

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

2022/2023

André Baptista Pestana Martins da Silva

Engenharia de Tecidos:  
Estratégias de Vasculogénese Sem Fatores de Crescimento utilizando a  
Fração Vascular Estromal de Tecido Adiposo Humano/  
Tissue Engineering:  
Growth Factor Free Strategies For Vasculogenesis Using Stromal Vascular  
Fraction From Human Adipose Tissue

Março 2023

FMUP

**U.** PORTO

**FM  
UP**

FACULDADE DE MEDICINA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

André Baptista Pestana Martins da Silva

Engenharia de Tecidos:

Estratégias de Vasculogénese Sem Fatores de Crescimento utilizando a  
Fração Vascular Estromal de Tecido Adiposo Humano/

Tissue Engineering:

Growth Factor Free Strategies For Vasculogenesis Using Stromal Vascular  
Fraction From Human Adipose Tissue

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Ciências Médicas e da Saúde

Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:  
Doutor Ricardo Horta

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:  
Biomedical and Biopharmaceutical Research  
Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica

Março 2023

**FMUP**

Eu, André Baptista Pestana Martins da Silva, abaixo assinado, n.º mecanográfico, 201706428, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 16/03/2023

Assinatura conforme cartão de identificação:

André Baptista

NOME

André Baptista Pestana Martins da Silva

NÚMERO DE ESTUDANTE

201706428 andrebpms@gmail.com

E-MAIL

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Ciências médicas e da saúde

TÍTULO MONOGRAFIA

Tissue Engineering: Growth Factor Free Strategies for Vasculogenesis Using Stromal Vascular Fraction From Human Adipose Tissue

ORIENTADOR

Professor Doutor Ricardo Horta

COORIENTADOR (se aplicável)

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES TRABALHOS APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES TRABALHOS (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTES TRABALHOS.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 15/03/2022

Assinatura conforme cartão de identificação:

André Baptista

“...o que hoje sou, não o sou apenas por ter crescido, antes por me terem deixado e ensinado a crescer...”

Aos meus pais e irmãos, por tudo.

Engenharia de Tecidos:  
Estratégias de Vasculogénese Sem Fatores de Crescimento Utilizando a  
Fração Vascular Estromal de Tecido Adiposo Humano

**Tissue Engineering: Growth Factor Free Strategies For Vasculogenesis  
Using Stromal Vascular Fraction From Human Adipose Tissue**

André BAPTISTA<sup>1</sup>, Ricardo HORTA<sup>1,2</sup>

1. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP)
2. Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva Estética e Maxilo-Facial do Hospital de São João (HSJ) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP)

Autor correspondente:

André Baptista Pestana Martins da Silva

Email: [andrebpm@gmail.com](mailto:andrebpm@gmail.com)

Rua Pico São Martinho nº 36, 9000-141, Funchal

## **Resumo:**

**Introdução:** A Engenharia de Tecidos tem sido palco de inúmeros avanços e constantes inovações; contudo, a aplicabilidade clínica com vista à regeneração ou substituição de tecidos e órgãos tem sido limitada pela dificuldade em conseguir, *in vivo*, uma vascularização eficiente das estruturas que assegure a sua viabilidade após a implantação. Têm-se multiplicado as estratégias de vascularização, focadas na otimização das estruturas de suporte, na adição de fatores de crescimento direcionados e na utilização de fontes celulares específicas.

**Objetivos:** Avaliar as orientações e estratégias atuais que utilizam a fração vascular do estroma do tecido adiposo como estratégia de promoção da vascularização das estruturas assegurando a sua integração no hospedeiro.

**Metodologia:** Com base em trabalhos de investigação desenvolvida entre o 3B's Research Group-UM e o Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva e Maxilo-Facial do HSJ-FMUP, efetuou-se pesquisa mais alargada na Pubmed, Google Scholar, Ovid e Mendeley Library, com as palavras chave “engenharia de tecidos”, “fração vascular do estroma”, “angiogénese”, “fatores de crescimento”, “biomateriais”, “*stem cells*” “*scaffolds*”. Após pesquisa, 29 publicações reuniram conteúdo de interesse para a presente monografia.

**Resultados:** A descoberta de células mesenquimatosas e outros tipos celulares, na fração vascular do estroma do tecido adiposo, colocaram a SFV no centro das atenções, como aposta estratégica no crescimento e diferenciação celular e na vasculogénese, sem necessidade de fatores de crescimento.

**Conclusões:** Embora com aplicação ainda limitada, os resultados obtidos são encorajadores porque, para além da sua abundância e fácil acesso, a SVF do tecido adiposo reúne capacidade regenerativa em várias linhagens celulares, derivadas da sua pluripotência, e características de elevada capacidade angiogénica.

Palavras chave: engenharia de tecidos, biomateriais, fatores de crescimento, fração vascular do estroma, angiogénese

## **Abstract:**

**Introduction:** Major advances and innovations are being made in the fields of tissue engineering; however, the clinical applicability aiming the regeneration or replacement of tissues and organs has been limited by the difficulty in achieving, *in vivo*, an efficient vascularisation of the structures that ensure their viability after implantation. Vascularization strategies have multiplied, focusing on the optimization of support structures, the addition of targeted growth factors, and the use of specific cellular sources.

**Objectives:** To evaluate current trends and strategies that use the stromal vascular fraction of adipose tissue as strategy to promote vascularization of structures ensuring their host integration.

**Methodology:** Based on research developed between 3B's Research Group-UM and the Plastic Reconstructive and Maxillofacial Surgery Service of HSJ-FMUP, a broader search was conducted in Pubmed, Google Scholar, Ovid and Mendeley Library, with the keywords "tissue engineering", "stromal vascular fraction", "angiogenesis", "growth factors", "biomaterials", "*stem cells*", "*scaffolds*". After search, 29 publications gathered content of interest for the present paper.

**Results:** The discovery of mesenchymal cells and other cell types in the stromal vascular fraction of adipose tissue have placed SFV in the spotlight as a strategic tool on cell growth and differentiation and vasculogenesis, in a growth factor free process .

**Conclusions:** Although its application is still limited, the results obtained are encouraging because, in addition to its abundance and easy access, adipose tissue SVF combines regenerative capacity in several cell lines, derived from its pluripotency, and characteristics of high angiogenic capacity.

Keywords: tissue engineering, biomaterials, growth factors, stromal vascular fraction, angiogenesis

## Índice

Índice de abreviaturas.....	05
Introdução.....	06
Material e Métodos.....	07
Resultados.....	08
1. Engenharia de Tecidos: conceito e aplicabilidade clinica – onde estamos agora?.....	08
2. Considerações históricas e evolução da ET.....	10
2.1 Biomaterais.....	10
2.2 Fontes Celulares.....	12
2.3 Fatores de crescimento.....	13
3. Limitações da Engenharia de tecidos – problema da vascularização.....	13
4. Vasculogénese sem adição de fatores de crescimento: Investigação e estratégias.....	15
5. Fração vascular estromal do tecido adiposo.....	17
6. Potencial angiogénico e regenerativo da SVF.....	19
7. SVF como estratégia de vascularização sem fatores de crescimento.....	20
Discussão.....	24
Conclusão e perspectivas futuras.....	27
Agradecimento.....	27

## Índice de Abreviaturas

ADSC/ASC - Adipose derived *stem cells*

ANG – Angiopoetina

BMSCs – *Stem Cells* da medula óssea

CAL – Cell assisted lipotransfer

CS - Cell Sheet

CD – Cluster dediferenciação

EC - Células endoteliais

EPC - Células Progenitoras endoteliais

ET - Engenharia de tecidos

FAK – Cínase de adesão focal

FGF - Fator de crescimento dos fibroblastos

HGF - Fator de crescimento dos hepatócitos

hiPSC - *Stem cells* pluripotentes induzidas humanas

HSJ - Hospital de São João

IGF- Fator de crescimento insulina-like

MCA - membrana corioalantóica

MEC - Matriz extracelular

MR - Medicina Regenerativa

MSCs *Stem cells* mesenquimatosas

PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas

PECAM - Molécula de adesão da célula endotelial plaquetária

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

SVF – Fração vascular do estroma

TGF - Fator de crescimento transformador

TIMP - Inibidor tecidual de metaloproteinases

UM - Universidade do Minho

UCSCs- *Stem cells* do cordão umbilical

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

WNT-Wingless

## **Introdução**

A necessidade e procura crescente de tecidos e órgãos humanos, para tratamento de doenças em que a solução passa pela transplantação de órgãos, bem como a pressão pela acrescida morbidade associada ao aumento da esperança de vida e da mortalidade por doença aguda, onde se destacam as mortes por doença cardiovascular, fez crescer, nos últimos anos, a investigação na área da Engenharia de Tecidos (ET), destacando a sua importância na reparação e regeneração dos tecidos.

Na sua essência, a Engenharia de Tecidos, integrada na Medicina Regenerativa (MR), tem como objetivo o desenvolvimento de substitutos biológicos, tecidos novos e funcionais, na procura de substituir ou regenerar tecidos ou órgãos lesados, envelhecidos ou disfuncionais, com mimetização, tanto quanto possível, das suas propriedades e funções nativas.

A grande maioria das estratégias de ET requer uma sequência bem concertada de eventos que compreendem o fornecimento de células que, através de estímulos de crescimento externos ou biomoléculas da matriz extracelular, aderem à superfície porosa da estrutura tridimensional de biomateriais, promovendo a sua integração, proliferação e diferenciação e, em última análise, a regeneração do tecido, órgão ou função alvo.

Essas construções (designadas pelo termo internacional *scaffold*), cuja conceção e desenvolvimento estão em constante investigação e atualização, no domínio das ciências da bioengenharia e biotecnologia, atuam como biomateriais hospedeiros de células incubadoras, orientando a sua fixação, crescimento, diferenciação, proliferação, fenótipo e migração, para o desenvolvimento de novos tecidos.

Mas, apesar dos inúmeros estudos e investigações já realizados, alguns com resultados muito promissores e impulsionadores, e que constituem avanços fundamentais nesta área, as alternativas existentes para a substituição ou regeneração dos tecidos, órgãos e funções, apresentam ainda limitações à sua aplicabilidade clínica, pelo que é premente o desenvolvimento de novas estratégias que o possibilitem.

Um dos fatores major limitantes na sua aplicabilidade é o problema da vascularização que possibilite a viabilidade e integração da *scaffold*, após a sua implantação, assegurando o sucesso da estratégia regenerativa.

As orientações e tendências vão no sentido de encontrar formas de promover, *in vitro*, a pré-vascularização da *scaffold* e assegurar a sua vascularização, *in vivo*, após a transplantação, com alternativas acessíveis, quer dos biomateriais quer dos tipos celulares, sem necessidade de recurso à suplementação de fatores de crescimento externos.

Nesse sentido, têm-se se multiplicado as pesquisas e orientações estratégicas que englobam e envolvem múltiplas áreas da ciência, entre biólogos celulares, biotecnólogos, engenheiros de materiais, diversas valências da medicina e a indústria <sup>(1,2)</sup>.

Demonstrativa dessa interdisciplinaridade é a colaboração entre a 3B's Research Group (Instituto de Investigação em Biomateriais, Biodegradáveis e Biomiméticos da Universidade do Minho (UM)- Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine) e o Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva e Maxilo-Facial do Hospital de São João (HSJ) - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP), cujas investigações serviram de base e inspiração para a elaboração da presente monografia <sup>(1-6)</sup>.

## **Material e métodos**

A partir de um conjunto de artigos de investigação desenvolvida entre o 3B's Research Group-UM e o Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva e Maxilo-Facial do HSJ-FMUP, realizámos uma pesquisa de literatura sobre o tema das estratégias de vascularização, em engenharia de tecidos, na Pubmed, Google Scholar, Ovid e Mendeley Library. Reunimos um conjunto de 29 artigos com interesse, que usamos para referência e citação.

Utilizámos as palavras chave “engenharia de tecidos”, “fração vascular do estroma”, “angiogénese”, “fatores de crescimento”, “biomateriais”, “*stem cells*” “*scaffolds*”.

## **Resultados:**

### **1. Engenharia de Tecidos: conceito e aplicabilidade clínica.**

#### **Onde estamos agora?**

A Engenharia de Tecidos poderá, num futuro não muito distante, potenciada pela Inteligência Artificial, revolucionar o panorama no tratamento das doenças, reduzindo a morbidade das abordagens atuais, evitando os problemas das zonas dadoras e a necessidade de imunossupressão de longo prazo, diminuindo os períodos de internamento hospitalar e os custos e risco associados <sup>(2)</sup>.

As técnicas de ET requerem, geralmente, o uso de estruturas porosas que servem de base tridimensional para a fixação inicial das células e subsequente formação de tecido. Assim, a reconstrução ou substituição de órgãos a partir da ET requer três componentes: (1) células, colhidas do órgão dador, para crescimento, diferenciação e formação de matriz, (2) *scaffolds*, estruturas tridimensionais para suporte celular temporário e transplantação, (3) biomoléculas, tais como citocinas e fatores de crescimento, que por sinalização molecular ou física promovam, num ambiente adequado, o crescimento e diferenciação do tipo de células desejadas.

A substituição de tecidos e/ou órgãos de forma fisiológica e estável, com estruturas mais simples ou complexas de ET, sendo embora muito promissora, não é, ainda, uma realidade quotidiana. Mas, apesar do longo caminho ainda a percorrer, existem pequenos grandes avanços que já se têm sido alcançados ao longo dos anos de investigação, com tradução prática, em algumas áreas da medicina regenerativa.

Atala *et al* foram pioneiros, ao publicar a utilização de bexigas autólogas construídas por técnicas de ET, a partir de células uroteliais e musculares, cultivadas numa *scaffold* em forma de bexiga, construída a partir de colagénio ou compostos de colagénio e ácido poliglicólico, em sete doentes que necessitavam de cistoplastia <sup>(7)</sup>. Nos anos seguintes multiplicaram-se, com êxito, as aplicações noutras áreas, com reparação de tecidos como a traqueia, uretra, cartilagem nasal, esófago, fígado, periodonto, miocárdio, e substituição de córnea, por exemplo <sup>(8)</sup>.

No caso particular da cirurgia plástica, que partilha com a ET o objetivo comum da restituição da morfologia e da função dos órgãos<sup>(1,2)</sup>, beneficiando também do papel privilegiado dos cirurgiões plásticos no acesso à fonte de células pluripotenciais existentes no tecido adiposo, o que os torna players e parceiros fundamentais na investigação e aplicabilidade clínica da medicina regenerativa, são múltiplas as aplicações da ET e MR. Merecem destaque o tratamento nas lesões com perda cutânea, nos defeitos músculo-esqueléticos e crânio-cervicais, nas lesões nervosas periféricas bem como a utilização de autoenxerto de gordura em situações de reconstrução mamária e outras em que, a par da reposição volumétrica, se tira vantagem da riqueza do tecido adiposo em células estaminais derivadas dos adipócitos (ADSC - adipose derived stem cells - mais resumidamente ASC).

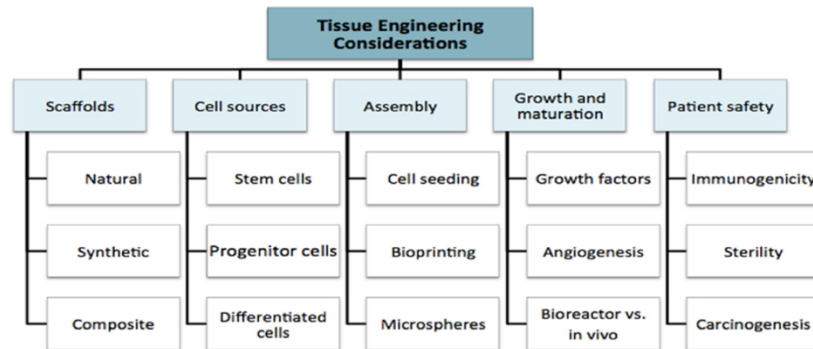
A técnica de Cell Sheet Engineering (CS) tem-se mostrado uma alternativa promissora, por ser uma técnica *scaffold-free*, obtendo um produto de bioengenharia através da cultura de ASC, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais ou de outro tipo, em folha única e contígua de cultura celular, numa superfície que permite a cultura de forma standard ou responsiva a estímulos (temperatura, hipoxia, etc)<sup>(2,5,9,10)</sup>. A comprovada maior estabilidade, maior sobrevivência celular, a par de um menor tempo de cultura necessária, colocam esta estratégia na vanguarda das opções, pela grande vantagem de serem implantes de menor espessura, com maior garantia de sobrevivência e integração no hospedeiro.

Situações que impliquem maior espessura do implante, como no caso das estruturas tridimensionais (*scaffolds*), exigem uma rápida vascularização do mesmo após o transplante, para assegurar a sua sobrevivência e integração, acarretando maiores dificuldades de êxito e de aplicabilidade<sup>(4)</sup>.

Por esse motivo é que, neste aspeto fulcral de assegurar a vascularização do implante e a sua integração no hospedeiro, se têm desenvolvido as estratégias de investigação e experimentação recentes, centradas nos pilares da ET, os biomateriais, os tipos celulares e os fatores de crescimento, sempre balizadas pelos aspetos da segurança e imunogenicidade.

## 2. Considerações históricas e evolução da ET

A falta de alternativas para a substituição ou regeneração dos tecidos e órgãos, muito condicionadas pelas restrições associadas à transplantação de órgãos e tecidos, à sua escassez, à morbidade no dador e à imunogenicidade, tornando necessário o desenvolvimento de novas estratégias que ultrapassem estes fatores altamente restritivos, impulsionou o desenvolvimento da Engenharia de tecidos, conceito criado em 1988 <sup>(2)</sup>.



Ao fabrico da *scaffold* (1), desenhada tendo em vista o órgão alvo, segue-se a colheita de células (2) a semear; após uma fase prévia de crescimento e manipulação (3) segue-se a inoculação (4) da cultura celular sobre o suporte, com adição de moléculas bioativas, fatores de crescimento e vias de sinalização (5) que promovem o crescimento, proliferação e diferenciação em ambiente controlado; por fim, ocorre a implantação no hospedeiro (6) sendo esperada a interação com integração rápida, onde são relevantes as características dos biomateriais utilizados e a vascularização precoce após implantação.

### 2.1 Biomateriais

A Sociedade Europeia de Biomateriais define-os como materiais naturais ou artificiais, capazes de atuar com os sistemas biológicos do corpo e tratar, aumentar ou substituir qualquer órgão ou função <sup>(11)</sup>. As *scaffolds* podem ser fabricadas a partir de uma diversa gama de biomateriais, agrupados em poliméricos e compósitos, materiais metálicos e materiais cerâmicos, que interagem com os sistemas biológicos, cuja escolha e estrutura determinará as características e comportamento das mesmas <sup>(12)</sup>. Pela sua biocompatibilidade e

biodegradabilidade destacam-se os polímeros , como o colagénio, ácido hialurónico, alginatos, quitosano, fibrina e gelatina, no caso de polímeros naturais, e o ácido polilático, ácido poliglicólico e polietilenoglicol, dentro dos polímeros sintéticos <sup>(13,14)</sup>.

Idealmente, uma *scaffold* deverá ser biocompatível, não tóxica e não carcinogénica; a sua forma tridimensional deverá possibilitar o crescimento de tecidos e órgãos mimetizando os tecidos e órgãos alvo; a configuração em estrutura porosa com interconectividade elevada, permitirá semear uma densidade elevada de células e que as mesmas, com ambiente e estímulos adequados, migrem e penetrem os poros e estabeleçam comunicações intercelulares, com crescimento de tecido ao longo da *scaffold* <sup>(14)</sup>; além disso, a porosidade possibilitará movimento de nutrientes e metabólitos para dentro e fora da mesma; as suas propriedades mecânicas deverão ser idênticas às do tecido alvo e possibilitar integridade estrutural suficiente *in vivo*, com tensão mecânica adequada para apoiar o tecido em desenvolvimento; a taxa de degradação da estrutura tridimensional, dando lugar ao tecido natural, deverá ser não tóxica e não inflamatória.

A interação célula-superfície assume particular importância na adesão celular e subsequente desenvolvimento do tecido; a atividade química da superfície da *scaffold* desempenha um papel fundamental na regularização do desenvolvimento tecidual, uma vez que tanto a proliferação das células quanto a sua diferenciação são reguladas através de biomoléculas e proteínas da matriz extracelular ou fornecidas exogenamente <sup>(4)</sup>, que aderem à superfície; aproveitando este conhecimento podem ser usadas modificações nas superfícies das *scaffolds* de forma a melhorar as suas propriedades seletivas (funcionalização das *scaffolds*).

A estruturas implantáveis podem ser sólidas, o que exige a implantação cirúrgica, ou podem ter a forma de gel que, quando injetado, adquire a forma apropriada do defeito, *in situ* <sup>(2)</sup>.

Todos estes aspetos não serão suficientes se não forem completados com outro aspeto fundamental das características que a *scaffold* deve possuir: a rápida e total integração no tecido hospedeiro.

### 3.1 2.2 Fontes Celulares

Sendo que a mimetização das características estruturais e funcionais é o objetivo da ET, os tipos celulares a utilizar serão, idealmente, as células nativas ou modificadas para a estrutura e função nativa dos tecidos que se pretende regenerar. Entre as possíveis fontes celulares encontram-se as células-tronco (*stem cells*) embrionárias, as *stem cells* de tecidos adultos e células adultas diferenciadas<sup>(2,8,15)</sup>. A seleção das fontes prende-se com aspetos que acabam por condicionar a opção, procurando-se que seja uma fonte acessível e abundante, de baixo custo e morbidade, sem restrições político-religiosas e que permita a reprodutividade e aplicação clínica em grande escala.

No caso das células estaminais embrionárias, não obstante a sua totipotencialidade, a sua escassez, a dificuldade na colheita, questões éticas e o potencial de tumorigénese associado ao elevado potencial de diferenciação e proliferação, tornam difícil a sua utilização rotineira.

Em oposição, as *stem cells* mesenquimatosas que podem ser obtidas a partir de diversos tecidos adultos, existem em grandes quantidades, alguns tipos celulares podem ser facilmente acessíveis e com menor dificuldade técnica, morbidade ou custo, são pluri ou multipotentes e podem diferenciar-se em múltiplas linhagens. Assim, além de precursoras do tecido de origem, em cujo crescimento podem crescer e proliferar, também podem, em certas condições de cultura e estímulos, diferenciar-se noutros tipos celulares e tecidos. São, assim, ultrapassadas as questões ético-religiosas da questão das células embrionárias e, também, os problemas de imunogenicidade e rejeição, por serem células colhidas do próprio hospedeiro. Essas características levaram à explosão do interesse pelas *stem cells* mesenquimatosas, de que as células do tecido adiposo (ASCs) são um exemplo paradigmático, nas várias aplicações da ET e terapia celular<sup>(16)</sup>.

As células adultas somáticas, por processos de reversão da sua diferenciação para um estado de pluripotência, as chamadas *stem cells* pluripotentes induzidas, poderão também ser uma possível fonte de utilização, muito embora ainda seja uma realidade com aplicação prática limitada.

### 2.3 Fatores de crescimento

O crescimento, diferenciação e proliferação celular deverá ser orientado no sentido dos tecidos ou órgãos alvo, pelo que, para além de uma estrutura que suporte esse crescimento e que mimetize a matriz extracelular, assegurada pela *scaffold*, é fundamental que o novo ambiente criado se aproxime do ambiente nativo, onde são essenciais, para a diferenciação e proliferação, moléculas bioativas que desencadeiam e mantêm esses processos, os chamados fatores de crescimento, para além dos estímulos mecânicos e outros gerados na matriz. Nesses processos participam, em simultâneo ou em diferentes fases, inúmeros fatores de crescimento e estímulos que promovem a diferenciação funcional e estrutural das células nos respetivos tecidos e órgãos (queratinócitos, fibroblastos, células musculares, células do tecido ósseo e cartilágneo, células endoteliais, etc.)

No caso particular da temática da ET e dos fatores de crescimento necessários à vascularização e angiogénese (fundamental para assegurar *in vitro* a formação de estruturas capilares e *in vivo* a integração dessa rede com os vasos do hospedeiro), a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células endoteliais e a maturação e complexidade dos vasos sanguíneos criados dependem da secreção, ou da adição, de um conjunto de fatores de crescimento e vias de sinalização, para além do recrutamento de outros tipos celulares (pericitos e células musculares lisas, por exemplo).

### 3. Limitações da Engenharia de tecidos – problema da vascularização

As atuais estratégias de vascularização usadas na ET enfrentam limitações como a dificuldade e custo no isolamento das células endoteliais, a complexidade do uso de fatores de crescimento, os problemas relacionados à biodegradação e imunogenicidade dos biomateriais, bem como espessura dos suportes, cuja dificuldade de pré-vascularização torna problemática a integração com o hospedeiro, aquando da implantação<sup>(4,5,17)</sup>.

A pré-vascularização implica a utilização de células endoteliais (EC) isoladas ou em co-cultura, para induzir a formação de redes tipo capilares que, após a implantação, se desenvolvem e amadurecem, formando anastomoses com a circulação do hospedeiro. A iniciação e manutenção desses processos requer a intervenção de fatores de crescimento angiogênicos. O isolamento e fornecimento de células endoteliais é, contudo, um fator limitante, além de que a formação da rede vascular que decorre da utilização das EC do cordão umbilical (fonte habitual de EC) não é robusta, agravando-se o panorama pelo fato de os fatores de crescimento, fornecidos de forma exógena, não reproduzirem o ambiente nativo da vasculogênese, o que resulta em formação de redes imaturas, com compromisso do resultado final <sup>(18)</sup>.

O problema da vascularização das *scaffolds* tem-se mantido como um dos maiores obstáculos e desafios-chave na aplicabilidade clínica, não obstante os avanços conseguidos nos biomateriais e tecnologias de implantação. Sem o suporte de vasos sanguíneos, a função dos órgãos é limitada, pela falta de aporte suficiente de nutrientes e das trocas gasosas e de metabólitos, o que limita a sobrevivência das células e tecidos <sup>(4,17)</sup>.

Claramente, a vascularização rápida é um aspecto crítico para a sobrevivência. Assim, as estratégias de ET devem focar-se na criação de *scaffolds* pré-vascularizadas, antes da implantação, ou desenhá-las de forma a promover a neovascularização no local da transplantação <sup>(4)</sup>. No entanto, é difícil construir implantes pré-vascularizados completos que possam mimetizar a espessura de tecidos e órgãos sem comprometer a distância entre células e os vasos sanguíneos.

A neovascularização compreende dois processos distintos: a vasculogênese e a angiogênese <sup>(14,19)</sup>. O primeiro corresponde ao processo pelo qual são formados vasos de novo. À vasculogênese seguem-se processos de estabilização, maturação e reorganização do plexo vascular primitivo, num circuito mais complexo e funcional, denominados por angiogênese. Para além das células endoteliais, as células musculares e os pericitos participam, também, na regulação dos processos de angiogênese <sup>(4)</sup>.

Inúmeros fatores químicos solúveis participam nestes processos de regulação da angiogênese e diferenciação vascular. Foram identificadas, em estudos *in vivo*, várias vias de sinalização celular e moléculas envolvidas nos processos de vasculogênese e angiogênese, cujo

conhecimento constitui informação valiosa no desenho das estratégias da ET, nomeadamente no aspeto crucial, e limitante, da vascularização dos suportes.

Entre essas, incluem-se as vias de sinalização NOTCH, WNT (wingless) e BMP, por exemplo, e fatores moleculares como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), os fatores de crescimento transformadores (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), o fator de crescimento insulina-like (IGF), a angiopoetina (ANG), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), entre outros.

#### **4. Vasculogénese sem adição de fatores de crescimento: Investigação e estratégias**

As orientações de investigação e estratégias de sucesso passarão pela seleção de fontes celulares adequadas e de acesso facilitado, pela utilização de biomateriais com criação de estruturas 3D ou 2D “inteligentes” e, sobretudo, por estratégias que assegurem a sua vascularização pré e pós implantação, para o que serão mais eficientes e vantajosas as estratégias que não necessitem da adição ou suplementação de fatores de crescimento.

Tipos Celulares:

Se as células vasculares maduras, as células endoteliais, podem ser isoladas a partir de fontes específicas, a verdade é que os seus fenótipos se perdem rapidamente durante a expansão *in vitro*, à medida que se perdem os estímulos do estrutura nativa. A mesma limitação decorre, também, na utilização das *stem cells* embrionárias (EPCs - *stem cells* progenitoras endoteliais) aquando da sua diferenciação, a que acrescem questões político-religiosas no seu isolamento. Tais fatos constituem um obstáculo e desafio para a sua utilização clínica generalizada, pelo que abordagens mais recentes apostam na obtenção de células estaminais pluripotenciais, presentes em tecidos adultos.

No contexto de descobertas impulsionadoras nesta área, tornou-se muito promissora a descoberta das *stem cells* pluripotentes induzidas humanas (hiPSC), obtidas através de reprogramação génica de células somáticas do adulto, pelo investigador japonês Shinya Yamanaka, em 2006<sup>(8)</sup>, que lhe valeu o Prémio Nobel da Medicina em 2012 e abriu as portas a

um mundo de novas possibilidades na área da ET e MR . Entre as grandes vantagens nas hiPSC, para além de se contornar o problema ético associado à colheita de células embrionárias, está o fato de se poder dispor de um pool de células progenitoras que poderão ser orientadas para uma diferenciação específica, por reprogramação de células somáticas, abundantes, acessíveis a partir do próprio indivíduo e, logo, disponíveis para transplante sem o problema da imunogenicidade (16,17).

A descoberta de *stem cells* mesenquimatosas (MSCs) presentes na medula óssea (BMSCs), no cordão umbilical (UCSCs) e, sobretudo, no tecido adiposo (ASCs), levou a uma explosão de interesse nestas fontes celulares, com um crescimento exponencial de investigações e aplicabilidade clínicas, colocando a questão do seu uso médico em bases completamente novas, pela eliminação das questões ético-religiosas e, também, por eliminar o problema da rejeição imunológica, tratando-se de células colhidas do próprio paciente (16,20). A esses aspetos acrescem a abundância e o fácil acesso, sendo que a colheita de células estaminais do tecido adiposo (ASC) ganha vantagem sobre a colheita a partir da medula óssea, quer na abundância, quer na facilidade de acesso e na diminuição da morbilidade associada (1,2). Relacionada à investigação do tecido adiposo como fonte celular, revelou-se extremamente importante a descoberta da fração vascular do estroma (SVF) do tecido adiposo como sendo uma mistura rica em células com elevado potencial regenerativo e angiogénico (vide adiante).

#### Biomateriais e estruturas

A evolução na investigação de biomateriais tem evoluído no sentido de utilizar materiais que ofereçam maior disponibilidade de utilização e que reproduzam o mais possível a matriz celular e ambiente nativo, através da sua funcionalização, criando biomateriais “inteligentes”, com a incorporação de pistas e estímulos biomoleculares na sua superfície, através do avanço nas técnicas computadorizadas microprecisas de montagem, criação de modelos, bioimpressão, microfluidificação e técnicas de nanotecnologia, entre outras, otimizando a adesão, o crescimento e diferenciação das células e o crescimento de novos tecidos (8,13,19). Têm sido

desenvolvidas vários tipos de configuração e estrutura, para permitir uma adequação mais específica e melhor integração, como por exemplo os hidrogéis, as esponjas, fibras, etc <sup>(15)</sup>.

A engenharia de folha celular (cell sheet – CS) é uma abordagem *scaffold-free* que permite a utilização das células angiogénicas cultivadas dentro da sua própria matriz como uma folha contínua <sup>(5,9,10)</sup>.

Possibilita, sem a necessidade de biomateriais de suporte, obter uma cultura em monocamada ou multicamadas (que podem posteriormente ser ligadas, com formação de estrutura 3D), mantendo a secreção da MEC, que atua como protetora e transportadora das células transplantadas, minimizando a perda celular e otimizando a viabilidade da cultura (15). A ausência de *scaffold* artificial confere melhor biocompatibilidade e menos resposta imunogénica<sup>(13)</sup>.

## **5. Fração vascular estromal (SVF) do tecido adiposo**

A forma como o tecido adiposo passou a ser encarado na comunidade científica mudou, radicalmente, com a descoberta de que constitui um reservatório abundante, de fácil acesso e a baixo custo, de células estaminais e estromais com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens, tornando o tecido adiposo uma fonte privilegiada para a colheita de células cuja aplicabilidade foi, e continua a ser, amplamente demonstrada em várias áreas da terapêutica médica e medicina regenerativa.

Desde a sua caracterização por Zuk *et al*, em 2001, as ASCs têm sido extensivamente estudadas quanto à suas características de multipotência mas também pelos seus efeitos parácrinos, Diversos estudos sugeriram que as propriedades regenerativas verificadas com a utilização do lipoaspirado eram resultado, não apenas das características da ASC mas, também, das diversas outras células presentes na fração vascular do estroma, de onde as ASCs eram originárias <sup>(21)</sup>.

A SVF é uma coleção heterogénea de células que se encontra no tecido adiposo e que se obtém por isolamento, através de processos enzimáticos e outros, com a remoção dos adipócitos, tecido conjuntivo e sangue. Contém uma mistura de *stem cells* mesenquimatosas (MSC), neste

caso denominadas adipose derived *stem cells* (ASC), células precursoras endoteliais (EPC), macrófagos, células T reguladoras, células musculares lisas, pericitos e pré-adipócitos <sup>(1,21)</sup>.

O interesse verificado nesta mistura de células presentes na SVF tornou-se notório e exponencial, como atestam a explosão de trabalhos, investigações e publicações sobre a crescente aplicabilidade, em diversas áreas da medicina, decorrente da sinergia conferida pela riqueza e diversidade desta mistura celular e do seu potencial translacional.

Matsumoto *et al* em 2006, com a introdução do conceito da CAL (cell assisted lipotransfer), popularizada por Yoshimura, demonstrou que o enriquecimento dos enxertos de gordura com SVF aumenta a sua capacidade de retenção e viabilidade, tendo-se confirmado aumento na microvascularização da gordura.

Em modelos terapêuticos de pesquisa laboratorial, os efeitos imunomodulador, angiogênico, de diferenciação e produção extracelular da SVF mostraram-se equivalentes e muitas vezes superiores aos das ASCs <sup>(22)</sup>.

O potencial regenerativo da SVF tem sido amplamente reconhecido e têm-se multiplicado as suas aplicações no tratamento de doenças como a diabetes, esclerose múltipla, queimaduras e radiodermites, regeneração de nervos periféricos, regeneração óssea e cartilágnea, isquemia do miocárdio, entre outros <sup>(1,2)</sup>.

Na engenharia de tecidos, considerando o seu potencial e tendo por base os resultados promissores já conseguidos, a utilização de SFV como fonte de células e geradora de mecanismos de vascularização, sem adição de fatores de crescimento, tem sido uma das grandes apostas nas estratégias dos investigadores <sup>(4)</sup>.

A sua enorme importância e mais-valia prende-se com o fato de, simultaneamente, constituir uma rica fonte celular para a formação específica de tecidos, de várias linhagens <sup>(22)</sup>, ao mesmo tempo que poderá, pela diversidade de células e microambiente envolvidos nos processos de angiogênese, ser a solução para a sobrevivência dos implantes pré-vascularizados, ao promover, sem a necessidade da introdução de fatores exógenos, uma vascularização precoce e sustentada que assegure a difusão de oxigénio e nutrientes, vitais para a integração no hospedeiro <sup>(4)</sup>.

Na literatura encontramos múltiplos trabalhos que envolvem a utilização de SFV do tecido adiposo humano na ET, em estruturas 3D<sup>(3,4,6)</sup> ou em estratégias *scaffold-free*, como na técnica de Cell Sheet<sup>(5)</sup>. A SFV pode ser utilizada na forma fresca, obtida de imediato após a colheita, ou pode ser armazenada na forma criopreservada para utilização posterior, sendo que os estudos publicados demonstraram a manutenção das funções de adesão e proliferação celular e potencial angiogénico mesmo após a criopreservação de tecido adiposo e SFV<sup>(4,23-25)</sup>, mantendo a sua estabilidade, inclusive, após 1 ano<sup>(26)</sup>. O tipo de técnica cirúrgica utilizada na colheita também não parece influenciar as propriedades da SVF obtida, tal como a região de colheita<sup>(1,16)</sup>.

## **6. O que se sabe do potencial angiogénico e regenerativo da SVF?**

Os marcadores de superfície celular, incluindo os clusters de diferenciação (CD), permitem a caracterização fenotípica da heterogeneidade celular que compõe a SVF, o que possibilita, entre outros aspetos, identificar a participação e o papel dos vários tipos celulares nos múltiplos processos, incluindo a diferenciação e angiogénese.

Para além das ASC (CD34<sup>++</sup>CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>), das EPC (CD34<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup>CD146<sup>-</sup>) e pericitos (CD34<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>CD146<sup>+</sup>), em trabalhos recentes demonstrou-se o papel angiogénico e regenerativo dos monócitos/macrófagos (CD14<sup>+</sup>) encontrados na SVF contribuindo, ativamente, na vascularização através da secreção de citocinas como VEGF e bFGF. Eto *et al*, identificaram uma subpopulação de macrófagos do tecido adiposo, M2 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>) com características de MSC, como a adesão, pluripotência e diferenciação, colocando estas células como mais uma linhagem interveniente no processo regenerativo.

Sabe-se que as células da SFV participam na regeneração celular e dos tecidos pelas diferenciação e proliferação das suas linhagens, mas há também evidência científica de processos de sinalização parácrina, com interação entre os vários tipos celulares e entre as células e o meio envolvente, com aumento da libertação de citocinas e várias outras moléculas capazes de desencadear mecanismos de angiogénese, diferenciação e imunomodulação.

## 7. SVF como estratégia de vascularização sem fatores de crescimento

Na literatura encontram-se referências, múltiplas e consistentes, sobre o papel da SFV na promoção da angiogénese e neovascularização dos tecidos e do impacto favorável dessa descoberta, com a utilização clínica das SFV em situações essencialmente caracterizadas por isquemia e insuficiente vascularização, como a isquemia do miocárdio, feridas, queimaduras, úlceras diabéticas e em aplicações estéticas, entre outras. Estas propriedades angiogénicas parecem resultar do cocktail celular que compõe a SVF, com interação entre grupos heterogéneos, que agem sinergicamente<sup>(1)</sup>. Traktuev *et al* demonstraram que a co-implantação de EPCs e ASCs resultaram, *in vitro*, numa maior neovascularização do que as EPCs ou ASCs isoladamente<sup>(27)</sup>. Koh *et al* implantaram SVF diretamente no músculo isquémico do rato e demonstraram a formação de uma nova rede vascular, onde os macrófagos desempenhavam papel importante na organização estrutural dos vasos, com melhoria da perfusão<sup>(28)</sup>. O enriquecimento do autoenxerto de gordura com SVF leva à libertação de citocinas e fatores de crescimento que promovem a angiogénese e revascularização do enxerto, o que possibilita a sua retenção e sobrevivência.

A estes resultados, junta-se a contribuição de muitos outros trabalhos, alguns muito recentes<sup>(1,3,4,6)</sup>, que evidenciam o reconhecimento do papel da SVF na angiogénese e neovascularização dos tecidos, *in vitro* e *in vivo*, e solidificam os argumentos de utilização da fração vascular do estroma de tecido adiposo humano como estratégia de vascularização, sem fatores de crescimento.

Entre estes destacamos, por se tratar de uma realidade portuguesa e que nos é próxima, a contribuição dos trabalhos de investigação que adiante descrevemos, realizados com colaboração entre a 3B's Research Group e o Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva e Maxilo-Facial do Hospital de São João – FMUP<sup>(1-6)</sup>.

Frias *et al*, num estudo recente (com publicação em Março de 2023), envolvendo 26 amostras de tecido adiposo, obtidas em pacientes admitidos para cirurgia de contorno corporal no serviço de C Plástica e Reconstructiva do Hospital de S. João, investigaram a expressão dos marcadores de superfície das células da SVF e a sua relação com as variáveis idade, índice de

massa corporal, história de obesidade e perda ponderal maciça (grupo de ex-obesos) e local de colheita <sup>(1)</sup>.

Na análise estatística das variáveis, através do teste de Mann-Whitney U, demonstraram que o grupo dos ex-obesos apresentava uma percentagem significativamente superior (Mdn=84.69) de células com expressão do CD90, um marcador expresso em células endoteliais e ASCs e correlacionado com taxas de proliferação e angiogénese mais elevadas, quando comparado com o grupo de não obesos (Mdn=54,26), uma diferença estatisticamente significativa que coloca esta subpopulação em situação mais vantajosa no contexto de cirurgias reconstrutivas e estéticas ou em áreas da medicina regenerativa, com utilização de SVF. Estes resultados poderão constituir uma janela de oportunidade, no sentido em que, pela primeira, vez foi descrita a relação de ex-obesidade como perfil favorável, pela maior capacidade angiogénica do SVF desses pacientes. Noutro espetro de análise, não foi encontrada variação da expressão dos marcadores celulares com o aumento da idade, confirmando, esta ausência de correlação negativa, uma esperança promissora das terapêuticas regenerativas com SVF em doentes mais idosos.

Freitas-Ribeiro S. *et al*<sup>(4)</sup>, considerando que a utilização do SVF na forma criopreservada tem sido subaproveitada, considerando como abordagem promissora a utilização de polímeros naturais (de que o colagénio é dos mais abundantes e utilizado, além de ser um componente estrutural major da MEC), e considerando, também, os condicionantes regulamentares e religiosos na utilização do colagénio dos mamíferos, realizaram um trabalho onde pretendiam explorar três aspetos fundamentais :

(a) a aposta no colagénio marinho, como fonte alternativa de biomaterial natural, disponível e biocompatível, para construções de suporte 3D

(b) utilização de SVF como fonte celular promotora de angiogénese, sem necessidade de fatores exógenos, sendo a SVF utilizada na forma

(c) criopreservada, o que, a manter as potencialidades do SFV fresco, permite equacionar uma aplicabilidade clínica mais alargada.

No presente estudo foi feita sementeira de SVF de tecido adiposo humano criopreservado, em matrizes 3D feitas de esponjas de colagénio de tubarão azul, e pretendeu-se explorar (i) a capacidade da SVF criopreservada de promover uma rede pré-vascular, *in vitro*, na ausência de fatores de crescimento externo, que foi confirmada através da formação espontânea de estruturas do tipo capilar, e (ii) a capacidade de promover, num ensaio em membrana corioalantóica (MCA) embrionária do ovo de galinha, o recrutamento de vasos, com integração da rede pré-vascular com o tecido do hospedeiro, após implantação. A imunohistoquímica para CD31 demonstrou aumento da integração das esponjas pré-vascularizadas nos tecidos da MCA; a hibridização *in situ* revelou a presença de células humanas no revestimento interno dos vasos sanguíneos da MCA.

Moreira H.R. *et al* <sup>(6)</sup> publicaram, recentemente, um trabalho de investigação sobre a vascularização de matrizes de hidrogéis (*scaffolds*) funcionalizadas com recetores de integrinas, sem fatores de crescimento exógenos, desencadeados pela interação ligando-integrina das células endoteliais da SVF, parecendo tratar-se de uma ferramenta promissora na desenho das *scaffolds*.

Tendo em conta a conhecida resposta das células endoteliais aos biomateriais modificados funcionalmente, bem como as propriedades angiogénicas das células da SVF e explorando a sua elevada expressão em heterodímeros de integrinas, desenharam a construção de matrizes 3D em formulação de hidrogéis modificados com recetores de integrinas. Estas matrizes demonstraram a capacidade aumentada de retenção de células PECAM1+ (CD31+) que, na ausência de fatores externos, através das vias de sinalização da integrina  $\alpha v \beta 3$ , desencadearam os processos de vasculogénese e migração, *in vitro*, e aceleraram, *in vivo*, a integração com o sistema vascular do hospedeiro, após implantação. Os resultados também sugerem que os mecanismos subjacentes à vasculogénese, na presença das integrinas, são iniciados, após a ligação das células endoteliais aos recetores do hidrogel, pela via de sinalização da  $\alpha v \beta 3$ , e parece resultar simultaneamente da inibição da via caspase 8 e da ativação da via FAK/paxilina, ambos envolvidos na sobrevivência e migração das células endoteliais, num microambiente auto-regulado e endógeno de crescimento.

Noutro trabalho, posterior <sup>(3)</sup>, os mesmo autores investigaram a relação e o papel da SVF na cicatrização cutânea de feridas de espessura total, comparando a utilização de *scaffolds* de esponjas de hidrogel pré-vascularizadas com SVF versus *scaffolds* com SFV fresco não pré-vascularizadas. Formularam a hipótese de que a pré-vascularização *in vitro* aceleraria a vascularização precoce da ferida e a integração com os vasos do hospedeiro, promovendo assim uma mais rápida cicatrização da ferida no modelo animal. Na verdade, concluíram, no seu trabalho, que as *scaffolds* pré-vascularizadas, ao potenciarem a vascularização e o influxo de células e mediadores inflamatórios, potenciaram também a fase inflamatória da cicatrização (documentada pela diminuição significativa do rácio dos subtipos de macrófagos M2/M1), que foi prolongada em detrimento da fase proliferativa, conduzindo, assim, a uma significativa diminuição e atraso na cicatrização quando comparado com os grupos não vascularizados ( $p < 0,05$ ). Apesar de no grupo pré-vascularizado pela SVF terem verificado o atraso na cicatrização, constataram, por outro lado, a eficácia da utilização de SVF na melhor e mais rápida epitelização por comparação com o grupo de controlo, em que a *scaffold* não fora semeada com SVF.

Costa M. *et al* <sup>(5)</sup> desenvolveram a sua pesquisa na técnica de engenharia tecidual *scaffold-free*, em monocamada, denominada cell sheet, com a utilização de SVF ao invés de células endoteliais, eliminando também a necessidade da utilização de fatores extrínsecos que desencadeiem e mantenham a angiogénese. Submetendo as células da SFV, em cultura monocamada, a condições de normóxia e hipóxia, durante 8 dias, na ausência de fatores de crescimento extrínsecos, demonstraram a formação espontânea, *in vitro*, de estruturas de tipo capilar (mais robustas nas culturas em hipóxia), confirmada por imunohistoquímica dos marcadores CD31 e CD146. A implantação *in vivo*, no ensaio de isquemia de membro posterior do rato, revelou que as monocamadas celulares de SVF em hipoxia melhoraram a reperfusão sanguínea. Os resultados *in vitro* e *in vivo* parecem apontar para uma estratégia promissora de vascularização nas construções da engenharia de tecidos.

## Discussão

Pelo papel importante que já demonstrou ter, e que virá a ser determinante no futuro, na sua capacidade de restituir e reparar os tecidos e órgãos, a engenharia de tecidos, onde recaem muitas expectativas, tornou-se uma área da ciência extremamente apelativa da investigação na área médica, da bioengenharia e da indústria. O princípio e êxito da ET baseia-se na premissa de que qualquer órgão ou tecido possa vir a ser reparado ou substituído se se conseguir reproduzir, com aplicabilidade clínica, suportados numa estrutura preferencialmente 3D, o crescimento e proliferação de uma ou várias linhagens celulares, num ambiente de estímulos e de moléculas bioativas criados endogenamente, pela matriz celular ou biomateriais da estrutura, ou adicionados de forma exógena, que permitam assegurar a sua diferenciação, com formação de um tecido específico, e a integração da estrutura no hospedeiro.

A ET baseia-se, assim, na interligação de três pilares fundamentais: os elementos celulares, a estrutura de suporte (*scaffold*) e as biomoléculas, tais como citocinas e fatores de crescimento, orquestrando-se desta forma, num ambiente adequado de estímulos e vias de sinalização celular, o crescimento e diferenciação das células desejadas, numa estrutura desenhada para potenciar e orientar esse crescimento. É também nesse trio que se centram as pesquisas e inovações e onde têm sido dado passos e avanços, fundamentais, que colocam a ET no patamar que hoje está, muito embora haja, ainda, um longo caminho pela frente.

Os avanços conseguidos pela engenharia de materiais, nos últimos anos, com desenvolvimento de estruturas a partir de materiais mais biomiméticos, biodegradáveis e não imunogénicos, tem sido importante; o desenho das estruturas em configuração altamente porosa que permita a interconetividade com o meio e possibilite o crescimento e migração celulares; a modificação das suas superfícies por técnicas computadorizadas de criação de modelos, com bioimpresão, microfluidificação e nanotecnologia, entre outras, tem permitido upgrades relevantes na criação de estruturas com libertação controlada de nanopartículas com moléculas bioativas que influenciam a adesão e a migração celular <sup>(18,19)</sup>.

As estruturas de suporte, contudo, necessitam de integração no hospedeiro, algo que não depende apenas dos biomateriais. Essa integração está relacionada com a capacidade das células

de iniciarem a formação de redes vasculares primitivas e promoverem também o seu amadurecimento, em condições de estímulos muito próximas do ambiente nativo da vasculogênese, o que não tem sido conseguido com a adição de fatores de crescimento exógenos que, apesar de promoverem a formação de estruturas tipo capilares *in vitro*, não se têm mostrado eficazes na maturação sustentada dessa rede vascular, condenando ao insucesso a integração das *scaffolds*.

A vascularização rápida das estruturas de suporte, que possibilite a sua integração no hospedeiro, é claramente um aspeto crítico, senão o mais crítico, nesta demanda da engenharia de tecidos, porque sem o suporte vascular adequado e mantido, por mais idealizada e elaborada que seja a *scaffold*, a espessura da mesma não permitirá o aporte necessário de nutrientes e oxigénio que assegurem a viabilidade das células e tecidos. Considerando que a vascularização é crítica para a sobrevivência, as estratégias da ET devem ser orientadas na conceção de *scaffolds* “inteligentes” pré-vascularizadas, antes da implantação, que assegurem, após a mesma, a criação precoce de uma rede vascular madura, com integração plena nos tecidos do hospedeiro <sup>(18,19,29)</sup>.

Nesse sentido, a acompanhar essa evolução na conceção e arquitetura das estruturas, tem-se tornado promissora e estratégica a aposta na utilização de SFV, que poderá vir a ser o filão a explorar para conseguir, com êxito, ultrapassar ou fazer grandes avanços nas limitações atrás referidas, ao reunir, em teoria, os demais argumentos que são necessários ao sucesso : a existência de um ambiente celular e citoquímico que possibilite, sem a necessidade da introdução de fatores exógenos, o crescimento e diferenciação celular e a formação, sustentada, de uma rede vascular que assegure esse crescimento e a integração no hospedeiro.

A SVF contém uma mistura rica de *stem cells* mesenquimatosas, as adipose derived *stem cells* (ASC), células precursoras endoteliais (EPC), macrófagos, células T reguladoras, células musculares lisas, pericitos e pré-adipocitos. A riqueza e diversidade celular dessa mistura estromal confere-lhe, pela pluripotência das suas células, a regeneração de várias linhas celulares bem como o ambiente adequado, em estímulos e moléculas bioativas, para a cascata da angiogênese. Sendo potencialmente geradora de mecanismos de vascularização, também pela sua

atividade parácrina, a utilização desta mistura celular dispensa a adição de fatores de crescimento pelo que tem sido uma das apostas da engenharia de tecidos nas estratégias de vascularização.

A funcionalização de *scaffolds* de hidrogéis com recetores de integrinas é uma estratégia que utiliza a interação ligando-integrinas da SVF, com resultados importante no desencadeamento da angiogénese, através da via de sinalização da integrina  $\alpha\beta3$  <sup>(6)</sup>.

A capacidade angiogénica da SFV foi também documentada pelo aumento da vascularização que *scaffolds* de esponjas de hidrogel pré-vascularizadas promoveram em feridas cutâneas de espessura total, perpetuando a fase inflamatória da cicatrização <sup>(3)</sup>.

A SVF tem sido utilizada como fonte celular e angiogénica, essencialmente, em estruturas de suporte tridimensionais, mas são também encorajadores os resultados nas estratégias *scaffold-free*, com culturas de células de SVF em monocamada (cell sheet) <sup>(5,9,10)</sup>.

Os trabalhos de investigação com SVF na forma criopreservada demonstraram a manutenção das suas características angiogénicas e regenerativas <sup>(4,23-26)</sup>. Num dos trabalhos realizados <sup>(4)</sup> a estratégia centrou-se na combinação de SVF, na forma criopreservada, com a utilização de colagénio marinho como fonte de biomateriais, abrindo as possibilidades da aplicabilidade em maior escala.

Num trabalho que não envolve técnicas de ET, mas que apresenta resultados curiosos com interesse nessas área, a análise da expressão de marcadores das células da SVF, tendo em conta variáveis como a idade, o local e técnica de colheita do tecido adiposo e a condição de ex-obeso, revelou que este último grupo apresentava uma percentagem significativamente superior de células com expressão do CD90, um marcador expresso em células endoteliais e ASCs e correlacionado com taxas de proliferação e angiogénese mais elevadas <sup>(1)</sup>. Pode ser inferido, destes resultados, que em contexto de cirurgias reconstrutivas, estéticas ou procedimentos de ET, com a utilização de SVF, este subgrupo apresenta um perfil favorável, por apresentar maior capacidade angiogénica, o que pode constituir uma janela de oportunidade a ser explorada.

## **Conclusão e perspectivas futuras**

A dificuldade da vascularização das estruturas na ET constitui, provavelmente, o fator mais limitante da sua aplicabilidade clínica e, apesar da constante evolução a que se tem assistido na área dos biomateriais, a sua configuração tridimensional e espessura constituem, por si só, um obstáculo à sua sobrevivência no hospedeiro; além disso, a adição de fatores de crescimento exógenos, entre outras limitações, não tem permitido a recriação, sustentada no tempo, do ambiente necessário à maturação da rede vascular. As estratégias de promoção da vascularização que assegurem a integração das *scaffolds* no hospedeiro poderão recair na utilização da fração vascular do estroma do tecido adiposo, pelo fato de constituir uma fonte celular com diversas linhagens celulares, com capacidade regenerativa e propriedades angiogénicas intrínsecas.

Contudo, apesar de todos os avanços e descobertas, há ainda necessidade de consolidar estudos, pesquisas e experimentações, numa colaboração estreita e coordenada entre a comunidade médica, investigadores e indústria biotecnológica, tendo em vista a aplicabilidade efetiva destas ferramentas revolucionárias na área clínica.

## **Agradecimento:**

Ao Professor Doutor Ricardo Horta, pela sábia orientação e pela incondicional disponibilidade, desde o primeiro momento.

## Referencias bibliográficas:

1. Frias F, Matos B, Jarnalo M, Freitas-Ribeiro S, Reis RL, Pirraco RP, et al. Stromal Vascular Fraction Obtained From Subcutaneous Adipose Tissue: Ex-Obese and Older Population as Main Clinical Targets. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2023;283:632–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002248042200751X>
2. Ribeiro J, Pirraco RP, Horta R. Tissue engineering in plastic surgery - what has been done. *Acta Chir Plast.* 2020;62(3–4):103–10.
3. Moreira HR, Rodrigues DB, Freitas-Ribeiro S, da Silva LP, da S. Morais A, Jarnalo M, et al. Spongy-like hydrogels prevascularization with the adipose tissue vascular fraction delays cutaneous wound healing by sustaining inflammatory cell influx. *Mater Today Bio.* 2022 Dec;100496.
4. Freitas-Ribeiro S, Diogo GS, Oliveira C, Martins A, Silva TH, Jarnalo M, et al. Growth Factor-Free Vascularization of Marine-Origin Collagen Sponges Using Cryopreserved Stromal Vascular Fractions from Human Adipose Tissue. *Mar Drugs.* 2022 Oct 1;20(10).
5. Costa M, Cerqueira MT, Santos TC, Sampaio-Marques B, Ludovico P, Marques AP, et al. Cell sheet engineering using the stromal vascular fraction of adipose tissue as a vascularization strategy. *Acta Biomater.* 2017 Jun 1;55:131–43.
6. Moreira HR, Rodrigues DB, Freitas-Ribeiro S, da Silva LP, da S. Morais A, Jarnalo M, et al. Integrin-specific hydrogels for growth factor-free vasculogenesis. *NPJ Regen Med.* 2022 Dec 1;7(1).
7. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006 Apr;367(9518):1241–6.
8. Al-Himdani S, Jessop ZM, Al-Sabah A, Combella E, Ibrahim A, Doak SH, et al. *Tissue-Engineered Solutions in Plastic and Reconstructive Surgery: Principles and Practice.* Vol. 4, *Frontiers in Surgery.* Frontiers Media S.A.; 2017.
9. Costa M, Pirraco RP, Cerqueira MT, Reis RL, Marques AP. Growth factor-free pre-vascularization of cell sheets for tissue engineering. In: *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc.; 2016. p. 219–26.
10. Filipa M, Costa S, Andrade A, Reis RL. *Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Sheets as Vascular Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications.* 2015.
11. Alaribe FN, Manoto SL, Motaung SCKM. Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia (Bratisl).* 2016 May 1;71(4):353–66.
12. Echeverria Molina MI, Malollari KG, Komvopoulos K. Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. Vol. 9, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* Frontiers Media S.A.; 2021.
13. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia.* Vol. 8, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology.* Frontiers Media S.A.; 2020.
14. Lopes S v., Collins MN, Reis RL, Oliveira JM, Silva-Correia J. *Vascularization Approaches in Tissue Engineering: Recent Developments on Evaluation Tests and Modulation.* Vol. 4, *ACS Applied Bio Materials.* American Chemical Society; 2021. p. 2941–56.
15. de Pieri A, Rochev Y, Zeugolis DI. Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: advances, shortfalls and forecast. Vol. 6, *npj Regenerative Medicine.* Nature Research; 2021.
16. Gomes RS. Perspectivas do uso de células-tronco em Cirurgia Plástica. *Rev Bras Cir Plást.* 2011;26(1):151–9.
17. Wang Y, Keshavarz M, Barhouse P, Smith Q. *Strategies for Regenerative Vascular Tissue Engineering.* Advanced Biology. John Wiley and Sons Inc; 2022.

18. Shahin H, Elmasry M, Steinvall I, Söberg F, El-Serafi A. Vascularization is the next challenge for skin tissue engineering as a solution for burn management. Vol. 8, *Burns and Trauma*. Oxford University Press; 2020.
19. Anthon SG, Valente KP. Vascularization Strategies in 3D Cell Culture Models: From Scaffold-Free Models to 3D Bioprinting. Vol. 23, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2022.
20. Hutchings G, Janowicz K, Moncrieff L, Dompe C, Strauss E, Kocherova I, et al. The proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells in neovascularization and angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 1;21(11).
21. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature. Vol. 69, *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. Churchill Livingstone; 2016. p. 170–9.
22. Guo J, Nguyen A, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, et al. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. Vol. 69, *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. Churchill Livingstone; 2016. p. 180–8.
23. Zanata F, Bowles A, Frazier T, Lowry Curley J, Bunnell BA, Wu X, et al. Effect of cryopreservation on human adipose tissue and isolated stromal vascular fraction cells: In vitro and in vivo analyses. *Plast Reconstr Surg*. 2018 Feb 1;141(2):232E-243E.
24. Kamenaga T, Kuroda Y, Nagai K, Tsubosaka M, Takashima Y, Kikuchi K, et al. Cryopreserved human adipose-derived stromal vascular fraction maintains fracture healing potential via angiogenesis and osteogenesis in an immunodeficient rat model. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Dec 1;12(1).
25. Pu LLQ, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg*. 2006 May;117(6):1845–50.
26. Agostini F, Rossi FM, Aldinucci D, Battiston M, Lombardi E, Zanolin S, et al. Improved GMP compliant approach to manipulate lipoaspirates, to cryopreserve stromal vascular fraction, and to expand adipose stem cells in xeno-free media. *Stem Cell Res Ther*. 2018 May 11;9(1).
27. Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzaheh MR, Murphy M, et al. Robust functional vascular network formation in vivo by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. *Circ Res*. 2009 Jun 19;104(12):1410–20.
28. Koh YJ, Koh BI, Kim H, Joo HJ, Jin HK, Jeon J, et al. Stromal vascular fraction from adipose tissue forms profound vascular network through the dynamic reassembly of blood endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):1141–50.
29. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.

## Scale for the Assessment of Narrative Review Articles – SANRA

Please rate the quality of the narrative review article in question, using categories 0–2 on the following scale. For each aspect of quality, please choose the option which best fits your evaluation, using categories 0 and 2 freely to imply general low and high quality. These are not intended to imply the worst or best imaginable quality.

### 1) Justification of the article's importance for the readership

The importance is not justified.	0	
The importance is alluded to, but not explicitly justified.	1	2
The importance is explicitly justified.	2	

### 2) Statement of concrete aims or formulation of questions

No aims or questions are formulated.	0	
Aims are formulated generally but not concretely or in terms of clear questions.	1	2
One or more concrete aims or questions are formulated.	2	

### 3) Description of the literature search

The search strategy is not presented.	0	
The literature search is described briefly.	1	2
The literature search is described in detail, including search terms and inclusion criteria.	2	

### 4) Referencing

Key statements are not supported by references.	0	
The referencing of key statements is inconsistent.	1	2
Key statements are supported by references.	2	

### 5) Scientific reasoning

*(e.g., incorporation of appropriate evidence, such as RCTs in clinical medicine)*

The article's point is not based on appropriate arguments.	0	
Appropriate evidence is introduced selectively.	1	2
Appropriate evidence is generally present.	2	

### 6) Appropriate presentation of data

*(e.g., absolute vs relative risk; effect sizes without confidence intervals)*

Data are presented inadequately.	0	
Data are often not presented in the most appropriate way.	1	2
Relevant outcome data are generally presented appropriately.	2	

**Sumscore**

**12**

**Fig. 1** SANRA - Scale

## SANRA – explanations and instructions

This scale is intended to help editors assess the quality of a narrative review article based on formal criteria accessible to the reader. It cannot cover other elements of editorial decision making such as degree of originality, topicality, conflicts of interest or the plausibility, correctness or completeness of the content itself. SANRA is an instrument for editors, authors, and reviewers evaluating individual manuscripts. It may also help editors to document average manuscript quality within their journal and researchers to document the manuscript quality, for example in peer review research. Using only three scoring options, 0, 1 and 2, SANRA is intended to provide a swift and pragmatic sum score for quality, for everyday use with real manuscripts, in a field where established quality standards have previously been lacking. It is not designed as an exact measurement of the quality of all theoretically possible manuscripts. For this reason, the extreme values (0 and 2) should be used relatively freely and not reserved only for perfect or hopeless articles.

We recommend that users test-rate a few manuscripts to familiarize themselves with the scale, before using it on the intended group of manuscripts. Ratings should assess the totality of a manuscript, including the abstract. The following comments clarify how each question is designed to be used.

### Item 1 – Justification of the article's importance for the readership

Justification of importance for the readership must be seen in the context of each journal's readership.

Consider how well the manuscript outlines the clinical problem and highlights unanswered questions or evidence gaps – thoroughly (2), superficially (1), or not at all (0).

### Item 2 – Statement of concrete/specific aims or formulation of questions

A good paper will propose one or more specific aims or questions which will be dealt with or topics which will be reviewed.

Please rate whether this has been done thoroughly and clearly (2), vaguely or unclearly (1), or not at all (0).

### Item 3 – Description of the literature search

A convincing narrative review will be transparent about the sources of information on which the text is based. Please rate the degree to which you think this has been achieved. To achieve a rating of 2, it is not necessary to describe the literature search in as much detail as for a systematic review (searching multiple databases, including exact descriptions of search history, flowcharts, etc.), but it is necessary to specify search terms, and the types of literature included. A manuscript which only refers briefly to its literature search would score 1, while one not mentioning its methods would score 0.

### Item 4 – Referencing

No manuscript references all statements. However, those that are essential for the arguments of the manuscript – “key statements” – should be backed by references in all or almost all cases. Exceptions could reasonably be made for rating purposes where a key statement has uncontroversial face-validity, such as “Diabetes is among the commonest causes of chronic morbidity worldwide.”

Please rate the completeness of referencing: for most or all relevant key statements (2), inconsistently (1), sporadically (0).

### Item 5 – Scientific reasoning

The item describes the quality of the scientific point made. A convincing narrative review presents evidence for key arguments.

It should mention study design (randomized controlled trial, qualitative study, etc), and where available, levels of evidence.

Please rate whether you feel this has been done thoroughly (2), superficially (1), or hardly at all (0). Unlike item 6, which is concerned with the selection and presentation of concrete outcome data, this item relates to the use of evidence and of types of evidence in the manuscript's arguments.

### Item 6 – Appropriate presentation of data:

This item describes the correct presentation of data central to the article's argument. Which data are considered relevant varies from field to field. In some areas relevant data would be absolute rather than relative risks or clinical versus surrogate or intermediate endpoints. These outcomes must be presented correctly. For example, it is appropriate that effect sizes are accompanied by confidence intervals. Please rate how far the paper achieves this – thoroughly (2), partially (1), or hardly at all (0). Unlike item 5, which relates to the use of evidence and of types of evidence in the manuscript's arguments, this item is concerned with the selection and presentation of concrete outcome data.

**Fig. 2** SANRA—explanations and instructions document

### 1 – Justification of the article's importance for readership

Página 6, parágrafo 1: “A necessidade e procura crescente de tecidos e órgãos humanos, para tratamento de doenças em que a solução passa pela transplantação de órgãos, bem como a pressão pela acrescida morbidade associada ao aumento da esperança de vida e da mortalidade por doença aguda, onde se destacam as mortes por doença cardiovascular, fez crescer, nos últimos anos, a investigação na área da Engenharia de Tecidos (ET), destacando a sua importância na reparação e regeneração dos tecidos.”

Página 25, parágrafo 3: “... tem-se tornado promissora e estratégica a aposta na utilização de SFV, que poderá vir a ser o filão a explorar para conseguir, com êxito, ultrapassar ou fazer grandes avanços nas limitações atrás referidas, ao reunir, em teoria, os demais argumentos que são necessários ao sucesso : a existência de um ambiente ...que possibilite, sem a necessidade de introdução de fatores exógenos, o crescimento e diferenciação celular e a formação, sustentada, de uma rede vascular que assegure esse crescimento e a integração no hospedeiro.”

### 2 – Statement of concrete aims or formulations of questions

Página 2, parágrafo 2: “..Avaliar as orientações e estratégias atuais que utilizam a fração vascular do estroma do tecido adiposo como estratégia de promoção da vascularização das estruturas assegurando a sua integração no hospedeiro.”

### 3 – Description of literature search

Página 7, parágrafo 5: “A partir de um conjunto de artigos de investigação desenvolvida entre o 3B’s Research Group-UM e o Serviço de Cirurgia Plástica Reconstructiva e Maxilo-Facial do HSJ-FMUP, realizámos uma pesquisa de literatura sobre o tema das estratégias de vascularização, em engenharia de tecidos, na Pubmed, Google Scholar, Ovid e Mendeley Library. Reunimos um conjunto de 29 artigos com interesse , que usamos para referenciação e citação.

Utilizámos as palavras chave “engenharia de tecidos”, “fração vascular do estroma”, “angiogénese”, “fatores de crescimento”, “biomateriais”, “stem cells” “scaffolds”.

À exceção de poucos artigos que selecionamos pela importância na evolução histórica, a quase totalidade dos artigos refletem trabalhos de investigações muito recentes, dos últimos anos, inclusive um com publicação datada deste mês (Frias F, Matos B, Jarnalo M, Freitas-Ribeiro S, Reis RL, Pirraco RP, Horta R. *Stromal Vascular Fraction Obtained From Subcutaneous Adipose Tissue: Ex-Obese and Older Population as Main Clinical Targets*. Journal of Surgical Research. Volume 283, March 2023, pages 632-639)

#### 4 – Referencing:

Página 17, parágrafo 5: “Desde a sua caracterização por Zuk *et al*, em 2001, as ASCs têm sido extensivamente estudadas quanto à suas características de multipotência mas também pelos seus efeitos parácrinos...”

Página 18, parágrafo 3: “Matsumoto *et al* em 2006, com a introdução do conceito da CAL (cell assisted lipotransfer), popularizada por Yoshimura, demonstrou que o enriquecimento dos enxertos de gordura com SVF aumenta a sua capacidade de retenção e viabilidade, tendo-se confirmado aumento na microvascularização da gordura.”

#### 5 – Scientific reasoning:

Página 20, parágrafo 4: “Frias *et al*, num estudo recente (com publicação em Março de 2023), envolvendo 26 amostras de tecido adiposo, obtidas em pacientes admitidos para cirurgia de contorno corporal no serviço de C Plástica e Reconstructiva do Hospital de S. João, investigaram a expressão dos marcadores de superfície das células da SVF e a sua relação com as variáveis idade, índice de massa corporal, história de obesidade e perda ponderal maciça (grupo de ex-obesos) e local de colheita.”

#### 6 – Appropriate presentation of data:

Página 21, parágrafo 2: “Na análise estatística das variáveis, através do teste de Mann-Whitney U, demonstraram que o grupo dos ex-obesos apresentava uma percentagem significativamente

superior (Mdn=84.69) de células com expressão do CD90, um marcador expresso em células endoteliais e ASCs e correlacionado com taxas de proliferação e angiogénese mais elevadas, quando comparado com o grupo de não obesos (Mdn=54,26), uma diferença estatisticamente significativa que coloca esta subpopulação em situação mais vantajosa no contexto de cirurgias reconstrutivas e estéticas ou em áreas da medicina regenerativa, com utilização de SVF.

Página 23, parágrafo 1: “...potenciaram também a fase inflamatória da cicatrização (documentada pela diminuição significativa do rácio dos subtipos de macrófagos M2/M1), que foi prolongada em detrimento da fase proliferativa, conduzindo, assim, a uma significativa diminuição e atraso na cicatrização quando comparado com os grupos não vascularizados ( $p < 0,05$ ).”

This Journal is dedicated to publish and promote knowledge and reflection on questions related to Health, giving priority to those related to the Portuguese reality, as well as those in other lusophone (Portuguese speaking) areas. The intention therefore is to catalyze a proficuous dialogue and exchange of experiences between health professionals and researchers from the lusophone communities and its projection on, and interchange with the international scientific community.

In order to attain such objectives, it has become indispensable to establish, since the beginning, a set of norms that guarantee a publication which respects the internationally established criteria for publications in the biomedical field. The main norms, which have been adapted to the above mentioned objectives, have the document "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to the Biomedical Journals" (available at URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) as their main orientation and are as follows:

**I.** The "Biomedical and Biopharmaceutical Research" (BBR) publishes original research and revision articles as well as other works of a pedagogical and scientific nature, in the different domains of the Health Sciences and Technologies, in portuguese and english languages .

**II.** It also publishes news, information, minutes and/or reports, as well as abstracts and proceedings of works presented in meetings, courses or congresses.

**III.** The authors have the final responsibility for the content of their publications.

**IV.** Only works that contain original material will be evaluated, as long as they have not been integrally or partly published (including tables and figures), and have also not been submitted for publication to other journals or periodicals. This restriction does not apply to press notes or summaries published in the realm of scientific meetings.

**V.** All the published articles become property of the BBR. Once accepted, the works cannot be published in a similar form in other places, and in no other language, without the express consent BBR.

**VI.** Before submitting a manuscript to BBR, the authors must get all the necessary authorizations for the submitted material to be published and when applicable, according the publication norms from the journal. In the terms already mentioned, several types of papers are considered for publication in BBR:

#### **1. Original articles of original research (full-papers)**

The text must not exceed 10 A4 pages (excluding references and tables) and be organized according the following stuture: introduction, material and methods, results and discussion, acknowledgements and bibliographical references.

All the articles of original research must have abstracts, followed by key-words that aim at a clear identification of the work, respective indexation and research.

#### **2. Brief articles and communications (shorts papers)**

This type of publication is focused on the divulgation of preliminary results of research carried out. The text must be organized as the articles of original research, include a maximum of 10 references and do not exceed 5 A4 pages.

#### **3. Review Articles**

These are articles whose objective is to describe "the state of the art", reflecting the progress in the diverse the domains of health sciences and technologies. This type of publication must be directed especially towards health professionals and students. Along with the pedagogical nature, the aim is to alert the readers for the impact of this progress on health care service. BBR editorial staff will give preference to and promote the publication of revision articles that have been expressly requested, however, those submitted, but not requested, will be also evaluated.

#### **4. Case Studies**

The publication of case studies (of clinical or other nature), has both pedagogical objectives and the transmission of experiences. They must, consequently, be studied and discussed in an exemplary form, and the text must be organized with those objectives in mind.

#### **5. Other texts and documents**

BBRES accepts texts based on multiple humanistic aspects that are involved in health care service as well as those related to history, ethics, anthropology, sociology, law, etc. that are of relevance to health sciences and technologies.

#### **Manuscripts Format**

**(a)** The instructions to be followed by authors for submission of papers to BBR, are listed below and are according to the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available at URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**(b)** The papers have to be submitted in English and Portuguese. The manuscripts must be typed, double spaced and aligned at the left, with margins of 2,5 cm, font size 11, and font Times, Times New Roman, or Arial, and use Symbol for special characters. All the pages are numbered. Each section begins on a new page.

**(c)** The manuscripts general organization must respect the following sequence:

- On the first page indicate: 1) title (concise and descriptive) in Portuguese; 2) complete title in English; 3) name(s) of author(s) (without indication of academic degrees or honorific titles); 4) the institutional affiliation of each author at the moment when the work was carried out; 5) the name and contact of the author who should receive correspondence, including address, telephone, fax and email; 6) reference to financing sources or scholarships (when applicable).

- Abstracts (2nd page) - maximum of 200 words. The abstract will have to be concise and indicate the objectives/scope, results and conclusions, or a summary description of the case studies presented. Each abstract will contain, on the same page, the respective key-words (up to 5).

- Text - the text must be structured in the traditional form, that is, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions and Acknowledgements. Small

Este Jornal propõe-se divulgar e promover o conhecimento e a reflexão sobre as questões relacionadas com a Saúde, com prioridade para com as relacionadas com a realidade nacional, bem como as existentes noutros espaços lusófonos. Pretende-se, por este meio, catalisar um proficuo diálogo e troca de experiências entre os profissionais e investigadores de saúde nas comunidades lusófonas e a sua projecção e intercâmbio com a comunidade científica internacional.

Para tais objectivos serem atingidos, torna-se indispensável estabelecer desde o início um conjunto de normas garantas numa publicação que respeite os critérios estabelecidos internacionalmente para as publicações de índole biomédica. As principais normas, adaptadas aos objectivos acima enunciados, são seguidamente expostas, tendo por orientação o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**I.** A Jornal de Investigação Biomédica e Biofarmacêutica (BBR) publica trabalhos originais de investigação, de revisão e outros trabalhos de índole pedagógica e científica, nos diferentes domínios das Ciências e Tecnologias da Saúde, em português e inglês

**II.** Publica também notícias, informações, actas e/ou relatórios, bem como o resumo dos trabalhos apresentados em reuniões, cursos ou congressos.

**III.** A responsabilidade final do conteúdo das publicações é dos autores.

**IV.** Apenas serão avaliados os trabalhos contendo material original que não hajam sido publicados, na íntegra ou em parte (incluindo tabelas e figuras), e que não estejam submetidos para publicação noutros jornais ou revistas. Esta restrição não se aplica a notas de imprensa ou a resumos publicados no âmbito de reuniões científicas.

**V.** Todos os artigos publicados passam a ser propriedade da BBR. Uma vez aceites, os trabalhos não podem ser publicados numa forma semelhante noutros locais, em nenhuma língua, sem o consentimento expresso da BBR.

**VI.** Antes de submeter um manuscrito à BBR, os autores devem obter todas as autorizações necessárias para a publicação do material submetido e, na medida do aplicável, respeitar as normas orientadoras de publicação da revista.

Nos termos já enunciados, são considerados vários tipos de trabalhos susceptíveis de publicação na BBR:

#### **1. Artigos originais de investigação original (full-papers)**

O texto não excedendo 10 páginas A4 (excluindo referências tabelas e figuras) deve ser organizado de acordo com seguinte estrutura: introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos e referências bibliográficas.

Todos os artigos de investigação original devem ser antecedidos por resumos, seguidos das palavras-chave que visem uma clara identificação do trabalho, respectiva indexação e busca.

#### **2. Artigos e comunicações breves (short papers)**

Este tipo de publicação destina-se à divulgação de resultados preliminares de trabalhos de investigação. O texto deve ser organizado tal como os artigos de investigação original, não devendo exceder as 5 páginas A4, e incluir um máximo de 10 referências.

#### **3. Artigos de revisão**

São artigos cujo objectivo é descrever o "estado-da-arte", ou seja os progressos nos diversos domínios das ciências e tecnologias da saúde. Este tipo de publicação deve ser especialmente dirigida aos profissionais de saúde e estudantes. A par da índole pedagógica, visam alertar uns e outros para o impacto destes progressos na prestação dos cuidados de saúde. O corpo editorial da BBR, promoverá a publicação preferencial de artigos de revisão por ele expressamente solicitados, sem prejuízo de avaliar artigos de revisão submetidos sem solicitação prévia.

#### **4. Estudo de casos**

A publicação de casos (clínicos ou de outra natureza), tem objectivos pedagógicos e de transmissão de experiências. Devem, por consequência, ser estudados e discutidos de forma exemplar, devendo o texto ser organizado com aqueles objectivos em atenção.

#### **5. Outros textos e documentos**

A BBR propõe-se aceitar textos livres que incidam sobre as múltiplas vertentes humanísticas envolvidas na prestação de cuidados de saúde, como sejam os relacionados com a história, ética, antropologia, sociologia, direito, etc. com relevância para as ciências e tecnologias da saúde.

#### **Formatação dos Manuscritos**

**(a)** As instruções a observar pelos autores para submissão de trabalhos à BBR, abaixo enunciadas, seguem os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**(b)** Os trabalhos devem ser submetidos em português e inglês. O manuscrito deve ser dactilografado a dois espaços e justificado à esquerda, com margens de 2,5 cm, com letra a 11 pontos, tipo Times, Times New Roman, ou Arial, utilizando a fonte Symbol para caracteres especiais. Todas as páginas são numeradas. Cada secção inicia-se em nova página.

**(c)** A organização geral do manuscrito deve respeitar a seguinte sequência:

- Na primeira página indicar: 1) o título (conciso e descritivo) em português; 2) o título completo em inglês ; 3) nome (s) do(s) autor(es) (sem indicação de graus académicos ou títulos honoríficos); 4) a filiação institucional de cada autor no momento em que o trabalho foi realizado; 5) o nome e contactos do autor que deverá receber a correspondência, incluindo endereço, telefone, fax e @mail; 6) referência às fontes de financiamento ou bolsas de estudo (quando aplicável).

- Resumos (2ª página) com um máximo de 200 palavras. Os resumos deverão ser concisos e indicar os objectivos/âmbito, resultados e conclusões, ou a descrição sumária dos casos (estudo de casos) apresentados. Cada resumo será complementado, na mesma página, com as respectivas palavras-chave até 5.

adaptations to the structure are admitted (inclusion of subparagraphs in Material and Methods, for example) in accordance with the nature of the work presented.

- References/Bibliography - the references must be listed after the main text, consecutively numbered in accordance with the order of its citation. The references must be presented in Arabic numeration, between parentheses and the respective citation must follow the adequate model of the respective source (article from a periodical, book, book chapter, Internet, etc.).

#### Models:

##### Article

Vega KJ, Pina I, Krevsky. Heart transplantation is associated with increase risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:980-3.

##### Book

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

##### Book Chapter

Phipps SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.465-478.

##### Article in Electronic Format

Morse SS. Factor sin the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. in: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

The abbreviated names of the publications must be in accordance with the Index Medicus. A list of publications can be obtained at <http://www.nlm.nih.gov>.

We suggest that the bibliography of submitted articles is made with the aid of a citation program, such as the End Note (from the Institute of Scientific Information). Among the various styles available, the above mentioned corresponds to that used in the Nature magazine.

#### -Legends, Tables and Figures

Legends of Tables and Figures must be put on the pages immediately following the bibliography, and be clearly identified and in order. The legend of each table or Figure must be followed by a heading and explanatory notes (e.g. definitions of abbreviations) in order to be understood and interpreted without resorting to the text.

Tables and figures must be presented after the legend section, individually, on separate pages, suitably and sequentially identified. Tables and figures must be individually numbered (separate Arabic numeration for tables and figures), on separate pages, and must be ordered in accordance with how they are referred in the text.

Photographs, illustrations or other originals such as radiographic images, must be converted into an electronic format (JPEG or TIFF) after digitalization and inserted into the file of tables and images. Since the final print is in black and white or in gray tones, colour graphs will only be accepted when the respective publication costs are provided by the authors.

#### Submission in electronic format

Papers submitted to the BBR must be sent by email to: [marisa.paiva@ulusofona.pt](mailto:marisa.paiva@ulusofona.pt) in electronic format. Any work may also be submitted by mail, in a CD or other electronic support, to the executive editor: Luis Monteiro Rodrigues  
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde - ULHT  
Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL.

All supports must be duly identified with the name of the author, the title of the work and the date of submission. It is highly recommendable that the submitted texts, in Portuguese and English, have been previously checked for possible misspellings using the tools available from the program.

#### Previous requirements to submission

##### (a) Conflicts of interest

The authors of any submitted manuscript must declare in writing, in the last chapter, the existence of a conflict of interests or declare their inexistence. The potential conflict areas are described in the document: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available at URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

##### (b) Previous authorization for submission

Before submitting a manuscript to the BBR, the authors must have in their ownership the following documents that could be requested by the editorial staff:

- declaration of interest by all co-authors;
- in clinical research works, the informed consent of each individual patient whose data or photographs are presented, even when attempts at hiding their respective identity have been made;
- authorization for use of previously published material;

##### (c) For any other missing indications in these instructions, please consult: "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

The publication of any article in the BBR will only be authorized after reception of the respective document that concedes the Rights of Reproduction, signed by the author held responsible for the work

Texto - o texto deverá estruturado na forma tradicional, isto é, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Agradecimentos. São admitidas pequenas adaptações a esta estrutura (inclusão de sub-parágrafos em Material e Métodos, por exemplo) de acordo com a natureza do trabalho apresentado.

- Referências / Bibliografia - as referências devem ser listadas após o texto principal, numeradas consecutivamente de acordo com a ordem da sua citação. As referências devem ser apresentadas por numeração árabe, entre parênteses e a respectiva citação seguir o modelo adequado da respectiva fonte (artigo de jornal, livro, capítulo de livro, Internet, etc.).

#### Modelos:

##### Artigo

Vega KJ, Pina I, Krevsky 8. Heart transplantation is associated with increase risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996; 124:980-3.

##### Livro

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

##### Capítulo de Livro

Phipps SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p.465-478.

##### Artigo em Formato Electrónico

Morse SS. Factor sin the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1 (1): [24 screens]. in: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Os nomes abreviados das publicações devem ser utilizados de acordo com o Index Medicus. Uma lista de publicações pode ser obtida em <http://www.nlm.nih.gov>.

Sugere-se que a bibliografia dos artigos submetidos seja feita com apoio dum programa de citações tal como o End Note (do Institute of Scientific Information). Entre os vários estilos disponíveis, o acima descrito corresponde ao da revista Nature.

#### -Legendas, Tabelas e Figuras

As legendas das Tabelas e Figuras devem ser reunidas na página imediatamente seguinte à da bibliografia, claramente identificadas e sequenciadas. A legenda de cada tabela ou figura deve ser acompanhada de um título e notas explicativas (ex. definições de abreviaturas) de modo a serem compreendidas e interpretadas sem recurso ao texto. As tabelas e figuras devem ser apresentadas após as legendas, de preferência em páginas separadas, por ordem, devidamente identificadas e sequenciadas. No texto devem ser mencionadas todas as tabelas e figuras, numeradas (numeração árabe separadamente para tabelas e figuras), de acordo com a ordem em que são referidas no texto. Os originais de fotografias, ilustrações ou outros materiais como imagens radiográficas, devem ser convertidas em formato electrónico (JPEG ou TIFF) após digitalização e, inseridos no ficheiro de tabelas e imagens. Sendo a impressão final a preto e branco ou em tons de cinzento, os gráficos a cores só são aceitáveis quando os respectivos custos de publicação forem suportados pelos autores.

#### Submissão em suporte electrónico

Os trabalhos submetidos à BBR devem ser enviados por via electrónica para [marisa.paiva@ulusofona.pt](mailto:marisa.paiva@ulusofona.pt). Os trabalhos podem também ser submetidos por correio normal, em CD ou em outro suporte electrónico, ao cuidados do editor-executivo: Luis Monteiro Rodrigues  
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde - ULHT  
Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, PORTUGAL.

Todos os suportes devem estar devidamente identificados com o nome do 1º autor, o título do trabalho e a data de submissão.

É altamente recomendável que os textos submetidos, em português e em inglês, tenham sido previamente submetidos à correcção ortográfica pelas ferramentas incluídas no programa editor de texto.

#### Requisitos prévios à submissão

##### (a) Conflitos de interesse

Os autores de qualquer manuscrito submetido devem declarar e por escrito, no seu último capítulo, a existência de conflitos de interesse ou declarar a sua inexistência. As potenciais áreas conflituais são referidas no documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (disponível em URL: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

##### (b) Autorizações prévias à submissão

Antes de submeter um manuscrito à BBR, os autores devem ter em sua posse os seguintes documentos que poderão ser solicitados pelo corpo editorial:

- declaração de interesse de todos os co-autores;
- em trabalhos de investigação clínica o consentimento informado de cada paciente individual cujos dados são apresentados, ou presentes em fotografias, mesmo quando tiverem sido efectuadas tentativas de ocultar a respectiva identidade;
- autorizações para utilização de material previamente publicado;

##### (c) Para quaisquer outras indicações omissas nestas instruções deve ser consultado o documento "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals".

A publicação de qualquer artigo na BBR apenas será autorizada após recepção do respectivo documento de cedência de Direitos de Reprodução assinado pelo autor responsável.