de lise, dentre outros (ERSSON; MÖLLER, 2011; AZQUETA et al., 2011; HERMETO et al., 2015). Assim, optamos por testar diferentes protocolos que variaram o tempo de lise e o pH do tampão de eletroforese, e verificar se estas variações não interferem nos resultados de genotoxicidade das células-tronco mesenquimais.

Os resultados desse estudo demonstraram que o tempo de lise, seja ele 2 ou 24h, não influencia na indução dos cometas. Além disso, os dois tampões com pH = 12 e ≥ 13 , após 2 ou 24h de lise, também não alteram os resultados. Diante do exposto, considerou-

se que lises por até 24h e tampão de pH = 12 e ≥ 13 podem ser utilizados nos ensaios de cometa para inferir lesões no DNA de CTM humanas. Esse resultado é divergente das conclusões de Hermeto et al. (2015) que relatam que a necessidade de utilizar o tampão com pH = 12 visto que pH ≥ 13 induz danos nas CTM do tecido adiposo de coelhos. Ciente das diferenças interespecíficas (coelho vs homem) sugerimos que o estudo de Hermeto et al. (2015) possui duas limitações: ausência de um controle positivo do teste e a relevância biológica entre as diferenças estatísticas do Tail Moment. Compreende-se que uma diferença menor do que 0,04 nesse parâmetro não indique necessidade de optar por um dos protocolos (pH = 12 ou pH ≥ 13). Além disso, compreendemos que para esse tipo de estudo não é obrigatória a inclusão de um controle positivo. Mas, esse controle interno, além de validar o teste, pode corrigir discrepâncias e auxiliar na compreensão dos efeitos biológicos do teste (MOLLER et al., 2018; 2020b). Frente ao exposto, sugerimos que o controle positivo seja realizado e incluído na análise estatística.

É importante destacar que, no momento em que as células foram desprendidas dos frascos houveram poucos danos no DNA nas CTM, o que foi comprovado por meio de avaliação da expressão de mRNA de genes de danos e reparo do material genético (NASH et al., 2001; MASSAGUÉ, 2004; BERTOLI et al., 2013; UEDA et al., 2017). Esses resultados indicam que quaisquer lesões no DNA observadas no ensaio do cometa, ocorreram durante a realização da técnica do próprio teste. De fato, o processo de reparo de danos ao DNA de células-tronco está associado com a expressão aumentada de genes, como os descritos neste estudo, o que contribui para preservar a integridade das mesmas, pois caso contrário estes danos se não detectados podem levar a vários distúrbios em um organismo quando as células são transplantadas (MANI et al., 2020). Assim, diante de alterações no material genético a ativação dos genes supressores tumorais utilizados fornece estabilidade para a célula interrompendo a progressão do ciclo celular até que o dano ao DNA seja reparado, ou em casos de dano fatal, induzindo a apoptose da mesma (KHANNA et al., 2001; GOODARZI et al., 2003; STIVALA et al., 2012; SALVADOR et al., 2013; CHEN, 2016).

A partir dos resultados obtidos, considera-se que qualquer protocolo testado neste trabalho pode ser aplicado em ensaios de genotoxicidade com CTM de lipoaspirado de humanos, sem causar danos a estas. Porém, recomendam-se investigações mais extensas quanto às condições específicas para as diversas etapas do ensaio cometa, com avaliações da interferência de tempos maiores de lise, bem como de outros fatores, a partir de uma avaliação criteriosa dos resultados.

5. Artigo 2: A criopreservação de células-tronco mesenquimais com DMSO não interfere na sua viabilidade e segurança genômica até a quarta passagem celular

Luana Bernardi^{1,2}

Laynna de Carvalho Schweich-Adami^{1,2}

Renata Trentin Perdomo^{3,5}

Giovana Bicudo Gomes⁵

Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,4}

Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva^{1,2}

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina Dr. Hélio Madetta - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas - CCB, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil.

⁵Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo

À medida que tratamentos em humanos com células-tronco mesenquimais (CTM) se desenvolvem, há necessidade de criopreservá-las para aumentar seu acesso e disponibilidade, além de garantir que elas preservem suas características terapêuticas e segurança após o período de armazenamento. Objetivou-se avaliar se o processo de criopreservação de CTM derivadas do tecido adiposo de humanos com dimetilsulfóxido (DMSO) durante 12 semanas interfere no fenótipo, na capacidade de diferenciação, integridade genômica, viabilidade celular e de formação de esferoides das mesmas. As amostras foram coletadas por lipoaspiração, aliquotadas e armazenadas a -196°C. O dano

ao DNA foi analisado pelo ensaio do cometa em células da primeira à décima passagem. A avaliação do fenótipo celular e da capacidade de diferenciação foi realizado em células na terceira passagem. A avaliação da viabilidade por integridade de membrana ocorreu em células nas passagens 2, 4, 6, 8 e 10; e a formação de esferoides pelo método livre de andaime em células nas passagens 1 e 10. Observamos que as CTM mantêm sua capacidade de diferenciação, de expressar marcadores celulares característicos e de formar esferoides nas passagens analisadas. No entanto, tiveram aumento da concentração de DNA na cauda a partir da quinta passagem e redução da sua viabilidade a partir da sexta. Estes dados indicam que a criopreservação nas condições adotadas garante a estabilidade da viabilidade e segurança genômica até a quarta passagem de CTM, mas o fenótipo, capacidade de diferenciação e de formação de esferoides permanecem inalterados.

Palavras-chave: Criopreservação. Células-tronco mesenquimais. Agente crioprotetor.

Introdução

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células de origem estromal, que apresentam a capacidade de auto-renovação e de diferenciação multilinhagem *in vitro* (BERNARDO et al., 2012). Estas células podem ser obtidas a partir de diversos tecidos, incluindo o tecido adiposo que é considerado uma fonte abundante e que normalmente é descartado em processos de lipoaspiração (MISHRA et al., 2017). Além destas características, as CTMs apresentam propriedades imunomoduladoras, anti-apoptóticas, anti-inflamatórias, anti-fibróticas, de reparo e regeneração tecidual (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015), o que as tornam atraentes para serem utilizadas em diversas terapias clínicas.

A quantidade de ensaios clínicos que fazem uso das CTM para tratamento de doenças, empregam principalmente células *in natura*. Porém, a relevância do trabalho com células criopreservadas vem sendo discutida (DEMIRCI et al., 2014; FREITAS et al., 2017; NARAKORNSAK et al., 2019; RASTEGAR et al., 2015; YUAN et al., 2016), visto que este processo possibilita o armazenamento das células em grande quantidade e que podem ser utilizadas após um longo período de estocagem (GONDA et al., 2008), facilitando sua utilização imediata quando necessário. Além disso, Yuan et al. (2016) descrevem que a criopreservação de células proporciona melhor controle de qualidade, padronização do produto a ser utilizado e fornece um suprimento terapêutico imediato, o que permite estender o tempo da terapia ao paciente.

Para a realização do processo de criopreservação, as CTM são normalmente preservadas usando técnicas de congelamento com o auxílio de crioprotetores, como o dimetilsulfóxido (DMSO), na intenção de proteger as células durante este congelamento. O DMSO penetra nas células e liga as moléculas de água presentes na solução, por ligações de hidrogênio, o que impede a desidratação celular durante o congelamento. Ao final, este crioprotetor promove a vitrificação da água reduzindo a probabilidade de formação de gelo intracelular considerado prejudicial (WINDRUM et al., 2005; MANDUMPAL et al., 2011). No entanto, o DMSO pode ser tóxico para a célula, tanto antes ou após o descongelamento, o que justifica a importância de sua completa eliminação da amostra celular que será transplantada para evitar efeitos adversos no indivíduo receptor. Além disso, alterações de temperatura durante o seu manuseio também podem interferir na ação deste material químico levando as células à apoptose por desnaturação (SMAGUR et al., 2013).

Desta forma a criação de um protocolo seguro de armazenamento das CTM com DMSO que garanta a quantidade e a qualidade efetiva e, por consequência, contribua com o sucesso da terapia celular se faz importante. Na tentativa de definir as melhores condições para a criopreservação, no presente trabalho, objetivou-se avaliar se o processo de criopreservação com DMSO de CTM derivadas do tecido adiposo de humanos durante 12 semanas interfere no fenótipo, na capacidade de diferenciação, integridade genômica, viabilidade celular e capacidade de formação de esferoides.

Métodos

Procedimentos de lipoaspiração, isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais

O tecido adiposo foi isolado de três indivíduos saudáveis do sexo feminino (idade = 20 a 50 anos) pelo procedimento de lipoaspiração abdominal realizado de acordo com Pesarini et al. (2017), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (número do parecer = 3.070.576).

Das três amostras lipoaspiradas foi realizado o isolamento das CTM, utilizando-se collagenase para digestão enzimática, conforme descrito por Markarian et al. (2014) com modificações. O meio de cultura foi o Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Sigma®; número do catálogo D5523-10L) – low glucose, HEPES 10 mM

suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco™, número do catálogo 10091148) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina, Sigma®, A5955).

Criopreservação e descongelamento das células-tronco mesenquimais

As CTM da primeira à décima passagem foram criopreservadas por meio do método de congelamento lento. Foram dissociadas por tripsina (0,25%), contadas usando um hemocítmetro e $3,0 \times 10^5$ células/ml foram suspensas em meio crioprotetor contendo 2,0 ml de solução de congelamento (SBF e 10% de DMSO). Os criotubos (Eppendorf/Alemanha) foram armazenados com as amostras -80°C durante a noite e, no dia seguinte, foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido (-196°C) onde foram mantidas por 12 semanas.

Após o período determinado, os criotubos foram colocados em banho-maria a 37°C e descongelados rapidamente (1-2 minutos). As células foram imediatamente transferidas para um tubo cônico estéril de 15 ml contendo DMEM suplementado com 10% de SBF e centrifugadas a 250 g durante 5 min para remover o crioprotetor. Em seguida, o sobrenadante obtido foi removido e o sedimento celular foi suspenso em PBS para ser utilizado nos ensaios descritos a seguir.

Caracterização por imunofenotipagem e diferenciação das células-tronco mesenquimais criopreservadas

A imunofenotipagem das células foi caracterizada por citometria de fluxo. Aproximadamente $3,0 \times 10^5$ CTM, na terceira passagem e após período de criopreservação, foram plaqueadas em placas de 6 poços e, ao atingir 90% da confluência foram coletadas por tripsinização. Posteriormente, foram incubadas durante 30 minutos a 4°C com anticorpos para os seguintes marcadores: CD105, CD90, CD34 e CD133 (Pharmingen BD, San Diego, CA. EUA). As células foram avaliadas em 10^4 eventos utilizando o citômetro ACCURI C6 (Becton Dickinson, EUA) e o programa padrão do equipamento (CellQuest software).

As células, na terceira passagem e após período de criopreservação, foram diferenciadas em linhagens de adipócitos, osteócitos e condrócitos para avaliar sua multipotência. Para induzir a diferenciação, as células foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 10^5 células/poço. Após a adesão celular (24 horas), o DMEM foi descartado e, em seguida, as células foram cultivadas com o meio específico,

conforme descrito por Schweich et al. (2017). Os procedimentos foram realizados em triplicatas.

Ensaio Cometa das células-tronco mesenquimais criopreservadas

Para detecção de danos no DNA, o ensaio do cometa foi testado a partir do protocolo de Villela et al. (2007), com algumas modificações propostas por Navarro et al. (2014). O material foi corado (100 µl de brometo de etídio, 20 mg/mL) e os nucleóides foram fotografados em microscópio de fluorescência (Leica, DMi8) com uma ampliação de 200X. Posteriormente, foram analisados mais de 200 nucleóides por repetição utilizando o programa CometScore 2.0.0.38 TriTek (CometScore Comet Scoring Software, 2004). Para esta análise, o parâmetro de momento da cauda (% DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda) foi utilizado (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Avaliação da viabilidade celular por integridade de membrana das células-tronco mesenquimais criopreservadas

As células das passagens 2, 4, 6, 8 e 10 foram distribuídas em tubos com pelo menos 2×10^5 células em 100 µL de PBS. A cada suspensão celular foram adicionados 5 µL de iodeto de propídio e aguardado 5 minutos em temperatura ambiente para posterior leitura. Foram analisados 10^4 eventos utilizando o software padrão do equipamento (software BD ACCURI C6; Becton Dickinson, EUA).

Formação de esferoides pelas células-tronco mesenquimais criopreservadas (Cultura 3D)

Para obter culturas 3D em forma de esferoide, CTM nas passagens 1 e 10 foram preparadas pelo método livre de andaime (STUART et al., 2017) com algumas modificações. 1×10^6 células em 120 µl foram arranjadas no molde de agarose por microdiscos (MicroTissues® 3D Petri Dish®/Sigma-Aldrich) e preenchidas com PBS para hidratação. Após 3 a 4 dias, os esferoides foram colhidos e usados para avaliar sua capacidade proliferativa por meio da análise da sua área (10^5 Pixels) e diâmetro de Feret (10^6 Pixels) em 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento usando microscópio invertido.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão (SD). A análise estatística foi realizada por ANOVA/Tukey, onde letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$; GraphPad InStat).

Resultados

Caracterização e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais criopreservadas

A análise do perfil imunofenotípico das CTMs demonstrou que elas expressaram os marcadores típicos CD105 e CD90 e não expressaram CD34 e CD133 (Figura 5E). Também, as culturas de células indiferenciadas (Figura 5A) e a diferenciação osteogênica (Figura 5B), adipogênica (Figura 5C) e condrogênica (Figura 5D) foram confirmadas pelo Alizarin Red, Oil Red O e Alcian Blue, respectivamente.

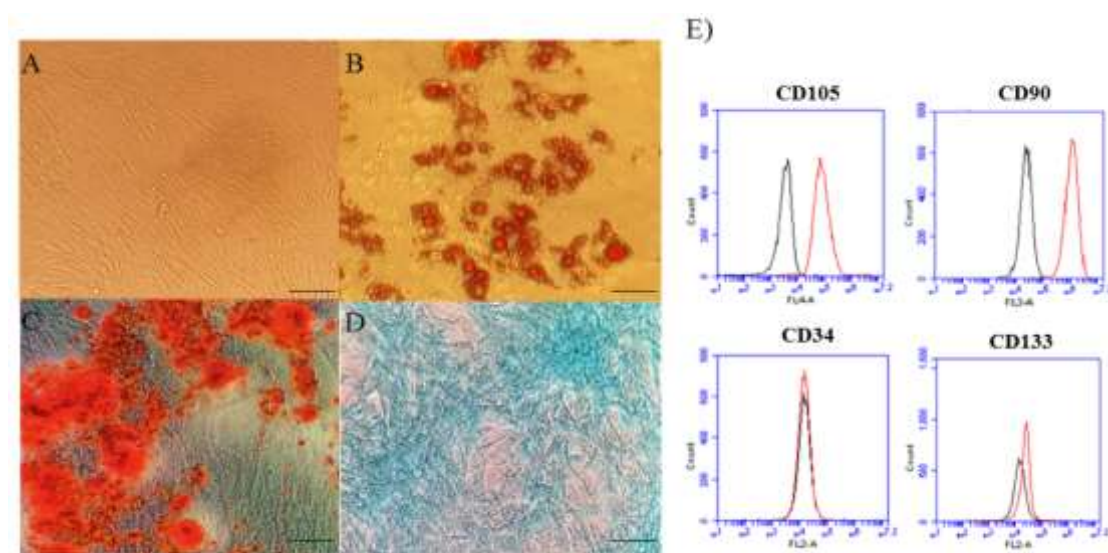


Figura 5. Caracterização da multipotência e imunofenotipagem das células tronco mesenquimais. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais indiferenciadas com aspecto fibroblastóide (A); diferenciação adipogênica confirmada pela coloração de *Oil Red* (B); diferenciação osteogênica confirmada pela coloração de *Alizarin Red* (C); e diferenciação condrogênica confirmada pela coloração de *Alcian Blue* (D) (Aumento 400x). Perfil imunofenotípico das células tronco mesenquimais que expressaram os marcadores CD90 e CD105 e não expressaram os marcadores CD38 e CD133.

Avaliação da genotoxicidade das células-tronco mesenquimais criopreservadas

O ensaio do cometa indicou que houve um aumento pequeno, porém significativo ($p < 0,05$), de DNA na cauda das células nas passagens 5, 7, 8 e 9 quando comparadas às demais. No entanto, ressalta-se que a ocorrência de danos permaneceu muito próxima ao valor zero (Figura 6).

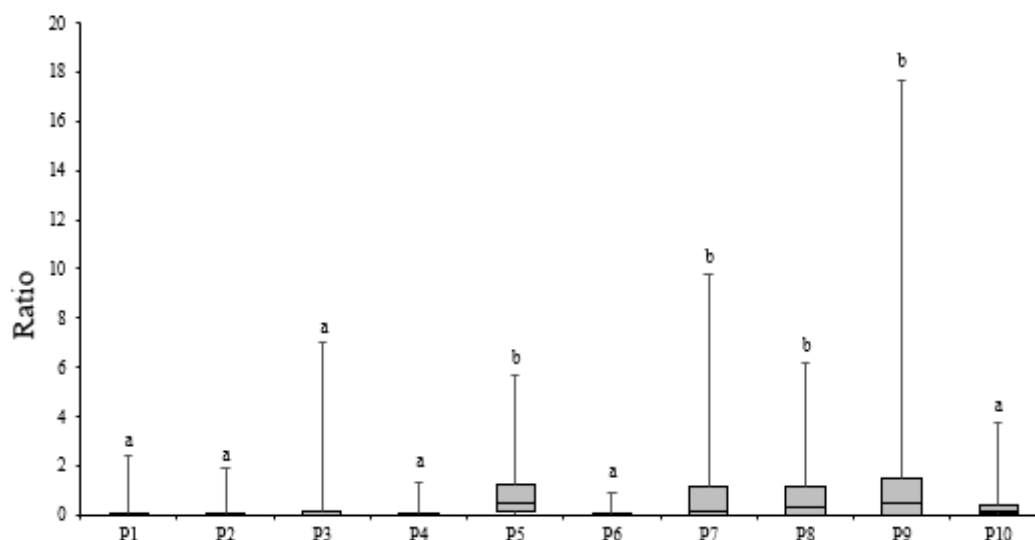


Figura 6. Avaliação da genotoxicidade (momento da cauda) de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos da 1ª à 10ª passagem pelo ensaio cometa usando média e desvio-padrão. P1 = passagem 1; P2 = passagem 2; P3 = passagem 3; P4 = passagem 4; P5 = passagem 5; P6 = passagem 6; P7 = passagem 7; P8 = passagem 8; P9 = passagem 9; P10 = passagem 10. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

Avaliação da viabilidade celular por integridade de membrana das células-tronco mesenquimais criopreservadas

O ensaio de viabilidade celular mostrou que quanto maior a passagem das CTM menos células viáveis permanecem disponíveis após o processo de criopreservação. Assim, observou-se que a partir da sexta passagem a viabilidade das células criopreservadas começou a diminuir (Figura 7A).

Formação de esferoides pelas células-tronco mesenquimais criopreservadas

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a área (Figura 7B) e o diâmetro (Figura 7C) dos esferoides formados pelas CTM da primeira e décima passagem nos quatro tempos analisados (0h, 24h, 48h e 72h), indicando que estas células mantêm capacidade de formar esferoides (Figura 7D) e não sofrem interferência quando se encontram em passagem tardia.

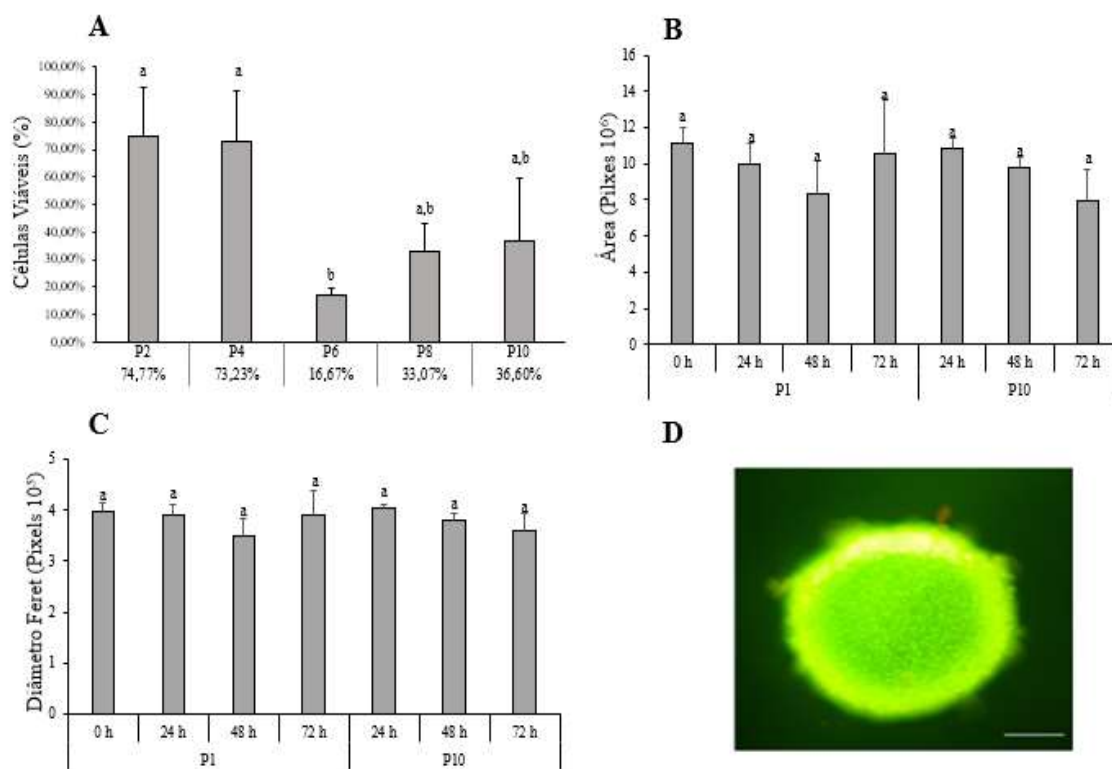


Figura 7. Avaliação da viabilidade e da formação de esferoides de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de humanos usando média e desvio-padrão. A) Viabilidade das CTM nas passagens 2 (P2), 4 (P4), 6 (P6), 8 (P8) e 10 (P10); B) Área dos esferoides formados pelas CTM nas passagens 1 (P1) e 10 (P10) nos quatro tempos analisados (0h, 24h, 48h e 72h); C) Diâmetro dos esferoides formados pelas CTM nas passagens 1 (P1) e 10 (P10) nos quatro tempos analisados (0h, 24h, 48h e 72h) e; D) Esferoide coberto por CTM e corado com laranja de acridina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA/Tukey).

Discussão

A medicina regenerativa representa a nova fronteira para diversas condições clínicas que podem se beneficiar de tratamentos com CTM derivadas do tecido adiposo (XU; YANG, 2019; THOMPSON et al., 2020; CHENG et al., 2020). Mas, para oferecer as doses necessárias para estudos clínicos, cada vez mais vem sendo discutida a forma mais eficaz de criopreservar estas células para aumentar seu acesso e disponibilidade a qualquer momento, garantir que elas preservem suas características terapêuticas após o período de armazenamento e que se mantenham seguras para uso clínico (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015). A literatura descreve que as células diminuem sua atividade metabólica e permanecem intactas quando armazenadas a -196°C , e que as CTM, de forma geral, retêm suas propriedades biológicas pós-descongelamento, mas com algumas alterações nas suas funções (MARQUEZ-CURTIS et al., 2015). Portanto, padronizar o método de congelamento e descongelamento de CTM derivadas do tecido adiposo de

humanos pode contribuir com a diminuição da perda das funções e qualidade e, assim, favorecer seu uso em transplantes futuros.

Os resultados demonstraram que o protocolo de criopreservação adotado não alterou a capacidade das CTM derivadas do tecido adiposo de humanos de se diferenciar em outras linhagens (adipócitos, condrócitos e osteócitos), de expressar marcadores celulares característicos (CD105 e CD90) e de formar esferoides. Por outro lado, as células tiveram aumento da concentração de DNA na cauda a partir da quinta passagem, e redução da sua viabilidade a partir da sexta passagem.

Outros estudos já revelaram um aumento de danos no DNA em células após o processo de criopreservação observados pelo ensaio do cometa (PU et al., 2016; MARINO et al., 2021). Neste aspecto, considera-se que o impacto da criopreservação, bem como do processo de descongelamento, podem ser fatores estressores para as células (LEN et al., 2019), podendo levar a danos no seu DNA. A hipótese é que as espécies reativas de oxigênio (EROs), formadas durante estes dois processos, ao reagirem com constituintes celulares (proteínas, DNA e lipídeos) podem resultar em quebras de fita dupla e simples quando a produção de EROs for suficiente para sobrecarregar as respostas a danos no DNA envolvidas na criopreservação, como as proteínas p53, RAD51 e yHDAX (BAI et al., 2018; LEN et al., 2019). Ou seja, embora as células tenham mecanismos para eliminar o excesso de EROs, eles estariam oprimidos durante a criopreservação podendo, assim, afetar vários processos celulares e induzir a danos aos ácidos nucleicos (TEMPLE et al., 2005; HALLIWELL, 2006).

O efeito do crioprotetor também é um fator bastante discutido. No protocolo adotado, foi utilizado o DMSO (10%), o qual é comumente usado para criopreservar células de mamíferos por ser de baixo custo e ter toxicidade relativamente baixa (MIYAGI-SHIOHIRA et al., 2015). Em estudo semelhante (YONG et al., 2015), foi verificado que CTM na segunda passagem mantém sua viabilidade, capacidade de diferenciação, taxa de proliferação e fenótipo normal quando armazenadas com este agente (concentração=10%) por 12 semanas. Já em outro (ANTEBI et al., 2019), observou-se diminuição da proliferação, da viabilidade, das propriedades anti-inflamatórias e aumento da apoptose celular devido ao processo de criopreservação com DMSO (concentração=10%) por 7 semanas. Por isso, devem ser considerados dois pontos quanto ao crioprotetor de escolha, que são a permeabilidade da célula a ele e qualquer toxicidade química que a célula possa sofrer com este agente (HUNT, 2019). Recomenda-se que o DMSO seja usado dentro de concentrações padrão (5-15%) (BAUST, 2005), por

apresentar característica de crioprotetor penetrante na célula (HUNT, 2019) e considera-se que seus efeitos deletérios são normalmente gerados após a exposição por muitas horas ou dias em cultura a 37° C; condições diferentes daquelas experimentadas durante a criopreservação em laboratório (HUNT, 2019). O protocolo adotado neste estudo condiz com estas recomendações e está de acordo com trabalho de Yong et al. (2015), no qual não houve diferença significativa entre a viabilidade das CTM criopreservadas com 5% de DMSO comparada à criopreservação padrão (10% de DMSO + 90% SBF). No entanto, vale ressaltar que em trabalho de Yong et al. (2015) as células foram avaliadas somente na segunda passagem.

A partir do que foi descrito, entende-se que o procedimento adotado durante o descongelamento também é importante para preservar as funções celulares. Aplicou-se o descongelamento rápido para evitar o maior tempo de contato entre as células com o DMSO em temperatura ambiente, mas compreende-se que o processo de senescência celular pode ter exercido impacto sobre a viabilidade das células, visto que ela diminuiu nas passagens tardias (6, 8 e 10). Em trabalho de Rastegar et al. (2014) foi observada a redução da viabilidade conforme a evolução das passagens celulares. No entanto, também deve ser considerado que o momento em que a viabilidade foi analisada foi logo após o descongelamento, e que provavelmente os resultados poderiam ser revertidos se esta análise fosse realizada após um período de aclimação. Assim, tem-se que 24 horas após o descongelamento as CTM podem recuperar seus níveis de viabilidade (ANTEBI et al., 2019; BAHSOUN et al., 2019) e reconhecemos que em futuros trabalhos devemos aderir a este período de recuperação em cultura após o descongelamento.

As CTM mantiveram sua capacidade de formar esferoides após a criopreservação, independente da sua passagem ser a primeira ou a décima. Embora as discussões a respeito do uso de esferoides de células-tronco em ensaios clínicos ainda estejam no início, testar se estas células após serem criopreservadas mantêm sua capacidade de se organizar em um ambiente 3D é importante por uma série de motivos. Ensaios *in vitro* e pré-clínicos revelam que esferoides formados por CTM apresentam efeitos potencialmente maiores quando comparados a injeção sozinha de células-tronco cultivadas em monocamada. Eles secretam mais fatores bioativos, aumentando a cicatrização de feridas (HSU; HSIEH, 2015), promovem regeneração óssea (SUENAGA et al., 2015), cardiomiogênica (LIU et al., 2013), hepática (LIU; CHANG, 2006) e atenuam a inflamação presente na colite experimental (MOLENDIJK et al., 2016), por

exemplo. Além disso, a injeção deles pode diminuir o processo de perda das células no momento do transplante (XU et al., 2020).

Embora não sejam encontrados muitos estudos que avaliem a formação de esferoides com CTM humanas para estabelecer comparações com os dados apresentados, em pesquisa recente (JEONG et al., 2020) identificou-se a possibilidade de criopreservá-los pelo método de vitrificação, o qual foi mais recomendado que o método de congelamento lento. Além disso, conforme o tamanho dos esferoides aumenta (área e diâmetro), ocorre o mesmo com sua viabilidade. Assim, entende-se que juntamente com outros estudos contribuímos para levantar novas discussões que permitem ampliar as possibilidades de infusão de CTM em tratamentos clínicos futuros, com benefícios possivelmente maiores em humanos comparado à infusão de células únicas, mas que requer mais investigações.

Em conclusão, este trabalho forneceu evidências importantes de que a criopreservação a -196°C por 12 semanas com DMSO (10%) pode garantir a estabilidade da viabilidade e segurança genômica até a quarta passagem de CTM isoladas do tecido adiposo de humanos. Além disso, o fenótipo, a capacidade de diferenciação e de formar esferoides permanecem inalterados. Assim, aconselha-se que sob as condições do protocolo adotado, e com o intuito de que estas células sejam utilizadas em transplantes futuros, o seu uso ocorra até a passagem celular descrita para garantir adequado tratamento clínico.

6. Artigo 3: Transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo na doença de Crohn refratária: revisão sistemática

Luana Bernardi^{1,4}

Carlos Henrique Marques dos Santos²

Verônica Assalin Zorgetto Pinheiro¹

Rodrigo Juliano Oliveira^{1,3}

Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva^{1,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Departamento de Coloproctologia, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Campo Grande, MS, Brasil.

³Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo

Introdução: Há diferentes opções de tratamento para a doença de Crohn, porém, em alguns casos, há a necessidade de outras abordagens terapêuticas, como o uso de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. **Objetivo:** Revisar sistematicamente a literatura para determinar as diferentes formas de administração das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em seres humanos com doença de Crohn refratária luminal e fistulizante perianal. **Método:** Buscaram-se artigos publicados entre 2008 e 2018 nas bases de dados PubMed e ScienceDirect, pelos descritores: Crohn's disease, fistulizing Crohn's disease, luminal Crohn's disease e transplantation of mesenchymal stem cells ou mesenchymal stem cell ou stromal cells. Treze artigos foram selecionados. **Resultados:** Somente um trabalho se referiu à doença luminal. A quantidade de células administradas foi variável, obtendo-se principalmente do tecido adiposo subcutâneo por lipoaspiração. Destacou-se o transplante autólogo (08), com a infusão exclusiva de células-tronco mesenquimais. Os procedimentos realizados no pré-transplante foram principalmente o de curetagem, colocação de setons e suturação com

fio absorvível; e de realização de exames e tratamento medicamentoso para a doença luminal. No transplante, ocorreu a injeção das células por todo o trajeto fistuloso, principalmente nas paredes do trato. **Conclusão:** Embora o uso de células-tronco mesenquimais seja promissor, o transplante na região luminal deve ser mais investigado. A injeção exclusiva de células-tronco mesenquimais é mais explorada quando comparada ao tratamento conjunto com outros produtos. A forma de preparo do trato fistuloso e o local de transplante envolve cuidados médicos padronizados na maioria dos estudos.

Palavras-chave: Doença de Crohn. Transplante de Células-Tronco Mesenquimais. Tecido Adiposo.

Introdução

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) que compromete a saúde do indivíduo, por ser uma condição crônica e recidivante do trato gastrointestinal¹. Entre as complicações mais comuns desta doença, tem-se as fístulas perianais, as quais se formam quando há uma conexão anormal entre a parede intestinal e outro órgão ou com a pele⁷. A sua prevalência varia geograficamente, sendo o Brasil o único país da América Latina considerado com alta incidência de casos². Além disso, as fístulas perianais podem afetar cerca de 28% dos pacientes dentro de 20 anos após o diagnóstico¹⁴.

Embora existam diferentes opções para controle da condição clínica, há pacientes refratários aos tratamentos disponíveis, e que necessitam de outras opções terapêuticas para controlar a inflamação gastrointestinal ou promover o processo de cicatrização das fístulas, sem efeitos. O uso de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido adiposo tem mostrado benefícios, sendo capaz de melhorar a regeneração ou reparo de tecidos danificados²⁴. Sua eficácia se deve principalmente ao potencial anti-inflamatório e imunomodulador³, sendo que grande parte dos tratamentos não declaram a ocorrência de reações adversas associadas ao transplante¹⁰. Além disso, elas têm alta capacidade de proliferação e diferenciação. Embora possam ser isoladas de diferentes tecidos, a obtenção por meio da gordura é considerada a maior fonte, por conferir baixa morbidade e desconforto ao paciente, além de poderem ser obtidas em grandes quantidades e por meio de técnicas fáceis de isolamento²².

Ainda é controverso na literatura a forma de manejo mais adequada para o transplante das CTM. Como exemplo, tem-se uma variedade de agentes administrados em fístulas perianais, como cola de fibrina, plugues, solução de glicose hiperosmolar e

doxíciclina, entre outros²⁰, sendo alguns inseridos juntamente com as células-tronco. Além disso, nota-se uma disparidade sobre a melhor localização corpórea do tecido adiposo para obtenção das CTM, a quantidade destas células que está sendo administrada na terapia, o tipo de transplante, entre outros fatores discutíveis. Assim, o objetivo deste estudo foi revisar sistematicamente a literatura para determinar as diferentes formas de administração das CTM derivadas do tecido adiposo em seres humanos com doença de Crohn refratária luminal e fistulizante perianal.

Métodos

Foram avaliados artigos (últimos 10 anos) da base de dados PubMed e ScienceDirect, publicados a partir de janeiro de 2008 e dezembro de 2018 e, posteriormente, procedeu-se a busca de resumos, empregando o operador booleano *and* entre os seguintes descritores: Crohn's disease, fistulizing Crohn's disease, luminal Crohn's disease e transplantation of mesenchymal stem cells ou mesenchymal stem cell ou stromal cells.

Os artigos foram selecionados através dos seguintes critérios de inclusão: a) obter resultados favoráveis/desfavoráveis a partir do processo de intervenção no trato fistuloso perianal ou no lúmen/mucosa intestinal; b) ter amostra composta por indivíduos portadores da doença de Crohn refratária; c) ser publicado entre 2008 e 2018 e; d) trabalhos envolvendo tratamento com CTM derivadas do tecido adiposo. Foram adotados os seguintes critérios de exclusão: a) estudos de revisão, editoriais, comentários ou cartas; b) sem descrição metodológica completa (objetivos, métodos e resultados); c) trabalhos que não envolvessem tratamento com CTM derivadas do tecido adiposo; d) estudos de fístulas em localização não perianal; e) estudos que incluíssem pacientes portadores de outra DII que não fosse a DC e; f) trabalhos que não envolvessem indivíduos portadores da DC refratária. Também foi considerado critério de exclusão artigos duplicados, os quais foram eliminados manualmente.

De acordo com os critérios de elegibilidade, duas autoras (LB e ACMBAS) selecionaram os estudos de modo independente em duas etapas, avaliando o título e resumo e, posteriormente, pela leitura do texto completo. Discordâncias foram resolvidas por consenso.

Intervenção com células-tronco mesenquimais na doença de Crohn luminal e fistulizante perianal

Para ambos os subtemas foram encontrados, respectivamente, um total de 11.525/7.680 artigos (PubMed: 982/522 e ScienceDirect: 10.543/7.158). Os descritores utilizados foram: *Crohn's disease* (Mesh), *luminal Crohn's disease* (TIAB), *mesenchymal stem cells transplantation* (Mesh), *mesenchymal stem cell* (Mesh) e *stromal cells* (Mesh) para ‘doença de Crohn luminal’ e *Crohn's disease* (Mesh), *fistulizing Crohn's disease* (TIAB), *mesenchymal stem cells transplantation* (Mesh), *mesenchymal stem cell* (Mesh) e *stromal cells* (Mesh) para ‘doença de Crohn fistulizante perianal’. A exclusão dos trabalhos ocorreu da seguinte forma, respectivamente: estudo de revisão, editorial, comentário ou carta (1.813/1.915); metodologia incompleta (12/9); intervenção sem o uso de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (110/134); trabalhos realizados com animais (98/86); estudos que não envolvessem indivíduos com doença de Crohn refratária (213/323); não ter sido publicado nos últimos dez anos (9.247/5.175) e; artigos duplicados (30/23). Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, permaneceram, respectivamente: 02/15 artigos (PubMed: 01/10 e ScienceDirect: 01/09), os quais foram lidos na íntegra. Em seguida, para o subtema “doença de Crohn luminal” foi excluído 01 trabalho que não estava condizente com o critério: trabalhos envolvendo tratamento com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Já para o subtema “doença de Crohn fistulizante perianal” foram excluídos mais 03 estudos que não estavam condizentes com o critério: ter amostra composta por indivíduos portadores da doença de Crohn refratária. Dessa forma, permaneceram um total de 01/12 trabalhos (Figura 8), respectivamente, que foram tabulados, com a discriminação dos itens a seguir: tipo da doença de Crohn, referência e design do estudo, número de participantes, origem das CTM, quantidade de CTM, tipo de transplante, tempo de acompanhamento (Quadro 1) e; ações prévias ao transplante das CTM, transplante das CTM (Quadro 2).

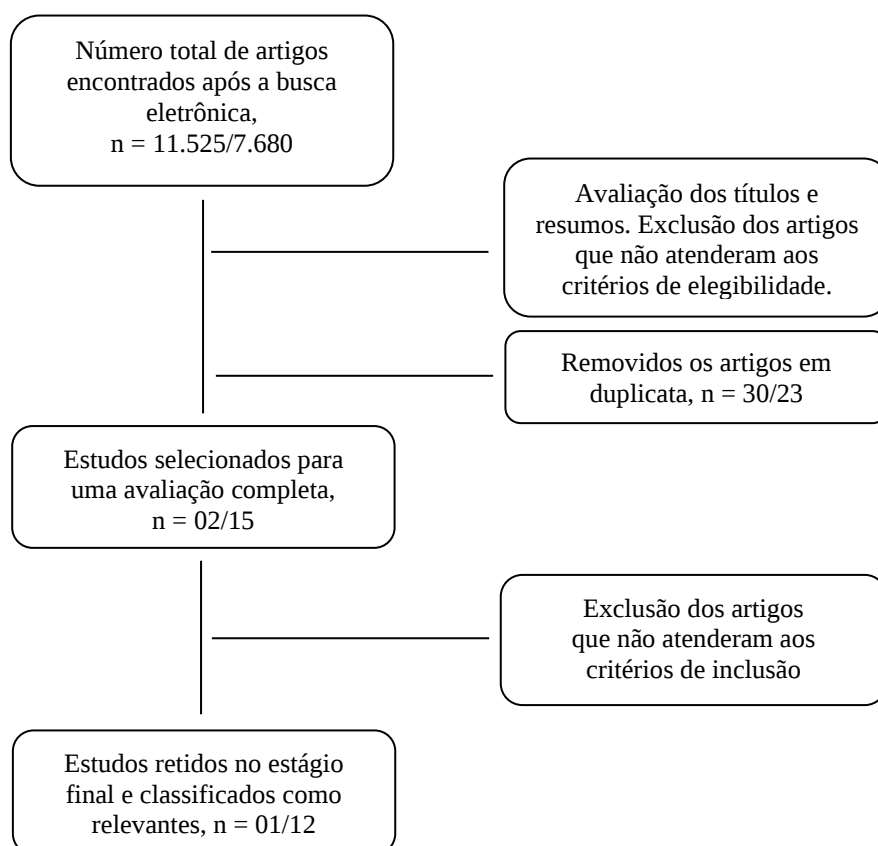


Figura 8. Fluxograma relacionado ao processo de seleção dos artigos com os temas “doença de Crohn luminal” e “doença de Crohn fistulizante perianal”, respectivamente.

Resultados

As principais características dos 13 estudos incluídos são detalhadas nos Quadros 1 e 2. Entre estes, um é sobre DC luminal²⁸ e doze são sobre DC fistulizante perianal^{6,7,11,12,15,16,18,23,24,25,26,29}.

Revisão do objetivo central

Formas de administração das CTM no trato fistuloso perianal e no lúmen intestinal de pacientes com DC refratária

Quanto à dose de CTM, o número de células transplantadas variou de 2×10^6 ²⁸ a $1,2 \times 10^8$ ^{23,24}, sendo que dois estudos infundiram um volume de células proporcional ao tamanho da fístula^{6,7} e os outros estudos infundiram a quantidade de células obtidas em cultivo, independentemente do tamanho da fístula. Em relação à infusão das células com outras substâncias, em dois estudos as CTM passaram por um pré-tratamento com interferon gama ($IFN-\gamma$)^{11,28} e somente em cinco trabalhos as CTM foram injetadas misturadas à uma solução, sendo que em um deles foi uma solução de trombina e fibrinogênio⁶, plasma rico em plaquetas²⁹ em outros dois com cola de fibrina^{6,7}.

A obtenção do tecido adiposo se deu a partir de fontes semelhantes. Dez estudos fizeram uso de tecido subcutâneo^{6,7,11,12,15,18,23,24,26,29} onde cinco obtiveram da região da abdominal^{6,12,15,18,26} um da região da coxa (Cho et al., 2013) e os demais não informaram^{7,11,16,23,24,25,28,29}. Dez estudos obtiveram o tecido adiposo por meio da técnica de lipoaspiração^{6,7,11,15,18,26,23,25,28,29}, e três também obtiveram por meio da técnica de extração para obtenção de tecido adiposo microfragmentado^{6,7,12}. Dois trabalhos não relatam nem a fonte nem a forma de obtenção do tecido adiposo^{16,28} e um relata apenas a forma de obtenção do tecido²⁵.

A comparação do método de transplante das CTM foi possível apenas para a DC fistulizante perianal. Cinco estudos realizaram transplante alogênico^{11,16,23,24,26} e oito realizaram transplante autólogo^{6,7,12,15,18,25,26,29} sendo que um destes trabalhos²⁶ realizou ou um ou outro tipo de transplante no decorrer da investigação, dependendo do paciente. Já para a DC luminal, o transplante ocorreu por infusão sistêmica²⁸.

Quanto à preparação dos tratos fistulosos para a infusão celular, onze estudos descreveram a realização dos procedimentos de curetagem^{6,7,11,12,15,16,18,23,24,25,29}, um estudo o procedimento de drenagem²⁹ dez estudos descreveram fechamento das aberturas internas com sutura absorvível^{6,7,11,12,15,18,23,26,24,25} cinco com a descrição de colocação prévia de seton e posterior retirada antes da infusão celular^{12,23,24,25,29} e dois descreveram o uso de retalhos (vaginais e/ou retais) para fechamento da abertura interna^{16,29}.

Sobre o uso de instrumentos para a infusão das células, um trabalho realizou o procedimento por meio da introdução de plugues com CTM¹², e os demais fizeram a aplicação diretamente na fístula com auxílio simples de agulha^{6,7,11,15,16,18,23,24,25,29}. A maioria realizou o procedimento de extração das CTM em ambiente laboratorial para posterior injeção destas nas fístulas. No entanto, um trabalho²⁵ realizou a injeção da fração vascular estromal derivada do tecido adiposo e o enxerto de *microfats* na fístula.

A descrição do procedimento de transplante mostrou-se homogênea na maioria dos estudos. A injeção das CTM por todo o trajeto fistuloso, principalmente nas paredes do trato, fez-se presente^{6,7,11,15,18,23,24,25}, destacando uma injeção superficial de até 2 mm em alguns trabalhos^{11,23,24}. O fechamento da fístula após a injeção celular foi citada por poucos autores, por meio da cola de fibrina^{15,18} ou sutura absorvível²⁵.

Quadro 1. Características dos estudos de transplante das células-tronco mesenquimais nas fístulas perianais e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária.

Tipo da DC	Referência e Design do estudo	Número de participantes	Origem das CTM	Quantidade de CTM	Tipo de transplante	Tempo de acompanhamento (meses)
Luminal	Taddio et al. ²⁸ Relato de caso	1	NI	2×10^6 células/kg/infusão 2 infusões	NI	NI
Fistulizante	Garcia-Olmo et al. ¹⁵ Ensaio clínico fase II	50	Subcutâneo (região abdominal) por lipoaspiração	1º dose = 2×10^7 2º dose (se necessário) = 6×10^7	Autólogo	12
	Herreros et al. ¹⁸ Ensaio clínico fase III	200	Subcutâneo (região abdominal) por lipoaspiração	1º dose = 2×10^7 2º dose (se necessário) = 6×10^7	Autólogo	12
	De La Portilla et al. ¹¹ Ensaio clínico fase I-IIa	24	Subcutâneo por lipoaspiração	1º dose = 2×10^7 2º dose (se necessário) = 4×10^7	Alogênico	6
	Cho et al. ⁶ Ensaio clínico fase I	10	Subcutâneo (região abdominal) por lipoaspiração ou subcutâneo (região da coxa) por extração	Grupo 1 = 1×10^7 Grupo 2 = 2×10^7 Grupo 3 = 4×10^7	Autólogo	8
	Cho et al. ⁷ Ensaio clínico fase II	41	Subcutâneo por lipoaspiração ou extração	Diâmetro da fístula < 1cm = 3×10^7 células/cm Diâmetro da fístula > 1cm e ≤ 2cm = 6×10^7 células/cm 2º dose (se necessário) = $4,5 \times 10^7$ células/cm	Autólogo	24
	Sanz-Baro et al. ²⁶ Série de relatos de caso	5	Subcutâneo (região abdominal) por lipoaspiração	Paciente 1 = $6,6 \times 10^7$ e 2×10^7 Pacientes 2, 3, 4 e 5: 2×10^7 e 4×10^7	Autólogo e alogênico	Paciente 1 = NI /Paciente 2 = 18 / Paciente 3 = 18 / Paciente 4 = 17 / Paciente 5 = NI
	García-Arranz et al. ¹⁶ Ensaio clínico fase I-IIa	11	NI	1º dose = 2×10^7 2º dose (se necessário) = 4×10^7	Alogênico	25

	Panés et al. ²³ Ensaio clínico fase III	107	Subcutâneo por lipoaspiração	$1,2 \times 10^8$	Alogênico	6
	Dietz et al. ¹² Ensaio clínico fase I	18	Subcutâneo (região abdominal) por extração	20×10^6 células/plugue	Autólogo	6
	Philandrianos et al. ²⁵ Ensaio clínico fase I	1	Por lipoaspiração	FVE = 150 ml / Microfats = 14 ml	Autólogo	6
	Wainstein et al. ²⁹ Ensaio clínico fase III	9	Subcutâneo por lipoaspiração	1×10^8 a $1,2 \times 10^8$	Autólogo	21 a 37
	Panés et al. ²⁴ Ensaio clínico fase III	103	Subcutâneo por lipoaspiração	$1,2 \times 10^8$	Alogênico	25

Legenda – DC: doença de Crohn; CTM: célula-tronco mesenquimal; NI: não informado.

Quadro 2. Avaliação do transplante das células-tronco mesenquimais nas fístulas perianais e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária.

Tipo da DC	Referência	Ações prévias ao transplante de CTM	Transplante de CTM
Luminal	Taddio et al. ²⁸	Realização de exame físico, colonoscopia, ressonância magnética e exames laboratoriais. Tratamento medicamentoso com dapsona e prednisona. Pré-tratamento das células com IFN-gama	Realização de 2 infusões sistêmicas de CTM.
Fistulizante	Garcia-Olmo et al. ¹⁵	Curetagem dos tratos fistulosos e fechamento da abertura interna com pontos de Vicryl	Injeção das CTM, com agulha longa e fina, nas paredes do trato: metade nos canais interesfinctéricos e adjacentes à abertura interna e metade nas paredes do trato na direção da abertura externa. Selagem dos tratos com cola de fibrina.
	Herreros et al. ¹⁸	Curetagem dos tratos fistulosos e fechamento da abertura interna com pontos de Vicryl	Injeção das CTM, com agulha longa e fina, nas paredes do trato: metade nos canais interesfinctéricos e adjacentes à abertura interna e metade nas paredes do trato na direção da abertura externa. Selagem dos tratos com cola de fibrina.
	De La Portilla et al. ¹¹	Curetagem dos tratos fistulosos, fechamento da abertura interna com sutura absorvível e pré-tratamento das células com IFN-gama	Injeção das CTM, com agulha longa e fina, nas paredes do trato: metade nos canais interesfinctéricos e adjacentes à abertura interna e metade nas paredes do trato na direção da abertura externa. Injeção superficial (até 2mm)
	Cho et al. ⁶	Curetagem dos tratos fistulosos e fechamento da abertura interna com pontos de Vicryl	Injeção das CTM, com seringa dupla, nas paredes do trato: toda a fístula foi preenchida com uma solução de trombina, fibrinogênio e CTM. O volume de células foi proporcional ao tamanho da fístula
	Cho et al. ⁷	Curetagem dos tratos fistulosos e fechamento da abertura interna com pontos de Vicryl	Injeção das CTM, com seringa dupla, nas paredes do trato: toda a fístula foi preenchida com uma solução de cola de fibrina e CTM. O volume de células foi proporcional ao tamanho da fístula
	Sanz-Baro et al. ²⁶	Fechamento da abertura interna com sutura absorvível	Injeção das CTM na mucosa retal, próximo a abertura interna
	García-Arranz et al. ¹⁶	Curetagem dos tratos fistulosos e adição de retalho vaginal ou retal (se necessário)	Injeção das CTM na área submucosa do trato da fístula e na abertura vaginal
	Panés et al. ²³	Curetagem dos tratos fistulosos e se necessário colocação de seton. Remoção do seton e suturação da abertura interna com sutura absorvível de poliglactina	CTM foram injetadas com uma agulha longa e fina, sendo metade da dose infundida através do canal anal no tecido ao redor da abertura interna da fístula, e a outra metade através da abertura externa nas paredes da fístula, fazendo várias microbolhas neste processo. Injeção superficial (até 2mm)

	Dietz et al. ¹²	Curetagem dos tratos fistulosos, colocação de seton com posterior remoção	Colocação intra-operatória de um plugue preenchido com CTM, o qual foi passado através do trato e fixado na abertura interna da fístula usando 4 a 6 suturas. Abertura externa foi alargada para permitir drenagem adequada
	Philandrianos et al. ²⁵	Curetagem dos tratos fistulosos e se necessário colocação de seton. Remoção do seton e suturação da abertura interna com sutura absorvível	Injeção da FVE, com agulha de 25 G, na parede da fístula e no tecido adjacente; e injeção de microfats, com uma cânula de 21 G, ao redor da fístula. A abertura interna foi fechada com suturas absorvíveis.
	Wainstein et al. ²⁹	Curetagem dos tratos fistulosos, colocação e remoção posterior de seton e fechamento da abertura interna com retalho endorretal	Injeção das CTM com PRP, com agulha, na abertura interna da fístula e nos tratos fistulosos.
	Panés et al. ²⁴	Curetagem dos tratos fistulosos e se necessário colocação de seton. Remoção do seton e suturação da abertura interna com sutura absorvível de poliglactina	Injeção das CTM, com agulha longa e fina, nas paredes do trato: metade através do canal anal no tecido ao redor da abertura interna da fístula, e a outra metade através da abertura externa nas paredes da fístula. Injeção superficial (até 2mm)

Legenda – DC: doença de Crohn; CTM: célula-tronco mesenquimal; NI: não informado; INF: interferon; FVE: fração vascular estromal; PRP: plasma rico em plaquetas.

Discussão

Características dos estudos de transplante das células-tronco mesenquimais no trato fistuloso e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária

Este estudo mostra o interesse crescente pelo transplante de CTM derivadas do tecido adiposo por diferentes técnicas, porém com o objetivo comum de potencializar o tratamento de pacientes com DC refratária que têm ou não fístulas perianais. Os resultados indicam que a literatura carece quando este enfoque se volta para pacientes com DC luminal. Em recente revisão de literatura²², observa-se que infusões sistêmicas de CTM para tratar DC luminal têm sido experimentadas, sendo a fonte destas células preferencialmente a medula óssea. Em trabalho de Bor et al.³, apenas quatro estudos com o objetivo de tratar a DC luminal com a infusão sistêmica de CTM foram levantados. Entre estes, três tinham como fonte a medula óssea e um o cordão umbilical. Estes fatos contribuem para justificar o enquadramento de apenas um trabalho nesta revisão, sugerindo que devam haver mais tentativas que façam uso do tecido adiposo como fonte.

A quantidade de células transplantadas variou entre os estudos. Isto pode ser justificado pelas diferentes técnicas de isolamento e cultura *in vitro*, o que faz com que protocolos distintos exerçam diferentes influências sobre o crescimento das CTM. Assim, o uso de meios de cultura diversos, a densidade e hipóxia celular, uso de frascos de cultura de tamanhos diferentes, bem como a adição de fatores de crescimento durante o cultivo, além das características do doador (idade, sexo, etnia, índice de massa corporal e histórico médico), tipo de tecido adiposo (amarelo/marrom) e localização (subcutâneo/gordura visceral)⁴, podem interferir no resultado final. Alguns estudos descreveram o uso de suplementos que auxiliam no processo de expansão celular, como o soro bovino fetal^{6,12,15,16,23,24}, albumina humana¹¹ e fator de crescimento de fibroblasto^{6,7}. No entanto, a dosagem ideal para aumentar as taxas de cura permanece como uma questão importante a se definir, juntamente com o momento ideal para injeções repetidas e a otimização dos protocolos de tratamento²⁰.

Embora não seja o foco desta revisão a análise dos protocolos de isolamento e expansão das células-tronco, a sua padronização pode garantir que terapias baseadas em CTM se tornem abordagens generalizadas. Sobre este aspecto, há uma pequena disparidade entre o local em que o tecido adiposo é obtido nos artigos analisados. Entre aqueles que disponibilizaram a informação, o tecido adiposo da região subcutânea foi o mais requerido, principalmente pela técnica de lipoaspiração. Alguns tecidos são mais ricos em células-tronco, o que faz com que sejam mais utilizados²². Realmente o tecido

adiposo subcutâneo é considerado uma fonte facilmente acessível em grandes quantidades por procedimentos minimamente invasivos (aspiração ou lipoaspiração)⁴. A lipoaspiração é pouco invasiva, de baixo custo e fornece um número adequado de células mesmo em pequenas quantidades²². Além disso, o abdômen é o local mais comum de coleta de gordura, seguido das regiões trocantérica e interior das coxas e joelhos¹⁹, o que também está de acordo com os estudos desta revisão.

Obtendo-se quantidades suficientes de CTM *in vitro*, a aplicação clínica destas no paciente pode ocorrer de forma autóloga ou alogênica²². Ressalva-se que a habilidade de inibir respostas imunes³ confere também às CTM a proteção contra rejeição à transplantes. No entanto, o risco de CTM alogênicas serem rejeitadas por pacientes imunocompetentes é maior⁵. Nesta revisão a maioria dos estudos enquadrados optou por transplante autólogo [08]. Este tipo de transplante é considerado a melhor opção, pois as chances de estimular uma resposta imunológica no organismo é praticamente nula²². Outro ponto a se considerar é que a sobrevivência das CTM autólogas no organismo é superior comparado a um material que provém de um doador⁵.

Quanto ao produto que pode ser transplantado no paciente com DC refratária, diferentes alternativas foram utilizadas nos artigos, como o uso exclusivo de CTM^{6,7,11,12,15,16,18,23,24,26,29}, da Fração Vascular Estromal (FVE) e de *microfats*²⁵. O mecanismo de regeneração tecidual pela FVE e do enxerto de pequenas partículas de gordura (*microfats*), vêm sendo investigado⁹. A FVE consiste em uma população heterogênea de células, incluindo CTM, porém com presença variável destas entre os pacientes ($\approx 3\%$ da FVE é composta por CTM)¹⁷. Salgado et al.²⁷ afirmam que esta fração é capaz de promover angiogênese, cicatrização de feridas e diferenciação das células-tronco, o que seria atribuído aos efeitos parácrinos das suas células. Além disso, o transplante de *microfats* é associado à correção de cicatrizes e regeneração de feridas, por exemplo⁹. No entanto, Philandrianos et al.²⁵, mesmo obtendo bons resultados, apresentaram o primeiro relato da literatura que fez uso combinado destes dois produtos para tratar fístulas perianais na DC, o que suscita a necessidade de mais trabalhos comparando a eficácia dos três tratamentos.

Uma série de casos¹⁵ verificou a eficácia do tratamento de fístulas perianais enterocutâneas com CTM derivadas do tecido adiposo e com FVE. Os pacientes que receberam as CTM expandidas *in vitro* tiveram maior obtenção da cura comparado ao outro grupo. A FVE pode proporcionar bons resultados; no entanto, por apresentar uma população de células bastante heterogênea, é essencial compreender o mecanismo de ação

antes de introduzi-la na prática clínica comum, o que já vem sendo discutido muito na literatura quando o transplante é de apenas células-tronco. Por outro lado, Philandrianos et al.²⁵ ressaltam que deve ser levado em consideração a perspectiva de custo-efetividade do tratamento, uma vez que a obtenção da FVE, requer apenas algumas horas, e não semanas como é o caso das células-tronco, permitindo que a lipoaspiração e a reinjeção sejam realizadas no mesmo dia. Assim, entende-se que novas estratégias terapêuticas vêm sendo investigadas para o tratamento de pacientes com fístulas perianais associadas à DC refratária, mas que a viabilidade destes procedimentos deve ser testada em grupos maiores de indivíduos, bem como a comparação da sua eficácia.

Avaliação do transplante das células-tronco mesenquimais na fístula perianal e no lúmen intestinal de pacientes com doença de Crohn refratária

O transplante propriamente dito requer o preparo da região que irá receber o produto (CTM, FVE ou *microfats*). Os estudos do Quadro 2, que disponibilizaram informações, relataram cuidados semelhantes com os participantes antes de realizar o transplante. Três etapas se mostraram padrões, como a curetagem do epitélio dos tratos fistulosos, colocação e remoção posterior de setons e suturação dos tratos com fios absorvíveis. O processo de curetagem promove a exposição das CTM a um tecido saudável, sendo considerado um mecanismo efetivo e reconhecido entre os tratamentos. Neste processo, a colocação de setons pode ser útil por evitar a formação de abscessos, visto que mantém limpo o trajeto da fístula; mas pode levar à formação de um tecido fibrótico em alguns casos o que diminuiria o fornecimento sanguíneo local para a injeção das células. Além disso, entre os estudos que fizeram uso de setons, o momento em que foi colocado variou de 1 a 2 semanas^{23,24,25} até 4 a 6 semanas²⁹ antes da suturação da fístula e da injeção celular, com remoção imediatamente antes destas etapas. Entre as suturas absorvíveis especificadas, foram citados pontos de Vicryl e de poliglactina. Apesar de não haver restrição quanto ao tipo de material utilizado para suturar, a poliglactina está entre os mais indicados pela literatura¹⁷.

Durante o processo de injeção celular, o uso da cola de fibrina foi citado, tanto em combinação com as CTM^{6,7,18}, quanto para fechar as fistulas após a infusão das células¹⁵. Kotze et al.²⁰ descrevem que o manejo cirúrgico de retirada de setons e o processo de curetagem podem ser considerados a melhor abordagem antes de injetar a cola. Esta não é considerada um produto citotóxico, apresenta capacidade de estimular a adesão e o crescimento celular, sendo estudada como um veículo para as CTM no campo da

medicina regenerativa³⁰. Neste aspecto, o interesse pela aplicação da cola de fibrina, principalmente em tratamento conjunto com as células-tronco em fístulas perianais, está associada à capacidade de cicatrização, tanto pela ação de angiogênese da matriz de fibrina¹³ e das CTM, quanto pela capacidade de secreção de fatores de crescimento e de diferenciação celular⁸. No entanto, sua aplicação em combinação com CTM deve ser cuidadosa, visto que não há evidências científicas suficientes para sua recomendação, e também por ainda não existir um protocolo definido para seu uso¹⁷.

Diversas terapias biológicas para tratamento da DC refratária vêm sendo exploradas e foram aqui identificadas. Citam-se o uso de retalhos teciduais¹⁶, plugues preenchidos com células¹² e aplicação do plasma rico em plaquetas²⁹. O uso destas terapias em conjunto com as CTM surge pelo interesse de melhorar a eficácia do tratamento, diminuindo o risco de incontinência nos pacientes. Assim, há a necessidade de estudos que comparem a eficácia dos diferentes modos de administração das CTM, bem como se a administração direta e exclusiva das células é superior ao uso conjunto de terapias biológicas. No entanto, sabe-se que estas podem ser úteis também para manter as CTM no local administrado por um tempo maior, o que pode contribuir com um aumento das taxas de cura²¹.

Embora o tratamento baseado em CTM possa aumentar a capacidade regenerativa dos tecidos, melhorando os resultados cirúrgicos, ainda não há diretrizes cirúrgicas claras para a aplicação da terapia com células-tronco¹⁷. Nesta revisão, o local de administração destas células mostrou-se padrão na maioria dos trabalhos, com a infusão tanto nos orifícios internos quanto nos orifícios externos das fístulas, frisando a injeção nas paredes do trato fistuloso^{6,7,11,15,18,23,24,29}. Estas técnicas estão de acordo com protocolo recente publicado passo a passo sobre o tratamento de fístulas perianais com CTM¹⁷. Neste, os autores acrescentam que as células não devem ser injetadas em contato com o lúmen da fístula, nem longe das paredes do trato, uma vez que apresentam efeito local e podem estar sendo eliminadas com secreções pós operativas.

Conclusão

Conclui-se que o uso de CTM a partir do tecido adiposo é promissor, conferindo destaque principalmente para o transplante autólogo. No entanto, o transplante na região luminal deve ser mais investigado. A injeção exclusiva de CTM em fistulas perianais é mais explorada quando comparada ao tratamento conjunto com outros produtos, que devem ser utilizados com cautela e apresentar técnicas padronizadas ao serem utilizados

em estudos clínicos. Entre o transplante de CTM e da FVE, esta última vem sendo estudada, porém sem evidências o suficiente de que exerça a mesma ação eficaz sobre o processo de cicatrização de fístulas perianais. Em contrapartida, a forma de preparo da região fistulosa, bem como o local de transplante das células, mostrou-se padrão entre a maioria dos autores, demonstrando que os estudos vêm seguindo cuidados médicos semelhantes.

7. Artigo 4: Avaliação da eficácia e segurança do transplante de células-tronco mesenquimais autólogas derivadas do tecido adiposo no tratamento da doença de Crohn fistulizante refratária

Luana Bernardi^{1,4}

Carlos Henrique Marques dos Santos²

Thiago Franchi Nunes³

Jovino Nogueira da Silva Menezes⁴

Rodrigo Juliano Oliveira^{1,5}

Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli da Silva^{1,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Departamento de Coloproctologia, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Campo Grande, MS, Brasil.

³Departamento de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Campo Grande, MS, Brasil.

⁴Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande, MS, Brasil.

⁵Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica – CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo:

O tratamento de fístulas perianais na doença de Crohn (DC) representa um desafio, por haver poucas farmacoterapias para esta manifestação e pelas altas taxas de falha e recidiva. As células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido adiposo são uma opção de tratamento de fístulas, mas seu comportamento no local de injeção precisa, ainda, ser mais investigado. Avaliou-se a eficácia e a segurança do transplante autólogo de CTM derivadas do tecido adiposo de pacientes com DC fistulizante perianal refratária. Um total de 6 pacientes (18-48 anos) foram recrutados. A intervenção consistiu de três aplicações de CTM autólogas (total de 3×10^7 células), isoladas do tecido adiposo por lipoaspiração.

As avaliações ocorreram na 12^a e 24^a semana após a primeira aplicação, considerando desfechos de eficácia primários e secundários, desfechos de segurança, avaliação antropométrica e da qualidade da alimentação. Três pacientes concluíram o estudo e foram inoculadas CTM em 8 fístulas no total, não sendo observados efeitos colaterais relevantes relacionados às aplicações. Em quatro fístulas ocorreu o fechamento da abertura externa, com reepitelização local e duas destas fecharam ainda na 12^a semana. O índice de Van Assche indicou melhora de somente um dos pacientes. Por outro lado, o Índice Clínico de Atividade da Doença Perianal e a avaliação da qualidade de vida indicaram progresso para os três pacientes até o fim do estudo. Pelo Escore Endoscópico Simples da DC, dois pacientes apresentaram a doença endoscopicamente inativa ao final do acompanhamento. A maioria das medidas antropométricas se mostraram adequadas e os alimentos que tiveram baixo consumo ao longo do estudo, em conformidade para os três avaliados, foram aqueles que pertencem ao grupo dos feijões. Conclui-se que as CTM autólogas do tecido adiposo apresentam potencial clínico para tratar as fístulas perianais na DC refratária e de forma segura.

Palavras-chave: Terapia celular. Transplante de células-tronco mesenquimais. Doença de Crohn.

Introdução

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) que se caracteriza por inflamação crônica, transmural e recidivante de qualquer parte do trato gastrointestinal (TORRES et al., 2017), e que resulta da interação entre a predisposição genética, fatores ambientais e respostas imunes descontroladas (KASER et al., 2010; ZHANG et al., 2018). Pode levar à sintomas, como dor abdominal, diarreia com passagem de sangue ou muco, obstrução intestinal (BAUNGART; SANDBORN, 2012; TORRES et al., 2017), fadiga, perda de peso, febre, anemia e, ainda, lesões perianais, como fissuras, úlceras, abscessos e fístulas (PEYRIN-BIROULET et al., 2012; OTT; SCHOLMERICH et al., 2013). Outros, podem apresentar manifestações sistêmicas extra-intestinais e, juntos, estes fatores aumentam o risco de hospitalização, cirurgias e impactam na qualidade de vida (TORRES et al., 2017). A maior prevalência é em países europeus e da América do Norte, no entanto, em países recém industrializados os casos têm aumentado (NG et al., 2018). Assim, alguns estudos relatam alta incidência de DC no Brasil (MANSOUR-GHANAIE et al., 2015; NG et al., 2016^a; 2018^b), passando de 0.81 (1990) para 1.94 (2016) por 100.000 pessoas por ano em quase todas as regiões (NG et al., 2018).

As fístulas são manifestações que caracterizam uma doença penetrante (PEYRIN-BIROULET et al., 2012; OTT; SCHOLMERICH et al., 2013), sendo as do tipo perianal de maior prevalência (GRAY et al., 1965; EGLINTON et al., 2012). O seu tratamento representa um desafio, tanto por haver poucas farmacoterapias direcionadas para este tipo de manifestação (GECSE et al., 2014), sendo indicado o agente anti-fator de necrose tumoral alfa (anti-TNF- α) infliximabe (MARZO et al., 2015; AGUILERA-CASTRO et al., 2017) e o uso adjuvante de antibióticos e tiopurinas (AGUILERA-CASTRO et al., 2017), mas também porque as taxas de falha e recidiva aos tratamentos médicos e cirúrgicos combinados, são observadas em 80% e 50% dos casos, respectivamente (PANES et al., 2018). Em vista disso, há necessidade de tratamentos mais eficazes, especialmente para pacientes refratários às terapias existentes (PANES et al., 2018).

A terapia com células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido adiposo é considerada uma opção de tratamento para fístulas de pacientes com DC que não respondem aos tratamentos convencionais e/ou biológicos. Entretanto, até o momento não se sabe muito sobre o comportamento destas células dentro do local de injeção, mas o seu uso no tecido perianal prejudicado pela doença se justifica, principalmente, pelas propriedades imunomoduladoras, de regeneração tecidual, cicatrização de feridas, angiogênese e pela capacidade de migração até os locais de injúria do corpo (CARVELLO et al., 2019). Com isto, estudos vem obtendo resultados promissores em relação às terapias convencionais, com pouco ou nenhum efeito colateral (DUIJVESTEN et al., 2010; CHO et al., 2013; FORBES et al., 2014; MOLENDIJK et al., 2015; WAINSTEIN et al., 2018; AVIVAR-VALDERAS et al., 2019), mas ainda não há um estudo sendo desenvolvido com pacientes no Brasil. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e a segurança do transplante autólogo de CTM derivadas do tecido adiposo em pacientes com DC fistulizante perianal refratária.

Métodos

População estudada

Um total de 6 pacientes do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian e do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul foram recrutados e inscritos no estudo. A idade variou de 18 a 51 anos, sendo 2 deles do sexo feminino e todos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da inscrição.

Os seguintes critérios de inclusão foram aplicados: pacientes voluntários, de ambos os sexos, com pelo menos 18 anos de idade, que tiveram diagnóstico comprovado

de DC fistulizante por biópsia ou exame histológico, refratários ao tratamento medicamentoso convencional, biológico e cirúrgico, e que aceitassem participar de todas as etapas do estudo. Ademais, imunomoduladores e medicamentos anti-TNF foram mantidos em doses estáveis ao longo do estudo.

Os critérios de exclusão adotados foram: pacientes não refratários ao tratamento medicamentoso convencional e/ou cirúrgico; com diagnóstico de doença autoimune ou doença inflamatória intestinal diferente da DC; com infecção que necessitasse tratamento com antibiótico; portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH); com história pregressa de tratamento de câncer ou de outra doença maligna, bem como com outras comorbidades, tais como doença cardíaca, doença hepática, doenças infecciosas em atividade, megacólon tóxico e aqueles com presença de tuberculose ativa confirmada por radiografia do tórax; que apresentassem condições físicas que excluíssem a possibilidade de realizar lipoaspiração; mulheres grávidas e que estivessem em período de amamentação.

Protocolo do estudo

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsinque, e o protocolo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (nº 3.690.658).

Este trabalho foi elaborado como sendo um ensaio analítico, experimental e longitudinal, para avaliar a eficácia e a segurança de CTM autólogas derivadas do tecido adiposo no tratamento de fístulas perianais refratárias na DC. Os pacientes foram alocados no grupo de intervenção e receberam o seguinte tratamento: 3 infusões de CTM, cada uma com 2 semanas de intervalo a partir da semana 0, sendo que os momentos de avaliação dos pacientes foram: (i) nos três momentos de infusão, (ii) nas 8 semanas anteriores à semana 0 (período T0 ou de pré-intervenção), (iii) nas 12 semanas após a semana 0 (período T1 ou de pós-intervenção) e (iv) nas 24 semanas após a semana 0 (período T2 ou de acompanhamento) (Figura 9).

No período T0, T1 e T2 foram avaliados o Índice Clínico de Atividade da Doença Perianal (PDAI) (IRVINE et al., 1995), o Escore Endoscópico Simples da DC (SES-CD) (DAPERNO et al., 2004), a qualidade de vida pelo Questionário de Qualidade de Vida (IBDQ) versão em português-Brasil (PONTES et al., 2004), bem como o registro de imagens fotográficas da região das fístulas. Nos períodos T0 e T2, também foi realizada avaliação da ressonância magnética de pelve pelo índice de Van Assche (VAN ASSCHE

et al., 2003), avaliação da qualidade da alimentação pelo Questionário de Frequência Alimentar para pacientes com doença de Crohn (BARRETO, 2017) adaptado conforme o Guia Alimentar para a População Brasileira (BRASIL, 2014), avaliação do estado nutricional, envolvendo o cálculo do índice de massa corporal (valores de normalidade = 18,5 a 24,9 kg/m²) (WHO, 1995), circunferência da cintura (valores de normalidade = homens < 94 cm; mulheres < 80 cm) (WHO, 1998), circunferência do braço, com posterior cálculo do seu percentual de adequação (valores de normalidade = 90 a 110%) (BLACKBURN, 1979) e análise da composição corporal (% de gordura corporal, % de massa muscular esquelética e gordura visceral) por meio de balança de bioimpedância (modelo HBF-514C).

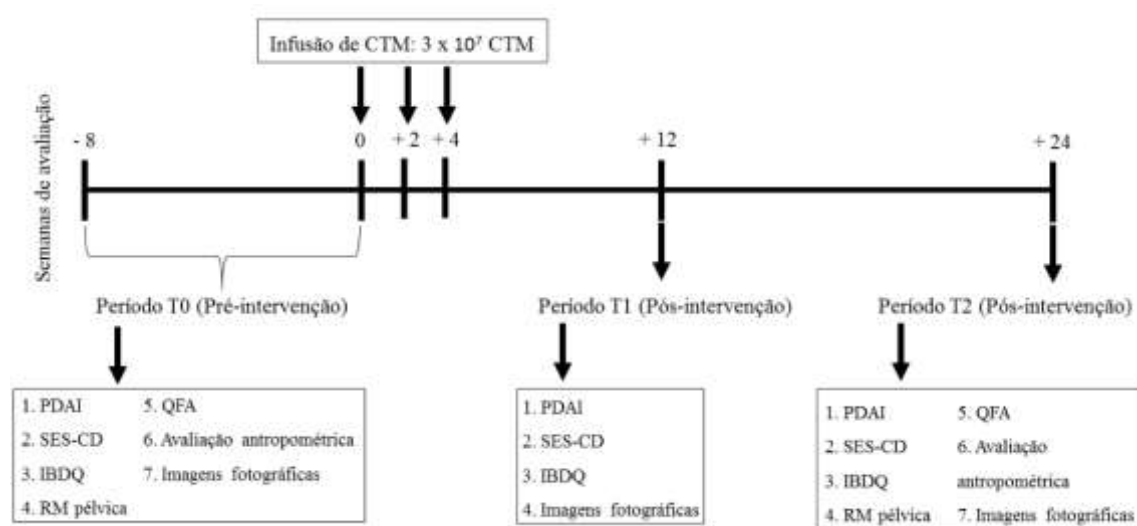


Figura 9. Visão geral do protocolo do estudo.

Preparo das células-tronco mesenquimais

As CTM foram obtidas de 20-25 mL do tecido adiposo dos pacientes, o qual foi coletado por meio de lipoaspiração da região dos flancos. Primeiramente, 200 mL de solução salina foram injetados via subcutânea para que houvesse desprendimento do estroma adiposo. Em seguida, o tecido adiposo solto foi coletado por meio de lipoaspiração com cânula própria, com calibre médio de 0,5 cm, acoplada a uma seringa de 50 mL para coleta da gordura. O material biológico foi coletado em recipiente estéril, contendo 100 mL de solução tampão fosfato (PBS; 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de KH₂PO₄, 1000 mL de água deionizada). Após, o lipoaspirado bruto foi armazenado apenas para obtenção dos dados do presente estudo, sendo posteriormente descartado em recipiente próprio para lixo hospitalar.

O processamento do lipoaspirado para extração das células foi realizado da seguinte forma: lavagem abundante do tecido adiposo com solução salina estéril, seguido de isolamento das CTM por meio de tratamento enzimático com a concentração correspondente de colagenase tipo I (Sigma®, código D5523). Após 30 minutos de digestão com agitação a 37°C, as camadas lipídicas e líquidas superiores foram centrifugadas e, posteriormente, o sobrenadante foi descartado. A fração vascular estromal (FVE) foi obtida removendo o tecido não digerido após a centrifugação e descartando o sobrenadante. Depois, a esta FVE foi adicionada uma solução de lise diluída (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO a 10%, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%), com centrifugação desta mistura. Após novo descarte do sobrenadante, a fração celular foi ressuspensa com meio de cultura e a coloração com azul de tripan foi utilizada para contar o número e a atividade das células. Para manutenção das mesmas, o meio escolhido foi Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Sigma®; número do catálogo D5523-10L) – low glucose com HEPES 10 mM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco™, número do catálogo 10091148) e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina, Sigma®, A5955. As células foram mantidas em uma incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Quando a confluência celular alcançava 80-90%, era adicionada tripsina (0,025%) para digerir as células e a suspensão celular era coletada e inoculada em novo frasco de cultivo para iniciar nova cultura (MARKARIAN et al., 2014; PESARINI et al., 2017).

Antes de serem utilizadas nos procedimentos de infusão, alguns parâmetros foram analisados para o uso clínico das CTM, como morfologia semelhante a fibroblastos, ausência de contaminação por patógenos, viabilidade >80%, capacidade de aderência ao plástico, caracterização por imunofenotipagem e potencial de diferenciação, de acordo com critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006; ROBEY, 2017). CTM na terceira passagem foram coletadas para detectar o fenótipo celular ($3,0 \times 10^5$ CTM) e a capacidade para diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica (1×10^5 CTM). A expansão celular ocorreu até a sexta passagem, sendo que as infusões nas fístulas ocorreram com as células que estavam na quarta, quinta e sexta passagem, quando foram colhidas com tripsina (0,025%) poucas horas antes de cada transplante e, transportadas para a sala da cirurgia em uma seringa estéril, em caixa que mantinha a temperatura entre 15-25°C.

Preparo da fístula e procedimento de injeção

Sob anestesia geral, o procedimento de injeção foi iniciado. Primeiramente, realizou-se a antisepsia da região perianal com solução salina e, em seguida, as fístulas e seus orifícios internos e externos foram cuidadosamente localizados com auxílio de sondas e solução salina para evitar qualquer tipo de efeito citotóxico provocado por outro material. Após, realizou-se procedimento de desepitelização dos tratos das fístulas, por meio de curetagem, especialmente nos orifícios internos, com posterior lavagem com água destilada para remoção do tecido necrótico. Após a limpeza, as aberturas internas foram fechadas com fio para sutura simples, absorvível, 2-0, sendo este fechamento confirmado pela injeção de solução salina através da abertura externa (GEORGIEV-HRISTOV et al., 2018). A suspensão de CTM, preparada na concentração de $1,6 \times 10^6$ células/mL, e distribuída em 2 seringas de 3 ml (sendo que o total infundido em cada paciente foi de 3×10^7 células após as 3 infusões), foi injetada uniformemente no orifício interno e ao redor da parede da fístula, tomando cuidado para não injetar as células nem dentro do lúmen das fístulas, nem muito longe das suas paredes.

Avaliações

A avaliação de segurança consistiu no monitoramento de possíveis eventos adversos em cada visita de estudo. Já a avaliação de eficácia, foi definida como o fechamento das aberturas externas que estavam drenando no início do estudo (T0), apesar de leve compressão com os dedos, analisada na semana 12 (T1) e na semana 24 (T2) após a primeira infusão com as CTM. O desfecho primário de eficácia ocorreu por meio de avaliação clínica em cada visita de acompanhamento e por exame de ressonância magnética de pelve. Os desfechos secundários de eficácia incluíram o PDAI, SES-CD e o IBDQ.

Resultados

População estudada

Seis pacientes foram incluídos no estudo, mas apenas três (pacientes 4, 5 e 6) concluíram o processo de intervenção e de acompanhamento nas 12 e 24 semanas, respectivamente, porque um optou por cancelar sua participação no estudo (paciente 1), outro apresentou agravamento da doença fistulizante, necessitando de colectomia e colostomia (paciente 2) e, o terceiro, não apresentou resposta ao procedimento de extração das CTM após três tentativas espaçadas (paciente 3). As características basais dos pacientes foram semelhantes (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos pacientes com doença de Crohn refratária no momento de pré-intervenção com as células-tronco mesenquimais.

Características	Pacientes					
	1	2	3	4	5	6
Idade (anos)	26	29	48	31	18	42
Sexo	M	F	M	M	F	M
Duração da doença (anos)	1	21	14	4	3	2
Histórico familiar de DII	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
Foi tabagista	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Tabagismo atual	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
Tempo de tabagismo (anos)	0	0	36	0	0	25
Cirurgias prévias	Curetagem e seton	Curetagem e seton	Curetagem, seton e Fistulectomias	Curetagem, seton, fistulectomias e hemorroidectomias	Curetagem e seton	Curetagem, seton e aplicação de cola de fibrina

Terapia biológica/imunomoduladora prévia	AZA	AZA, MES, ADA	IFX, CIPR, MTX, ADA, ranitidina, tramadol	IFX, ADA	AZA, MES, IFX, CIPR, MTX, USTE	AZA, COR, IFX, CIPR, ranitidina, omeprazol
Terapia biológica/imunomoduladora durante o estudo	AZA, ADA	AZA, MES	IU	USTE	AZA, CIPR, MTX, dipirona, tramadol	IFX, morfina, ATP, GABA

Classificação de Montreal

Idade que o diagnóstico foi estabelecido	A2	A2	A2	A2	A1	A2
Localização anatômica de maior extensão da doença	L3	L3	L3	L1	L3	L3
Comportamento clínico da doença	B3 + doença perianal concomitante	B3 + doença perianal concomitante	B3 + doença perianal concomitante	B3 + doença perianal concomitante	B3 + doença perianal concomitante	B3 + doença perianal concomitante
Número de fístulas	2	2	2	3	4	2
Tipo de fístula	Perianal	Perianal	Perianal	Perianal	Perianal	Perianal

Legenda: DII – doença inflamatória intestinal. M = masculino. F = feminino. A2 = 17 a 40 anos. A1 = ≤ 16 anos. L1 = íleo terminal. L3 = íleo e cólon. B3 = doença penetrante. AZA = azatioprina. IFX = infliximabe. ADA = adalunimabe. MES = mesalazina. CIPR = ciprofloxacina. USTE = uestequinumabe. MTX = metronidazol. IU = insulina humana. COR = corticoide. ATP = amitriptilina. GABA = gabapentina.

As CTM derivadas do tecido adiposo mostraram morfologia com aspecto de fuso (Figura 10A), expressaram os antígenos de superfície celular CD90 e CD105 e apresentaram baixa expressão de CD133 e CD34 (Figura 10B). Para confirmar o potencial de diferenciação dessas células, foram utilizados estímulos indutores de diferenciação específicos para CTM, que produziram osteócitos (Figura 10C), adipócitos (Figura 10D) e condrócitos (Figura 10E).

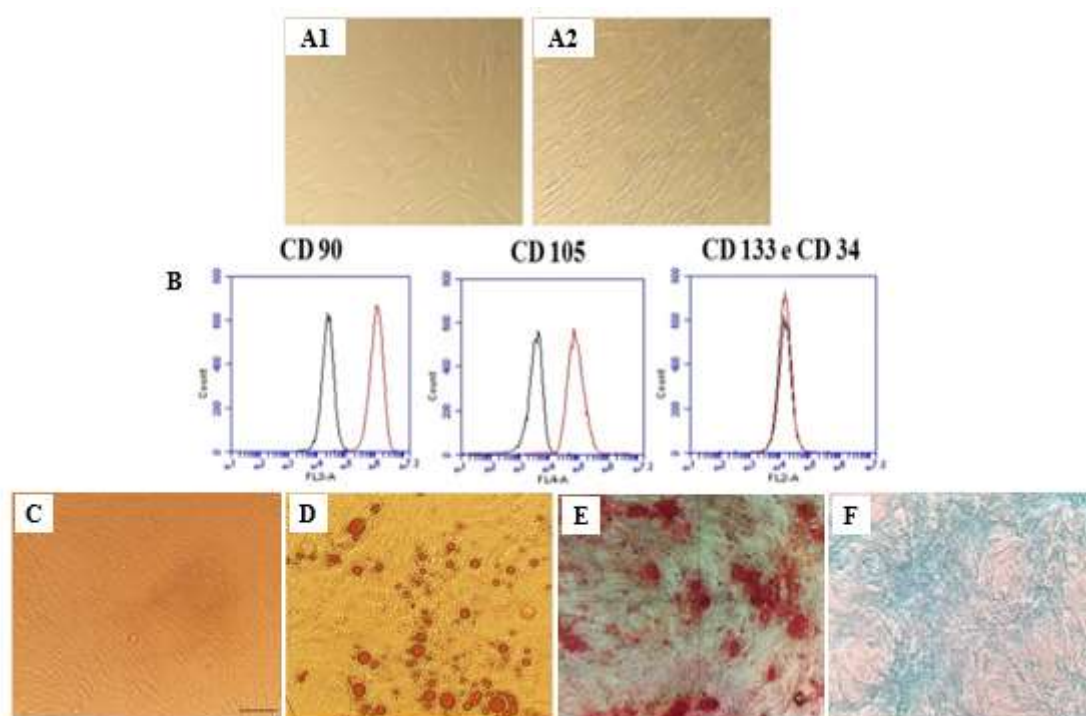


Figura 10. Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas do tecido adiposo. CTM semelhantes a fibroblastos em processo de expansão (A1) e com 80 a 90% de confluência celular (A2). Perfil imunofenotípico das CTM (B). As células expressaram os marcadores CD 90 e CD 105 e não expressaram CD 133 e CD 34. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais indiferenciadas com aspecto fibroblastóide (C); diferenciação adipogênica confirmada pela coloração de *Oil Red* (D); diferenciação osteogênica confirmada pela coloração de *Alizarin Red* (E); e diferenciação condrogênica confirmada pela coloração de *Alcian Blue* (F) (Aumento 400x).

Paciente 4

O paciente apresentava 3 fístulas perianais no período T0. Com relação ao desfecho primário da eficácia do tratamento, notou-se o fechamento da abertura externa de uma fístula no período T1, mas a piora do índice Van Assche ao final das 24 semanas de acompanhamento, indicando que os tratamentos das fístulas e o processo inflamatório interno persistem nas imagens de ressonância magnética pélvica. O índice PDAI diminuiu na 12ª semana e permaneceu satisfatório ao longo das 24 semanas de acompanhamento,

sendo que esta diminuição foi associada à melhoria da qualidade de vida até o final do estudo em todos os domínios analisados pelo IBDQ. Contudo, ressalta-se que o subdomínio emocional foi o que apresentou a menor progressão, principalmente ao final do estudo. A atividade da DC luminal se manteve como doença endoscopicamente ativa ao longo do acompanhamento, aumentando de 4 para uma pontuação de 10 (Tabela 2). Também, foi observado melhora do epitélio que circunda a região perianal, com reepitelização local, bem como cicatrização da abertura externa da fístula que fechou, diminuição do edema e das secreções na região das fístulas, comparando os períodos de pré e pós intervenção (Figura 11 A, D e G).

Nenhuma mudança relevante foi observada nas medidas antropométricas de peso, circunferência do braço, circunferência da cintura, percentual de gordura corporal e gordura visceral durante as 24 semanas de acompanhamento. Entretanto, fica evidenciada a classificação de sobrepeso alcançada ao final do período de acompanhamento e a ligeira diferença entre o peso atual e o peso usual relatado, indicando a perda de peso pelo paciente após o diagnóstico da doença. O percentual de massa muscular esquelética se manteve alto durante todo o período (Tabela 3).

Quanto à qualidade da alimentação, os grupos alimentares que apresentaram aumento do consumo diário e/ou semanal na 24ª semana foram: grupo das carnes e ovos, grupo das frutas e das raízes e tubérculos, ao passo que os demais se mantêm com baixo consumo nestas frequências, principalmente o grupo do leite e queijos, grupo dos feijões e, de forma positiva, o grupo das bebidas alcoólicas e dos alimentos ultraprocessados (Tabela 4).

Paciente 5

O paciente apresentava 3 fístulas perianais no período T0. O paciente apresentou fechamento das aberturas externas de 2 fístulas no período T2, com a melhora do índice Van Assche ao final das 24 semanas de acompanhamento. O escore PDAI apresentou redução até o fim do período do estudo, indicando melhora. A qualidade de vida melhorou seis meses após a primeira infusão com as CTM, no entanto, o subdomínio emocional apresentou piora da sua pontuação após 12 e 24 semanas de acompanhamento (Tabela 2). A atividade da DC luminal passou de doença endoscopicamente ativa para inativa ao longo do acompanhamento, diminuindo de 5 para uma pontuação de 0 (Tabela 2). A melhora do epitélio que circunda a região perianal, com reepitelização local, bem como a cicatrização da abertura externa da fístula que fechou, diminuição do edema e das

secreções na região das fístulas, podem ser observadas nos períodos de pré e pós intervenção (Figura 11 B, E e H).

A maioria das medidas antropométricas realizadas mostraram-se adequadas durante o período de acompanhamento, com exceção da circunferência do braço, na 24ª semana, que indicou desnutrição leve. Além disso, o percentual de massa muscular esquelética se manteve alto durante todo o período (Tabela 3).

A avaliação da frequência alimentar indicou que o consumo diário e/ou semanal não aumentou de maneira proporcional para nenhum grupo. No entanto, destaca-se a diminuição positiva do consumo, nestas frequências, dos alimentos dos grupos das gorduras saturadas e ultraprocessados, mas também, de forma negativa, das gorduras insaturadas, cereais, frutas, leite e queijos e do grupo dos feijões (Tabela 4).

Paciente 6

O paciente apresentava 2 fístulas perianais no período T0. No período T1, houve o fechamento da abertura externa de uma fístula, o que se manteve no período T2; no entanto, não ocorreu diminuição do índice Van Assche, que aumentou 4 pontos em relação ao T0. O escore PDAI diminuiu de 20 na linha de base para 18, mantendo-se assim no período T1 e T2, e essa diminuição foi acompanhada pela melhora da qualidade de vida, embora o subdomínio emocional não tenha apresentado evolução. A atividade da DC luminal permaneceu estável ao longo do estudo, com uma pontuação igual a 0, indicando doença endoscopicamente inativa (Tabela 2). O paciente também apresentou melhora do epitélio que circunda a região perianal, com cicatrização e reepitelização da abertura externa da fístula que fechou, diminuição do edema e das secreções na região das fístulas, comparando os períodos de pré e pós intervenção (Figura 11 C, F e I).

Fica evidenciada a perda de peso do paciente, devido a diferença entre o peso atual e o peso usual relatado, o que pode ter relação com o diagnóstico da doença. Além disso, a maioria das medidas antropométricas se mostraram inadequadas durante o período de acompanhamento, destacando-se o excesso de gordura corporal e o baixo percentual de massa muscular esquelética (Tabela 3).

Avaliando a qualidade da alimentação na 24ª semana, notou-se o aumento do consumo diário e/ou semanal para os alimentos dos grupos do leite e queijos, gorduras saturadas e insaturadas, cereais, frutas, bebidas alcoólicas, água e chás e para os ultraprocessados. Ao passo que os alimentos que se mantêm com baixo consumo são o grupo dos feijões e das raízes e tubérculos (Tabela 4).

Tabela 2. Características da doença de Crohn dos pacientes no momento de pré e pós-intervenção com as células-tronco mesenquimais.

Característica da doença	Paciente	Período do estudo		
		T0	T1	T2
PDAI	4	20	13	15
	5	22	17	18
	6	20	18	18
IBDQ	4	94	123	116
	5	84	103	112
	6	55	72	110
Índice Van Assche	4	11	NA	17
	5	15	NA	9
	6	15	NA	19
SES-CD	4	4	NA	10
	5	5	NA	0
	6	0	NA	0
Quantidade de fístulas perianais	4	3	2	4
	5	3	3	1
	6	2	1	1
Número de fístulas perianais fechadas	4	0	1	0
	5	0	0	2
	6	0	1	0

Legenda: PDAI = Perianal Disease Activity Index (Índice de Atividade da Doença Perianal). IBDQ = Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (Questionário de Qualidade de Vida). SES-CD = Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (Escore Endoscópico Simples da doença de Crohn). T0 = pré-intervenção com células-tronco mesenquimais. T1 = 3 meses pós-intervenção com células-tronco mesenquimais. T2 = 6 meses pós-intervenção com células-tronco mesenquimais. NA = não avaliado.

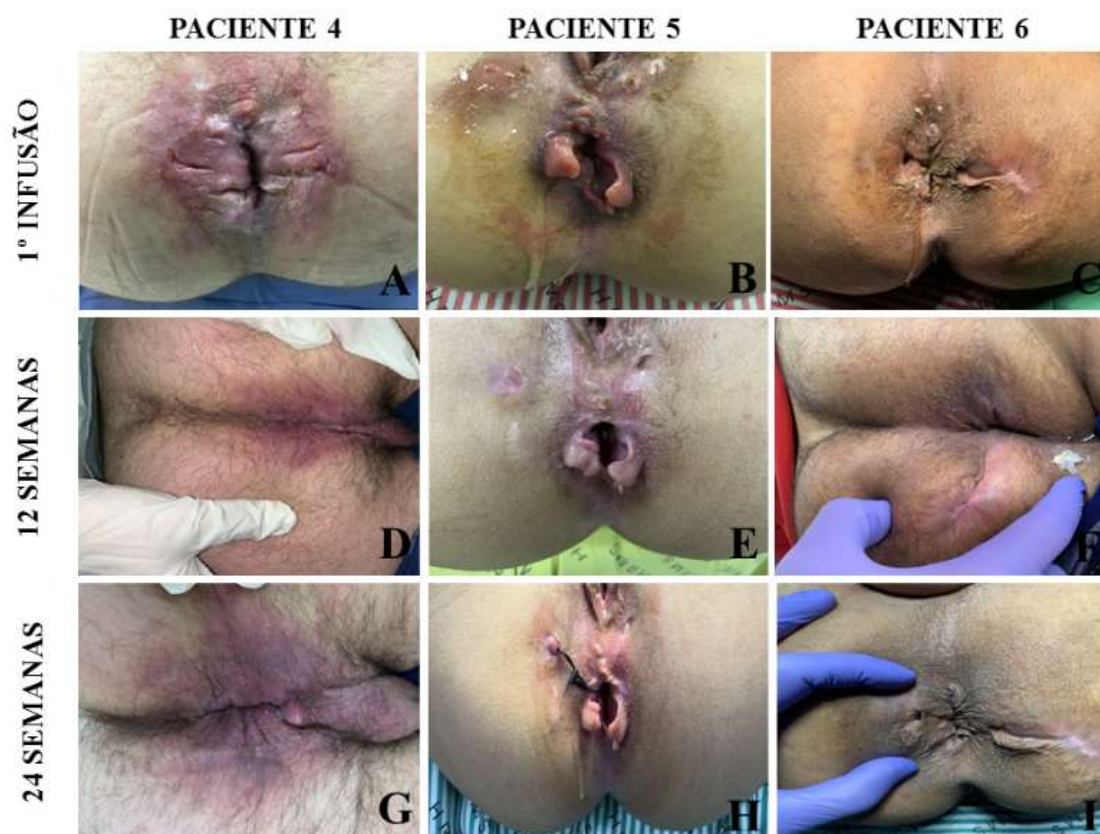


Figura 11. Representação da evolução do processo de cicatrização das fístulas perianais após injeções locais de células-tronco mesenquimais autólogas do tecido adiposo no momento da primeira injeção (A-C), 12 semanas após a primeira injeção (D-F) e 24 semanas após a primeira injeção (G-I). Em detalhes, os pacientes 4,5 e 6 apresentaram melhora do processo inflamatório perianal, com evidente diminuição do edema, aparecimento de tecido regenerativo nesta região e fechamento de algumas aberturas externas (24ª semana). Este último critério observado principalmente nos pacientes 5 e 6.

Tabela 3. Características antropométricas dos pacientes nos momentos de pré-intervenção (T0) e seis meses após a intervenção (T2) com as células-tronco mesenquimais.

Característica antropométricas	Paciente	Período do estudo		Classificação	
		T0	T2	T0	T2
PU (kg)	4	74	NA	sc	sc
	5	54	NA	sc	sc
	6	94	NA	sc	sc
PA (kg)	4	70,4	73,9	sc	sc
	5	54,2	56,9	sc	sc
	6	89,2	84,4	sc	sc
IMC (kg/m ²)	4	24	25	Eutrofia	Sobrepeso
	5	21	22	Eutrofia	Eutrofia
	6	33,0	31,0	Obesidade I	Obesidade I
CB (cm)	4	33	35	Eutrofia	Eutrofia
	5	24	23,5	Eutrofia	Desnutrição leve
	6	32	34	Eutrofia	Eutrofia
CC (cm)	4	78	81	Adequado	Adequado
	5	58	69	Adequado	Adequado
	6	110	105	Muito elevado	Muito elevado
% MME	4	44,9	44,6	Muito alto	Muito alto
	5	31	31,3	Alto	Alto
	6	27,3	26,2	Baixo	Baixo
% GC	4	11,9	11,3	Adequado	Adequado
	5	26	28	Adequado	Adequado
	6	39,6	39,3	Muito alto	Muito alto
GV	4	8	7	Adequado	Adequado
	5	3	3	Adequado	Adequado
	6	18	19	Muito alto	Muito alto

Legenda: PU = peso usual. PA = peso atual. IMC = índice de massa corporal. CB = circunferência do braço. CC = circunferência da cintura. MME = massa muscular esquelética. GC = gordura corporal. GV = gordura visceral. sc = sem classificação. cm = centímetros. T0 = pré-intervenção com células-tronco mesenquimais. T2 = 6 meses pós-intervenção com células-tronco mesenquimais.

Tabela 4. Frequência de consumo alimentar dos pacientes nos momentos de pré-intervenção (T0) e seis meses após a intervenção (T2) com as células-tronco mesenquimais.

Grupos Alimentares	Período do estudo	Frequência de Consumo												nº de alimentos avaliados
		Paciente 4				Paciente 5				Paciente 6				
		N.C	F.D	F.S	F.M	N.C	F.D	F.S	F.M	N.C	F.D	F.S	F.M	
Leite e queijos	T0	7	0	0	0	4	2	0	1	4	0	0	3	7
	T2	7	0	0	0	4	0	2	1	1	1	2	3	
Gorduras saturadas	T0	4	0	1	1	3	2	0	1	2	1	1	2	6
	T2	5	0	1	0	5	0	0	1	0	0	6	0	
Carnes e ovos	T0	4	2	1	0	3	2	1	1	2	3	1	1	7
	T2	3	3	0	1	4	0	3	0	1	3	1	2	
Gorduras insaturadas	T0	3	0	0	3	1	4	0	1	5	1	0	0	6
	T2	4	0	1	1	1	1	2	2	0	3	0	3	
Feijões	T0	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0	1	0	2
	T2	2	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	1	
Cereais	T0	8	3	0	3	6	6	2	0	7	1	1	5	14
	T2	8	0	4	2	8	3	2	1	5	4	3	2	
Frutas	T0	17	1	0	1	5	10	4	0	15	0	2	2	19
	T2	7	1	1	10	9	4	2	4	4	0	6	9	
Raízes e tubérculos	T0	3	0	1	1	2	3	0	0	2	0	3	0	5
	T2	4	1	0	0	2	3	0	0	1	0	2	2	
Legumes e verduras	T0	19	2	0	3	11	13	0	0	13	11	0	0	24
	T2	12	0	4	8	10	9	3	2	5	7	5	7	

Bebidas alcoólicas	T0	1	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	3
	T2	1	0	0	2	3	0	0	0	0	1	2	0	
Água e chás	T0	3	2	0	0	3	2	0	0	5	1	0	0	5
	T2	3	2	0	0	3	2	0	0	0	2	1	2	
Ultraprocessados	T0	22	0	1	3	4	14	8	0	13	4	4	4	26
	T2	21	0	1	4	14	0	10	2	6	10	2	6	

Legenda: N.C = não consome. F.D = frequência diária. F.S = frequência semanal. F.M = frequência mensal. T0 = pré-intervenção com células-tronco mesenquimais. T2 = 6 meses pós-intervenção com células-tronco mesenquimais.

Avaliação de segurança

Durante o período do estudo foram observados os seguintes eventos adversos: dor perianal, aumento das secreções inflamatórias, edema perianal, febre, obstipação, diarreia, diminuição da ingestão de alimentos e queda de cabelo relacionados às complicações da doença; dor moderada no local da lipoaspiração, que foi associada à coleta de gordura e foi rapidamente resolvida por analgesia oral simples (com paracetamol e tramadol); e não foi observado nenhum efeito colateral relevante associado à infusão das CTM, sendo os mais comuns dor e edema na região perianal e febre, este último somente no paciente 5, todos ocorrendo algumas horas após a administração celular.

Discussão

As fístulas perianais são uma complicação comum da DC e estima-se que podem afetar cerca de um terço dos pacientes durante a evolução da doença (SCHWARTZ et al., 2002; LAPIDUS, 2006; INGLE; LOFTUS, 2007), além de 40% apresentar recidiva mesmo após cirurgias complexas e terapia médica avançada (BISLENGHI et al., 2019). O tratamento da DC fistulizante tem mudado bastante na última década (HAAGEN NIELSEN et al., 2009), e com o advento da medicina regenerativa, baseada principalmente na terapia celular, tem sido fornecida uma abordagem promissora para tratá-la com eficácia e com efeitos colaterais reduzidos (LIGHTNER; FAUBION, 2017). Assim, este estudo mostra que o processo de injeção local de CTM autólogas do tecido adiposo, parece ser seguro, uma vez que poucos efeitos colaterais relacionados às infusões de CTM foram observados. Corroborando, não foram relatados efeitos adversos significativos em estudos com DC fistulizante de CTM autólogas administradas em fístulas (CICCOCIOPO et al., 2011; CHO et al., 2013; ZHOU et al., 2020).

Embora não tenha sido possível avaliar os pacientes por mais de seis meses, e os mecanismos de ação pelos quais as CTM exerceram dentro do local de injeção não tenham sido investigados neste trabalho, além de permanecer ainda pouco claros na literatura (LIGHTNER; FAUBION, 2017; CARVELLO et al., 2019), após três infusões celulares, o processo de cicatrização do epitélio que circunda a região perianal, o fechamento de algumas fístulas, a reepitelização da região perianal externa, a diminuição das secreções, dor e o grau de induração nesta região, a melhora endoscópica a nível de intestino grosso (pacientes 5 e 6) e do índice PDAI, bem como a diminuição do índice Van Assche (paciente 5), podem estar fundamentados, possivelmente, nos efeitos de reparo tecidual (DEVINE et al., 2003; LA PORTILLA et al.,

2013; CARVELLO et al., 2019), imunomodulatórios e anti-inflamatórios destas células (GHANNAM et al., 2010; CARVELLO et al., 2019).

Após sua aplicação nas fístulas, as células-tronco podem se diferenciar em outros tipos celulares e se enxertar em outros tecidos (ROSE et al., 2008; CASHMAN et al., 2013), exercer ação trófica sobre o tecido danificado, limitar a apoptose das células locais, recrutar células imunes para o sítio de lesão, reduzir a fibrose no órgão danificado, estimular a angiogênese (ZUK et al., 2001; CRISOSTOMO et al., 2008; CAPLAN, 2009; KACHGAL, PUTNAM, 2011) e modular o processo de cicatrização pelo estímulo à fibroblastos dérmicos e pela expressão de colágeno (KIM et al., 2007). Além disso, a diminuição e o controle da inflamação na região perianal, podem ter relação com a capacidade delas de estabelecer um contato célula-a-célula, possibilitando a diminuição da proliferação de células imunes (CORCIONE et al., 2006; KRAMPERA et al., 2003; 2006; PODOJIL et al., 2009), alteração da maturação das células apresentadoras de antígenos, diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias (AGGARWAL; PITTENGER, 2005) e a promoção do recrutamento e geração de células T reguladoras (IANNI et al., 2008; CICCOCIOPPO et al., 2011; ENGLISH, 2013). Isto se torna importante uma vez que o desequilíbrio imunológico é característico da DC e está relacionado a vários sintomas (CARVELLO et al., 2019).

Analisando os mecanismos de ação das CTM descritos acima e a situação dos indicadores que não melhoraram nos pacientes durante o período de transplantes, a hipótese levantada é a de que o processo inflamatório intenso, principalmente na região perianal, não pôde ser efetivamente controlado, resultando no não fechamento de algumas fístulas, mesmo que os pacientes continuassem a fazer uso das medicações durante a intervenção (Tabela 1). Além disso, acredita-se que neste estudo foi utilizada uma concentração total de CTM mais baixa (3×10^7 células), por não ter sido utilizado durante o cultivo celular outros fatores de crescimento além do SBF, o que se observa, por exemplo, na metodologia de outros trabalhos (CHO et al., 2013; 2015; LA PORTILLA et al., 2013). Também, pela dificuldade sentida pela pesquisadora responsável em obter uma cultura celular que atingisse confluência ideal (80-90%) de forma mais rápida, considerando este estágio de expansão da cultura demorado e trabalhoso (período de cultivo para o primeiro transplante = 3 a 4 meses). Mas, como um dos objetivos deste estudo foi avaliar a segurança, optou-se por trabalhar com doses mais baixas e administradas de forma intercalada (1×10^7 células/infusão), embora se especule que esta quantidade possa não ter sido suficiente para o alcance da eficácia clínica completa de algumas fístulas, ainda que tenham sido realizadas 3 infusões em cada paciente.

Neste estudo, outros pontos de eficácia do tratamento foram analisados. O paciente 5 apresentou melhora do escore SES-CD e, presume-se que isto pode ser compreendido tanto pela capacidade que as células-tronco tem de migrar em direção a outros locais de lesão (KARP; TEO, 2009), podendo exercer seus benefícios a nível intestinal mesmo que infundidas na região das fístulas; quanto pela possível ação combinada das células com a terapia medicamentosa utilizada durante o período de tratamento. Assim, em testes *in vitro* (DUIJVESTEN et al., 2010; 2011) e em seres humanos, quando são infundidas de forma intravenosa (KAGRAMANOVA et al., 2016), as CTM têm seus efeitos imunomoduladores aumentados quando combinadas com a terapia farmacológica para DC, ao ser comparado com o tratamento envolvendo somente as células.

Outro ponto observado, foi o impacto positivo que as infusões com CTM exerceram na qualidade de vida dos pacientes. No entanto, entre os domínios analisados pelo IBDQ, o emocional teve a pior evolução ao longo do estudo. Problemas como a ansiedade e depressão, altamente prevalentes nas DII, estão associados à pior qualidade de vida relacionada à saúde destes indivíduos (SOUZA et al., 2011; NAVABI et al., 2018; CHOI et al., 2019). Este estresse psicológico pode ter relação com a própria conscientização dos pacientes sobre seu diagnóstico crônico e recidivante (CHOI et al., 2019), mas também com a possível expectativa gerada pela intervenção proposta nesta pesquisa, podendo deixá-los ansiosos ou deprimidos e, com isso, provocar até a exacerbação da doença (GALLEY et al., 2014; CHO et al., 2015), impossibilitando que alguns indicadores avaliados melhorem mais.

Entre os pacientes avaliados, a maioria das medidas antropométricas mostraram-se adequadas, mas devido ao pequeno número de participantes torna-se difícil fechar o diagnóstico nutricional da amostra. De todo o modo, deve-se apontar o percentual alto de MME dos pacientes 4 e 5, o que não condiz com outros estudos que verificaram depleção de massa muscular na DC (BIN et al., 2007; BENJAMIN et al., 2008; ROCHA et al., 2009). Assim, esperava-se obter, a partir das medidas antropométricas analisadas, o estado de desnutrição entre os três pacientes, uma vez que a literatura indica o alto risco desta população à esta condição (BISCHOFF et al., 2020). No entanto, o excesso de peso e de gordura corporal nos pacientes 4 e 5, respectivamente, podem refletir a mudança do cenário nutricional nas DII, que é o aumento do número de casos de excesso de peso e obesidade entre os mesmos (BACK et al., 2017; BRYANT et al., 2018; DE CASTRO et al., 2019), não sendo marcada mais somente pelo baixo peso, fato que se deve principalmente a um estilo de vida cada vez mais

ocidentalizado, com dietas hipercalóricas, aumento do sedentarismo e fatores de risco genéticos predisponentes (KREUTER et al., 2019).

A avaliação do padrão alimentar na DC é importante, pois existem poucos dados na literatura sobre isto. Por meio de relatos dos pacientes, notou-se a dificuldade em manter uma alimentação variada, principalmente em momentos de atividade da doença. Os alimentos que tiveram baixo consumo ao longo do estudo, em conformidade para os três avaliados, foram aqueles que pertencem ao grupo dos feijões. Também, outros alimentos que mantiveram baixo consumo foram citados, como aqueles dos grupos do leite e queijos, ultraprocessados, cereais, raízes e tubérculos, gorduras e bebidas alcoólicas. Embora não tenha sido determinado quais experiências levaram os pacientes a ter baixa ingestão dos mesmos, muitos dos alimentos citados condizem com outros trabalhos (COHEN et al., 2013; DE CASTRO et al., 2020) como sendo itens que pioram os sintomas relacionados à doença, e que por conta disso são menos ingeridos.

As limitações deste estudo incluem o tamanho pequeno da amostra, o alto custo do tratamento proposto, o que limita para que seja amplamente promovido, bem como o período de acompanhamento dos pacientes que não pudera se estender para mais de 6 meses, visto que somente o tempo necessário para atingir a quantidade proposta de CTM para transplante foi considerado longo (3-4 meses). Ademais, para iniciar o desenvolvimento deste estudo, os autores dependeram da sua aprovação pelo Comitê Nacional de Ética, a qual foi obtida somente após 2 anos e, ainda, durante um ano, aproximadamente, do seu desenvolvimento, os procedimentos de seleção de novos participantes, lipoaspiração e posterior transplante das CTM, precisaram ser interrompidos devido ao coronavírus 2019, pois todas as etapas ocorriam e dependiam de espaços nos hospitais públicos onde este estudo foi realizado. Ainda há incerteza quanto ao maior risco de infecção de pacientes com DII ao novo vírus, e há a recomendação de que procedimentos cirúrgicos eletivos com os mesmos devem ser adiados neste momento (RUBIN et al., 2020, SAGES, 2020; CBCD, 2020). Contudo, deve-se considerar que esta é a primeira pesquisa, a nível nacional, que avalia o uso de CTM autólogas do tecido adiposo em fístulas perianais refratárias de pacientes com DC atendidos em hospitais públicos, e que sua aprovação ética permite a continuidade futura dos procedimentos com novos pacientes.

Em conclusão, os dados sugerem que a injeção de CTM autólogas advindas do tecido adiposo é possível e bem tolerada. Além disso, a aplicação destas demonstrou produzir

benefícios clínicos a este grupo de pacientes, e melhora da sua qualidade de vida, com potencial para tratar as fístulas perianais da DC, o que encoraja a realização de outros estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, A.T.; KENNEDY, N.A.; HANSEN, R.; VENTHAM, N.T.; O'LEARY, K.R.; DRUMMOND, H.E.; et al. Two-stage genome-wide methylation profiling in childhood-onset Crohn's disease implicates epigenetic alterations at the VMP1/MIR21 and HLA Loci. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 20, n. 10, p. 1784–1793, 2014.
- AGHDASSI, E.; WENDLAND, B.E.; STAPLETON, M.; RAMAN, M.; ALLARD, J.P. Adequacy of nutritional intake in a Canadian population of patients with Crohn's disease. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 107, n. 9, p. 1575-80, 2007.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- AGUILERA-CASTRO, L.; FERRE-ARACIL, C.; GARCIA-GARCIA-DE-PAREDES, A.; RODRIGUEZ-DE-SANTIAGO, E.; LOPEZ-SANROMAN, A. Management of complex perianal Crohn's disease. *Annals of Gastroenterology*, v. 30, n. 1, p. 33-44, 2017.
- AHMED, I.; ROY, B.C.; KHAN, S.A.; SEPTER, S.; UMAR, S. Microbiome, Metabolome and Inflammatory Bowel Disease. *Microorganisms*, v. 4, n. 2, p. 20, 2016.
- ALEKSANDROVA, K.; ROMERO-MOSQUERA, B.; HERNANDEZ, V. Diet, gut microbiome and epigenetics: emerging links with inflammatory bowel diseases and prospects for management and prevention. *Nutrients*, v. 9, n. 9, p. 962, 2017.
- ALVES, H.; MUNOZ-NAJAR, U.; DE WIT, J.; RENARD, A.J.; HOEIJMAKERS, J.H.; SEDIVY, J.M.; et al. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multipotency of human mesenchymal stromal cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 14, n. 12, p. 2729–2738, 2010.
- AMRE, D.K.; D'SOUZA, S.; MORGAN, K.; SEIDMAN, G.; LAMBRETTE, P.; GRIMARD, G.; et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 102, n. 9, p. 2016–2025, 2007.
- AMERICAN GASTROENTROLOGICAL ASSOCIATION (AGA). American Gastroenterological Association medical position statement: perianal Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 125, n. 5, p. 1503-1507, 2003.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N.; KHALILI, H.; KONIJETI, G.G.; HIGUCHI, L.M.; DE SILVA, P.; FUCHS, C.S. et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, v. 63, p. 776–84, 2014.

- ANANTHAKRISHNAN, A.N. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 12, n. 4, p. 205–217, 2015.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N.; BERNSTEIN, C.N.; ILIOPOULOS, D.; MACPHERSON, A.; NEURATH, M.F.; ALI, R.A.R.; et al. Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 15, p. 39–49, 2018.
- ANTEBI, B.; ASHER, A.M.; RODRIGUEZ, L.A.; et al. Cryopreserved mesenchymal stem cells regain functional potency following a 24-h acclimation period. *Journal of Translational Medicine*, v. 17, p. 297, 2019.
- ANKRUM, J.A.; ONG, J.F.; KARP, J.M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, v. 32, p. 252–260, 2014.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 338, de 20 de fevereiro de 2020. Dispõe sobre o registro de produto de terapia avançada e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-338-de-20-de-fevereiro-de-2020-244803291>.
- ARDIZZONE, S.; PORRO, G.B. Perianal Crohn's disease: overview. *Digestive and Liver Disease*, v. 39, n. 10, p. 957-8, 2007.
- ARUTYUNYAN, I.; ELCHANINOV, A.; MAKAROV, A.; FATKHUDINOV, T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells International*, v. 2016, n. 6901286, 2016.
- ARPÓN, A.; MILAGRO, F.I.; RAZQUIN, C.; CORELLA, D.; ESTRUCH, R.; FITÓ, M.; et al. Impact of consuming extra-virgin olive oil or nuts within a Mediterranean diet on DNA methylation in peripheral white blood cells within the PREDIMED-Navarra randomized controlled trial: a role for dietary lipids. *Nutrients*, v. 10, n. 1, p. 15, 2017.
- ASMA, L.; MERIEM, S.; NADIA, B.M.; MONIA, F.; JALEL, B.; AZZA, F. La transplantation de cellules souches comme thérapie de sauvetage au cours de la maladie de crohn réfractaire: une revue systématique de la littérature. *La Tunisie Medicale*, v. 92, n.11, 2014.
- ATARASHI, K.; TANOUE, T.; OSHIMA, K.; SUDA, W.; NAGANO, Y.; NISHIKAWA, H.; et al. T_{reg} induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*, v. 500, p. 232–236, 2013.
- AVIVAR-VALDERAS, A.; MARTÍN-MARTÍN, C.; RAMÍREZ, C.; DEL RÍO, B.; MENTA R.; MANCHEÑO-CORVO, P.; et al. Dissecting Allo-Sensitization After Local Administration

of Human Allogeneic Adipose Mesenchymal Stem Cells in Perianal Fistulas of Crohn's Disease Patients. *Frontiers in Immunology*, v. 14, n. 10, p. 1244, 2019.

AYALA-CUELLAR, A.P; KANG, J.H; JEUNG, E.B; CHOI, K.C. Roles of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration and Immunomodulation. *Biomolecules & Therapeutics*, v. 27, n. 1, p. 25-33, 2019.

AZQUETA, A.; GUTZKOW, K.B.; BRUNBORG, G.; COLLINS, A.R. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research*, v. 724, p. 41–45, 2011.

AZQUETA, A.; ENCISO, J.M.; PASTOR, L.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; VETTORAZZI, A. Applying the comet assay to fresh vs frozen animal solid tissues: a technical approach. *Food and Chemical Toxicology*, v. 132, p. 110671, 2019.

AZQUETA, A.; et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: an COMET perspective. *Mutation Research*, v. 783, p. 108288, 2020.

BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Crohn's disease. *The Lancet*, v. 380, p. 1590-1605, 2012.

BAUCH, T.; BÖCKER, W.; MALLEK, U.; MÜLLER, W.U.; STREFFER, C. Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlentherapie und Onkologie*, v. 175, n. 7, p. 333-40, 1999.

BAUST, J.M. Advances in media for cryopreservation and hypothermic storage. *BioProcess International*, v. 3, p. 46-56, 2005.

BARRETO, L.M.R. Avaliação da densidade mineral óssea e da composição corporal em portadores de doença de Crohn. [Dissertação]. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP, 2017.

BACK, I.R.; MARCON, S.S.; GAINO, N.M.; VULCANO, D.S.B.; DORNA, M.S de.; SASSAKI, L.Y. BODY COMPOSITION IN PATIENTS WITH CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 54, n. 2, p. 109-114, 2017.

BARRETT, J.C.; HANSOUL, S.; NICOLAE, D.L.; CHO, J.H.; DUERR, R.H.; RIOUX, J.D.; et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature Genetics*, v. 40, p. 955–962, 2008.

BAI, C.; GAO, Y.; LI, Q.; FENG, Y.; YU, Y.; MENG, G.; ZHANG, M.; GUAN, W. Differentiation of chicken umbilical cord mesenchymal stem cells into beta-like pancreatic islet cells. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, v. 43, n. 2, p. 106–111, 2015.

- BAI, L.; BEST, O.G.; XIA, W.; PETERS, L.; WONG, K.; WARD, C.; et al. DNA Damage in Haemopoietic Stem Cells Impacts on Neutrophil and Platelet Engraftment Following Autologous Transplantation. *Blood*, v. 132, p. 4622, 2018.
- BAHSOUN, S.; COOPMAN, K.; AKAM, E.C. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *Journal of Translational of Medicine*, v. 17, n. 1, p. 397, 2019.
- BARBALHO, S. M.; GOULART, R. A.; BECHARA, K. Q. M. D.; CARVALHO, A. C. A. Inflammatory bowel disease: can omega-3 fatty acids really help? *Annals of Gastroenterology*, v. 29, n. 1, p. 37–43, 2016.
- BEERAVOLU, N.; MCKEE, C.; ALAMRI, A.; MIKHAEL, S.; BROWN, C.; PEREZ-CRUET, M.; et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human umbilical cord and fetal placenta. *Journal of Visualized Experiments*, v. 122, p. e55224, 2017.
- BENCHIMOL, E.I.; KAPLAN, G.G.; OTLEY, A.R.; NGUYEN, G.C.; UNDERWOOD, F.E.; GUTTMANN, A.; et al. Rural and Urban Residence During Early Life is Associated with Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Inception and Birth Cohort Study. *American Journal of Gastroenterology*, v. 112, p. 1412–1422, 2017.
- BERNARDO, M.E.; PAGLIARA, D.; LOCATELLI, F. Mesenchymal stromal cell therapy: a revolution in Regenerative Medicine? *Bone Marrow Transplantation*, v. 47, n. 2, p. 164-71, 2012.
- BERNARDO, M.E.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, v. 13, p. 392–402, 2013.
- BERNSTEIN, C.N.; BLANCHARD, J.F.; RAWSTHORNE, P. et al. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 96, p. 1116–1122, 2001.
- BEMELMAN, W.A.; ALLEZ, M. The surgical intervention: earlier or never? *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, v. 28, n. 3, p. 497-503, 2014.
- BEN-HORIN, S.; KOPYLOV, U.; CHOWERS, Y. Optimizing anti-TNF treatments in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, n. 1, p. 24-30, 2014.
- BELL, S.J.; HALLIGAN, S.; WINDSOR, A.C.; WILLIAMS, A.B.; WIESEL, P.; KAMM, M.A. Response of fistulating Crohn's disease to infliximab treatment assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 17, p. 387-393, 2003.
- BEHZADI, P.; BEHZADI, E.; RANJBAR, R. The Incidence and Prevalence of Crohn's Disease in Global Scale. *SOJ Immunology*, v. 3, n. 2, p.1-6, 2015.

- BELLAGAMBA, B.C.; ABREU, B.R.; GRIVICICH, I.; MARKARIAN, C.F.; CHEM, E.; CAMASSOLA, M.; et al. Human mesenchymal stem cells are resistant to cytotoxic and genotoxic effects of cisplatin in vitro. *Genetics and molecular biology*, 39(1), 129–134, 2016.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J.M.; DE BRUIN, R.A. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 14, n. 8, p. 518-28, 2013.
- BISCHOFF, S.C.; ESCHER, J.; HÉBUTERNE, X.; KLEK, S.; KRZNARIC, Z.; SCHNEIDER, S.; et al. ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in inflammatory bowel disease. *Clinical Nutrition*, v. 39, p. 632-653, 2020.
- BIN, C.M. Comparação entre Método Funcional com Avaliação Subjetiva Global, Antropometria, Inquérito Alimentar e Análise Bioquímica na Estimativa do Estado Nutricional de Pacientes com Doença de Crohn em Remissão Clínica. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de pós graduação em medicina: gastroenterologia. Porto Alegre, 2007.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 4, p. 313- 319, 2008.
- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, RS, 2007.
- BISLENGHI, G.; WOLTHUIS, A.; VAN ASSCHE, G.; VERMEIRE, S.; FERRANTE, M.; D'HOORE, A. Cx601 (darvadstrocel) for the treatment of perianal fistulizing Crohn's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*. v. 19, n. 7, p. 607-616, 2019.
- BLACKBURN, G.L.; THORNTON, P.A. Nutritional assessment of the hospitalized patients. *Medical Clinics of North America*, v. 63, p. 1103-115, 1979.
- BOQUEST, A.C.; SHAHDADFAR, A.; BRINCHMANN, J.E.; COLLAS, P. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods in Molecular Biology*, v. 325, p. 35-46, 2006.
- BOMMELAER, G., LAHARIE, D., NANCEY, S., HEBUTERNE, X., ROBLIN, X., NACHURY, M. Oral curcumin no more effective than placebo in preventing recurrence of Crohn's Disease after surgery in a randomized controlled trial. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (7), 1553–1560, 2020.
- BRYANT, R.V.; SCHULTZ, C.G.; OOI, S.; GOESS, C.; COSTELLO, S.P.; VINCENT, A.D.; et al. Obesity in Inflammatory Bowel Disease: Gains in Adiposity despite High Prevalence of Myopenia and Osteopenia. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1192, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

- BRAZILIAN STUDY GROUP OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. Consensus guidelines for the management of inflammatory bowel disease. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 313-325, 2010.
- BROWN, C.; McKEE, C.; BAKSHI, S.; WALKER, K.; HAKMAN, E.; HAJASSY, S.; et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 13, p. 1738–1755, 2019.
- BUCHMAN, A.; SCOLAPIO, J. Nutritional support in inflammatory bowel disease. In: BUCHMAN, A. ed. *Clinical Nutrition in Gastrointestinal Disease*. Thorofare. NJ: SLACK: p. 225-232, 2006.
- CAMASSOLA, M.; MACEDO BRAGA, L.M.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. *Methods in Molecular Biology*, v. 879, p. 491-504, 2012.
- CASHMAN, T.J.; GOUON-EVANS, V.; COSTA, K.D. Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms. *Stem cell reviews and reports*, v. 9, n. 3, p. 254–265, 2013.
- CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*, v. 213, n. 2, p. 341–347, 2007.
- CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology*, v. 217, n. 2, p. 318-24, 2009.
- CARVELLO, M.; LIGHTNER, A.; YAMAMOTO, T.; KOTZE, P.G.; SPINELLI, A. Mesenchymal Stem Cells for Perianal Crohn's Disease. *Cells*, v. 8, n. 7, p. 764, 2019.
- CADER, M.Z.; KASER, A. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut*, v. 62, n.11, p.1653-64, 2013.
- CALDECOTT, K.W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair*, v. 6, n. 4, p. 443–453, 2007.
- CAMPISI, J. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing. *Nature* v. 571, p. 183–192, 2019.
- CELLA, M.; FUCHS, A.; VERMI, W.; et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature*, v. 457, p. 722-725, 2009.
- CHENG, F.; HUANG, Z.; LI, Z. Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cells in Treatment of Complex Perianal Fistulas: A Meta-Analysis. *Stem Cells International*, v. 2020, p. 8816737, 2020.

- CHOI, Y.J.; LI, W.Y.; MOON, G.J.; LEE, P.H.; AHN, Y.H.; LEE, G.; et al. Enhancing trophic support of mesenchymal stem cells by ex vivo treatment with trophic factors. *Journal of Neurological Sciences*, v. 298, n. 1-2, p. 28-34, 2010.
- CHO, Y.B.; LEE, W.Y.; PARK, K.J.; KIM, M.; YOO, H.W.; YU, C.S. Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: a phase I clinical study. *Cell Transplant*, v. 22, p. 279–285, 2013.
- CHO, Y.B.; PARK, K.J.; YOON, S.N.; SONG, K.H.; KIM, D.S.; JUNG, S.H. et al. Long-Term Results of Adipose-Derived Stem Cell Therapy for the Treatment of Crohn's Fistula. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 4, n. 5, p. 532-7, 2015.
- CHO, M.J.; SEONG, S.J.; PARK, J.E.; CHUNG, I.W.; LEE, Y.M.; BAE, A. Prevalence and Correlates of DSM-IV Mental Disorders in South Korean Adults: The Korean Epidemiologic Catchment Area Study 2011. *Psychiatry Investigation*, v. 12, p. 164, 2015.
- CHOI, K.; CHUN, J.; HAN, K.; PARK, S.; SOH, H.; KIM, J.; et al. Risk of anxiety and depression in patients with inflammatory bowel disease: a national population-based study. *Journal of Clinical Medicine*, v. 8, n. 5, p. 654, 2019.
- CHOW, J.; TANG, H.; MAZMANIAN, S. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Current Opinion in Immunology*, v. 23, p. 473–480, 2011.
- CHAN, S. S. M. et al. Association between high dietary intake of the n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid and reduced risk of Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 39, n. 8, p. 834-42, 2014.
- CHOI, J.Y.; KIM, T.H.; YANG, J.D.; et al. Adipose-derived regenerative cell injection therapy for postprostatectomy incontinence: a Phase I clinical study. *Yonsei Medical Journal*, v. 57, p. 1152–1158, 2016.
- CHAN, D.; KUMAR, D.; MENDALL, M. What is known about the mechanisms of dietary influences in Crohn's disease? *Nutrition*, v. 31, n. 10, p.1195-203, 2015.
- CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p.2739-49, 2007.
- CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Biology of stem cells: an overview. *Kidney International Supplements*, v. 1, p. 63–67, 2011.
- CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 40, p. 815–820, 2008.

- CHEN, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 3, p. a026104, 2016.
- CICCOCIOPPO, R.; BERNARDO, M.E.; SGARELLA, A.; MACCARIO, R.; AVANZINI, M.A.; UBEZIO, C.; et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*, v. 60, n. 6, p. 788-798, 2011.
- CICCOCIOPPO, R.; KLERSY, C.; LEFFLER, D.A.; ROGERS, R.; BENNETT, D.; CORAZZA, G.R. Systematic review with meta-analysis: Safety and efficacy of local injections of mesenchymal stem cells in perianal fistulas. *JGH Open*. v. 3, n. 3, p. 249–260, 2019.
- COHEN, D.; BIN, C.M.; FAYH, A.P.T. Assessment of quality of life of patients with inflammatory bowel disease residing in Southern Brazil. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 47, n. 3, p. 285-9, 2010.
- CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.
- COHEN, A.B.; LEE, D.; LONG, M.D.; KAPPELMAN, M.D.; MARTIN, C.F.; SANDLER, R.S. et al. Dietary patterns and self-reported associations of diet with symptoms of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 58, n. 5, p.1322-1328, 2013.
- COLOMBEL, J.F.; SCHWARTZ, D.A.; SANDBORN, W.J. et al. Adalimumab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gut*, v. 58, p. 940–948, 2009.
- COLOMBEL, J.F.; FEAGAN, B.G.; SANDBORN, W.J.; VAN ASSCHE, G.; ROBINSON, A.M. Therapeutic drug monitoring of biologics for inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 18, p. 349-358, 2012.
- COOKE, J.; ZHANG, H.; GREGER, L.; SILVA, A.L.; MASSEY, D.; DAWSON, C.; et al. Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 18, n. 11, p. 2128–2137, 2012.
- COQUEIRO AY, RAIZEL R, BONVINI A, TIRAPEGUI J, ROGERO MM. Probiotics for inflammatory bowel diseases: a promising adjuvant treatment. *Int J Food Sci Nutr*, v. 70, n. 1, p. 20-29, 2019.
- CometScore Comet Scoring Software, TriTek Corp, 2004.
- DARFEUILLE-MICHAUD, A.; BOUDEAU, J.; BULOIS, P.; NEUT, C.; GLASSER, A.L.; BARNICH, N.; et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 127, p. 412–421, 2004.

- DAILEY, F.E. et al. Review of stem cells as promising therapy for perianal disease in inflammatory bowel disease. *World Journal of Transplantation*, v. 8, n. 4, p. 97–101, 2018.
- DAVE, M.; MEHTA, K.; LUTHER, J.; BARUAH, A.; DIETZ, A.B.; FAUBION, W.A. J.R. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 21, n.11, p. 2696-707, 2015.
- DAMLE, R.N; CHERNG, N.B.; FLAHIVE, J.M.; DAVIDS, J.S.; MAYKEL, J.A. et al. Clinical and financial impact of hospital readmissions after colorectal resection: Predictors, outcomes, and costs. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 57, n. 12, p. 1421-1429, 2014.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.
- DANESE, S.; SEMERARO, S.; PAPA, A. et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. v. 11, p. 7227–7236, 2005.
- DANESE, S.; FIORINO, G.; PEYRIN-BIROULET, L. Early intervention in Crohn's disease: towards disease modification trials. *Gut*, v. 66, n. 12, p. 2179–2187, 2017.
- DAPERNO, M.; D'HAENS, G.; VAN ASSCHE, G.; BAERT, F.; BULOIS, P.; MAUNOURY, V. et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. v. 60, p. 505-12, 2004.
- DER HAVE, M.V.; DER AALST, K.S.V.; KAPTEIN, A.A.; LEENDERS, M.; SIERSEMA, P.D.; OLDENBURG, B.; FIDDER, H.H. Determinants of health-related quality of life in Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 8, p. 93–106, 2014.
- DEL ZOTTO, B.; MUMOLO, G.; PRONIO, A.M.; MONTESANI, C.; TERSIGNI, R.; BOIRIVANT, M. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 134, p. 120-126, 2003.
- DE MATTOS, B.R.R.; GARCIA, M.P.G.; NOGUEIRA, J.B.; PAIATTO, L.N.; ALBUQUERQUE, C.G.; SOUZA, C.L. et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation*, p. 2015: 493012, 2015.
- DEVKOTA, S.; WANG, Y.; MUSCH, M.W.; LEONE, V.; FEHLNER-PEACH, H.; NADIMPALLI, A. et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*^{-/-} mice. *Nature*, v. 487, p. 104–8, 2012.

- CASTRO, F.D DE.; et al. Lower levels of vitamin d correlate with clinical disease activity and quality of life in inflammatory bowel disease. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 52, n. 4, p. 260-265, 2015.
- DE CASTRO, M.M.; CORONA, L.P.; PASCOAL, L.B.; MIYAMOTO, J.E.; IGNACIO-SOUZA, L.M.; AYRIZONO, M.L.S.; et al. Dietary Patterns Associated to Clinical Aspects in Crohn's Disease Patients. *Scientific Reports*, v. 10, p. 7033, 2020.
- DE CASTRO, M.M.; CORONA, L.P.; PASCOAL, L.B.; RODRIGUES, B.L.; AYRIZONO, M.L.S.; COY, C.S.R.; et al. Impaired nutritional status in outpatients in remission or with active Crohn's disease – classified by objective endoscopic and imaging assessments. *Clinical Nutrition ESPEN*, v. 33, p. 60–65, 2019.
- DEVINE, S.M.; COBBS, C.; JENNINGS, M. et al. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, v. 101, n. 8, p. 2999–3001, 2003.
- DELAROSA, O.; LOMBARDO, E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators of Inflammation*, v. 2010 p. 865601, 2010.
- DEL BO', C.; FRACASSETTI, D.; LANTI, C.; PORRINI, M.; RISO, P. Comparison of DNA damage by the comet assay in fresh versus cryopreserved peripheral blood mononuclear cells obtained following dietary intervention. *Mutagenesis*, v. 30, p. 29–35, 2015.
- DEMIRCI, S.; DOĞAN, A.; ŞİŞLI, B.; SAHIN, F. Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Cryobiology*, v. 68, p. 139–146, 2014.
- DIETZ, A.B; DOZOIS, E.J.; FLETCHER, J.G.; BUTLER, G.W.; RADEL, D.; LIGHTNER, A.L. et al. Autologous mesenchymal stem cells, applied in a bioabsorbable matrix, for treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 153, p. 59–62, 2017.
- IANNI, M.D.; PAPA, B.D.; IOANNI, M.D.; MORETTI, L. Mesenchymal Cells Recruit and Regulate T Regulatory Cells. *Experimental Hematology*, v. 36, n. 3, p. 309–318, 2008.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, v. 8, p. 315–317, 2006.

- DONG, Y.; XU, S.; LIU, J.; PONNUSAMY, M.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y.; et al. Non-coding RNA-linked epigenetic regulation in cardiac hypertrophy. *International Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 9, p. 1133–1141, 2018.
- DOORN, J. et al. Pro-osteogenic trophic effects by PKA activation in human mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, v. 32, n. 6089, 2011.
- DOZOIS, E.J.; LIGHTNER, A.L.; MATHIS, K.L.; CHUA, H.K.; KELLEY, S.R.; FLETCHER, J.G.; et al. Early Results of a Phase I Trial Using an Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Coated Fistula Plug for the Treatment of Transsphincteric Cryptoglandular Fistulas. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 62, n. 5, p. 615-622, 2019.
- DUIJVESTEN, M.; VAN DEN BRINK, G.R.; HOMMES, D.W. Stem cells as potential novel therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 2, p. 99-106, 2008.
- DUIJVESTEN, M.; VOS, A.C.; ROELOFS, H. et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Journal of the British Society of Gastroenterology*, v. 59, p. 1662–9, 2010.
- DUIJVESTEN, M.; WILDENBERG, M.E.; WELLING, M.M.; HENNINK, S.; MOLENDIJK, I.; VAN ZUYLEN, V.L.; et al. Pretreatment with interferon- γ enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells*, v. 29, n.10, p. 1549-58, 2011.
- DUTHIE, S.J.; PIRIE, L.; JENKINSON, A.M.; NARAYANAN, S. Cryopreserved versus freshly isolated lymphocytes in human biomonitoring: endogenous and induced DNA damage, antioxidant status and repair capability. *Mutagenesis*, v. 17, n. 3, p. 211–214, 2002.
- DWARKASING, S.; HUSSAIN, S.M.; HOP, W.C.J.; KRESTIN, G.P. Anovaginal Fistulas: Evaluation with Endoanal MR Imaging. *Radiology*, v. 231, n. 1, 2004.
- EDWARDS, R.G. IVF and the history of stem cells. *Nature*, v. 413, n. 6854, p. 349-51, 2001.
- EGLINTON, T.W.; BARCLAY, M.L.; GEARRY, R.B.; FRIZELLE, F.A. The spectrum of perianal Crohn's disease in a population-based cohort. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 55, p. 773-777, 2012.
- ENCISO, J.M.; GUTZKOW, K.B.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A.; CERAIN, A.L. DE.; AZQUETA, A. Standardisation of the in vitro comet assay: influence of lysis time and lysis solution composition on the detection of DNA damage induced by X-rays. *Mutagenesis*, v. 33, n. 1, p. 25–30, 2018.

- ENGLISH, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol. Cell Biol.*, v. 91, n. 1, p. 19-26, 2013.
- ERSSON, C.; MÖLLER, L. The effects on DNA migration of altering parameters in the comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments. *Mutagenesis*, v. 26, p. 689–695, 2011.
- ERSSON, C.; et al. An ECVAG inter-laboratory validation study of the comet assay: inter laboratory and intra-laboratory variations of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in human mononuclear cells. *Mutagenesis*, v. 28, n. 3, p. 279–286, 2013.
- FAZIO, V.W.; TJANDRA, J.J.; LAVERY, I.C.; JAMES, M.C.; JEFFREY, W.M. et al. Long-term follow-up of strictureplasty in crohn's disease. *Diseases of the colon and rectum*, v. 36, n. 4, p. 355-361, 1993.
- FARIA. A.M.C.; WEINER, H.L. "Oral tolerance,". *Immunological Reviews*, v. 206, p. 232–259, 2005.
- FARIA. A.M.C.; WEINER, H.L. "Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases". *Clinical & Developmental Immunology*, v. 13, n. 2–4, p. 143–157, 2006.
- FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, v. 339, p. 37-59, 1995.
- FORBES, G.M.; STURM, M.J.; LEONG, R.W.; SPARROW, M.P.; SEGARAJASINGAM D.; CUMMINS, A.G.; PHILLIPS, M.; HERRMANN, R.P. A Phase 2 Study of Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells for Luminal Crohn's Disease Refractory to Biologic Therapy. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 12, n. 1, p. 64-71, 2014.
- FORCHHAMMER, L.; et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*, v. 25, n. 2, p. 113–123, 2010.
- FRANK, D.N.; ST. AMAND, A.L.; FELDMAN, R.A.; BOEDEKER, E.C.; HARPAZ, N.; PACE, N.R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, p. 13780–13785, 2007.
- FRANCIS, S.L.; DUCHI, S.; ONOFRILLO, C.; DI BELLA, C.; CHOONG, P. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Use of Cartilage Tissue Engineering: The Need for a Rapid Isolation Procedure. *Stem cells international*, 8947548, 2018.

- FRANÇOIS, M.; ROMIEU-MOUREZ, R.; LI, M.; GALIPEAU, J. Human MSC Suppression Correlates with Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. *Molecular Therapy*, v. 20, p. 187-195, 2012.
- FREITAS, D.M.B.; AGUIAR, A.M.; JANZ, F.L.; MILLÉO, F.Q.; FAVERO, G.M. Isolation and cryopreservation of adipose tissue derived stem cells from different adipose tissues in obese patients. *Journal of Morphological Sciences*, v. 34, n. 3, p. 168-172, 2017.
- FROLKIS, A.; DIELEMAN, L.A; BARKEMA, H.; et al. Environment and the inflammatory bowel diseases. *Canadian Journal of Gastroenterology*, v. 27, p. 18–24, 2013.
- FRISANCHO, A.R. New norms of upper limb fat muscle areas for assessment of nutritional status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 34, p. 2540-2545, 1981.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, v. 20, p. 263-272, 1987.
- FUCHS, R.; STELZER, I.; DREES, C.M.; REHNOLT, C.; SCHRAML, E.; SADJAK, A.; et al. Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v. 36, n. 1, p. 113-117, 2012.
- FUJIMOTO, T.; IMAEDA, H.; TAKAHASHI, K.; KASUMI, E.; BAMBA, S.; FUJIYAMA, Y.; et al. Decreased abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* in the gut microbiota of Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 28, p. 613–619, 2013.
- FUSS, I.J.; NEURATH, M.; BOIRIVANT, M.; DE LA MOTTE, C.; STRONG, S.A.; FIOCCHI, C.; et al. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease: Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *The Journal of Immunology*, v. 157, p.1261–70, 1996.
- FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; ARAKI, Y.; et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, v. 52, n. 1, p. 65–70, 2003.
- GASPARINI, R.G.; SASSAKI, L.Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, v. 11, p. 423-429, 2018.

- GALIPEAU, J.; SENSEBÉ, L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, v. 22, n. 6, p. 824-833, 2018.
- GALLEY, J.D.; NELSON, M.C.; YU, Z.; DOWD, S.E.; WALTER, J.; et al. A exposição a um estressor social perturba a estrutura da comunidade da microbiota associada à mucosa colônica. *BMC Microbiology*, v. 14, p. 189, 2014.
- GARCIA-CARBONELL, R.; WONG, J.; KIM, J.Y.; CLOSE, L.A.; BOLAND, B.S.; WONG, T.L.; et al. Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, p. E9192–E9200, 2018.
- GAJENDRAN, M.; LOGANATHAN, P.; CATINELLA, A.P.; HASHASH, J.G. A comprehensive review and update on Crohn's disease. *Disease-a-Month*, v. 64, n. 2, p. 20–57, 2018.
- GARCIA-OLMO, D.; GUADALAJARA, H.; RUBIO-PEREZ, I.; HERREROS, M.D.; DE LA QUINTANA, P.; GARCIA-ARRANZ, M. Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, p. 3330–3336, 2015.
- GARCIA-OLMO, D.; GARCÍA-ARRANZ, M.; GARCÍA, L.G.; CUELLAR, E.S.; BLANCO, I.F.; PRIANES, L.A.; MONTES, J.A., PINTO, F.L.; MARCOS, D.H.; GARCIA-SANCHO, L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 18, p. 451-454, 2003.
- GARCIA-OLMO, D.; GARCIA-ARRANZ, M.; HERREROS, D.; PASCUAL, I.; PEIRO, C.; RODRIGUEZ-MONTES, J.A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 48, p. 1416–1423, 2005.
- GARCIA-OLMO, D.; HERREROS, D.; PASCUAL, I.; PASCUAL, J.A.; DEL-VALLE, E.; ZORRILLA J.; DE-LA-QUINTANA, P.; GARCIA-ARRANZ, M.; PASCUAL, M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 52, p. 79-86, 2009.
- GARCÍA-BOSCH, O.; RICART, E.; PANÉS, J. Review article: stem cell therapies for inflammatory bowel disease—efficacy and safety. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 32, p. 939–52, 2010.
- GECSE, K.B.; BEMELMAN, W.; KAMM, M.A.; STOKER, J.; KHANNA, R.; NG, S.C.; et al. A global consensus on the classification, diagnosis and multidisciplinary treatment of perianal fistulizing Crohn's disease. *Gut*, v. 63, p. 1381–92, 2014.

GARCIA-OLMO, D.; GARCÍA-ARRANZ, M.; HERREROS, D.; PASCUAL, I.; PEIRO, C.; RODRÍGUEZ-MONTES, J.A. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 48, p. 1416-1423, 2015.

GANJI-ARJENAKI M, RAFIEIAN-KOPAEI M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 3, p. 2091-2103, 2018.

GEORGIEV-HRISTOV, T.; GUADALAJARA, H.; HERREROS, M.D.; LIGHTNER A.L.; DOZOIS, E.J.; GARCÍA-ARRANZ, M. et al. A Step-By-Step Surgical Protocol for the Treatment of Perianal Fistula with Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, v. 22, n. 11, n. 2003-2012, 2018.

GELTZEILER, C.B.; WIEGHARD, N.; TSIKITIS, V.L. Recent developments in the surgical management of perianal fistula for Crohn's disease. *Annals of Gastroenterological*, v. 27, n. 4, p. 320–330, 2014.

GEIBLER, S.; TEXTOR, M.; KUHNISCH, J.; KONNIG, D.; KLEIN, O.; ODE, A.; et al. Functional Comparison of Chronological and In Vitro Aging: Differential Role of the Cytoskeleton and Mitochondria in Mesenchymal Stromal Cells. *Plos One*, v. 7, p. 52700, 2012.

GHANNAM, S.; BOUFFI, C.; DJOUAD, F.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem cell research & therapy*, v. 1, n. 1, p. 2, 2010.

GIR, P.; ONI, G.; BROWN, S.A.; MOJALLAL, A.; ROHRICH, R.J. Human adipose stem cells: current clinical applications. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 129, p. 1277–1290, 2012.

GOMOLLÓN, F.; DIGNASS, A.; ANNESE, V.; TILG, H.; ASSCHE, G.V.; LINDSAY, J.O.; et al. ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 11, n. 1, p. 3–25, 2017.

GOETHEL, A.; CROITORU, K.; PHILPOTT, D.J. The interplay between microbes and the immune response in inflammatory bowel disease. *The Journal of Physiology*, v. 596, p. 3869–3882, 2018.

GOTO, Y.; PANEA, C.; NAKATO, G.; CEBULA, A.; LEE, C.; DIEZ, M.G.; et al. Segmented filamentous bacteria antigens presented by intestinal dendritic cells drive mucosal Th17 cell differentiation. *Immunity*, v. 40, n. 4, p. 594-607, 2014.

- GÓMEZ-GÓMEZ, G.J.; MASEDO, A.; YELA, C.; MARTÍNEZ-MONTIEL, M.P.; CASÍS, B. Current stage in inflammatory bowel disease: What is next? *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 40, p. 11282–11303, 2015.
- GONZALEZ-REY, E.; ANDERSON, P.; GONZALEZ, M.A.; BÜSCHER, D.; DELGADO, M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*, v. 58, n. 7, p. 929–939, 2009.
- GONDA, K.; SHIGEURA, T.; SATO, T.; MATSUMOTO, D.; SUGA, H.; INOUE, K.; et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 121, n. 2, p. 401–410, 2008.
- GOODARZI, A.A.; BLOCK, W.D.; LEES-MILLER, S.P. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Progress in Cell Cycle Research*, v. 5, p. 393–411, 2003.
- GREENSTEIN, A.J.; JANOWITZ, H.D.; SACHAR, D.B. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine*, v. 55, p. 401–412, 1976.
- GRAFF, L.A.; WALKER, J.R.; LIX, L.; CLARA, I.; RAWSTHORNE, P.; ROGALA, L.; et al. The relationship of inflammatory bowel disease type and activity to psychological functioning and quality of life. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 4, n. 12, p. 1491–1501, 2006.
- GRAY, B.K.; LOCKHARTMUMMERY, H.E.; MORSON, B.C. Crohn's disease of the anal region. *Gut*, v. 6, p. 515–524, 1965.
- GREUTER, T.; VAVRICKA, S.R. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease -epidemiology, genetics and pathogenesis. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, v. 13, n. 4, p. 307–317, 2019.
- GUYATT, G.; MITCHELL, A.; IRVINE, E.J.; SINGER, J.; WILLIAMS, N.; GOODACRE, R.; TOMPKINS, C. A new measure of health status for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v. 96, p. 804–10, 1989.
- GUTHRIE, E.; JACKSON, J.; SHAFFER, J.; THOMPSON, D.; TOMENSON, B.; CREED, F. Psychological disorder and severity of inflammatory bowel disease predict health-related quality of life in ulcerative colitis and Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology*, v. 97, p. 1994–9, 2002.
- GU, F.M.; LI, Q.L.; GAO, Q.; JIANG, J.; ZHU, K.; HUANG, X.; et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, v. 10, p. 150, 2011.

- GUPTA, S.C.; KISMALI, G.; AGGARWAL, B.B. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *Biofactors*, v. 39, p. 2–13, 2013.
- GÓMEZ-GÓMEZ, G.J.; MASEDO, A.; YELA, C.; MARTÍNEZ-MONTIEL, M.P.; CASÍS, B. Current stage in inflammatory bowel disease: What is next? *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, n. 40, p. 11282–11303, 2015.
- GUTSCHNER, T.; DIEDERICH, S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biology*, v. 9, n. 6, p. 703–719, 2012.
- GUO, X.; QIU, J.; TU, T.; YANG, X.; DENG, L.; ANDERS, R.A.; et al. Induction of innate lymphoid cell-derived interleukin-22 by the transcription factor STAT3 mediates protection against intestinal infection. *Immunity*, v. 40, p. 25–39, 2014.
- HALLIGAN, S.; STOKER, J. Imaging of fistula in ano. *Radiology*, v. 239, p. 18-33, 2006.
- HAAGEN NIELSEN, O.; ROGLER, G.; HADNLOSER, D. et al. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, v. 6, p. 92-106, 2009.
- HAAGEN-NIELSEN, O. New strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Frontiers in Medicine*, v. 1, p. 3, 2014.
- HAACK-SØRENSEN, M.; KASTRUP, J. Cryopreservation and Revival of Mesenchymal Stromal Cells. In: Vemuri M., Chase L., Rao M. (eds). *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 698. Humana Press, 2011.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox Biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, p. 312–322, 2006.
- HELBIG, K.L.; NOTHNAGEL, M.; HAMPE, J.; BALSCHUN, T.; NIKOLAUS, S.; SCHREIBER, S.; et al. A case-only study of gene-environment interaction between genetic susceptibility variants in NOD2 and cigarette smoking in Crohn's disease etiology. *BMC Medical Genetics*, v. 13, p. 14, 2012.
- HERREROS, M.D.; GARCIA-ARRANZ, M.; GUADALAJARA, H.; DE-LA-QUINTANA, P.; GARCIA-OLMO, D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula advanced therapy trial 1) and long-term evaluation. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 55, p. 762–772, 2012.
- HERMETO, L.C.; OLIVEIRA, R.J.; MATUO, R.; JARDIM, P.H.A.; DeROSSI, R.; ANTONIOLLI, A.C.M.B.; et al. Evaluation of pH effects on genomic integrity in adipose-

derived mesenchymal stem cells using the comet assay. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, p. 339-348, 2015.

HERMETO, L.C.; DeROSSI, R.; OLIVEIRA, R.J.; PESARINI, J.R.; ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B.; JARDIM, P.H.A.; et al. Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*, v. 15, n. 3, p. 15038569, 2016.

HOOPEL, L.V.; MIDTVEDT, T.; GORDON, J.L. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p. 283–307, 2002.

HORIUCHI, T.; MITOMA, H.; HARASHIMA, S.; TSUKAMOTO, H.; SHIMODA, T. Transmembrane TNF- α : Structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*, v. 49, p. 1215–1228, 2010.

HOSSEINI, S.; TAGHIYAR, L.; SAFARI, F.; BAGHABAN ESLAMINEJAD, M. Regenerative Medicine Applications of Mesenchymal Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1089, p. 115-141, 2018.

HONG, J.; YUN, J.; KIM, H.; KWON, S.M. Three-dimensional culture of mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 12, p. 211-221, 2015.

HO, C.K.; CHOI, S.W.; SIU, P.M.; BENZIE, I.F. Cryopreservation and storage effects on cell numbers and DNA damage in human lymphocytes. *Biopreservation and Biobanking*, v. 9, n. 4, p. 343–347, 2011.

HSU, S.H.; HSIEH, P.S. Self-assembled adult adipose-derived stem cell spheroids combined with biomaterials promote wound healing in a rat skin repair model. *Wound Repair and Regeneration*, v. 23, p. 57–64, 2015.

HUANG, H.; WENG, H.; ZHOU, K.; WU, T.; ZHAO, B.S.; SUN, M.; et al. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m(6)A RNA modification co-transcriptionally. *Nature*, v. 567, n. 7748, p. 414–419, 2019.

HUNT, C.J. Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 46, p. 134-150, 2019.

INGLE, S.B.; LOFTUS, E.V. Jr. The natural history of perianal Crohn's disease. *Digestive and Liver Disease*, v. 39, p. 963–969, 2007.

IRVINE, E.J.; FEAGAN, B.; ROCHON, J.; ARCHAMBAULT, A.; FEDORAK, R.N.; GROLL, A.; et al. Quality of life: a valid and reliable measure of outcome for clinical trials in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v. 106, p. 287-96, 1994.

IRVINE, E.J. Usual therapy improves perianal Crohn's disease as measured by a new disease activity index. McMaster IBD Study Group. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 20, p. 27–32, 1995.

JAMES AW, ZARA JN, CORSELLI M, ASKARINAM A, ZHOU AM, HOURFAR A, et al. An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 1, p. 673–84, 2012.

JAMES, A.W.; ZARA, J.N.; ZHANG, X.; ASKARINAM, A.; GOYAL, R.; CHIANG, M.; et al. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 1, p. 510–19, 2012.

JAYARAJ, J.S.; JANAPALA, R.; QASEEM, A.; et al. Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy in Advanced Heart Failure Patients: A Systematic Review with a Meta-analysis of Recent Trials Between 2017 and 2019. *Cureus*, v. 11, n. 9, p. e5585, 2019.

JELTSCH, A.; BROCHE, J.; BASHTRYKOV, P. Molecular processes connecting DNA methylation patterns with DNA methyltransferases and histone modifications in mammalian genomes. *Genes (Basel)*, v. 9, n. 11, p. 566, 2018.

JEONG, Y.H.; KIM, U.; LEE, S.G.; RYU, B.; KIM, J.; IGOR, A.; et al. Vitrification for cryopreservation of 2D and 3D stem cells culture using high concentration of cryoprotective agents. *BMC Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 45, 2020.

JIANG, X.X.; ZHANG, Y.; LIU, B.; ZHANG, S.; WU, Y.; YU, X.; et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 105, p. 4120, 2005.

Jl, Y.; SAKATA, Y.; TSO, P. Nutrient-induced inflammation in the intestine. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, v. 14, p. 315–21, 2011.

JOSTINS, L.; RIPKE, S.; WEERSMA, R.K.; DUERR, R.H.; MCGOVERN, D.P.; HUI, K.Y.; et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 491, n. 7422, p. 119–124, 2012.

JONES, V.A. Comparison of total parenteral nutrition and elemental diet in induction of remission of Crohn's disease. Long-term maintenance of remission by personalized food exclusion diets. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 32, p. 100Se7S, 1987.

- KARP, J.M.; TEO, G.S.L. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*, v. 4, 2009.
- KACHGAL, S.; PUTNAM, A.J. Mesenchymal stem cells from adipose and bone marrow promote angiogenesis via distinct cytokine and protease expression mechanisms. *Angiogenesis*, v. 14, n. 1, p. 47–59, 2011.
- KASER, A.; ZEISSIG, S.; BLUMBERG, R.S. Inflammatory bowel disease. *Annual Review of Immunology*, v. 28, p. 573–621, 2010.
- KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y.; ANDOH, A. Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Pharmaceutical design*, v. 9, n. 4, p. 333–346, 2003.
- KAPLAN, G.G.; HUBBARD, J.; KORZENIK, J.; SANDS, B.E.; PANACCIONE, R.; GHOSH, S.; et al. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: A novel association. *American Journal of Gastroenterology*, v. 105, p. 2412–2419, 2010.
- KAPLAN, G.G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 12, p. 720–727, 2015.
- KAPLAN, G.G.; NG, S.C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, v. 152, p. 313–21, 2017.
- KANG, K.; BAE, J.H.; HAN, K.; KIM, E.S.; KIM, T.O.; YI, J.M. A genome-wide methylation approach identifies a new hypermethylated gene panel in ulcerative colitis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 8, p. 1291, 2016.
- KALLA, R.; VENTHAM, N.T.; KENNEDY, N.A.; QUINTANA, J.F.; NIMMO, E.R.; BUCK, A.H.; et al. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*, v. 64, n. 3, p. 504–513, 2015.
- KELSEN, J.R.; WU, G.D. The gut microbiota, environment and disease of modern society. *Gut Microbe*, v. 3, p. 374–82, 2012.
- KHALILI, H.; CHAN, S.S.M.; LOCHHEAD, P.; ANANTHAKRISHNAN, A.N.; HART, A.R.; CHAN, A.T. The role of diet in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 15, n. 9, p. 525–535, 2018.
- KHALILI, H.; ANANTHAKRISHNAN, A.N.; HART, A.R. Physical activity and risk of inflammatory bowel disease: prospective study from the Nurses' Health Study cohorts. *BMJ*, v. 347, p. 6633, 2013.
- KHANNA, K.; LAVIN, M.; JACKSON, S.; et al. ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death & Differentiation*, v. 8, p. 1052–1065, 2001.

- KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, v. 474, n. 7351, p. 307-17, 2011.
- KIM, W.S.; PARK, B.S; SUNG, J.H.; YANG, J.M.; PARK, S.B.; KWAK, S.; et al. Wound Healing Effect of Adipose-Derived Stem Cells: A Critical Role of Secretory Factors on Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, v. 48, n. 1, p. 15-24, 2007.
- KIM, S.V.; XIANG, W.V.; KWAK, C.; YANG, Y.; LIN, X.W.; OTA, M.; et al. GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science*, v.340, p. 1456–1459, 2013.
- KIM, D.H.; CHEON, J.H. Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Network*, v. 17, n.1, p. 25–40, 2017.
- KIM, W.S.; PARK, B.S; SUNG, J.H.; YANG, J.M.; PARK, S.B.; KWAK, S.; et al. Wound Healing Effect of Adipose-Derived Stem Cells: A Critical Role of Secretory Factors on Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, v. 48, n. 1, p. 15-24, 2007.
- KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research*, v. 363, n. 2, p. 89–96, 1996.
- KAGRAMANOVA, P.; KNYAZEVA, N.; KONOPLYANNIKOV, A. The combined of mesenchymal stem cells and infliximab reduces the recurrence rate of Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 10, n. 1, p.346, 2016.
- KOPYLOV, U.; BEN-HORIN, S.; SEIDMAN, E. Therapeutic drug monitoring in inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology*, v. 27, p. 304-312, 2014.
- KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England Journal of Medicine*, v. 349, p. 570–582, 2003.
- KORNBLUTH, A.; SACHAR, D.B.; SALOMON, P. Crohn's disease. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B.F.; SLEISINGER, M.T. (Eds.), *Sleisenger & Fordtran's gastrointestinal and liver disease: Pathophysiology, diagnosis, and management*. 6. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1998.
- KREUTER, R.; WANKELL, M.; AHLENSTIEL, G.; HEBBARD, L. The role of obesity in inflammatory bowel disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1865, p. 63–72, 2019.
- KRUIS, W.; KATALINIC, A.; KLUGMANN, T.; FRANKE, G.R.; WEISMÜLLER, J.; LEIFELD, L.; et al. Predictive factors for an uncomplicated long-term course of Crohn's disease: a retrospective analysis. *Journal of Crohn's & Colitis*, v. 7, n. 7, p. 263–70, 2013.

- KRAMPERA, M. et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, v. 101, n. 3722, 2003.
- KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELI, R.; PASINI, A.; LIOTTA, F.; ANDREINI, A.; et al. Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 24, n. 386, 2006.
- KRAUTKRAMER, K.A.; KREZNAR, J.H.; ROMANO, K.A.; VIVAS, E.I.; BARRETT-WILT, G.A.; RABAGLIA, M.E.; et al. Diet-microbiota interactions mediate global epigenetic programming in multiple host tissues. *Molecular Cell*, v. 64, n. 5, p. 982–992, 2016.
- LA PORTILLA, F.; ALBA, F.; GARCIA-OLMO, D.; HERRERIAS, J.M.; GONZALEZ, F.X.; GALINDO, A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *International Journal of Colorectal Disease*, v. 28, p. 313–323, 2013.
- LA PORTILLA, F.; GARCÍA-CABRERA, A.M.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, R.M.; REYES, M.L.; GARCÍA-OLMO, D. Autologous and Allogeneic Stem Cell Transplantation for Treatment of Crohn's Fistulae. *New Insights into Inflammatory Bowel Disease*, 2016.
- LAPIDUS, A. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. *World Journal Gastroenterology*, v. 12, p. 75–81, 2006.
- LAZARUS, H.M.; HAYNESWORTH, S.E.; GERSON, S.L.; ROSENTHAL, N.S.; CAPLAN, A.I. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation*, v. 16, p. 557-564, 1995.
- LAW, S.; CHAUDHURI, S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *American Journal of Stem Cells*, v. 2, n. 1, p. 22-38, 2013.
- LEREBOURS, E.; GOWER-ROUSSEAU, C.; MERLE, V.; BRAZIER, F.; DEBEUGNY, S.; MARTI, R.; et al. Stressful life events as a risk factor for inflammatory bowel disease onset: A population-based case-control study. *American Journal of Gastroenterology*, v. 102, p. 122–131, 2007.
- LEE, S.Y.; LEE, S.H.; YANG, E.J.; KIM, E.K.; KIM, J.K.; SHIN, D.Y.; et al. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the STAT3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg balance. *PLoS One*, v. 10, n. 9, p. 0135858, 2015.

- LEE, M.J.; PARKER, C.E.; TAYLOR, S.R.; GUIZZETTI, L.; FEAGAN, B.G.; LOBO, A.J. et al. Efficacy of Medical Therapies for Fistulizing Crohn's Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 16, n. 12, p. 1879-1892, 2018.
- LEN, J.S.; KOH, W.S.D.; TAN, S.X. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Bioscience Reports*, v. 39, n. 8, p. BSR20191601, 2019.
- LI, M.O.; FLAVELL, R.A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell*, v. 134, p. 392-404, 2008.
- LI, N.; SHI, R. Updated review on immune factors in pathogenesis of Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 24, n. 1, p. 15-22, 2018.
- LI, L.; FU, K.; ZHOU, W.; SNYDER, M. Applying circulating tumor DNA methylation in the diagnosis of lung cancer. *Precision Clinical Medicine*, v. 2, n. 1, p. 45-56, 2019.
- LIU, Z.C.; CHANG, T.M.S. Transdifferentiation of bioencapsulated bone marrow cells into hepatocyte-like cells in the 90% hepatectomized rat model. *Liver Transplant*, v. 12, p. 566-572, 2006.
- LIU, Y.; XU, X.; MA, X.; MARTIN-RENDON, E.; WATT, S.; CUI, Z. Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-defined freezing solutions. *Biotechnology Progress*, v. 26, n. 6, p. 1635-43, 2010.
- LIU, B.H.; YEH, H.Y.; LIN, Y.C.; WANG, M.H.; CHEN, D.C.; LEE, B.H.; et al. Spheroid formation and enhanced cardiomyogenic potential of adipose-derived stem cells grown on chitosan. *BioResearch Open Access*, v. 2, p. 28-39, 2013.
- LIU, J.Z.; ANDERSON, C.A. Genetic studies of Crohn's disease: Past, present and future. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 28, p. 373-386, 2014.
- LIMA, C.M.A.O DE.; JUNQUEIRA, F.P.; RODRIGUES, M.C.S.; GUTIERREZ, C.A.S.; DOMINGUES, R.C.; JUNIOR, A.C.C. Avaliação por ressonância magnética das fístulas perianais: ensaio iconográfico. *Radiologia Brasileira*, v. 43, n. 5, p. 330-335, 2010.
- LICHTENSTEIN, G.R.; FEAGAN, B.G.; COHEN, R.D.; et al. Infecções graves e mortalidade associadas a terapias para a doença de Crohn: registro TREAT. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 4, p. 621-630, 2006.
- LICHTENSTEIN L, AVNI-BIRON I, BEN-BASSAT O. Probiotics and prebiotics in Crohn's disease therapies. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016 Feb;30(1):81-8.

- LIGHTNER, A.L.; FAUBION, W.A. Mesenchymal Stem Cell Injections for the Treatment of Perianal Crohn's Disease: What We Have Accomplished and What We Still Need to Do. *Journal of Crohn's & Colitis*, v. 11, n. 10, p. 1267-1276, 2017.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, v. 25, 402-408, 2001.
- LOFTUS, E.V., JR. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, v. 126, p. 1504-1517, 2004.
- LONGOBARDI, T.; JACOBS, P.; BERNSTEIN, C.N. Utilization of health care resources by individuals with inflammatory bowel disease in the United States: a profile of time since diagnosis. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 99, n. 4, p. 650-655, 2004.
- LOHMAN, T.G.; ROCHE, A.F.; MARTORELL R. Anthropometric standardization reference manual. *Human Kinetics: Champaign*, 1988.
- LOHAN, P.; TREACY, O.; GRIFFIN, M.D.; RITTER, T.; RYAN, A.E. Anti-Donor Immune Responses Elicited by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Their Extracellular Vesicles: Are We Still Learning? *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1626, 2017.
- LU, L.; DAI, C.; ZHANG, Z.; DU, H.; LI, S.; YE, P.; et al. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 10, n. 1, p. 143, 2019.
- MANSOUR GHANAIE, F.; HAGHKERDAR, M.; JOUKAR, F.; AMINIAN, K.; MASHHOUR, M.Y.; SHAFAGHI, A.; et al. Epidemiologic features of inflammatory bowel disease in Guilan province, north of Iran, during 2002-2012. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, v. 7, p. 69-74, 2015.
- MARZO, M.; FELICE, C.; PUGLIESE, D.; ANDRISANI, G.; MOCCI, G.; ARMUZZI, A.; GUIDI, L. Management of perianal fistulas in Crohn's disease: an up to-date review. *World Journal of Gastroenterology*, v. 21, p. 1394-1403, 2015.
- MARKARIAN, C.F.; FREY, G.Z.; SILVEIRA, M.D.; CHEM, E.M.; MILANI, A.R.; ELY, P.B.; HORN, A.P.; NARDI, N.B.; CAMASSOLA, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnology Letters*, v. 36, n. 4, p. 693-702, 2014.
- MARQUEZ-CURTIS, L.A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MCGANN, L.E.; ELLIOTT, J.A. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, v. 71, n. 2, p. 181-97, 2015.

- MAYNE, C.G.; WILLIAMS, C.B. Induced and natural regulatory T cells in the development of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 19, n. 8, p. 1772-1788, 2013.
- MANZEL, A.; MULLER, D.N.; HAFLER, D.A.; ERDMAN, S.E.; LINKER, R.A.; KLEINewietfeld, M. Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Current Allergy and Asthma Reports*, v. 14, n. 1, p. 404, 2014.
- MANI, C.; REDDY, P.H.; PALLE, K. DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health, and disease. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 4, p. 165444, 2020.
- MANDUMPAL, J.B.; KRECK, C.A.; MANCERA, R.L. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, p. 3839-3842, 2011.
- MARCHUKOV, D.; MISSELWITZ, B. Insights into the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases: Genetics and Microbiota. *Therapeutische Umschau*, v. 75, n. 5, p. 273-279, 2019.
- MATRICON, J.; BARNICH N.; ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonsell*, v.1, p. 299-309, 2010.
- MATEOS, B.; CORA P.; ESTEBAN S.; MORET, I.; LOPEZ, A.; SANDOVAL, J. Epigenetics of Inflammatory Bowel Disease: Unraveling Pathogenic Events. *Crohn's & Colitis* 360, v. 1, n. 2, 2019.
- MAASER, C.; STURM, A.; VAVRICKA, S.R.; KUCHARZIK, T.; FIORINO, G.; ANNESE, V.; et al. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD. Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *Journal of Crohn's & Colitis*, v. 13, n. 2, p. 144–64, 2019.
- MARINO, M.; GIGLIOTTI, L.; MØLLER, P.; RISO, P.; PORRINI, M.; DEL BO, C. Impact of 12-month cryopreservation on endogenous DNA damage in whole blood and isolated mononuclear cells evaluated by the comet assay. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 363, 2021.
- MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, v. 432, n. 7015, p. 298-306, 2004.
- McMILLAN, T.J.; TOBI, S.; MATEOS, S.; LEMON, C. The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v. 49, n. 2, p. 373-377, 2001.
- McDERMOTT, E.; RYAN, E.J.; TOSETTO, M.; GIBSON, D.; BURRAGE, J.; KEEGAN, D.; et al. DNA methylation profiling in inflammatory bowel disease provides new insights into disease pathogenesis. *Journal of Crohn's & Colitis*, v. 10, n. 1, p. 77–86, 2016.

- MENDOZA, J.L.; LANA, R.; TAXONERA, C.; ALBA, C.; IZQUIERDO, S.; DÍAZ-RUBIO, M. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Medicina Clinica*, v. 125, n. 8, p. 297–300, 2005.
- MENDALL, M.A.; GUNASEKERA, A.V.; JOHN, B.J.; KUMAR, D. Is obesity a risk factor for Crohn's disease? *Digestive Diseases and Sciences*, v. 56, p. 837–44, 2011.
- MITSUYAMA, K.; TOMIYASU, N.; TAKAKI, K.; MASUDA, J.; YAMASAKI, H.; KUWAKI, K.; et al. Interleukin-10 in the pathophysiology of inflammatory bowel disease: increased serum concentrations during the recovery phase. *Mediators of Inflammation*, v. 2006, n. 6, p. 26875, 2006.
- MISHRA, T.; SARSWAT, A.; MISHRA, K.; SRIVASTAVA, A. Inflammatory bowel diseases: current therapeutic approaches and potential of using stem cells. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, v. 2, n. 2, p. 57, 2017.
- M'KOMA, A.E. Inflammatory bowel disease: an expanding global health problem. *Clinical medicine insights Gastroenterology*, v. 6, p. 33-47, 2013.
- MIYAMAE, Y.; IWASAKI, K.; KINAE, N.; TSUDA, S.; MURAKAMI, M.; TANAKA, M.; et al. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migrations and alkaline condition. *Mutation Research*, v. 393, p. 107-113, 1997.
- MIYAGI-SHIOHIRA, C.; KURIMA, K.; KOBAYASHI, N.; SAITOH, I.; WATANABE, M.; NOGUCHI, Y.; et al. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Medicine*, v. 8, p. 3–7, 2015.
- M'KOMA, A.E. The Multifactorial Etiopathogeneses Interplay of Inflammatory Bowel Disease: An Overview. *Gastrointestinal Disorders*, v. 1, p. 75–105, 2019.
- MOLENDIJK, I.; BONSING, B.A.; ROELOFS, H.; PEETERS, K.C.; WASSER, M.N.; DIJKSTRA, G.; et al. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, v. 149, n. 4, p. 918-927, 2015.
- MOLENDIJK, I.; BARNHOORN, M.C.; JONGE-MULLER, E.S.M.; MIEREMET-OOMS, M.A.C.; REIJDEN, J.J.V.; HELM, D.V.; et al. Verspaget, Intraluminal Injection of Mesenchymal Stromal Cells in Spheroids Attenuates Experimental Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, v. 10, p. 953–964, 2016.

- MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO, R.; MORRONE, G.; MARASCO, O.; LUZZA, F.; et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*, v. 112, n. 4, p. 1169-1178, 1997.
- MORRIS, J.; SPENCER, J.A.; AMBROSE, N.S.M.R. Imaging classification of perianal fistulas and its implications for patient management. *Radiographics*, v. 20, p. 623-35, 2000.
- MØLLER, P.; AZQUETA, A.; BOUTET-ROBINET, E.; et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, v. 15, p. 3817–3826, 2020a.
- MØLLER, P.; et al. Searching for assay controls for the Fpg- and hOGG1-modified comet assay. *Mutagenesis*, v. 33, p. 9–19, 2018.
- MØLLER, P.; STOPPER, H.; COLLINS, A.R. Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. *Mutagenesis*, v. 35, p. 5–18, 2020b.
- MØLLER, P.; MÖLLER, L.; GODSCHALK, R.W.; JONES, G.D. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. *Mutagenesis*, v. 25, p. 109–111, 2010.
- MOLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, v. 33, p. 1–7, 2018.
- MURPHY, M.B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 45, p. 54, 2013.
- MULLER, F.J.; LAURENT, L.C.; KOSTKA, D.; ULITSKY, I.; WILLIAMS, R.; LU, C.; et al. Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. *Nature*, v. 455, p. 401–405, 2008.
- MURCH, S.H.; BRAEGGER, C.P.; WALKER-SMITH, J.A.; MACDONALD, T.T. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, v. 34, p. 1705-1709, 1993.
- MUELLER-KLIESER, W. “Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications,” *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, v. 273, n. 4, p. C1109-C1123, 1997.
- NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.S.; KARAZIACK, C.B.; et al. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3Hisobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 75, p. 132-42, 2014.

- NASH, P.; TANG, X.; ORLICKY, S.; CHEN, Q.; GERTLER, F.B.; MENDENHALL, M.D.; et al. Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature*, v. 414, n. 6863, p. 514-21, 2001.
- NARAKORNSAK, S.; AUNGSUCHAWAN, S.; POTHACHAROEN, P.; PUANINTA, C.; MARKMEE, R.; TANCHAROEN, W.; et al. Amniotic fluid: Source of valuable mesenchymal stem cells and alternatively used as cryopreserved solution. *Acta Histochemica*, v. 121, p. 72-83, 2019.
- NAVABI, S.; GORREPATI, V.S.; YADAV, S.; CHINTANABOINA, J.; MAHER, S.; DEMUTH, P.; et al. Influências e Impacto da Ansiedade e Depressão no Cenário da Doença Inflamatória Intestinal. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 24, p. 2303-2308, 2018.
- NAWAB, K.; BHERE, D.; BOMMARITO, A.; et al. Stem Cell Therapies: A Way to Promising Cures. *Cureus*, v. 11, n. 9, p. e5712, 2019.
- NEURATH, M.F. New targets for mucosal healing and therapy in inflammatory bowel diseases. *Mucosal Immunology*, v. 7, p. 6–19, 2014.
- NERI, S.; BOURIN, P.; PEYRAFITTE, J.A.; et al. Human Adipose Stromal Cells (ASC) for the Regeneration of Injured Cartilage Display Genetic Stability after in vitro culture expansion. *PLoS One*, v. 8, p. 77895, 2013.
- NTEGE, E.H.; SUNAMI, H.; SHIMIZU, Y. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regenerative Therapy*, v. 14, p. 136-153, 2020.
- NG, S.C.; SHI, H.Y.; HAMIDI, N.; UNDERWOOD, F.E.; TANG, W.; BENCHIMOL, E.I.; et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, v. 390, n. 10114, p. 2769–2778, 2017.
- NIEMIADOMSKI, O.; STUDD, C.; WILSON, J.; WILLIAMS, J.; HAIR, C.; KNIGHT, R. et al. Influence of food and lifestyle on the risk of developing inflammatory bowel disease. *Internal Medicine Journal*, v. 46, n. 6, p. 669-76, 2016.
- NIKOLOVA, I.; GEORGIEVA, M.; STOILOV, L.; KATEROVA, Z.; TODOROVA, D. Optimization of Neutral Comet Assay for studying DNA double-strand breaks in pea and wheat. *Journal of BioScience and Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 151-157, 2013.
- NOVAK, T.E.; BABCOCK, T.A.; JHO, D.H.; HELTON, W.S.; ESPAT, N.J. NF- κ B inhibition by ω -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- α transcription. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 284, p. 84–89, 2003.

- O'DONNELL, S.; BOROWSKI, K.; ESPIN-GARCIA, O.; MILGROM, R.; KABAKCHIEV, B.; STEMPAK, J. et al. The Unsolved Link of Genetic Markers and Crohn's Disease Progression: A North American Cohort Experience. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 25, n. 9, p. 1541-1549, 2019.
- OMIDKHODA, A.; MOZDARANI, H.; MOVASAGHPOOR, A.; FATHOLAH, A.A. Study of apoptosis in labeled mesenchymal stem cells with superparamagnetic iron oxide using neutral comet assay. *Toxicology In Vitro*, v. 21, n. 6, p. 1191-6, 2007.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A EDUCAÇÃO, A CIÊNCIA E A CULTURA (UNESCO) Cairo Office. Ethics and Law in Biomedicine and Genetics; an Overview of National Regulations in the Arab States. Paris: UNESCO, 2011.
- O'SHEA, J.J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 2, p. 37-45, 2002.
- OTT, C.; SCHÖLMERICH, J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. *Nature Review Gastroenterology Hepatology*, v. 10, p. 585–595, 2013.
- OWCZAREK, D.; RODACKI, T.; DOMAGAŁA-RODACKA, R.; CIBOR, D.; MACH, T. Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 3, p. 895-905, 2016.
- OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal Stem Cells: Marrow-Derived Osteogenic Precursors. *Ciba Foundation Symposium*, v. 136, p. 42–60, 1988.
- PALLIS, A.G.; MOUZAS, I.A. Quality of health care in inflammatory bowel disease and its assessment. *Annals of Gastroenterology*, v. 15, p. 143-147, 2002.
- PANÉS, J.; GOMOLLÓN, F.; TAXONERA, C.; HINOJOSA, J.; CLOFENT, J.; NOS, P. Crohn's disease. A review of current treatment with a focus on biologics. *Drugs*, v. 67, n. 17, p. 2511-2537, 2007.
- PANÉS, J.; GARCÍA-OLMO, D.; VAN ASSCHE, G.; COLOMBEL, J.F.; REINISCH, W.; BAUMGART, D.C.; et al. Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients with Crohn's Disease. *Gastroenterology*, v. 154, n. 5, p. 1334-1342, 2018.
- PARKS, A.G.; GORDON, P.H.; HARDCASTLE, J.D. A classification of fistula-in-ano. *British Journal of Surgery*, v. 63, p.1-12, 1976.
- PARK, K.T.; BASS, D. Inflammatory bowel disease-attributable costs and cost-effective strategies in the united states: a review. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 17, n.7, p. 1603-1609, 2011.

- PANÉS, J.; GARCÍA-OLMO, D.; VAN ASSCHE, G.; COLOMBEL, J.F.; REINISCH, W.; BAUMGART, D.C.; et al. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: A phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *The Lancet*, v. 388, n. 10051, p. 1281-1290, 2016.
- PALLIS, A.; VLACHONIKOLIS, I.; MOUZAS, I. Assessing Health-Related Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease, in Crete, Greece. *BMC Gastroenterology*, v. 2, p. 1, 2002.
- PETERSON, D.A.; FRANK, D.N.; PACE, N.R.; GORDON, J.I. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell Host Microbe*, v. 3, p. 417–427, 2008.
- PEYRIN-BIROULET, L.; LOFTUS, E.V. JR.; COLOMBEL, J.F.; SANDBORN, W.J. The natural history of adult Crohn's disease in population-based cohorts. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 105, n. 2, p. 289–297, 2010.
- PEYRIN-BIROULET, L.; LOFTUS, E.V.; TREMAINE, W.J.; HARMSSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R.; SANDBORN, W.J. Perianal Crohn's disease findings other than fistulas in a population-based cohort. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 18, p. 43–48, 2012.
- PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; FELICIDADE, I.; NARDI, N. B.; et al. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 91, p. 861– 871, 2017.
- PFEFFER-GIK, T.; LEVINE, A. Dietary clues to the pathogenesis of Crohn's disease. *Digestive Diseases*, v. 32, p. 389–94, 2013.
- HAM, T.A.; CLARE, S.; GOULDING, D.; ARASTEH, J.M.; STARES, M.D.; BROWNE, H.P.; et al. Epithelial IL-22RA1- mediated fucosylation promotes intestinal colonization resistance to an opportunistic pathogen. *Cell Host & Microbe*, v. 16, p. 504-516, 2014.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143–147, 1999.
- PINSON, C.; DOLORES, M.; CRUYPENINCK, Y.; KONING, E.; DACHER, J.N.; SAVOYE, G. et al. Magnetization transfer ratio for the assessment of perianal fistula activity in Crohn's disease. *European Radiology*, v. 27, n. 1, p. 80-87, 2017.

- PIGNEUR, B.; RUEMMELE, F.M. Nutritional interventions for the treatment of IBD: current evidence and controversies. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 12, 1756284819890534, 2019.
- PIZARRO, T.T.; MICHIE, M.H.; BENTZ, M.; WORARATANADHARM, J.; SMITH Jr, M.F.; FOLEY, E.; et al. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *Journal of immunology*, v. 162, n. 11, p. 6829-6835, 1999.
- PODOLSKY, D.K. Inflammatory bowel disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 325, p. 928-937, 1991.
- PONTES, R.M.; MISZPUTEN, S.J.; FERREIRA-FILHO, O.F.; MIRANDA, C.; FERRAZ, M.B. Qualidade de vida em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal: tradução para o português e validação do questionário "Inflammatory Bowel Disease Questionnaire". *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 41, p. 137-43, 2004.
- PODOJIL, J.R.; MILLER, S.D. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunological Review*, v. 229, n. 1, p. 337-355, 2009.
- POSICIONAMENTO DO CBCD QUANTO AO COVID-19. 2020. Available from: [http://www.cbcd.org.br/cbcdnews/2020/posicionamento-do-cbcd-quantoao-covid-19/\[cited Apr 1st, 2020\]](http://www.cbcd.org.br/cbcdnews/2020/posicionamento-do-cbcd-quantoao-covid-19/[cited Apr 1st, 2020]).
- PRIETO, J.M.I. Avaliação do consumo alimentar e do estado nutricional em portadores da doença de Crohn. [Dissertação]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia, São Paulo, 2013.
- PROCKOP, D.J. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells*, v. 31, p. 2042–2046, 2013.
- PU, X.; WANG, Z.; KLAUNIG, J.E. Cryopreservation of human blood for alkaline and Fpg-modified comet assay. *Toxicology Mechanisms Methods*, v. 26, n. 3, p. 196–201, 2016.
- QUARESMA, A.B.; KAPLAN, G.G.; KOTZE, P.G. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. *Current Opinion on Gastroenterology*, v. 35, n. 4, p. 259-264, 2019.
- RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTO, M.; MONTECUCCO, F.; BUSCA, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; PISTOIA, V. Human mesenchymal stem cells inhibit

neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, v.26, n.1, p.151-162, 2008.

ROCHA, R.; SANTANA, G.O.; ALMEIDA, N.; LYRA, A.C. Analysis of fat and muscle mass in patients with inflammatory bowel disease during remission and active phase. *The British Journal Nutrition*, v. 101, n. 5, p. 676-679, 2009.

RANKIN, G.B.; WATTS, H.D.; MELNYK, C.S. et al. National Cooperative Crohn's Disease Study: extraintestinal manifestations and perianal complications. *Gastroenterology*, v. 77, p. 914–920, 1979.

RANI, R.; SMULIAN, A.G.; GREAVES, D.R.; HOGAN, S.P.; HERBERT, D.R. TGF- β limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *European Journal of Immunology*, v. 41, p. 2000-2009, 2011.

RAJENDRAN, N.; KUMAR, D. Role of diet in the management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 16, n. 12, p. 1442–1448, 2010.

RASTEGAR, A.M.; PAHLAVANZADEH, F.; VAHDANI, R.; et al. The effect of cell passage on the viability of mesenchymal stem cells after cryopreservation. *Comparative Clinical Pathology*, v, 24, p. 403–408, 2015.

REIMUND, J.M.; WITTERSHEIM, C.; DUMONT, S.; MULLER, C.D.; KENNEY, J.S.; BAUMANN, R.; et al. Increased production of tumour necrosis factor- α interleukin-1 β , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut*, v. 39, p. 684–689, 1996.

RICART, E.; PANACCIONE, R.; LOFTUS, EV. Jr.; TREMAINE, W.J.; HARMSSEN, W.S.; ZINSMEISTER, A.R.; et al. Autoimmune disorders and extraintestinal manifestations in first-degree familial and sporadic inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 10, p. 207–214, 2004.

ROSE, R.A.; JIANG, H.; WANG, X.; HELKE, S.; TSOPORIS, J.N.; GONG, N.; et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem Cells*, v. 26, n. 11, p. 2884-2892, 2008.

ROBEY, P. "Mesenchymal stem cells": Fact or fiction, and implications in their therapeutic use. *F1000 Research*, v. 6, p. 1524, 2017.

RUBIN, D.T.; ABREU, M.T.; RAI, V.; SIEGEL, C.A. Management of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis During the COVID-19 Pandemic: Results of an International Meeting. *Gastroenterology*, v. 159, n. 1, p. 6-13, 2020.

- SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 14, p. 4280-4288, 2008.
- SALGADO, A.J.; REIS, R.L.; SOUSA, N.J.; GIMBLE, J.M. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 5, n. 2, p. 103–110, 2010.
- SALVADOR, J.M.; BROWN-CLAY, J.D.; FORNACE, A.J. Jr. Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 793, p. 1-19, 2013.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature Immunology*, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.
- SANDBORN, W.J.; FEAGAN, B.G.; FEDORAK, R.N.; SCHERL, E., FLEISHER, M.R.; KATZ, S. et al. A randomized trial of Ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate-to-severe Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 135, p. 1130–1141, 2008.
- SARLO, R.S.; BARRETO, C.R.; DOMINGUES, T.A.M. Compreendendo a vivência do paciente portador de doença de Crohn. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 21, n. 4, p. 629-635, 2008.
- SAGES and EAES recommendations regarding surgical response to COVID-19 crisis. 2020. Available from: <http://www.sages.org/recommendations-surgical-response-covid-19/> [cited Mar 29th, 2020].
- SANCHEZ-GUIJO, F.; GARCÍA-ARRANZ, M.; LOPEZ-PARRA, M.; MONEDERO, P.; MATA-MARTÍNEZ, C.; SANTOS, A.; et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia requiring mechanical ventilation. A proof of concept study. *EClinicalMedicine*, v. 25, p. 100454, 2020.
- SCHEPPACH, W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, v. 35, n. 1, p. 35–8, 1994.
- SCHUH, E.M.; FRIEDMAN, M.S.; CARRADE, D.D.; LI, J.; HEEKE, D.; OYSERMAN, S.M.; et al. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *American Journal of Veterinary Research*, v. 70, p. 1526–1535, 2009.

- SCHWARTZ, D.A.; LOFTUS, E.V. JR; TREMAINE, W.J. et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*, v. 122, p. 875–880, 2002.
- SCHWARTZ, D.A.; HERDMAN, C.R. Review article: The medical treatment of Crohn's perianal fistulas. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 19, n. 9, p. 953-967, 2004.
- SEWELL, G.W., MARKS, D.J., SEGAL, A.W. The immunopathogenesis of Crohn's disease: a three-stage model. *Current opinion in immunology*, v. 21, n. 5, p. 506–513, 2009.
- SCHWEICH, L. C.; OLIVEIRA, E. J. T. DE; PESARINI, J. R.; HERMETO, L. C.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B.; et al. All trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 96, p. 1267-1274, 2017.
- SERENA, C.; KEIRAN, N.; MADEIRA, A.; MAYMO-MASIP, E.; EJARQUE, M.; TERRO'N-PUIG, M. et al. Crohn's Disease Disturbs the Immune Properties of Human Adipose-Derived Stem Cells Related to Inflammasome Activation. *Stem Cell Reports*, v. 9, p. 1109–1123, 2017.
- SEGAIN, J.P.; DE LA BLETIERE, R.D.; BOURREILLE, A.; LERAY, V.; GERVOIS, N.; ROSALES, C. et al. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF kappa B inhibition: Implications for Crohn's disease, v. 47, p. 397–403, 2000.
- SEIFARTH, C.; KREIS, M.E.; GRÖNE, J. Indications and Specific Surgical Techniques in Crohn's Disease. *Viszeralmedizin*, v. 31, n. 4, p. 273–279, 2015.
- SENSEBÉ, L.; GADELORGE, M.; FLEURY-CAPPELLESSO, S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, n. 3, p. 66, 2013.
- SHEN, W.; GASKINS, H.R.; MCINTOSH, M.K. Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, p. 270–80, 2014.
- SILVA-CARVALHO, A.E.; SOUSA, M.R.R.; ALENCAR-SILVA, T.; CARVALHO, J.L.; SALDANHA-ARAÚJO, F. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- γ licensing and the path ahead. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 47, p.32-42, 2019.
- SILVA-CARVALHO, A.É.; SOUSA, M.R.R.; ALENCAR-SILVA, T.; CARVALHO, J.L.; SALDANHA-ARAÚJO, F. Mesenchymal stem cells immunomodulation: The road to IFN- γ licensing and the path ahead. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 47, p. 32-42, 2019.

SILVERBERG, M.S.; SATSANGI, J.; AHMAD, T.; ARNOTT, I.D.R.; BERNSTEIN, C.N.; BRANT, S.R.; et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 19, p. 5-36, 2005.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.

SINGH, N.P.; BANNER, D.B.; TICE, R.R.; MCCOY, M.T.; COLLINS, G.D.; SCHNEIDER, E.L. Abundant alkali sensitive sites in DNA of human and mouse sperm, *Experimental Cell Research*, v. 184, p. 461-470, 1989.

SLEEBOOM-FAULKNER, M.; CHEKAR, C.K.; FAULKNER, A.; HEITMEYER, C.; MAROUDA, M.; ROSEMAN, A.; et al. Comparing national home-keeping and the regulation of translational stem cell applications: An international perspective. *Social Science & Medicine*, v. 153, p. 240-9, 2016.

SMAGUR, A.; MITRUS, I.; GIEBEL, S.; SADUS-WOJCIECHOWSKA, M.; NAJDA, J.; KRUZEL, T.; et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Vox Sanguinis*, v. 104, p. 240-247, 2013.

SONNENBERG, G.F.; MONTICELLI, L.A.; ELLOSO, M.M.; FOUSER, L.A.; ARTIS, D. CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. *Immunity*, v. 34, p. 122-134, 2011.

SOUZA, M.M.; BARBOSA, D.A.; ESPINOSA, M.M.; BELASCO, A.G.S. Qualidade de vida de pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 24, n. 4, p. 479-484, 2011.

SOHRABPOUR, A.A.; MALEKZADEH, R.; KESHAVARZIAN, A. Current therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, n. 33, p. 3668-3683, 2010.

SOUZA, M.M. de.; BARBOSA, D.A.; ESPINOSA, M.M.; BELASCO, A.G.S. Qualidade de vida de pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 24, n. 4, p.479-484, 2011.

SPITS, H.; CUPEDO, T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *The Annual Review of Immunology*, v. 30, p. 647-675, 2012.

- SPAGGIARI, G.M.; CAPOBIANCO, A.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MINGARI, M.C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, v. 111, n. 3, p. 1327-33, 2008.
- SRIVASTAVA, A.S.; SHENOUDA, S.; MISHRA, R.; CARRIER, E. Transplanted embryonic stem cells successfully survive, proliferate, and migrate to damaged regions of the mouse brain. *Stem cells*, v. 24, n. 7, p. 1689- 1694, 2006.
- SREEDHAR, R.; ARUMUGAM, S.; THANDAVARAYAN, R.A.; et al. Curcumin as a therapeutic agent in the chemoprevention of inflammatory bowel disease. *Drug Discovery Today*, v. 21, p. 843–9, 2016.
- STROBER, W.; ZHANG, F.; KITANI, A.; FUSS, I.; FICHTNER-FEIGL, S. Proinflammatory cytokines underlying the inflammation of Crohn's disease. *Current Opinion Gastroenterology*, v. 26, p. 310-317, 2010.
- STEENHOLDT, C.; BENDTZEN, K.; BRYNSKOV, J.; THOMSEN, M.; AINSWORTH, M.A. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 46, p. 310-318, 2011.
- STROBER, W.; FUSS, I.; MANNON, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n.3, p. 514–521, 2007.
- STERODIMAS, A.; DE FARIA, J.; NICARETTA, B.; PITANGUY, I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, v. 63, p. 1886–1892, 2010.
- STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells and Development*, v. 21, p. 2724–2752, 2012.
- STIVALA, L.A.; CAZZALINI, O.; PROSPERI, E. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21CDKN1A as a target of anti-cancer drugs. *Current Cancer Drug Targets*, v. 12, n. 2, p. 85-96, 2012.
- STUART, M.P.; MATSUI, R.A.M.; SANTOS, M.F.S.; CÔRTEZ, I.; AZEVEDO, M.S.; SILVA, K.R.; et al. Successful Low-Cost Scaffold-Free Cartilage Tissue Engineering Using Human Cartilage Progenitor Cell Spheroids Formed by Micromolded Nonadhesive Hydrogel. *Stem Cells International*, v. 2017, p. 7053465, 2017.

- SU, C.G.; JUDGE, T.A.; LICHTENSTEIN, G.R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 31, p. 307–327, 2002.
- SUENAGA, H.; FURUKAWA, K.S.; SUZUKI, Y.; TAKATO, T.; USHIDA, T. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, p. 254, 2015.
- TAKAHASHI, K.; NISHIDA, A.; FUJIMOTO, T.; FUJII, M.; SHIOYA, M.; IMAEDA, H.; et al. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion*, v. 93, p. 59–565, 2016.
- TAHARA, T.; SHIBATA, T.; NAKAMURA, M.; YAMASHITA, H.; YOSHIOKA, D.; OKUBO, M.; et al. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 23, n. 4, p. 521-527, 2009a.
- TEMPLE, M.D.; PERRONE, G.G.; DAWES, I.W. Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biology*, v. 15, p. 319–326, 2005.
- TENG, C.J.; LUO, J.; CHIU, R.C.; SHUM-TIM, D. Massive mechanical loss of microspheres with direct intramyocardial injection in the beating heart: Implications for cellular cardiomyoplasty. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 132, p. 628–632, 2006.
- THIRUMALA, S.; GIMBLE, J.M.; DEVIREDDY, R.V. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells and Development*, v. 19, n. 4, p. 513–522, 2010.
- THOMPSON, M.; MEI, S.; WOLFE, D.; CHAMPAGNE, J.; FERGUSON, D.; STEWART, D.J.; et al. Cell therapy with intravascular administration of mesenchymal stromal cells continues to appear safe: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, v. 19, p. 100249, 2020.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*, 2000; 35(3): 206-221.
- TORRES, J.; MEHANDRU, S.; COLOMBEL, J.F.; PEYRIN-BIROULET, L. Crohn's disease. *The Lancet*, v. 389, p. 1741–1755, 2017.

- TORRES, J.; BONOVAS, S.; DOHERTY, G.; KUCHARZIK, T.; GISBERT, J.P.; RAINE, T.; et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *Journal of Crohn's & Colitis*, v. 14, n. 1, p. 4-22, 2020.
- TOZER, P.J.; RAYMENT, N.; HART, A.L.; DAULATZAI, N.; MURUGANANTHAN, A.U.; WHELAN, K.; et al. What role do bacteria play in persisting fistula formation in idiopathic and Crohn's anal fistula? *Colorectal Disease*, v. 17, n. 3, p. 235-241, 2015.
- TURPIN, W.; GOETHEL, A.; BEDRANI, L.; CROITORU MDCM, K. Determinants of IBD Heritability: Genes, Bugs, and More. *Inflammatory bowel diseases*. v. 24, p. 577-1148, 2018.
- UEDA, T.; KOHAMA, Y.; KUGE, A.; KIDO, E.; SAKURAI, H. GADD45 family proteins suppress JNK signaling by targeting MKK7. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 635, p. 1-7, 2017.
- TURINETTO, V.; VITALE, E.; GIACHINO, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci*, v. 17, n. 7, p. 1164, 2016.
- VAN HARMELEN, V.; ROHRIG, K.; HAUNER, H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 53, n. 5, p. 632-637, 2004.
- VAN ASSCHE, G.; VANBECKEVOORT, D.; BIELEN, D.; COREMANS, G.; AERDEN, I.; NOMAN, M.; et al. Magnetic resonance imaging of the effects of infliximab on perianal fistulizing Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 98, p. 332-339, 2003.
- VAN DER SLOOT, K.W.J.; AMINI, M.; PETERS, V.; DIJKSTRA, G.; ALIZADEH, B.Z. Inflammatory Bowel Diseases: Review of Known Environmental Protective and Risk Factors Involved. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 23, n. 9, p. 1499-1509, 2017.
- VAVRICKA, S.R.; SCHOEPFER, A.; SCHARL, M.; LAKATOS, P.L.; NAVARINI, A.; ROGLER, G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 21, n. 8, p. 1982-1992, 2015.
- VAN ONKELEN, R.S.; MITALAS, L.E.; GOSSELINK, M.P.; BELKUM, A.V.; LAMAN, J.D.; SCHOUTEN, W.R. Assessment of microbiota and peptidoglycan in perianal fistulas. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 75, n. 1, p. 50-54, 2013.

- VELOSO, F.T.; CARVALHO, J.; MAGRO, F. Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 23, p. 29–34, 1996.
- VENTHAM, N.T.; KENNEDY, N.A.; NIMMO, E.R.; SATSANGI, J. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, v. 145, n. 2, p. 293–308, 2013.
- VENTHAM, N.T.; KENNEDY, N.A.; ADAMS, A.T.; KALLA, R.; HEATH, S.; O'LEARY, K.R.; et al. Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, v. 7, p. 13507, 2016.
- VIEIRA, S.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A. Importance of a stable topoisomerase IB clamping for an efficient DNA processing: Effect of the Lys(369)Glu mutation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 76-82, 2015.
- VILLELA, I.V.; DE OLIVEIRA, I.M.; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J.F.; HENRIQUES, J.A.; DA SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortune* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research*, v. 628, n. 2, p. 76-86, 2007.
- VUITTON, L.; MARTEAU, P.; SANDBORN, W.J.; LEVESQUE, B.G.; FEAGAN, B.; VERMEIRE, S. et al. IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut*, v. 0, p. 1-9, 2015.
- WAINSTEIN, C.; QUERA, R.; FLUXÁ, D.; KRONBERG, U.; CONEJERO, A.; LÓPEZ-KÖSTNER, F. et al. Stem Cell Therapy in Refractory Perineal Crohn's Disease: Long-term Follow-up. *Colorectal Disease*, v. 20, n.3, p. 68-75, 2018 .
- WEDEMEYER, J.; KIRCHHOFF, T.; SELLGE, G.; BACHMANN, O.; LOTZ, J.; GALANSKI, M.; et al. Transcutaneous perianal sonography: a sensitive method for the detection of perianal inflammatory lesions in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology*, v. 10, p. 2859-2863, 2004.
- WEST, R.L.; VAN DER WOUDE, C.J.; ENDTZ, H.P.; HANSEN, B.E.; OUWEDIJK, M.; BOELEN, H.A.M.; et al. Perianal fistulas in Crohn's disease are predominantly colonized by skin flora: implications for antibiotic treatment? *Digestive Diseases and Sciences*, v. 50, n. 7, p. 1260–1263, 2005.
- WEISSMAN, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 157-68, 2000.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series, Geneva, 1995. 452 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Obesity: preventing and managing the global epidemic. WHO Technical Report Series, Geneva, n. 894, 1998 (Technical Report Series, n. 894).
- WILLIAMS, A.R.; HARE, J.M. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*, v. 109, n. 8, p. 923–940, 2011.
- WILLEMSSEN, L.E.; KOETSIER, M.A.; BALVERS, M.; BEERMANN, C.; STAHL, B.; VAN TOL, E.A. Polyunsaturated fatty acids support epithelial barrier integrity and reduce IL-4 mediated permeability in vitro. *European Journal of Nutrition*, v. 47, p. 183–91, 2008.
- WILUSZ, J.E.; SUNWOO, H.; SPECTOR, D.L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & Development*, v. 23, n. 13, p. 1494–1504, 2009.
- WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R.I.; DIEDERICH, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.
- WINDRUM, P.; MORRIS, T.C.; DRAKE, M.B.; NIEDERWIESER, D.; RUUTU, T. EBMT Chronic Leukaemia Working Party Complications Subcommittee. Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres. *Bone Marrow Transplant*, v. 36, n. 7, p. 601–3, 2005.
- WRUCK, C.J.; FRAGOULIS, A.; GURZYNSKI, A.; BRANDENBURG, L.; KAN, Y.W.; CHAN, K.; et al. Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 70, p. 844–850, 2011.
- WU, F.; GUO, N.J.; TIAN, H.Y.; MAROHN, M.; GEARHART, S.; BAYLESS, T.M.; et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 17, n. 1, p. 241–250, 2011.
- WU XIUWEN, REN JIANAN, JIESHOU LI. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*, v. 14, n. 555–562, 2012.
- WU, P.; WANG, J.; CHEN, C.; CHAO, K.; MING-CHAU, C.; CHEN, W.; et al. Early Passage Mesenchymal Stem Cells Display Decreased Radiosensitivity and Increased DNA Repair Activity. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 6, n. 6, p. 1504–1514, 2017.

- XU, P.; YANG, X. The Efficacy and Safety of Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Spinal Cord Injury Patients: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Cell Transplantation*, v. 28, n. 1, p. 36-46, 2019.
- XU, Y.; YANG, Y.; ZHENG, H.; HUANG, C.; ZHU, X.; ZHU, Y.; et al. Intracavernous injection of size-specific stem cell spheroids for neurogenic erectile dysfunction: Efficacy and risk versus single cells. *The Lancet*, v. 52, p. 102656, 2020.
- YANG, X.O.; PANOPOULOS, A.D.; NURIEVA, R.; CHANG, S.H.; WANG, D.; WATOWICH, S.S.; et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of Biological Chemical*, v. 282, p. 9358-9363, 2007.
- YANG, Z.; LIU, W.; ZHOU, X.; ZHU, X.; SUO, F.; YAO, S. The effectiveness and safety of curcumin as a complementary therapy in inflammatory bowel disease. *Medicine*, v. 99, p. e22916, 2020.
- YONG, K.W.; WAN SAFWANI, W.K.; XU, F.; WAN ABAS, W.A.; CHOI, J.R.; PINGGUAN-MURPHY, B. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications: Current Methods and Challenges. *Biopreservation and Biobanking*, v. 13, n. 4, p. 231-9, 2015.
- YUAN, Z.; LOURENCO, S.D.S.; SAGE, E.K.; KOLLURI, K.K.; LOWDELL, M.W.; JANES, S.M. Cryopreservation of human mesenchymal stromal cells expressing TRAIL for human anti-cancer therapy. *Cytotherapy*, v. 18, n. 7, p. 860–9, 2016.
- ZEISSIG, S.; BÜRGEL, N.; GÜNZEL, D.; RICHTER, J.; MANKERTZ, J.; WAHNSCHAFTE, U.; et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, v. 56, p. 61–72, 2007.
- ZENG, Z.; MUKHERJEE, A.; ZHANG, H. From Genetics to Epigenetics, Roles of Epigenetics in Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Genetics*, v. 10, p. 1017, 2019.
- ZORZANELLI, R.T.; SPERONI, A.V.; MENEZES, R.A.; LEIBING, A. Pesquisa com células-tronco no Brasil: a produção de um novo campo científico. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 24, n. 1, p. 129-144, 2017.
- ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Journal of Tissue Engineering*, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

- ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, v. 13, n. 12, p. 4279–4295, 2002.
- ZHU, M.; HEYDARKHAN HAGVALL, S.; HEDRICK, M.; BENHAİM, P.; ZUK, P. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. *Journal of Visualized Experiments*, v. 79, p. 50585, 2013.
- ZHANG, H.; ZENG, Z.; MUKHERJEE, A.; SHEN, B. Molecular diagnosis and classification of inflammatory bowel disease. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, v. 18, n. 10, p. 867–886, 2018.
- ZHOU, C.; LI, M.; ZHANG, Y.; NI, M.; WANG, Y.; DACHAO, X.; et al. Autologous adipose-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula-in-ano: an open-label, controlled trial. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 11, p. 124, 2020.
- ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; et al. Multiple lineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.
- ZVAIFLER, N.J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C.J.; MOSS, J.; BURGER, J.A.; et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Research & Therapy*, v. 2, n. 6, p. 477-488, 2000.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado (a) Senhor (a),

O (a) Sr (a) está sendo convidado (a) a participar da pesquisa “Efeitos do transplante autólogo de células-tronco mesenquimais em pacientes com Doença de Crohn, associada ou não à fístulas perianais”. O (a) Sr (a) precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo sobre qualquer dúvida que o (a) Sr (a) tiver.

Este estudo está sendo conduzido pela Pesquisadora responsável Luana Bernardi, e pelos pesquisadores Rodrigo Juliano Oliveira, Andreia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva, Carlos Henrique Marques dos Santos, Thiago Franchi Nunes e Nivaldo Isidoro Oliveira e tem como objetivo investigar os efeitos do transplante de células-tronco mesenquimais em pacientes com Doença de Crohn, que têm fístulas próximo à região anal.

Nesta pesquisa, o (a) Sr (a) será convidado (a) a passar por um procedimento cirúrgico para retirar uma pequena quantidade de células de gordura do seu abdômen. No total, será retirado um volume total de 50 ml entre gordura e sangue (aproximadamente 8 colheres de sopa). Estas células serão diferenciadas em células-tronco mesenquimais em laboratório para que depois possam ser aplicadas diretamente na sua fístula e, com isso, ajudar na melhora da sua Doença de Crohn. Tanto a coleta das suas células de gordura quanto a aplicação das células-tronco na sua fístula será realizado por um médico especializado neste assunto.

Após a retiradas das células de gordura do seu organismo, o (a) Sr (a) irá responder algumas perguntas sobre o desenvolvimento e progressão da sua Doença de Crohn, comportamento da Doença, quais sintomas clínicos o (a) Sr (a) tem no seu dia-a-dia e sobre sua qualidade de vida. Para isso, o (a) Sr (a) precisará realizar também alguns exames, como a endoscopia digestiva alta, ênterografia por tomografia computadorizada, colonoscopia, ressonância magnética de pelve e coleta de sangue do membro superior, os quais irão identificar qualquer inflamação relacionada à Doença de Crohn dentro do seu

Rubrica do Participante

Rubrica do Pesquisador responsável

corpo. Além disso, serão obtidas as medidas de quantidade de massa muscular do seu corpo e circunferência do seu braço. Para a obtenção de todas estas informações a pesquisadora irá aplicar alguns formulários específicos, o que não irá ultrapassar um período de 45 minutos e, todos os exames citados serão realizados pela equipe médica do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (HUMAP/UFMS) e do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS). É importante o (a) Sr (a) saber que todos os indivíduos que irão participar desta pesquisa já são atendidos pelo serviço de Coloproctologia do HUMAP e do HRMS, e que os exames que serão feitos já fazem parte das solicitações previstas pela equipe médica dos Hospitais.

Este estudo será dividido em seis etapas. Na primeira etapa serão obtidas as informações descritas no parágrafo anterior. A segunda etapa se refere ao período de tempo entre o agendamento e coleta das células de gordura do seu corpo. Na terceira etapa será agendada a aplicação das células-tronco na sua fístula. Após completar três meses (quarta etapa), seis meses (quinta etapa) e um ano (sexta etapa) deste transplante, algumas avaliações descritas na primeira etapa serão obtidas novamente, com exceção do exame de ressonância magnética de pelve, que será realizado somente na primeira etapa e quando completar seis meses após a aplicação das células-tronco na sua fístula (quinta etapa); e dos exames de endoscopia digestiva alta e ênterografia por tomografia computadorizada, que serão realizados somente na primeira etapa e quando completar um ano após a aplicação das células-tronco na sua fístula (sexta etapa).

É importante que o (a) Sr (a) saiba que para a realização da coleta do seu sangue, o (a) Sr (a) irá precisar estar 12 horas em jejum. No entanto, logo após a coleta de sangue lhe será servido um lanche totalmente gratuito.

O (a) Sr (a) também está sujeito à riscos ao realizar os procedimentos deste estudo. Os riscos relacionados à coleta da gordura do seu corpo poderão ocorrer através de pequenos sangramentos, bem como alguns riscos previsíveis como infecção, dor e manchas roxas na pele decorrentes da infiltração do sangue. Também poderão acontecer alguns incidentes que podem ou não estar relacionados ao procedimento cirúrgico do transplante das células-tronco, como a ocorrência de febre, enjoos, diarreia, dores de cabeça e dor de barriga, dor ou sangramento na região anal, inchaço, tonturas, entre

Rubrica do Participante

Rubrica do Pesquisador responsável

outros. Em relação à coleta de sangue os riscos são dor localizada, manchas roxas na pele, desmaio e infecção. Já em relação aos exames de endoscopia digestiva alta e colonoscopia podem ocorrer complicações decorrentes da aplicação da sedação (dor ou inflamação no local da injeção), e outras raras, como sangramento, infecção ou até perfurações em órgãos. Os exames de enterografia por tomografia computadorizada e ressonância magnética de pelve também podem provocar algumas reações adversas, incluindo enjoos, dor de cabeça, coceira, vermelhidão na pele e vômito. Ademais, diante de qualquer risco relacionado ao seu estado psicológico (desconforto em responder as perguntas, constrangimento, mal-estar), será interrompida a entrevista ou adiada, caso o (a) Sr (a) prefira.

Será concedido ao (a) Sr (a) assistência e acompanhamento de forma integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, caso qualquer dano ou complicação lhe ocorra (sejam imediatos ou tardios), sejam estes danos relacionados direta ou indiretamente com o estudo, além do atendimento de cunho emergencial. Saiba que é de responsabilidade da pesquisadora e do HUMAP/EBSERH, a realização de toda e qualquer forma de suporte ao participante.

Será garantido ao participante o atendimento no pós-operatório imediato e tardio, de forma gratuita, sendo que os pacientes receberão acompanhamento especializado e orientações primárias quanto à realização de suas atividades de vida diária (AVD) no Ambulatório de Coloproctologia do HUMAP. Além disso, caso haja a necessidade de atendimento em caráter de urgência, o pronto atendimento médico (PAM) do HUMAP estará à disposição. O acompanhamento será mantido pelo tempo que for necessário e sem custos para os participantes da pesquisa. Lembrando que os profissionais participantes da equipe serão suficientemente habilitados e cientes das peculiaridades do histórico de cada paciente.

Todas as vezes que o (a) Sr (a) precisar se deslocar até o HUMAP ou até o HRMS, seja para realizar os exames ou para as consultas, todos os gastos de transporte serão custeados pela pesquisadora deste estudo, caso haja impossibilidade do participante de o fazer. Para isso, será disponibilizado ao (a) Sr (a) um valor em dinheiro que permite se deslocar até o HUMAP 8 vezes, contabilizando a ida e volta (R\$ 28,00), por meio de transporte urbano coletivo. Além disso, esta pesquisa garante a cobertura dos custos

Rubrica do Participante

Rubrica do Pesquisador responsável

referentes também aos procedimentos ou consultas que serão realizados, visto que todos os procedimentos citados em parágrafos anteriores serão realizados em hospitais públicos, ou seja, o (a) Sr (a) não terá qualquer tipo de gasto relacionado à pesquisa.

Não haverá qualquer compensação financeira para os que decidirem participar deste estudo e os benefícios serão obtidos quando os resultados da pesquisa forem usados pelos médicos que buscam novos tratamentos para a Doença de Crohn. Os dados obtidos nesse estudo serão publicados em revistas, jornais, eventos, teses, porém em nenhum momento serão divulgados nomes, ou seja, os dados da pesquisa são anônimos e apenas o pesquisador e você, terão acesso a este documento em que consta o seu nome. Isso significa que se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo.

Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar, e pode desistir em qualquer momento, mesmo após ter iniciado a pesquisa, sem nenhum prejuízo para você. Assim, se você quiser desistir de participar, pode informar essa decisão para a pesquisadora responsável através do número de telefone que se encontra abaixo.

Para perguntas/dúvidas ou problemas referentes ao estudo, ligue para Luana Bernardi, telefone (067) 98118 1975 em qualquer dia da semana ou horário. Para considerações ou dúvidas sobre a ética em pesquisa, pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (067) 3345 7187 de segunda-feira à sexta-feira em horário comercial.

Você receberá uma via deste termo de consentimento, o qual deverá ser rubricado em todas as páginas e assinado na última página, ficando a outra com o pesquisador.

Declaro que li e entendi este termo de consentimento, que sou voluntário a fazer parte deste estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas com a pesquisadora Luana Bernardi. Declaro que estou recebendo uma via assinada deste termo de consentimento.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Assinatura da pesquisadora responsável (Luana Bernardi)

ANEXO 2

FORMULÁRIO PARA CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES

Variáveis sócio-demográficas:

Identificação: _____ Telefone: _____ / _____

Sexo: () Masculino () Feminino Idade: _____ (anos)

Variáveis clínicas:

Tabagismo: () Sim () Não Atualmente: () Sim () Não

Tempo de tabagismo: _____ (anos)

História familiar de DII (Doença de Crohn ou Colite Ulcerativa): () Sim () Não

Idade do diagnóstico da Doença de Crohn: _____ anos

Realização de cirurgia prévia no sistema digestório (relacionada à Doença de Crohn): () Sim () Não

Qual: _____

Medicações já utilizadas:

Sulfa (Azufin) () Sim () Não

Mesal (Pentasa/Azalit/Mesacol) () Sim () Não

Mesalazina (SUPOS) () Sim () Não

Azatioprina (Imuran) () Sim () Não

Corticoide Supos (Entocort) () Sim () Não

Metotrexate () Sim () Não

Infliximab (Remicade) () Sim () Não

Ciprofloxacina () Sim () Não

Metronidazol (Flagil) () Sim () Não

Ranitidina/Cometid (Antak) () Sim () Não

Omeprazol () Sim () Não

Medicações em uso:

Sulfa (Azufin) () Sim () Não

Mesal (Pentasa/Azalit/Mesacol) () Sim () Não

Mesalazina (SUPOS) () Sim () Não

Azatioprina (Imuran) () Sim () Não

Corticoide Supos (Entocort) () Sim () Não

Metotrexate () Sim () Não

Infliximab (Remicade) () Sim () Não

Ciprofloxacina () Sim () Não

Metronidazol (Flagil) () Sim () Não

Ranitidina/Cometid (Antak) () Sim () Não

Omeprazol () Sim () Não

Outras medicações já utilizadas:

Outras medicações em uso:

ANEXO 3

CLASSIFICAÇÃO DE MONTREAL

1. Idade em que o diagnóstico foi estabelecido da doença (A):

- () A1 - ≤ 16 anos () A2 - 17 a 40 anos () A3 - ≥ 40 anos

2. Localização anatômica de maior extensão da doença (L):

- () L1 – Íleo terminal () L2 – Cólon () L3 – Íleo e cólon () L4 – TGS*

- () L1+L4 () L2+L4 () L3+L4

*Trato gastrointestinal superior

3. Comportamento clínico da doença (B):

- () B1 – Não estenosante e não penetrante () B2 – Estenosante
- () B3 – Penetrante () B1 + doença perianal concomitante
- () B2 + doença perianal concomitante () B3 + doença perianal concomitante

ANEXO 4**QUESTIONÁRIO DE QUALIDADE DE VIDA**

1. Com que frequência você tem evacuado nas duas últimas semanas? Por favor, indique com que frequência tem evacuado nas últimas duas semanas, escolhendo uma das seguintes opções:

1. Mais frequente do que nunca
2. Extremamente frequente
3. Muito frequente
4. Moderado aumento na frequência
5. Pouco aumento
6. Pequeno aumento
7. Normal, sem aumento na frequência das evacuações

2. Com que frequência se sentiu cansado, fatigado e exausto nas últimas duas semanas?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

3. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você se sentiu frustrado, impaciente ou inquieto?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

4. Com que frequência, nas duas últimas semanas, você não foi capaz de ir à escola ou ao seu trabalho, por causa do seu problema intestinal?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

5. Com que frequência, nas duas últimas semanas, você teve diarreia?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes

5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

6. Quanta disposição física você sentiu que tinha nas últimas duas semanas?

1. Absolutamente sem energia
2. Muito pouca energia
3. Pouca energia
4. Alguma energia
5. Uma moderada quantidade de energia
6. Bastante energia
7. Cheio de energia

7. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você se sentiu preocupado com a possibilidade de precisar de uma cirurgia, por causa do seu problema intestinal?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

8. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você teve que atrasar ou cancelar um compromisso social por causa do seu problema intestinal?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

9. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você teve cólicas na barriga?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

10. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você sentiu mal estar?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

11. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você teve problemas por medo de não achar um banheiro?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

12. Quanta dificuldade você teve para praticar esportes e se divertir como você gostaria de ter feito, por causa dos seus problemas intestinais, nas duas últimas semanas?

1. Grande dificuldade, sendo impossível fazer estas atividades
2. Grande dificuldade
3. Moderada dificuldade
4. Alguma dificuldade
5. Pouca dificuldade
6. Raramente alguma dificuldade
7. Nenhuma dificuldade

13. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você foi incomodado por dores na barriga?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

14. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você teve problemas para ter uma boa noite de sono ou por acordar durante a noite? (Pelo problema intestinal)

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

15. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você se sentiu deprimido e sem coragem?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes

- 6. Raramente
- 7. Nunca

16. Com que frequência, nas últimas duas semanas, você evitou ir a lugares que não tivessem banheiros (privada) bem próximos?

- 1. Sempre
- 2. Quase sempre
- 3. Muitas vezes
- 4. Poucas vezes
- 5. Bem poucas vezes
- 6. Raramente
- 7. Nunca

17. De uma maneira geral, nas últimas duas semanas, quanto problema você teve com a eliminação de grande quantidade de gases?

- 1. O principal problema
- 2. Um grande problema
- 3. Um importante problema
- 4. Algum problema
- 5. Pouco problema
- 6. Raramente um problema
- 7. Nenhum problema

18. De uma maneira geral, nas duas últimas semanas, quanto problema você teve para manter o seu peso como você gostaria que fosse?

- 1. O principal problema
- 2. Um grande problema
- 3. Um importante problema
- 4. Algum problema
- 5. Pouco problema
- 6. Raramente um problema
- 7. Nenhum problema

19. Muitos pacientes com problemas intestinais, com frequência têm preocupações e ficam ansiosos com sua doença. Isto inclui preocupações com câncer, preocupações de nunca se sentir melhor novamente, preocupação em ter uma piora. Com que frequência, nas duas últimas semanas, você se sentiu preocupado ou ansioso?

- 1. Sempre
- 2. Quase sempre
- 3. Muitas vezes
- 4. Poucas vezes
- 5. Bem poucas vezes
- 6. Raramente
- 7. Nunca

20. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você sentiu inchaço na barriga?

- 1. Sempre
- 2. Quase sempre
- 3. Muitas vezes
- 4. Poucas vezes

5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

21. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você se sentiu tranquilo e relaxado?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

22. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você teve problemas de sangramento retal com suas evacuações?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

23. Quanto do tempo, nas duas últimas semanas, você sentiu vergonha por causa do seu problema intestinal?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

24. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você foi incomodado por ter que ir ao banheiro evacuar e não conseguiu, apesar do esforço?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

25. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você sentiu vontade de chorar?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente

7. Nunca

26. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você foi incomodado por evacuar acidentalmente nas suas calças?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

27. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você sentiu raiva por causa do seu problema intestinal?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

28. Quanto diminuiu sua atividade sexual, nas duas últimas semanas, por causa do seu problema intestinal?

1. Absolutamente sem sexo
2. Grande limitação
3. Moderada limitação
4. Alguma limitação
5. Pouca limitação
6. Raramente limitação
7. Sem limitação alguma

29. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você se sentiu enjoado?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

30. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você se sentiu irritado?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

31. Quanto tempo, nas últimas duas semanas, você se sentiu falta de compreensão por parte das outras pessoas?

1. Sempre
2. Quase sempre
3. Muitas vezes
4. Poucas vezes
5. Bem poucas vezes
6. Raramente
7. Nunca

32. Quanto satisfeito, feliz ou agradecido você se sentiu com sua vida pessoal, nas duas últimas semanas?

1. Muito insatisfeito, infeliz a maioria do tempo
2. Geralmente insatisfeito, infeliz
3. Um pouco insatisfeito, infeliz
4. Geralmente satisfeito, agradecido
5. Satisfeito a maior parte do tempo, feliz
6. Muito satisfeito a maior parte do tempo, feliz
7. Extremamente satisfeito, não poderia estar mais feliz ou agradecido

Pontuação do IBDQ

As questões que compõem cada domínio apresentam-se no questionário de maneira não ordenada, para que sejam evitados vieses nas respostas.

Cada questão dentro de cada um dos domínios aferidos tem sete alternativas de respostas. Cada opção de resposta vale seu próprio número em pontos, sendo 1 pior qualidade de vida e 7 a melhor, somando-se o total de pontos obtidos em cada domínio. A soma simples de todos os domínios resultará no escore total obtido pelo paciente. Abaixo são relacionadas os domínios e suas respectivas questões:

1. Questões do componente sintomas intestinais: 01, 05, 09, 13, 17, 20, 22, 24, 26, 29 (escores podem variar de 10 a 70 pontos).
2. Questões do componente sintomas sistêmicos: 02, 06, 10, 14, 18 (escores podem variar de 5 a 35 pontos).
3. Questões do componente aspectos sociais: 04, 08, 12, 16, 28 (escores podem variar de 5 a 35 pontos).
4. Questões do componente aspectos emocionais: 03, 07, 11, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 30, 31, 32 (escores podem variar de 12 a 84 pontos).

Escore total pode variar de 32 a 224.

ANEXO 5

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Nome:		Data:		
GRUPOS ALIMENTARES	Frequências de Consumo			
Grupo do leite e queijos	N	D	S	M
Leite				
Leite em pó				
Queijo muçarela				
Queijo prato				
Iogurte				
Leite de soja				
Grupo das gorduras saturadas	N	D	S	M
Manteiga				
Bacon/torresmo				
Banha de porco				
Salgado frito/folhado				
Batata inglesa (frita)				
Salgado assado				
Grupo das carnes e ovos	N	D	S	M
Ovos				
Carne de boi				
Carne de frango				
Carne de porco				
Peixes frescos				
Peixes enlatados				
Carne de soja hidratada				
Grupo das gorduras insaturadas	N	D	S	M
Óleo (soja, milho, girassol ou canola)				
Azeite de oliva				
Azeitona				
Abacate				
Oleaginosas				
Linhaça				
Grupo dos feijões	N	D	S	M
Leguminosas				
Ervilha verde enlatada				
Grupo dos cereais	N	D	S	M
Arroz branco				
Arroz integral				
Macarrão comum				
Macarrão integral				

Milho verde				
Farinha de milho				
Pão francês				
Pão de forma branco				
Pão de forma integral (liso)				
Pão de forma integral com grãos				
Bolo, farinha branca, comum				
Aveia em flocos				
Farinha de cereais				
Farinha de mandioca				
Grupo das frutas	N	D	S	M
Abacaxi				
Mamão				
Melão				
Melancia				
Manga				
Banana				
Maçã/pera				
Laranja/mexerica				
Kiwi				
Goiaba				
Ameixa fresca				
Ameixa seca/damasco				
Uva passa				
Suco de laranja				
Suco de uva				
Suco de acerola				
Suco de maracujá				
Grupo das raízes e tubérculos	N	D	S	M
Batata inglesa cozida				
Batata doce				
Cará/inhame				
Mandioquinha				
Mandioca				
Grupo dos legumes e das verduras	N	D	S	M
Alface				
Acelga				
Agrião/rúcula/almeirão/couve				
Espinafre/chicória/escarola				
Tomate				
Molho de tomate				
Cenoura/beterraba				
Cebola (branca/roxa)				
Repolho branco/roxo				
Rabanete				

Pepino				
Abobrinha				
Abóbora				
Berinjela				
Brócolis/couve-flor				
Chuchu				
Pimentão				
Vagem				
Vinagre				
Limão				
Pimentas				
Alho				
Açafrão-da-terra/gengibre/canela				
Ervas frescas				
Bebidas alcoólicas	N	D	S	M
Cerveja				
Vinho branco/tinto				
Whisque				
Água e chás	N	D	S	M
Café preto				
Chá mate/preto				
Chá verde				
Chá de frutas				
Água				
Alimentos ultraprocessados	N	D	S	M
Macarrão instantâneo				
Salgadinho, batata/diversos				
Sorvete (massa)				
Sorvete (picolé)				
Açaí (polpa)				
Frutas em calda				
Requeijão				
Creme de leite				
Linguiça/salsicha				
Salame/mortadela				
Presunto				
Margarina				
Maionese				
Biscoito salgado				
Biscoito doce				
Barra de cereais				
Tempero pronto/industrializado				
Sazon				
Doces de padaria/doce de leite condensado				

Achocolatado				
Chocolate branco				
Chocolate ao leite				
Chocolate ½ amargo				
Balas comuns/chicletes/pirulitos				
Gomas de gelatina				
Gelatina preparada				
Refrigerante				
Molho de salada pronto				

Legenda: N = nunca consome; D = consome diariamente; S = consome semanalmente; M = consome mensalmente.

ANEXO 6

ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA PERIANAL

Variáveis	Escore				
	0	1	2	3	4
1-Supuração	Ausente	Mínima/mucosa	Mucosa moderada ou purulenta	Abundante	Escape fecal
2-Dor/restricção da atividade	Sem restricção	Desconforto mínimo, sem restricção	Desconforto moderado, alguma limitação da atividade	Desconforto marcado e limitação acentuada da atividade	Dor severa, limitação severa
3-Restricção da atividade sexual	Sem restricção	Restricção ligeira	Restricção moderada	Restricção marcada	Restricção completa
5-Tipo de doença perianal	Sem doença perianal/mariscas	Fissura anal/úlceras	< 3 fístulas anais	≥ 3 fístulas anais	Úlceras anais profundas ou fístulas associadas a alterações cutâneas significativas
5-Grau de induração	Sem induração	Induração mínima	Induração moderada	Induração substancial	Flutuação/abscesso

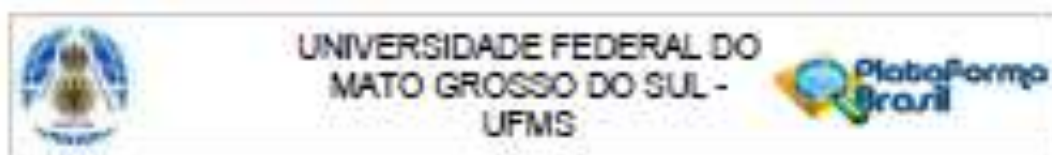
ANEXO 7

ESCORE ENDOSCÓPICO SIMPLES DA DOENÇA DE CROHN (SES-CD)

Escore Endoscópico Simples da Doença de Crohn (SES-CD)						
	Íleo	Cólon direito	Cólon transversal	Cólon esquerdo + sigmoide	Reto	Total
(1) Úlceras (presença e tamanho, 0-3)						
(2) Superfície atingida pela doença (proporção, 0-3)						
(3) Superfície ulcerada (proporção, 0-3)						
Estenoses (presença e tipo, 0-3)						
Total 1 + Total 2 + Total 3 + Total 4 = SES-CD						

ANEXO 8

Parecer Consubstanciado da CONEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DO TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TROFEO MIELOIDEIS EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN, ASSOCIADA OU NÃO À FÍSTULAS PERIANAIS.

Pesquisador: Luana Bernardi

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 5

CAAE: 79659417.8.0000.0001

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

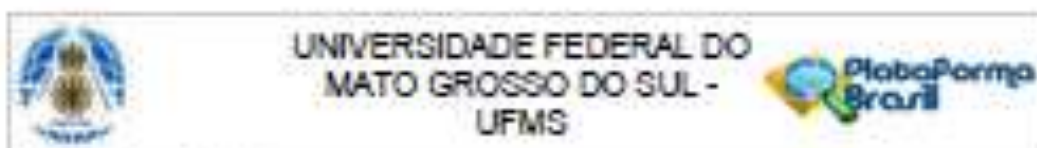
Número do Parecer: 3.266.458

Apresentação do Projeto:

A Doença de Crohn (DC) é uma condição crônica inflamatória que apresenta alta incidência no Brasil (BENICADJ et al., 2015). Esta doença impacta a qualidade de vida dos pacientes, principalmente em sua fase ativa, uma vez que nestas condições provoca sintomas extraintestinais, como dor abdominal, diarreia, sangramento retal, perda de peso, febre e fadiga (FUOSS et al., 2004), além de obstrução do intestino, presença de fístulas, abscessos e fissuras anais, caso o processo inflamatório crônico não for tratado (SANDS, 2004). Ademais, as fístulas perianais são as manifestações mais comuns da DC, que por provocarem dor, presença de descarga e formação de abscessos (KAMM, 2008), comprometem a permanência do indivíduo em um emprego e a ter uma vida social normal. Como consequência, geram-se impactos sobre os custos em saúde pública (KAPPELMAH et al., 2008), uma vez que a manutenção da saúde destes pacientes e a busca por melhores opções de tratamento são recorrentes.

O principal objetivo do tratamento na fase ativa da doença é alcançar a remissão com a diminuição do

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande			
Bairro: Casa Verde 248	CEP: 79.075-110		
UF: MS	Município: CAMPO GRANDE		
Telefone: (67)3345.7107	Fax: (67)3345.7107	E-mail: concep@ufms.br	



Continuação do Parecer: 1.386.001

Outros	docx	11:54:41	Luana Bernardi	Aceito
Outros	Pedido_de_promoçao_conep.pdf	09/11/2017 11:53:38	Luana Bernardi	Aceito
Outros	resolucao_secretaria.pdf	09/11/2017 20:48:23	Luana Bernardi	Aceito
Outros	anuencia_cetrogen.pdf	09/11/2017 20:48:33	Luana Bernardi	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biorisco	declaração_manuseio_biológico.pdf	09/11/2017 20:44:42	Luana Bernardi	Aceito
Outros	declaração_orcamentaria.pdf	09/11/2017 20:43:51	Luana Bernardi	Aceito
Outros	anuencia_coleproctologia.pdf	09/11/2017 20:42:07	Luana Bernardi	Aceito
Outros	Termo_compromisso_prontuario.pdf	09/11/2017 20:41:40	Luana Bernardi	Aceito
Outros	Anuencia_prontuario.pdf	09/11/2017 20:39:59	Luana Bernardi	Aceito
Outros	Aprovação_hospital2.pdf	09/11/2017 20:39:21	Luana Bernardi	Aceito
Outros	Aprovação_hospital.pdf	09/11/2017 20:38:43	Luana Bernardi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_plataforma_brasil.pdf	09/11/2017 20:34:35	Luana Bernardi	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	09/11/2017 20:32:19	Luana Bernardi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 15 de Abril de 2019

Assinado por:
Geraldo Vicente Martins
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade - Campo Grande
Bairro: Caixa Postal 553 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (51) 3345-7187 Fax: (51) 3345-7187 E-mail: secretaria@ufms.br

Página 16 de 16