

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS ALOGÊNICAS NA
ANGIOGÊNESE DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DE CICATRIZAÇÃO EM
ENXERTOS CUTÂNEOS DE ESPESSURA COMPLETA

Nathalia Franco

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS ALOGÊNICAS NA
ANGIOGÊNESE DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DE CICATRIZAÇÃO EM
ENXERTOS CUTÂNEOS DE ESPESSURA COMPLETA

Autor: Nathalia Franco

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias
na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientadora: Dra. Fernanda dos Santos de Oliveira

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Franco, Nathalia

Impacto da administração de células mesenquimais adipoderivadas na angiogênese durante a fase inflamatória de cicatrização em enxertos cutâneos de espessura completa / Nathalia Franco. -- 2020.

66 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Fernanda dos Santos de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Angiogênese. 2. Enxertos cutâneos. 3. Terapia celular. 4. Cirurgia reconstrutiva. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. de Oliveira, Fernanda dos Santos, coorient. III. Título.

Nathalia Franco

CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS ALOGÊNICAS NA
ANGIOGÊNESE DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DE CICATRIZAÇÃO EM
ENXERTOS CUTÂNEOS DE ESPESSURA COMPLETA

Aprovada em 31 de março de 2020.

APROVADO POR

Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini
Orientador e Presidente da Comissão (UFRGS)

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Membro da Comissão (UFSM)

Prof. Dra. Melissa Medeiros Markoski
Membro da Comissão (UFCSPA)

Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima
Membro da Comissão (HCPA-UFRGS)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória de Sabrinne Peglow dos Santos, médica veterinária incansável, insubstituível, que vibrou com cada conquista durante a execução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À meus pais, Mara e Antonio, pelo carinho, eterno incentivo e apoio integral. Amo vocês mais que o mundo! À Violet e Erlichia, presentes que a vida me deu, agradeço pelas abanadas de rabo, mordidas de amor, companhia e carinho. Nossa família é a mais linda desse mundo.

À minha avó e tia que nunca mediram esforços para que eu alcançasse todos os objetivos e sonhos na “capital”. Ao meu avô, que apesar de não estar mais conosco, sempre quis me ver concretizar um momento como esse. Onde quer que esteja, sei que estás muito feliz.

Ao meu orientador, professor Emerson Antonio Contesini, por ter acreditado em mim, me apoiado nas decisões e estar sempre disposto a discutir os problemas de uma forma mais leve, com um chazinho quente e horas de conversa.

À minha coorientadora, Fernanda Oliveira, por abrir as portas do Hospital de Clínicas e me fazer sentir em casa desde o início.

À minha coorientadora não oficial, Paula Terraciano. Faltam palavras para descrever o quanto me senti acolhida e amparada na tua companhia e o quanto essa trajetória se tornou mais fácil por te ter no meu caminho. Agradeço pela amizade e puxões de orelha nos momentos necessários.

À família emprestada que ganhei com a pós-graduação, Emanuelle Degregori, Simone Bianchi e Isabel Durli, por serem meu apoio em todos os momentos nesses dois anos. Tenho um carinho inexplicável por vocês, obrigada por tudo!

À Luciana Teixeira, pelo apoio incondicional na elaboração e execução do projeto, e por estar sempre disponível a sugerir, discutir e contribuir na redação deste trabalho. Obrigada pelas discussões, risadas e constantes divagações sobre o futuro.

Ao meu segundo coorientador emprestado, Markus Berger, por entrar de cabeça em todas as minhas ideias malucas e fazer deste trabalho um motivo de orgulho para todos nós. Obrigada por me desafiar diariamente a buscar mais conhecimento.

Às meninas dos laboratórios de Embriologia e Diferenciação Celular e Bioquímica Farmacológica principalmente Mariana Silva e Pâmela Zanon, por todo o apoio, disponibilidade, compreensão e acolhimento dessa forasteira que veio de um “mundo” completamente diferente.

À Emilly Pillar e Flavia, do Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, pelo excelente trabalho na confecção e auxílio na leitura e interpretação das lâminas de imunohistoquímica.

Ao professor David Dreimeier e seu pós-doutorando, Ronaldo Bianchi, pela disponibilidade na interpretação e análise dos achados histológicos.

À dra. Patrícia Sesterheim pelo auxílio na citometria de fluxo das células GFP.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, em especial Tuane Garcez, Daniela Campagnol e Marta Cioato pelo auxílio, sugestões e contribuições durante toda a execução deste projeto.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por propiciar a execução deste e de tantos outros projetos fundamentais ao crescimento da pesquisa, única forma de ampliar nossos conhecimentos e contribuir na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, sejam eles humanos ou animais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que mesmo em tempos difíceis demonstra a cada dia o valor de uma universidade pública, gratuita e de qualidade que fomenta pesquisas fundamentais ao desenvolvimento da nossa sociedade. Seguimos lutando!

Por fim, aos animais, em especial a meus estimados ratinhos, imprescindíveis para a execução deste projeto. A vocês devo meu respeito e eterna gratidão.

RESUMO

Enxertos cutâneos de espessura completa possuem a característica inicial de nutrição sem um aporte sanguíneo autônomo, predispondo a altas taxas de necrose. Células mesenquimais adipoderivadas (ADSC) auxiliam no desenvolvimento da angiogênese e cicatrização cutânea, contudo, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente compreendidos. Esse trabalho teve como objetivo investigar a influência de ADSCs no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, seu efeito anti-inflamatório e o tempo de sobrevivência das células após sua aplicação em um modelo de enxerto cutâneo de espessura completa. As ADSCs foram isoladas de ratos Wistar positivos para a proteína fluorescente verde (GFP). Os demais animais experimentais foram submetidos aos enxertos e posteriormente atribuídos de forma aleatória aos grupos ADSC, solução salina ou SHAM. Animais pertencentes ao grupo ADSC receberam 1×10^6 células ressuspensas em 200 μ L de solução salina, o grupo SS recebeu apenas 200 μ g de solução salina e o grupo SHAM não recebeu nenhum tratamento. Dezoito animais foram eutanasiados aos três dias, os demais aos cinco dias. A avaliação macroscópica analisou a taxa de contração, presença de sangramento ou exsudato. Os enxertos foram coletados para avaliação molecular e histopatológica, e aqueles pertencentes ao grupo ADSC foram corados com anticorpo anti-GFP para avaliar a presença e localização das células. O grupo ADSCs demonstrou menor taxa de contração e aumento da expressão de enzimas, fatores de crescimento e marcadores de superfície pró-angiogênicos. Marcadores de hipóxia, inflamação e estresse oxidativo tiveram expressão reduzida no grupo tratado com ADSCs. As células marcadas foram localizadas em ambos os dias de avaliação. Em conclusão, baseado nos dados obtidos, as células marcadas permanecem no local de aplicação ao terceiro e quinto dias de avaliação e podem promover a angiogênese precoce em enxertos cutâneos de espessura completa, reduzindo o tempo de exposição à hipóxia e podem aumentar as taxas de sucesso do enxerto.

Palavras-chave: Angiogênese, enxerto cutâneo de espessura completa, células mesenquimais adipoderivadas, medicina regenerativa

ABSTRACT

Full-thickness skin grafts have the initial characteristic of graft nutrition without an autonomous blood supply, predicting to high necrosis rates. Adipose-derived stem cells supports angiogenesis development and wound healing, however, the mechanisms involved still not completely understood. In this study, we aimed to investigate ADSC influence in blood vessels growth, its anti-inflammatory effect and the remaining cell survival time on skin graft in full-thickness skin graft rat model. ADSCs were isolated from green-fluorescent protein positive Wistar rats. All the remaining experimental animals were submitted to skin graft and randomly assigned to ADSC, saline solution or SHAM groups. ADSC animals received 1×10^6 ADSCs GFP-positives resuspended in 200 μg of saline solution. SS group only received 200 μg of saline solution and SHAM group did not receive any treatment. Eighteen animals were euthanized at three days, the remaining at five days. Macroscopic evaluation was based on FTSG contraction rates, bleeding and exudate presence. Skin grafts were collected for molecular and histopathological assessment, and the ADSC group grafts were also immunostained with anti-GFP antibody for presence and location of cells. ADSC group have showed lower contraction rates and significant enhanced expression of proangiogenic enzymes, growth factors, surface markers. Expression of hypoxia, proinflammatory cell types and oxidative stress markers was decreased on ADSC treated group. The labeled ADSCs could be found on grafted tissue at both evaluation times. In conclusion, based on the obtained data, labeled ADSC remain on injected site at third and fifth evaluation days and can promote early angiogenesis development of FTSG, reducing hypoxia exposure and may increase the graft survival rates.

Key words: Angiogenesis, full-thickness skin graft, adipose-derived stromal cells, regenerative medicine

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS	13
1 INTRODUO	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Especficos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Anatomia da pele e cicatrizao	16
3.2 Enxertos cutâneos no reparo de feridas	21
3.3 Terapia celular e cicatrizao cutnea	24
4 MANUSCRITO	27
INTRODUCTION	29
MATERIAL AND METHODS	30
1. Animals	30
2. ADSC isolation and culture	31
3. ADSC differentiation and characterization	31
4. Full-thickness skin graft model	32
6. Immunohistochemical analysis of GFP ADSC cells	33
7. Histopathology	33
RESULTS	36
DISCUSSION	38
CONCLUSIONS	43
REFERENCES	43
5 CONCLUSOES	57

6	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A.....	65
	APÊNDICE B.....	66
	APÊNDICE C.....	67
	ANEXO 1.....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Escala das três fases sobrepostas de cicatrização e seus períodos médios de ocorrência. Adaptado de Swezey, L. Wound Educators. Disponível em: <https://woundeducators.com/phases-of-wound-healing/>17

Figura 2 – Curva das fases de revascularização de enxertos cutâneos. Baseado nos dados de MacFarlane (2006)20

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

μL	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ADSC	Células mesenquimais adipoderivadas, do inglês <i>adipose-derived stem cells</i>
bFGF	Fator de crescimento básico de fibroblastos
BMSC	Células mesenquimais de medula óssea, do inglês <i>bone marrow stem cells</i>
CEUA	Comit� de �tica para uso de animais
CREAL	Centro de reprodu�o e experimenta�o de animais de laboratório/UFRGS
cm	Centímetros
cm^2	Centímetros quadrados
0d	Dia zero
3d	Dia três
5d	Dia cinco
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
ESC	Células tronco embrionárias, do inglês <i>embryonic stem cells</i>
g	Gramas
GFP	Proteína fluorescente verde, do inglês <i>green fluorescent protein</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e eosina
HIF-1 α	Fator 1 induzível de hipóxia alfa, do inglês <i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
IHC	Imunohistoquímica
iNOS	óxido nítrico-sintase induzível
IP	Intraperitoneal
iPS	Células tronco pluripotentes induzidas, do inglês <i>induced pluripotent stem cells</i>
kg	Quilogramas
MEC	Matriz extracelular

mg·kg ⁻¹	Miligramas por quilograma
mm	Milímetros
MMP-2	Metaloproteinase 2
MMP-9	Metaloproteinase 9
MSC	Células tronco mesenquimais, do inglês <i>mesenchymal stem cells</i>
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
P4	Quarta passagem do cultivo celular
P5	Quinta passagem do cultivo celular
P6	Sexta passagem do cultivo celular
P7	Sétima passagem do cultivo celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
r.p.m.	Rotações por minuto
SHAM	Grupo SHAM
SS	Solução de NaCl 0,9%
TCC	Taxa de contração cicatricial
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
UEA	Unidade de Experimentação Animal do HCPA
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

1 INTRODUÇÃO

Enxertos cutâneos são caracterizados como porções de tecido de espessura variável completamente desprendidas de seu leito doador para cobertura de um leito receptor (ANDREASSI *et al.*, 2005; MACFARLANE, 2006). São divididos como enxertos de espessura completa ou parcial, sendo que os de espessura completa são rotineiramente usados em feridas crônicas, lesões extensas decorrentes de queimaduras, traumas ou feridas distais em membros (DARRACH *et al.*, 2019; GAO *et al.*, 2019; RICCIO *et al.*, 2019). Possuem como característica inicial de cicatrização uma fase de embebição, em que são nutridos exclusivamente pelo leito receptor do enxerto, sem a presença de aporte sanguíneo autônomo (ANDREASSI *et al.*, 2005; PAZZINI *et al.*, 2017). Após a fase de embebição seguem-se mais duas, de inosculação, onde ocorre a ligação entre os vasos sanguíneos neoformados e aqueles existentes no leito receptor, seguida da fase de revascularização, onde ocorre o remodelamento vascular (CAPLA *et al.*, 2006). A embebição no leito receptor pode levar a altas taxas de insucesso devido ao período prolongado de exposição à hipóxia, podendo haver necrose do tecido enxertado (TAKAHASHI *et al.*, 2018).

As células mesenquimais, especialmente adipoderivadas, demonstram efeito benéfico na cicatrização cutânea, em todas as fases de cicatrização, compreendidas por inflamação, proliferação e remodelamento. Enxertos cutâneos possuem fases similares de cicatrização, onde a fase de embebição compara-se à fase inflamatória, a de inosculação à proliferativa e de revascularização, similar à de remodelamento (ANDREASSI *et al.*, 2005).

A utilização de células mesenquimais na promoção da angiogênese pode resultar em aumento das taxas de sucesso de enxertos cutâneos (VIDOR *et al.*, 2018). No entanto, ainda se observam lacunas no que se refere à compreensão de seu tempo de permanência no tecido enxertado e sua capacidade de estímulo à angiogênese precoce e efeito no tempo de exposição à hipóxia, assim como inflamação e estresse oxidativo.

Desafiando tal hipótese, esse trabalho permitiu a investigação do real impacto da utilização de células mesenquimais adipoderivadas em enxertos cutâneos de espessura completa nas fases iniciais de cicatrização (embebição e inosculação) e sua influência na angiogênese precoce do tecido, regulação dos componentes do sistema plasmina-plasminogênio, efeito anti-inflamatório e expressão de fatores relacionados ao estresse tecidual, assim como a definição de seu tempo de permanência no local.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da associação de células mesenquimais adipoderivadas a enxertos cutâneos de espessura completa no estímulo à angiogênese durante a fase inflamatória de cicatrização.

2.2 Objetivos Específicos

- Localizar as células mesenquimais adipoderivadas após aplicação no tecido enxertado
- Avaliar a influência de ADSCs na revascularização precoce de enxertos cutâneos de espessura completa através da expressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos
- Avaliar a taxa de contração dos enxertos nos diferentes grupos de tratamento
- Avaliar macroscopicamente a presença de necrose, sangramento e exsudato nos diferentes grupos
- Avaliar macro e histologicamente a presença de infiltrado inflamatório nos diferentes grupos de tratamento
- Analisar a expressão de óxido nítrico e componentes do sistema plasmina-plasminogênio e sua relação com inflamação e estímulo à angiogênese
- Avaliar a influência de ADSCs na regulação de fatores relacionados ao dano tecidual ocasionado por estresse oxidativo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia da pele e cicatrização

3.1.1 Anatomia e fisiologia cutâneas

A pele é composta de epitélio escamoso cornificado estratificado, exceto nas junções mucocutâneas, onde apresenta o epitélio escamoso não cornificado (SUNDBERG *et al.*, 2017). Classifica-se em quatro camadas principais, denominadas a partir da estrutura mais superficial em direção à mais profunda: epiderme, derme, panículo carnoso – presente na maior parte dos mamíferos não-humanos, e tecido subcutâneo ou hipoderme (HARRISSON; MACNEIL, 2008; MIKESH *et al.*, 2013; SOM *et al.*, 2017; SUNDBERG *et al.*, 2018).

Histologicamente, na epiderme, observa-se estruturação das células do epitélio escamoso cornificado estratificado em quatro camadas, iniciando-se pelo estrato córneo, mais superficial, sendo seguido pelo estrato granuloso, espinoso e basal (de BEM *et al.*, 2010; SOM *et al.*, 2017; KABASHIMA *et al.*, 2018; SUNDBERG *et al.*, 2018). Devido

à sua ativa capacidade de regeneração e renovação, tais camadas são definidas a partir da diferenciação celular, principalmente de queratinócitos imaturos, presentes no estrato basal (KOLARSICK *et al.*, 2009; SOM *et al.*, 2017). Sua diferenciação progride até a senescência celular, promovendo assim à camada córnea a presença de células planas e anucleares e permitindo a formação de uma estrutura de consistência firme, espessa e indiferenciada, capaz de promover proteção às estruturas subjacentes (de BEM *et al.*, 2010; KABASHIMA *et al.*, 2018; SUNDBERG *et al.*, 2018). As células majoritariamente encontradas na epiderme são queratinócitos e células dendríticas, contudo, também são observados melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (KOLARSICK *et al.*, 2009; MIKESH *et al.*, 2013).

Entre a epiderme e a próxima camada observa-se a junção derme-epidermal ou membrana basal (KOLARSICK *et al.*, 2009). Tal junção, formada principalmente por colágeno do tipo IV atua como uma barreira semipermeável entre as camadas (KOLARSICK *et al.*, 2009; MIKESH *et al.*, 2013). Imediatamente subjacente à junção localiza-se a derme, composta por fibroblastos, mastócitos, macrófagos, linfócitos, células plasmáticas e leucócitos (KOLARSICK *et al.*, 2009). Tais tipos celulares promovem a produção de colágeno, majoritariamente dos tipos I e IV, e fibras elásticas (WONG *et al.*, 2016). Nesta camada são observados folículos pilosos, glândulas sudoríparas, vasos sanguíneos e grande concentração de terminações nervosas, atuando como barreira para manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico, térmico, proteção contra traumas mecânicos e promoção de sensibilidade nervosa (KOLARSICK *et al.*, 2009; SOM *et al.*, 2017; SUNDBERG *et al.*, 2018). A derme é considerada uma das principais camadas responsáveis pela cicatrização cutânea, devido a disponibilidade celular e grande densidade de vasos sanguíneos (SOM *et al.*, 2017).

O panículo carnoso, presente em grande parte das espécies de mamíferos, corresponde a uma porção de musculatura estriada limitando as camadas derme e hipoderme e permite maior movimento da pele e, devido ao aporte sanguíneo, é uma região altamente irrigada, auxiliando na contração de feridas e promoção da revascularização (RITTIÉ, 2016; NALDAIZ-GATESI *et al.*, 2018; SUNDBERG *et al.*, 2018). Tal músculo é majoritariamente ausente em humanos e primatas não-humanos (HARRISON; MACNEIL, 2008). A hipoderme ou tecido subcutâneo, observada abaixo da derme, é composta por tecidos adiposo e conjuntivo frouxo, apresentando grande aporte nervoso e vascular às camadas mais superficiais da pele (SUNDBERG *et al.*,

2018). –Além disso, devido a sua composição adiposa, a hipoderme auxilia no fornecimento de energia ao indivíduo (KOLARSICK *et al.*, 2009).

A vascularização cutânea se dá através de três formas, sendo estas o sistema cutâneo *per se* e as regiões musculocutânea e fasciocutânea (SOM *et al.*, 2017). O aporte sanguíneo pelo sistema cutâneo se dá por dois plexos intercomunicantes, sendo estes o plexo superficial, localizado na região da junção derme-epidermal e plexo profundo, encontrado na região da junção derme-subcutâneo (KOLARSICK *et al.*, 2009; SOM *et al.*, 2017). Em humanos e roedores tais plexos, derivados de fontes arteriais e venosas profundas, percorrem a pele em sentido paralelo, onde a vascularização provém de duas redes horizontais, a primeira entre o panículo carnoso e a hipoderme, a segunda ao redor de folículos pilosos encontrados na derme (RITTIÉ, 2016). As regiões musculocutânea e fasciocutânea são caracterizadas pela nutrição proveniente de angiossomas advindos da vascularização muscular e fascial e são comuns à maior parte das espécies de mamíferos (WONG *et al.*, 2016; SOM *et al.*, 2017).

3.1.2 Anexos cutâneos

A pele possui estruturas anexas responsáveis pela manutenção da hidratação, proteção e podem permitir re-epitelização precoce diante de algumas lesões (KOLARSICK *et al.*, 2009). Segundo Sundberg e colaboradores (2018), devido a sua anatomia única, desenvolvimento independente, regulação e ação altamente especializada, os anexos cutâneos podem ser considerados como órgãos independentes da pele.

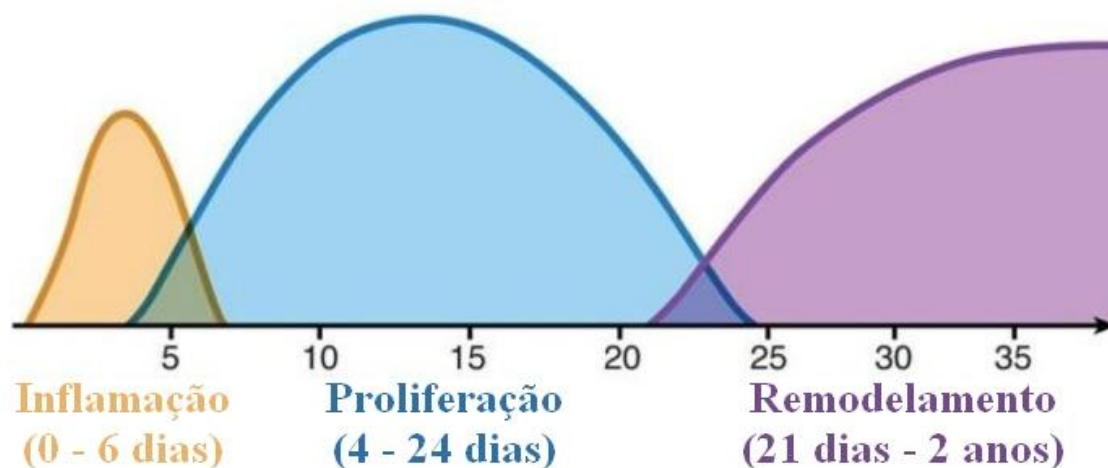
Os tipos de anexo dividem-se em folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas (SUNDBERG, 2018). Os folículos pilosos se localizam na porção mais profunda da derme, assim como no panículo carnoso, em roedores, e no tecido subcutâneo (PAVLETIC, 2018). As glândulas sebáceas são desenvolvidas juntamente aos folículos, sendo encontradas próximas a estes no indivíduo adulto (SOM *et al.*, 2017; PAVLETIC, 2018).

3.1.3 Fisiologia do processo de cicatrização

A cicatrização cutânea é um processo complexo e contínuo, resultando em formação cicatricial, e se dá a partir de três fases com períodos de sobreposição entre si, sendo estas: fase de inflamação, fase de proliferação e fase de maturação ou

remodelamento (GANTWERKER; HOM, 2012; RITTIÉ, 2016) (Figura 1). A definição e progresso das fases se dá a partir da liberação de citocinas, fatores de crescimento e proteases envolvidos no processo como um todo (KONDO; ISHIDA, 2010).

Figura 1. Escala das três fases sobrepostas de cicatrização e seus períodos médios de ocorrência. Adaptado de Swezey, L. Wound Educators. Disponível em: <https://woundeducators.com/phases-of-wound-healing/>



A fase inflamatória é crucial para a cicatrização de feridas e se baseia na hemostasia inicial, seguida da secreção de fatores de crescimento e células inflamatórias, caracterizada principalmente pelo processo de remoção de debris celulares (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014; RITTIÉ, 2016; McCARTHY *et al.*, 2018). A fase proliferativa propicia o desenvolvimento de uma matriz extracelular provisória pela migração de queratinócitos, promovendo o início de re-epitelização da ferida (KONDO; ISHIDA, 2010; RITTIÉ, 2016). A última fase, de maturação ou remodelamento, ocorre a partir da substituição do tecido de granulação por fibras de colágeno e elastina, gerando a cicatriz (GANTWERKER; HOM, 2012; YOUNG; McNAUGHT, 2011; PORTOU *et al.*, 2015).

O processo inicial da fase inflamatória ocorre de segundos a minutos após a ruptura da epiderme e resulta na formação de um coágulo que induz hemostasia e, através de moléculas reguladoras da permeabilidade vascular como o óxido nítrico (*nitric oxide* – NO), promove a chegada de células inflamatórias (GANTWERKER; HOM, 2012; KRAUSZ; FRIEDMAN, 2015). A fase inflamatória possui duração aproximada de quatro a cinco dias após a lesão, no entanto, diante do estresse oxidativo permanente ou incontrolado, decorrente da liberação de espécies reativas a oxigênio (ROS) pode ser

observada a formação de feridas crônicas, com permanência do estado inflamatório (YOUNG; McNAUGHT, 2011; KANJI; DAS, 2017; PAVLETIC, 2018; BILGEN *et al.*, 2019).

As principais células encontradas nessa fase são neutrófilos, linfócitos e monócitos, convertidos em macrófagos no local da lesão tecidual, visando eliminar possíveis patógenos e prevenir infecções (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014). Os macrófagos passam a liberar quantidades maiores de NO, principalmente na forma de óxido nítrico-sintase induzível (iNOS), responsiva apenas após ativação celular, com pico ocorrendo entre um a cinco dias após a lesão (ISENBERG *et al.*, 2005; KRAUSZ; FRIEDMAN, 2015; MINUTTI *et al.*, 2017). As funções já descritas do NO como capacidades antimicrobianas, vasodilatadoras, angiogênicas e estimuladoras de colágeno, agem também no estímulo a fatores de crescimento indutores de angiogênese, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KRAUSZ; FRIEDMAN, 2015). Além disso, macrófagos são os maiores responsáveis pela produção de VEGF durante a fase inicial de cicatrização, assim como de outros fatores de crescimento como transformador beta (TGF- β) e de crescimento epidermal (EGF) relevantes aos processos simultâneos de angiogênese, formação de fibroblastos e deposição de matriz extracelular (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014; KRAUSZ; FRIEDMAN, 2015; MINUTTI *et al.*, 2017).

O processo de angiogênese faz-se necessário para a restauração do fluxo sanguíneo e oxigenação dos tecidos danificados e inicia-se a partir da liberação de fatores de crescimento pelas plaquetas responsáveis pela formação do *plug* plaquetário-, assim como por neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, quininas e plasmina, compreendendo todo o sistema plasmina-plasminogênio na liberação e regulação dos fatores de crescimento (ROTH *et al.*, 2006; GREAVES *et al.*, 2013; HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014). A liberação de fatores como TGF- β , fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e VEGF levam à formação de capilares e reparo de vasos danificados, iniciando o processo de neovascularização (HARPER; YOUNG; McNAUGHT, 2014). A presença de um ambiente pobre em oxigênio também pode provocar a produção e liberação de fatores de crescimento pró-angiogênicos, fazendo-se parte importante do processo (ZHU *et al.*, 2019).

3.2 Enxertos cutâneos no reparo de feridas

3.2.1 Tipos e indicações de enxertos

A descrição de enxertos cutâneos data-se de 1597, com a publicação do livro “*De curtorum chirurgia per Insitionem*” pelo médico italiano Gaspare Tagliacozzi, responsável pelo desenvolvimento e descrição de técnicas de reconstrução de feridas extensas e de extremidades com o uso de retalhos e enxertos cutâneos (TOMBA *et al.*, 2014). Na rotina de cirurgia plástica e reconstrutiva, tanto humana quanto veterinária, a utilização de retalhos e enxertos livres demonstra-se bem consolidada (ANDREASSI *et al.*, 2005; PAVLETIC, 2018).

Enxertos cutâneos livres demonstram maior aplicabilidade principalmente em feridas de difícil cicatrização como queimaduras, feridas crônicas, lesões em extremidades distais ou em áreas extensas, além de regiões de alta tensão à sutura (SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014; DARRACH *et al.*, 2019). Ainda, seu uso vem sendo relatado na reconstrução de defeitos extensos de parede abdominal ou em seu reforço após herniorrafias, podendo ser uma alternativa ao uso de malhas sintéticas (CLAY *et al.*, 2018). Enxertos livres cutâneos são caracterizados pelo completo desprendimento do leito doador e classificados como autoenxertos, quando provenientes de um leito doador do próprio indivíduo; aloenxertos, quando provenientes de um doador da mesma espécie e xenoenxertos, quando provenientes de doador de espécie diferente (PAVLETIC, 2018). Por sua fácil aquisição e redução na possibilidade de rejeição ao tecido transplantado, preconiza-se a utilização de autoenxertos, que se subdividem em enxertos epidermais, de espessura parcial ou completa (SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014; GUOGIENÉ *et al.*, 2018; JALLER *et al.*, 2018).

Enxertos de espessura completa constituem-se de epiderme, derme e podem manter uma porção de tecido subcutâneo, geralmente com espessura maior que 0,6 mm (SERRA *et al.*, 2017; GUOGIENÉ *et al.*, 2018). São capazes de uma melhor adesão ao leito da ferida, maior força tênsil do tecido, menor taxa de contração e melhor aspecto estético final (WANG *et al.*, 2016; JALLER *et al.*, 2018). Devido a seu aspecto mais robusto e maior espessura, são mais utilizados em medicina veterinária (STANLEY *et al.*, 2013). Os de espessura parcial, compostos de epiderme e algumas camadas da derme, com espessura variando de 0,15 a 0,6 mm assim como os enxertos epidermais, compostos apenas de epiderme, possuem maior habilidade de contração, podem sofrer ruptura devido a sua espessura e podem tornar-se hipo ou hiperpigmentados, provocando

resultados menos estéticos após a cicatrização completa (SERRA *et al.*, 2016; GUOGIENÉ *et al.*, 2018; JALLER *et al.*, 2018). Em pequenos animais, contém menor quantidade de folículos pilosos, também demonstrando resultados menos estéticos se comparados aos enxertos de espessura completa (PAVLETIC, 2018).

Devido ao completo desprendimento do leito doador, enxertos cutâneos não possuem aporte sanguíneo próprio, e, dessa forma, a influência direta da vascularização do leito receptor pode significar o sucesso ou fracasso da técnica (UYSAL *et al.*, 2010; SUN; SIPRASHVILI; KHAVARI, 2014). Faz-se necessária a completa ausência de materiais acumulados como sangue, pus, corpos estranhos ou tecidos isquêmicos, incapazes de prover nutrição adequada ao enxerto e que possam reduzir a aderência do tecido ao leito receptor e a viabilidade dos capilares em formação (ANDREASSI *et al.*, 2005; PAVLETIC, 2018). Além disso, o posicionamento do enxerto diretamente em tecido de granulação tende a facilitar a contração tecidual, podendo prejudicar a adesão do enxerto (HARRISON; MACNEIL, 2008). Devido a sua espessura os enxertos parciais necessitam de menor aporte sanguíneo inicial, justificando sua indicação principal para úlceras venosas ou regiões distais, enquanto que os de espessura total necessitam de vascularização adequada no leito receptor para permitir a neovascularização no interior do enxerto, permitindo a cicatrização e adesão adequada do tecido (SERRA *et al.*, 2016; GUOGIENÉ *et al.*, 2018).

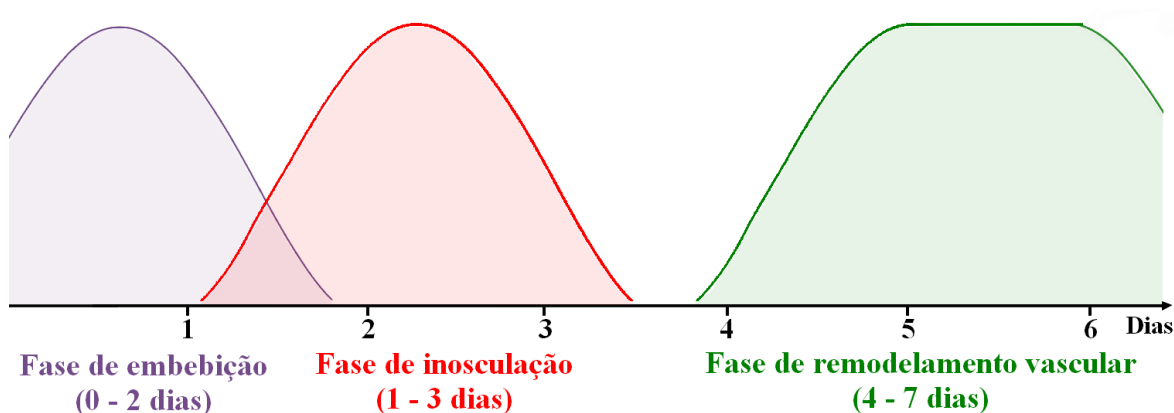
3.2.2 Fases de cicatrização de enxertos cutâneos

A cicatrização de enxertos cutâneos passa por três fases, sendo estas a de embebição, revascularização ou inosculação e maturação, podendo ser comparáveis às fases da cicatrização de feridas em geral (ANDREASSI *et al.*, 2005; ERWIN *et al.*, 2017). A etapa de revascularização tende a se iniciar a partir de três dias, mantendo-se assim o enxerto por período prolongado em hipóxia e promovendo lesões do tipo isquemia/reperfusão, podendo levar à necrose (KERN; SUCHER, 2013; ERWIN *et al.*, 2017).

Devido à ausência de vascularização e nutrição adequada ao tecido enxertado, as fases de cicatrização de um enxerto cutâneo se baseiam em uma fase inicial de embebição, correspondente à fase inflamatória de cicatrização, onde o tecido se nutre apenas pela absorção de fluidos do leito receptor, durante até 48 horas. Em seguida, na fase de inosculação, equivalente à fase proliferativa, inicia-se o processo de aderência vascular

entre os vasos do leito receptor e os capilares expostos do tecido enxertado. A terceira fase, de remodelamento vascular, análoga à fase de remodelamento cicatricial, age através da formação de novos vasos e capilares sanguíneos. Após a conclusão desta fase, a “pega” do enxerto é tida como adequada (STANLEY *et al.*, 2013; PAVLETIC, 2018) (Figura 2). A coloração inicial do enxerto é pálida, mas o desenvolvimento de uma coloração rósea e a visualização de que está firmemente aderido ao leito receptor são bons indícios de uma cicatrização adequada (ANDREASSI *et al.*, 2005).

Figura 2. Curva das fases de revascularização de enxertos cutâneos. Baseado nos dados de MacFarlane (2006).



Um dos principais aspectos observados diante da confecção de enxertos cutâneos é a contração do tecido, um fenômeno fisiológico destinado a reduzir o diâmetro da lesão inicial, mas capaz de prejudicar a adesão do enxerto e promover a formação de cicatrizes não estéticas (HARRISON; MACNEIL, 2008). A contração do enxerto se dá a partir de duas fases, primária e secundária. Após a excisão do tecido de seu leito doador há a contração primária, com redução imediata no diâmetro do tecido excisado. Tal fenômeno é observado de forma crescente de acordo com a espessura do enxerto (HARRISON; MACNEIL, 2008). A contração secundária, por outro lado, é observada após o posicionamento do tecido no leito receptor, com o alargamento do leito receptor e o efeito se dá de forma mais acentuada em enxertos de menor espessura (TUNCALI *et al.*, 2005; HARRISON; MACNEIL, 2008; KAMRAN *et al.*, 2012).

3.2.3 Complicações

Faz-se necessária a imobilização da ferida por até cinco dias, visando a redução da taxa de contração, principalmente em enxertos de espessura parcial (SERRA *et al.*,

2016). Além disso, a imobilização do tecido enxertado também permite melhor aderência entre o tecido e o leito receptor, assim como a manutenção e viabilidade de vasos sanguíneos neoformados (ANDREASSI *et al.*, 2005). A imobilização geralmente é realizada com uma primeira camada não aderente, composta de gaze e vaselina e a segunda, composta de compressas ou gazes visando restringir a movimentação local, usualmente com um curativo do tipo *tie-over* (STANLEY *et al.*, 2013). Esse tipo de curativo, composto de dois componentes principais, objetiva imobilizar a ferida de forma eficiente e reduzir o espaço morto, evitando assim a formação de seromas e hematomas. A primeira camada, não aderente, geralmente é compreendida por gaze ou algodão úmidos ou vaselina sólida, visando manter o ambiente úmido para favorecer a re-epitelização. A segunda camada geralmente é composta de compressa de gaze e suturas interrompidas com fio de náilon ou seda, exercendo pressão uniforme no tecido enxertado (BULLER *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2018).

As principais complicações compreendem a formação de seromas, hematomas, infecções, deiscência de sutura, necrose ou a própria falha de adesão do tecido à ferida, e os fatores capazes de levar a tais complicações podem ser tanto intrínsecos ao paciente, como a presença de comorbidades ou o desenvolvimento de infecções pós-operatórias, relacionadas à confecção do enxerto ou preparo do leito receptor (ANDREASSI *et al.*, 2005; STANLEY *et al.*, 2013; SERRA *et al.*, 2016).

Como complicação pós-operatória tardia, um dos principais aspectos a serem levados em conta é a contração secundária do enxerto, capaz de gerar defeitos na mobilidade e até induzir a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides, observado principalmente em regiões articulares ou com alta flexibilidade (HARRISON; MACNEIL, 2008). Tendo em vista a promoção de cicatrização adequada e menores taxas de complicação pós-operatórias, cabe a avaliação de novas técnicas capazes de promover a cicatrização e melhorar assim a qualidade de vida do paciente submetido à técnica de enxertia cutânea. Uma das opções mais promissoras refere-se à terapia celular.

3.3 Terapia celular e cicatrização cutânea

3.3.1 Origem de células tronco e suas capacidades

As células tronco são definidas como células capazes de autorrenovação e diferenciação em diversos tipos celulares com funções específicas (UYSAL *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2014). São divididas em dois grandes grupos, as células tronco embrionárias

(ESC – *Embryonic stem cells*) e células tronco mesenquimais (MSC – *Mesenchymal stem cells*), provenientes do próprio indivíduo após o nascimento (ZUK *et al.*, 2001).

As ESCs são tidas como as únicas células pluripotentes, capazes de se diferenciar em qualquer uma das três camadas germinativas, resultando em diferenciação em qualquer tipo celular, contudo, sua utilização tornou-se limitada devido a vieses éticos, legais e a sua imprevisibilidade de diferenciação (ZUK *et al.*, 2001; UYSAL *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2014).

As MSCs são células estromais multipotentes, encontradas em diversos tecidos de indivíduos após o nascimento (KING *et al.*, 2014). Inicialmente foram isoladas a partir da medula óssea (BMSC – *Bone marrow stem cells*) por Freidenstein e colaboradores (1966), porém, em seguida foram isoladas em outros tipos de tecidos, como membrana amniótica, polpa dentária, cordão umbilical e, finalmente, tecido adiposo (ADSCs – *Adipose derived stromal cells*), por Zuk e colaboradores (2001), com multipotência similar à obtida nas células isoladas de medula óssea.

Em 2006 iniciou-se a pesquisa básica com células tronco pluripotentes induzidas (iPS – *Induced pluripotent stromal cells*), abrindo espaço para a possibilidade de reprogramação celular, induzindo células adultas já definidas ao retorno de seu estado de pluripotência (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Tal estratégia demonstra excelente potencial terapêutico, já que as iPSs podem se diferenciar em qualquer tipo celular, contudo, a manipulação das células e a técnica exigida para seu desenvolvimento inviabiliza sua capacidade translacional (KING *et al.*, 2014). Além disso, ainda é visto como um procedimento oneroso, tornando sua utilização injustificável.

As ADSCs surgiram como uma opção viável devido a sua possibilidade de abundante extração, facilidade de obtenção e baixa morbidade, sendo que em humanos geralmente provém de lipoaspirados (McCARTHY *et al.*, 2018). A densidade celular obtida ao final do processo de isolamento de ADSCs é maior que a de BMSCs, sendo descrito por de Ugarte e colaboradores (2003) com $3,5 \times 10^5$ a 1×10^6 células obtidas por grama de tecido adiposo *versus* 5×10^4 células por grama de aspirado de medula óssea.

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), os critérios para sua caracterização envolvem capacidade de aderência ao plástico, diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Além disso, devem manifestar expressão positiva aos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e expressão negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD 19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006).

3.3.3 Indicações de terapia celular em cirurgia reconstrutiva

As células mesenquimais, apesar de descritas e pesquisadas há décadas, encontram-se em fase de ensaio clínico em diversos âmbitos da medicina, tanto humana quanto veterinária. Seu potencial terapêutico se baseia na plasticidade, capacidade de diferenciação em diferentes tipos células e efeito parácrino (TSUJI *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2019).

ADSCs são associadas à cicatrização de feridas com efeito local na redução da resposta inflamatória e liberação de fatores de crescimento envolvidos na cicatrização, angiogênese e re-epitelização, além da redução da expressão leucocitária tanto no tecido lesado quanto a nível sistêmico, em órgãos alvo (TSUJI *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2019).

3.3.4 Uso de terapia celular na cicatrização cutânea

O uso de células mesenquimais na cicatrização de enxertos cutâneos se dá, principalmente, devido a sua plasticidade e efeito parácrino, propiciando a adaptação e promoção da regeneração tecidual pós-injúria (KING *et al.*, 2014; RITTIÉ, 2016). Além disso, sua ação imunomoduladora permite a supressão ou redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias e estímulo de citocinas anti-inflamatórias (TSUJI, 2014). Contudo, a aplicabilidade da terapia celular em feridas cutâneas ainda é restrita já que demanda técnicas apuradas para seu processamento, falta de consenso quanto aos métodos de aplicação adequados e sua imprevisibilidade diante do microambiente em que serão implantadas (RITTIÉ, 2016).

Células mesenquimais adultas encontradas na epiderme habitam principalmente as regiões de folículos pilosos e glândulas sebáceas, promovendo crescimento e manutenção de pelos (BLANPAIN *et al.*, 2014). ADSCs, por outro lado, quando aplicadas no tecido lesado apresentam capacidades anti-inflamatória, angiogênica e promotora de cicatrização. As ADSCs podem agir de acordo com sua diferenciação em células endoteliais e/ou progenitoras de vasos sanguíneos, permitindo ou auxiliando na secreção de fatores de crescimento responsáveis pelo desencadeamento da cascata de cicatrização, como VEGF, bFGF, HGF, PDGF, TGF, EGF e angiopoietina-1. Também é capaz de regular o sistema plasmina-plasminogênio, responsável pela liberação de fatores de crescimento pró-angiogênicos, citocinas e quimiocinas responsáveis pelo processo

cicatricial e redução na inflamação e estresse tecidual (UYSAL *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2014; TSUJI, 2014; DENU; HEMATTI, 2016; McCARTHY *et al.*, 2018).

A influência das MSCs no processo cicatricial pode ser observada em todas as suas fases, promovendo a redução do processo inflamatório inicial, promoção da angiogênese, auxílio no processo de re-epitelização durante a fase proliferativa e a promoção de cicatrizes mais estéticas ao final da fase de remodelamento (McCARTHY *et al.*, 2018). As respostas positivas frente à utilização de MSCs são descritas tanto diante de feridas agudas quanto crônicas, e possuem notável reconhecimento também no âmbito da cirurgia reconstrutiva, permitindo uma melhor qualidade e desfecho em retalhos e enxertos cutâneos (BARTHLOMEW *et al.*, 2002; UYSAL *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2013; PLOCK *et al.*, 2015; PLOCK *et al.*, 2017; VIDOR *et al.*, 2018).

Tendo em vista o potencial já descrito da utilização de ADSCs na cicatrização de enxertos cutâneos, com o presente trabalho objetiva-se avaliar o efeito da aplicação de ADSCs em enxertos cutâneos de espessura completa em ratos Wistar. Com isso, avaliou-se a capacidade de auxiliar na neoformação de vasos sanguíneos, efeito anti-inflamatório e redução no estresse oxidativo nas primeiras fases de cicatrização

4 MANUSCRITO

Este trabalho utilizou como animais experimentais 36 ratos Wistar provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Dois ratos Wistar positivos para a proteína fluorescente verde obtidos a partir do Instituto de Cardiologia de Porto Alegre (ICFUC) foram utilizados como doadores de tecido adiposo para isolamento e cultivo de células mesenquimais adipoderivadas.

Os resultados serão apresentados em forma de artigo científico, descrito como subtítulo deste capítulo.

4.1 **Allogeneic adipose-derived stromal cells transplantation in full-thickness skin grafts promote early angiogenesis, reduces inflammation and protects against oxidative damage**

Nathalia Franco^{1,3*§}, Markus Berger^{2,3,4§}, Paula Barros Terraciano^{2,3}, Luciana Gonçalves Teixeira¹, Emanuelle Bortolotto Degregori^{1,3}, Pâmela Zanon^{2,4}, Mariana da Silva^{3,4},

Ronaldo Michel Bianchi¹, Emily Pillar⁵, Elizabeth Obino Cirne-Lima³, Eduardo Pandolfi Passos^{2,3}, Fernanda dos Santos de Oliveira³, Emerson Antonio Contesini^{1,6}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
3. Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Laboratório de Bioquímica Farmacológica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
5. Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
6. Faculdade de Veterinária Universidade Federal do Rio Grande do Sul

§ Both authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Nathalia Franco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil. +55 (55) 99648-5491. E-mail address: nathaliafranco.nf@gmail.com

ABSTRACT

Adipose-derived stromal cells (ADSC) have been shown to improve angiogenesis and wound healing in full-thickness skin grafts (FTSG), but its effects on early phases of FTSG healing are not clear. We investigated ADSC survival time on a FTSG rat model and its role on neovascularization, plasmin-plasminogen system regulation, inflammation and oxidative damage. ADSCs were isolated from green-fluorescent protein (GFP)-positive Wistar rats. Animals were submitted to FTSG and assigned to ADSC, SS (saline solution) or SHAM (no treatment) groups. At 3 and 5-postoperative days, grafts were macroscopic evaluated for contraction and presence of exudate or bleeding and collected for histopathological assessment for new blood vessels, fibrin, muscle and collagen fiber and epidermis or dermis necrosis and molecular analysis of proangiogenic growth factors and surface markers expression, plasmin-plasminogen system regulation, inflammation and oxidative damage. ADSC group grafts were also immunostained with anti-GFP

antibody for location of cells. ADSC group revealed higher neovascularization, impaired inflammatory infiltrate, fibrin deposition and muscle degeneration at histopathological analysis when compared to the other groups. ADSC group also presented enhanced expression of proangiogenic growth factors and plasmin-plasminogen system. Decrease of profibrotic components, inflammatory cell, superoxide and protein carbonyl and hypoxia markers confirmed the contribution of ADSCs on reducing oxidative damage, inflammation and hypoxia. The labeled ADSCs were found on grafted tissue at both evaluation times. In conclusion, labeled ADSC remain on injected site and are responsible for lower contraction, early angiogenesis development of FTSG, reduction of inflammation and oxidative damage and may increase the graft survival rates.

Keywords: Neovascularization, skin grafts, stem cells, regenerative therapy, reconstructive surgery

INTRODUCTION

Autologous skin grafts are widely used in burns, extensive skin losses related to oncologic resections or trauma, chronic wounds or distal lesions in limbs (Gao et al., 2019; Riccio et al., 2019). Skin graft healing is divided into three main phases: plasmatic imbibition, when the graft nutrition is exclusively based on the receptor site, with no autonomous blood supply; inosculation, when donor and recipient sites new blood vessels connect and form a network, and revascularization, when blood vessels become larger and blood flow is completely reestablished (Capla et al., 2006). The first healing phase defies the skin graft, since it is subjected to prolonged tissue ischemia and hypoxia, which can lead to necrosis (Gao et al., 2019). In this context, the early promotion of angiogenesis represents a challenge that could define the graft outcome (Pazzini et al., 2017; Gao et al., 2019).

The angiogenesis process involves two main phases, activation and resolution (Pepper, 2001). Both phases are intimate related to proangiogenic growth factors (GF) release and regulation, being the key factors vascular endothelial (VEGF), basic fibroblast (bFGF) and epidermal (EGF) GF, that can induce the plasmin-plasminogen system activation, also responsible for GF expression (Matkar et al., 2017). Several proteases such as chymase and cell types as macrophages also promote its expression and regulation (Muramatsu et al., 2002; Lo Sicco et al., 2017). An upregulation of proangiogenic GF can

be observed both on hypoxic environments and after mesenchymal stem cells (MSCs) administration (Ottrock et al., 2007; Gao et al., 2011; Vidor et al., 2018).

MSCs, especially adipose-derived stromal cells (ADSCs), have been used in regenerative medicine due to its plasticity and paracrine effect (Gao et al., 2011; Tsuji et al., 2014; Feng et al., 2019). Its response on promoting early angiogenesis has not been completely described, but their ability to differentiate in several cellular types, migrate into damaged tissue and release specific GF can represent their potential on wound healing and neovascularization promotion (Gao et al., 2011; Tsuji et al., 2014; Vidor et al., 2018; Feng et al., 2019). However, after administration, its dwell time on tissue has not been completely clear, as well as its real effect on blood vessels formation (Doorn et al., 2012; Vidor et al., 2018). Besides its influence on angiogenesis, MSCs are also deeply linked to an anti-inflammatory and antioxidant effect, decreasing inflammation and tissue damage based on reactive oxygen species (ROS) (Denu; Hematti, 2016).

In the present study, we used a rat full-thickness skin graft (FTSG) model to characterize and understand the effects of labeled ADSC positive for the green-fluorescent protein (GFP+) cells on early angiogenesis and its relation with proangiogenic GF and surface markers. We also aimed to assess the effect of ADSCs on plasmin-plasminogen system, inflammation and oxidative damage on grafted tissue.

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

Thirty-six eight-week old male Wistar rats, weighting 300-380g, were used as experimental models. Two adult, male, GFP+ Wistar rats were used as adipose tissue donors. Animals were purchased from Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CREAL-UFRGS) and Centro de Cardiologia Experimental do Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia de Porto Alegre (ICFUC), respectively. Animals were housed under controlled conditions and had free access to dry food and water. All animal procedures were based on approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee for Animal Use.

Surgical procedures were performed under isoflurane general anesthesia (Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, Brazil) as an induction and maintenance

drug. Before anesthetic induction, all 36 experimental animals received a subcutaneous single dose of ampicillin (Vetnil, Brazil – 20 mg·kg⁻¹) and intraperitoneal tramadol chloride (Cristália, Brazil – 20 mg·kg⁻¹), followed by applications every 12 hours during the five experimental days.

2. ADSC isolation and culture

ADSC were isolated from inguinal adipose tissue of two GFP+ Wistar rats euthanized by isoflurane overdose. Tissue was minced, placed into a 50 mL Falcon tube, submitted to enzymatic digestion with type I collagenase (GIBCO, Brazil) and shaken for 60 minutes. After, it was centrifuged at 500 x G for five minutes and the solution was fragmented into a cell pellet and a supernatant fraction. The cell pellet was suspended and transferred to a six-well culture plate and cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM – GIBCO, Brazil) containing 1% antibiotic solution (Penicillin-Streptomycin – GIBCO, Brazil) and 20% of Fetal Bovine Serum (FBS – GIBCO, Brazil).

The plate was incubated at 37°C and 5% of CO₂. Culture medium was changed every two days. Cells grown to 80% confluence were expanded by chemical detachment using trypsin (0,25% - GIBCO, Brazil) and were stored in T75 culture flasks until third or fourth passage.

3. ADSC differentiation and characterization

Aiming to confirm ADSCs differentiation potential, third to fourth passage ADSC cells were plated in 24-well plates on cell density of 1 x 10⁴ cells per plate and submitted to osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation. The induction was accomplished by introducing osteogenic, chondrogenic and adipogenic induction medium. Each differentiation plate had a control, maintained with DMEM medium containing 1% antibiotic solution and 10% of FBS. Medium was changed every 48 hours until the 21st culture day. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with alizarin red for osteogenic, alcian blue for chondrogenic and oil red for adipogenic lineages.

For the characterization by flow cytometry, cells were incubated with antibodies against surface markers CD73 (1µg:1 x 10⁶ cells, BD Pharmingen, 551123, USA), CD90 (1µg:1 x 10⁶ cells, BD Pharmingen, 554898, USA), CD105 (1µg:1 x 10⁶ cells, abcam, ab11414, USA), CD11b (1µg:1 x 10⁶ cells, BD Pharmingen, 554982, USA), CD34 (1µg:1 x 10⁶ cells, Santa Cruz Biotechnology, sc-7324 PE, USA) and CD45 (1µg:1 x 10⁶ cells, BD Pharmingen, 554878, USA) conjugated with phycoerythrin (PE) or fluorescein

isothiocyanate (FITC) for 30 min at 4°C. Control samples were incubated in the absence of antibodies. Cells were analyzed in a FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) using the CellQuest software and a minimum of 10,000 events was collected.

4. Full-thickness skin graft model

The 36 animals were randomly assigned in three groups, ADSC (Adipose-derived stem cell group), SS (saline solution group) and SHAM, representing 12 rats per group. Six animals from each group were euthanized at the third day (3d) of experiment, the remaining animals were euthanized at the fifth day (5d). All animals were submitted to skin graft procedure according to Vidor et al. (2018) protocol. A dorsal 12mm round skin and *panniculus carnosus* fragment was excised and, with surgical microscope magnification, *panniculus carnosus* was removed. The skin graft was reattached on donor-receiving site and sutured with 6-0 mononylon (Ethicon, Johnson & Johnson, Brazil). ADSC group received 1×10^6 ADSCs resuspended in 200 μ L 0,9% sodium chloride (SC), subcutaneously, in four equidistant points. SS group received only 200 μ L SC, subcutaneously, in four equidistant points and SHAM group were submitted to FTSG but did not received any local injection.

The grafts were photographed, traced on transparent paper and measured with digital caliper (width x length in mm). After, *tie over*-like dressings, composed of two layers, were performed. First layer received solid vaseline (Rioquímica, Brazil) on top of a gauze and the second layer a sterile polyurethane foam (Rioquímica, Brazil), sutured with 5-0 mononylon (Ethicon, Johnson & Johnson, Brazil). For an efficient immobilization, a bandage tape was applied (3M, Brazil). Dressings were changed on the third postoperative day.

5. Macroscopic assessment and planimetry

On 3d, all animals were evaluated based on a form due to exudate, bleeding and necrosis presence and degree, scales varying from low to accentuated, and 18 were euthanized. The 18 remaining animals were also evaluated on 5d. Planimetry analysis were based on grafts measurements with digital caliper and transparent film demarcation with permanent pen. Drawings were digitalized and total wound area was calculated by ImageJ software [U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA]. Contraction rate was assessed by total wound area (A) and days of interest, as in 0d-3d, 0d-5d and 3d-5d based on following formulas stablished by Vidor et al. (2018): $(A0d-A3d)/A0d \times 100$, $(A0d-A5d)/A0d \times 100$ and $(A3d-A5d)/A3d \times 100$.

6. Immunohistochemical analysis of GFP ADSC cells

On 3d, six animals from each group were euthanized and the skin graft area was excised, with same procedure on the remaining animals at 5d. The excised fragment was sectioned in two equal parts and one was immediately soaked in 10% tamponed formalin solution for 36 hours. Then, fragment was placed in paraffin and sliced in 4-6 μm pieces. Slides from ADSC group animals were incubated with anti-GFP polyclonal antibody (1:600 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-8334, USA). Analysis was accomplished by an evaluation form, allowing to assess ADSCs presence, distribution, format and its presence on hair follicles. Slides were scanned using a virtual slide microscope (VS120-S5 Virtual Slide Microscope, Olympus, Japan).

7. Histopathology

For histopathological analysis, the paraffined pieces were sliced in 4-6 μm pieces and slides were stained with hematoxylin and eosin (HE). A pathologist analyzed all slides, sections in 200 to 400 x magnification per field searching mainly by neovascularization, presence of inflammatory infiltrate, fibrin deposition and hemorrhage, muscle and collagen fiber necrosis, epidermis and dermis necrosis. Neovascularization was quantified in a scale from 0 to 4, when 0 mean absent, 1 occasional, 2 discrete, 3 moderate and 4 prominent.

8. Molecular analysis

8.1 *Sample preparation*

The remaining skin graft fragment were sectioned in two pieces and cut into small pieces and reserved for western blot and enzymatic assays. Western blot extracts were prepared by macerating skin graft pieces in RIPA buffer containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, pH 8.0. The extracts used in enzymatic assays were prepared by macerating skin graft pieces in cold PBS solution containing 1 % Triton X-100 in the absence of protease inhibitors. After homogenization all extracts were centrifuged at 9500 x G for 15 min at 4°C, supernatants were collected and protein content was determined using BCA assay kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

8.2 *Enzyme assays*

Activity of serine-proteinases involved in plasminogen-plasmin system and the main mast cell enzyme, chymase, were determined in skin graft extracts using

chromogenic substrates designed for each peptidase as described by Berger et al. (2010). The enzymatic reaction was triggered by addition of substrate solutions (10 μ L) for measure tissue kallikrein (0.2 mM H-D-Pro-Phe-Arg-p-nitroanilide), urokinase-type plasminogen activator (uPA) (0.2 mM pyro-Glu-Gly-Arg-p-nitroanilide) and chymase (0.2 mM Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide) enzymes. Kinetics of p-nitroaniline formation was followed at 405 nm using a SpectraMAX 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) and enzyme activity was expressed as mOD/min/mg of protein. In another set of experiments the ability of skin grafts to potentiate the main fibrinolytic enzyme, plasmin (PPA), was also tested. In this case, extracts (5 μ g) were previously incubated with purified human plasmin (1 μ g) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 at 37°C for 10 min and enzyme activity was determined by the addition of plasmin chromogenic substrate (0.2 mM H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide). The results were expressed as fold increase to a control which represents basal plasmin activity in the absence of skin graft extracts.

8.3 Western-Blotting (WB)

Proteins from skin graft extracts (40 μ g) were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions and transferred (25 V, 1.3 A, 30 min) through a semi-dry transfer system (Trans-Blot Turbo, Bio Rad, Hercules, CA, USA) onto nitrocellulose membranes. Proteins ranging from 50 – 200 kDa were resolved in 10% SDS-PAGE gels, while proteins ranging from 6 – 50 kDa were resolved in 15% gels. Unspecific membrane sites were blocked with 3% BSA and immediately incubated with the primary poly or monoclonal antibodies obtained from commercial sources. The following antibodies were used: anti-heme oxygenase-1, HO-1 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-136960, USA); anti-hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α (1:500 dilution, Novus Biologicals, IB 100-105, USA); anti-inducible nitric oxide synthase, iNOS (1:800 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-650-G, USA); anti-intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-366318, USA); anti-vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-1504, USA); anti-urokinase-type plasminogen activator surface receptor protein, uPAR (1:1000 dilution, Cusabio Biotech Co., CSB-PA07505A0Rb, USA); anti-plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1 (1:1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-6644, USA); anti-mast cell chymase, MCP-1 (1:400 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-59586, USA); anti- α smooth muscle actin, α -

SMA (1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-53015); anti-CD34 (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-7324, USA); anti-epidermal growth factor, EGF (1:400 dilution, Novus Biologicals, IBP1-19806, USA); anti-basic fibroblast growth factor, bFGF (1:800 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-136255, USA); anti-fibroblast growth factor receptor, FGFR (1:500 dilution, Novus Biologicals, IB 100-2079) and anti-vascular endothelial growth factor, VEGF (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, sc-7269, USA). An anti- β -tubulin (1:1000 dilution, Abcam, ab210797, USA) antibody was used as the internal standard for all immunoblots. After primary antibody incubation, membranes were also incubated with the appropriated secondary-horseradish peroxidase conjugated antibody and revealed using the colorimetric kit Opti-4CN (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Protein expression levels was normalized with β -tubulin and quantified using Image J software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

8.4 *Superoxide anion and nitric oxide determinations*

The superoxide anion production was estimated in skin graft homogenates based on NBT (Nitroblue Tetrazolium) reduction assay (Hohmann et al., 2013). The absorbance was measured at 600 nm and the results are expressed as NBT reduction (OD at 600 nm). Total nitrate and nitrite levels in skin grafts was determined as an indication of nitric oxide (NO) production as previously described by Miranda et al., 2001. The absorbance was then determined at 540 nm after 30 minutes incubation at room temperature protected from light. Sample absorbance values were compared with a standard curve made with known concentrations of sodium nitrate (1 – 200 μ M).

8.5 *N-acetyl- β -d-glucosaminidase (NAG) and myeloperoxidase (MPO) activities*

Homogenate samples (around of 0.5 mg protein) were incubated in 50 mM K_2HPO_4 , pH 6.0 containing HTAB (0.5% w/v), and then centrifuged (16000 x G) for 5 minutes. For NAG assay, the supernatants (20 μ L), were added to 96-well plates and incubated in 50 mM K_2HPO_4 , pH 6.0 (80 μ L). The enzymatic reaction was initiated by the addition of 4-nitrophenyl N-acetyl- β -d-glucosaminide substrate (2.24 mM). After incubation (10 minutes at 37° C), the reaction was stopped by the addition of 0.2 M glycine, pH 10 (100 μ L). The enzymatic activity was determined spectrophotometrically at 400 nm and results were expressed as NAG activity (optical density/min/mg skin tissue). For MPO assay, the supernatants (30 μ L) obtained from homogenates were incubated in 50 mM K_2HPO_4 , pH 6.0 (200 μ L) containing o-dianisidine dihydrochloride (0.0167 %, w/v) and hydrogen peroxide (0.05 %, v/v). The absorbance was then

determined after 5 min at 450 nm. The results of MPO activity were also expressed as optical density/min/mg skin tissue.

8.6 Protein carbonyl content (CO)

Total CO content was determined according to Levine et al. (1994). Absorbance was measured at 380 nm in 96-well plates using the molar extinction coefficient of 22.000 M⁻¹ cm⁻¹. Results were expressed as nmol carbonyl residues (DNPH)/mg protein.

9. Statistical analysis

Data were typed twice and expressed on mean \pm standard error (SE). Revision and analysis of final data was performed on SPSS, version 18.0 [SPSS Inc. PASW Statistics for Windows. Chicago: SPSS Inc.]. Contraction rate was assessed by generalized estimated equations (GEE), using an unstructured working correlation matrix in a factorial model, followed by least significant difference (LSD) correction. Histopathology and molecular analysis were assessed by ANOVA two-way followed by Bonferroni correction. Significance level was established as $p < 0.05$.

RESULTS

1. ADSC characterization and differentiation

ADSCs were submitted to flow cytometry and differentiation protocol, confirming its characterization as stromal cells. ADSCs *in vitro* were able to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. Flow cytometry revealed CD73, CD90 and CD105 as positive and CD11b, CD34 and CD45 as negative markers.

2. Permanence of ADSC GFP+ cells on skin graft

Grafts analyzed at 3d and 5d by immunohistochemistry revealed the presence of labeled ADSCs in all animals. Most cells were found both in epidermis, dermis, and hypodermis. Outstandingly, in all animals, cells were also found in hair follicles and sebaceous glands (Figure 1).

3. Macroscopic assessment, planimetry and FTSG contraction rates

ADSC, SS and SHAM groups were evaluated due to bleeding, exudate and necrosis presence, revealing no difference between the groups. Contraction rate between groups revealed lower contraction rate between SS and SHAM groups when compared to ADSC group both on d0-d5 ($p=0.03$) and d3-d5 ($p=0.04$) evaluation (Table 1).

Table 1. Contraction rate of FTSG between ADSC, SS and SHAM groups at three evaluation periods

Evaluation period	ADSC	SS	SHAM
d0-d3	-6,00 ± 5,23	3,33 ± 3,09	3,25 ± 3,3
d0-d5	-6,03 ± 5,9	-17,71 ± 11,95*	7 ± 3,4*
d3-d5	-0,69 ± 4,55	-21,98 ± 11,29*	1,85 ± 4,55*

Abbreviation: ADSC: Adipose-derived stem cell group. SS: Saline solution group. Results were expressed as mean ± standard error (SE). * p<0.05 compared with ADSC group.

4. ADSC group revealed increase of neovascularization when compared to SS and SHAM groups

Figure 2 represents the neovascularization rates. Fig. 2A 1-6 (arrowheads) presents ADSC group increased neovascularization compared to the other groups. ADSC group presented the higher neovascularization rates (p=0.0012; Figure 2B) than SHAM at both 3d and 5d, and than SS at 3d. Inflammatory infiltration, fibrin deposition and hemorrhage were mostly observed in SS and SHAM groups, as well as muscle, collagen, epidermis and dermis necrosis, however, with no significant difference.

5. Molecular analysis

5.1 Plasmin-plasminogen system is upregulated by ADSCs

To explore the effect of ADSCs on regulation of the plasmin-plasminogen system and its further influence on proangiogenic GF release and regulation, plasmin (PPA), uPA, uPA specific receptor (uPAR), uPA and plasmin primary inhibitor, PAI-1, a plasmin-plasminogen system inhibitor, and chymase, the major mast cell protease, were analyzed by western-blotting (Figure 3). Plasmin and plasminogen activity were upregulated in ADSC treated group, in both 3d and 5d compared to the other groups (Fig. 3A, B) (p<0.0001).

PAI-1, on the other hand, was significantly reduced both on 3d and 5d in ADSC group. Chymase also had decreased activity on both days (p=0.002) (Figure 3C). WB results has shown increase of uPAR and decrease of chymase expression (Figure 3E). Positive WB control with β -tubulin expression was compared with chymase, uPAR and PAI-1 activity, representing a relation between the enzymes of interest and control, β -tubulin (Figure 3D).

5.2 ADSCs promote early angiogenesis development on FTSG

VEGF ($p=0.006$), FGF ($p=0.0001$), FGFR ($p=0.004$) and the endothelial surface marker CD34 ($p=0.002$) were upregulated in ADSC group at 3d ($p<0.0001$), while EGF ($p<0.0001$) and α -SMA ($p<0.0001$) were highly expressed at 5d compared to the other groups. HIF-1 α , a hypoxia marker, was down expressed in ADSC group at 3d and 5d (Figure 3). Positive WB control was assessed with β -tubulin expression.

5.3 ADSCs protects skin grafts against inflammatory oxidative damage

MPO, a neutrophil marker, presented low activity both at 3d and 5d in ADSC group when compared to SS and SHAM ($p<0.0001$), while NAG was mostly reduced at 5d ($p=0.0002$) (Fig. 5B-C). HO-1 was significantly increased in ADSC group both at 3d and 5d ($p=0.0002$) (Fig. 5D-E).

Kallikreins, a group of proteases, were analyzed as a marker of inflammatory response and observed its increase especially on 5d in ADSC group ($p=0.0002$) (Fig. 5D). NOx and iNOS activity, used to assess NO response to ADSCs, were downregulated in ADSC group, both at 3d and 5d when compared to SS and SHAM groups ($p=0.002$ and $p<0.0001$, respectively) (Figure 5A, D-E). Integrins were assessed by intracellular and vascular adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1. Both ICAM-1 and VCAM-1 were downregulated in ADSC group, at 3d and 5d compared to SHAM and SS groups at the same evaluation times ($p<0.0001$ and $p=0.0001$, respectively) (Figure 5D). Figure 5E represents WB findings based on β -tubulin positive control ratio.

Protein oxidative damage related to inflammation was also assessed in our study by analyzing CO, superoxide anion activity, and HO-1 expression. Both CO ($p<0.0001$) and superoxide anion ($p<0.0001$) were downregulated in ADSC group at 3d and 5d when compared to the other groups (Figure 6A-B).

DISCUSSION

In this study we aimed to evaluate ADSCs effect on early angiogenesis in FTSG. We could also characterize molecular factors included in angiogenesis promotion, as well as the remaining time of ADSCs on grafted tissue, inflammation and oxidative damage of skin grafts. According to our results, we could confirm an enhanced presence of proangiogenic growth factors, increased expression of proteins related to the release of those growth factors and decrease of inflammation and oxidative stress markers on ADSC group. The findings of this study confirmed that subcutaneous ADSC GFP+ cells can

represent a benefit on skin graft take due to increase of early angiogenesis, anti-inflammatory effect and impaired oxidative damage.

The use of FTSGs can soften major wound contraction when compared to split-thickness skin grafts (Sakrar et al., 2012; Rose et al., 2015). However, contraction cannot be completely avoided and can increase patient morbidity (Harrison; MacNeil, 2008; Cheng et al., 2016). In our study, ADSC group had lower contraction rates and it can be related to α -SMA expression by myofibroblasts, observed in inflammatory and proliferative wound healing phases (Uysal et al., 2014). Further, in our study we observed a significant increase on α -SMA expression at the fifth evaluation day in ADSC group. α -SMA and smooth muscle cells in general are the major constituent of blood vessels and increase their production and expression due to vascular injury (Bak et al., 2016). These results may be related to the increased neovascularization and inosculation phase of graft healing, promoting maturation of recently formed blood vessels. We can infer that the skin graft thickness associated to ADSC administration impaired α -SMA activity on earlier skin graft contraction. It was also demonstrated by Cheng et al. (2016), in a prolonged study, who observed decreased contracture of the skin grafts after MSCs application.

Our ADSC GFP+ cells were tracked by immunostaining with GFP-antibody and could be found in all animals, both on epidermis, pilosebaceous units, dermis and connective tissue cells at third and fifth evaluation days. It may be related to stromal cells tropism for injured, constantly regenerating tissues or locations that present a particular niche of adult stromal cells, as epidermis, hair follicles or sebaceous glands (Naldaiz-Gatesi et al., 2016; Naldaiz-Gatesi et al., 2018). It could explain why ADSCs were found around pilosebaceous units and epidermis in this study. After application on wounded tissue, the release of growth factors and cytokines, combined with cells plasticity, allows the migration of the injected cells to structures in constant or cycled renewal, as hair follicles, sebaceous glands and epidermis (Blanpain; Fuchs, 2014). Gao et al. (2011) found labeled ADSCs at the seventh evaluation day, but cells were aggregated in the subcutaneous tissue. However, as observed in our study, their use of ADSCs on skin flap revascularization also represented increased viability in ADSC groups. In a prolonged study, Wu et al. (2007) also found a constant amount of GFP+ bone marrow stromal cells (BMSC) at seventh day, but at 14th day, a substantial decrease was observed. Due to the short evaluation time, we can only assume that in a longer evaluation time our ADSC

GFP+ cells could have a decreased survival, since the progression of wound healing can lead to both differentiation or apoptosis of ADSCs.

The plasmin-plasminogen system plays a key role in angiogenesis process due to its capacity to release and regulate GF expression. Plasmin and bFGF can also promote the activation of uPA system, in the presence of its specific receptor (uPAR). PAI-1, a uPA and plasmin primary inhibitor, has the potential to decrease angiogenesis through GF downregulation (Stefansson, 2001; Otrrock et al., 2007). In our study, plasmin and plasminogen were assessed by uPA system and plasmin potentiating activity (PPA), revealing upregulation of plasminogen and plasmin activity on ADSC treated grafts on both evaluation days. As observed by Rabbani and Mazar (2001), the increase of plasmin-plasminogen system can promote cell migration and stimulate angiogenesis-linked growth factors, such as VEGF and bFGF, corroborating with our findings. The decreased expression of PAI-1 on both days in ADSC group, when compared to the SS and SHAM groups indicates that the improvement of neovascularization was capable of suppressing the expression of this inhibitor. Chymase, a mast cell protease, can induce angiogenesis by releasing GF but is also linked to a proinflammatory phase of healing (Katada et al., 2002; Muramatsu et al., 2002). Its expression can be suppressed by HO-1 (Pae et al., 2008) and, in our study, its expression was significantly decreased both on 3 and 5 days, as observed by Huttunen et al. (2000), with a decrease of chymase at inflammatory phases of wound healing. It could be explained by ADSC-related resolution of inflammation on the early healing stage.

We observed enhanced vascular density in ADSC group on both histopathological and molecular assessments. The increase in proangiogenic GF as VEGF, bFGF, its receptor FGFR and the surface marker CD34 in ADSC group at day 3 and EGF at day 5 were compatible with our histopathological findings of increased neovascularization in this group, attesting the influence of ADSCs on new blood vessels formation. VEGF can be elucidated as the main proangiogenic GF, mediating angiogenesis specially on early phases of wound healing (Cheng et al., 2016). Uysal et al. (2010) has also observed an increase of VEGF and blood vessels in ADSC and BMSC groups after seven days. HIF-1 α and the whole HIF system can contribute to angiogenesis via VEGF transcription on hypoxic environments (Otrrock et al., 2007; Gao et al., 2011). However, we detected a meaningful decrease in HIF-1 α expression in ADSC group on both evaluation days. This result might indicate that the addition of ADSCs allowed the skin graft to preserve a

normal concentration of oxygen, consequently expressing VEGF, bFGF and EGF, while reducing HIF-1 α expression on the grafted environment.

In skin grafts, viability is deeply linked to early vascularization and immobilization acts as a key factor, since the movement can rupture any recently formed blood vessels (Richter et al., 2009; Kim et al., 2018). In this study, we used a tie over-like dressing based on Buller et al. (2017), using a sterile polyurethane scrub foam. We found absence of exudate or fluid accumulation, and infection or purulent secretions on the wound, which could be explained by sterile condition of the foam, as well as the presence of an antiseptic solution (chlorhexidine 2%).

Our findings showed that ADSCs promote an anti-inflammatory response on FTSG, according to a series of molecular analysis such as neutrophil, macrophage and HO-1 expression and kallikrein, NO and integrins activity. Neutrophils and macrophages, related to early inflammatory response, were assessed by MPO and NAG activity. Neutrophils are soon depleted and degranulated, a process evaluated by MPO release (Ferreira et al., 2007; Jiang et al., 2016). In our study, MPO was already decreased on day 3 in ADSC group, revealing less degranulation of neutrophils, and, consequently, less skin graft damage as suggested by Jiang et al. (2016). Macrophages, specially M2, can be identified as the major source of VEGF on inflammatory phase of wound healing (Krausz; Friedman, 2015; Lo Sicco et al., 2017). Based on Wang et al. (2016) and Lo Sicco et al. (2017) findings, ADSCs can regulate macrophage expression, switching from a pro to an anti-inflammatory pattern. The reduction of NAG, a marker of macrophage recruitment or activity, in ADSC group at the fifth evaluation day, when associated to our previously described findings, can elucidate ADSC impact on inflammation resolution and change of macrophage inflammatory pattern (Ferreira et al., 2007).

HO-1, expressed by macrophages, can turn them over from a pro to anti-inflammatory state (Vijayan et al., 2018). Its expression is based on a response to hypoxia, presence of proinflammatory cytokines, NO or oxidative stress (Vijayan et al., 2018). In this study, we observed increased expression of HO-1, corroborating the NAG findings. The increased activity of HO-1 can also be linked to the reduction of chymase expression in our study, promoting fewer mast cells degranulation and, consequently, improving HO-1 and ADSC anti-inflammatory effect. Kallikreins, a main group of proteases, are related to release of proteins involved in coagulation and tissue inflammation, but also to vasodilatation and endothelial cell proliferation (Bhoola et al., 1992; Emanuelli et al.,

2001; Colman, 2006). The upregulation of kallikrein in ADSC group at d5 added to the findings of histopathological and molecular assessments, and it might suggest that kallikrein was also represented as a proangiogenic factor, since ADSC groups revealed increased neovascularization when compared to the other groups.

NO expression can be indirectly assessed by iNOS and NOx expression (Lo Sicco et al., 2017) and here, we observed impaired expression of both NO indirect markers in ADSC group on both days. NO expression can be connected to wound healing due to its properties of regulating vascular permeability to inflammatory cells and increase of GF expression. However, its overexpression can lead to a prolonged inflammatory phase (Krausz; Friedman, 2015). Integrins, mediators of the interaction between neutrophils and endothelial cells, when overexpressed, are also connected to increased inflammatory response (Jiang et al., 2016). Here, both ICAM-1 and VCAM-1 revealed a decreased expression at third evaluation day in ADSC group. It can be justified by impaired neutrophil degranulation and release of proteases and impaired inflammatory response when compared to the other groups. iNOS, NOx and integrins findings allow us to assume that ADSCs promote an early inflammatory phase resolution.

NOx activity can also inhibit an intracellular form of reactive oxygen species (ROS) called superoxide anion, produced by M1 type macrophages. ROS can promote protein, lipidic and DNA damage (Dalle-Donne et al., 2003). Superoxide anion is cytotoxic, increases vascular permeability and can lead to inflammation or tissue damage, acting as an oxidative stress marker (Yang et al., 2015). CO is also related to protein oxidation and can be linked to ROS expression, presented as one of the main indicators of protein oxidative damage and inflammation increase and prolongation on wounded tissues (Dalle-Dorne et al., 2003; Semchyshyn, 2014). We observed a decreased expression of oxidative stress markers such as superoxide anion (assessed by NBT) and CO in ADSC group. These markers expression can block tissue and blood vessels restoration and it was suggested by Yang et al. (2015) that reduced NOx and superoxide anion expression can reduce the wounded skin production of NOS, corroborating our findings and representing, once again, a clear effect of ADSCs in inflammation reduction.

Our study is not without limitations. Despite the exciting results, we believe that the short evaluation period, the skin graft' size and the small number of groups demonstrate the need for further studies regarding the evaluation of pro and anti-

inflammatory cytokines and quality of the neovascularization in more advanced stages of full-thickness skin grafts healing.

CONCLUSIONS

Our findings demonstrated that ADSCs can promote early angiogenesis and upregulation of plasmin-plasminogen system on full-thickness skin grafts, reducing the effects of prolonged hypoxia and further necrosis, improving the graft take and further viability. ADSCs can also stimulate an anti-inflammatory effect and decrease oxidative damage. ADSC group presented decreased contraction rates, possibly promoting less morbidity rates and long-term aesthetic scars.

REFERENCES

- Bak, S.; Ahmad, T.; Lee, Y. B.; Lee, J.; Kim, E. M.; Shin, H. Delivery of a cell patch of cocultured endothelial cells and smooth muscle cells using thermoresponsive hydrogels for enhanced angiogenesis. **Tissue Engineering**, v. 22, n. 1-2, p. 182-193, 2016.
- Berger, M., Reck, J., Terra, R.M.S., Pinto, A.F.M., Termignoni, C., Guimarães, J.A., 2010. *Lonomia obliqua* caterpillar envenomation causes platelet hypoaggregation and blood incoagulability in rats. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 33–44, 2010.
- Blanpain, C.; Fuchs, E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. **Science**, v. 344, n. 6189, p. 1242281-1-10, 2014.
- Buller, M.; Lee, T. J.; Davis, J.; Wilhelmi, B. J. Bolstering skin grafts with a surgical scrub brush: a cost-effective solution. **Eplasty**, v. 17, n. e21, 2017.
- Capla, J. M.; Ceradini, D. J.; Tepper, O. M.; Callaghan, M. J.; Bhatt, K. A.; Galiano, R. D.; Levine, J. P.; Gurtner, G. C. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 3, p. 836-844, 2006.
- Cheng, C.; Sheng, L.; Li, H.; Mao, X.; Zhu, M.; Gao, B.; Li, Q. Cell-assisted skin grafting: Improving texture and elasticity of skin grafts through autologous cell transplantation. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 137, n. 1, p. 58e-66e, 2016.
- Colman, R. W. Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 21, p. 2599-2607, 2006.

Dalle-Dorne, I.; Rossi, R.; Giustarini, D.; Milzani, A.; Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

Denu, R. A.; Hematti, P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, ID 2989076, 2016.

Doorn, J.; Moll, G.; Le Blanc, K.; Blitterswijk, C.; Boer, J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. **Tissue Engineering: Part B**, v. 18, n. 2, p. 101-115, 2012.

Emanuelli, C.; Minasi, A.; Zacheo, A.; Chao, J.; Chao, L.; Salis, M B.; Straino, S.; Tozzi, M. G.; Smith, R.; Gaspa, L.; Bianchini, G.; Stillo, F.; Capogrossi, M. C.; Madeddu, P. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. **Circulation**, v. 103, n. 1, p. 125-132, 2001.

Feng, C. J.; Lin, C. H.; Tsai, C. H.; Yang, I. C.; Ma, H. Adipose-derived stem cells-induced burn wound healing and regeneration of skin appendages in a novel skin island rat model. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 82, n. 8, p. 635-642, 2019.

Ferreira, M. A.; Barcelos, L. S.; Teixeira, M. M.; Bakhle, Y. S.; Andrade, S. P. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sciences**, v. 81, n. 3, p. 210-217, 2007.

Foroglou, P.; Demiri, E.; Koliakos, G.; Karathanasis, V. Autologous administration of adipose stromal cells improves skin flap survival through neovascularization: An experimental study. **International Wound Journal**, v. 16, n. 6, p. 1471-1476, 2019.

Gao, W.; Qiao, X.; Ma, S.; Cui, L. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap *via* expression of hypoxia-inducible factor-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2575-2585, 2011.

Gao, Y.; Gao, B.; Zhu, H.; Yu, Q.; Xie, F.; Chen, C.; Li, Q. Adipose-derived stem cells embedded in platelet-rich plasma scaffolds improve the texture of skin grafts in a rat full-thickness wound model. **Burns**, in press, 2019.

Harrison, C. A.; MacNeil, S. The mechanism of skin graft contraction: An update on current research and potential future therapies. **Burns**, v. 34, n. 2, p. 153-163, 2008.

Hohmann, M. S. N.; Cardoso, R. D. R.; Pinho-Ribeiro, F. A.; Crespigio, J.; Cunha, T. M.; Alves-Filho, J. C.; da Silva, R. V.; Pinge-Filho, P.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Casagrande, R.; Verri Jr. W. A. 5-Lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen

induced hepatotoxicity and lethality. **Biomed Research International**, v. 2013, article ID 627046, 2013.

Huttunen, M.; Aalto, M. L.; Harvima, R. J.; Horsmanheimo, M.; Harvima, I. T. Alterations in mast cells showing tryptase and chymase activity in epithelializing and chronic wounds. **Experimental Dermatology**, v. 9, n. 4, p. 258-265, 2000.

Jiang, D.; Muschhammer, J.; Qi, Y.; Kügler, A.; de Vries, J. C.; Saffarzadeh, M.; Sindrilaru, A.; Beken, S. V.; Wlaschek, M.; Kluth, M. A.; Ganss, C.; Frank, N. Y.; Frank, M. H.; Preissner, K. T.; Scharffetter-Kochanek, K. Suppression of neutrophil-mediated tissue damage—A novel skill of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 34, n. 9, p. 2393-2406, 2016.

Katada, J.; Muramatsu, M.; Hayashi, I.; Tsutsumi, M.; Konishi, Y.; Majima, M. Significance of vascular endothelial cell growth factor up-regulation mediated via a chymase-angiotensin-dependent pathway during angiogenesis in hamster sponge granulomas. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 949-956, 2002.

Kim, S. W.; Kim, J. H.; Kim, J. T.; Kim, Y. H. A simple and fast dressing for skin grafts: comparison with traditional techniques. **Journal of Wound Care**, v. 27, n. 7, p. 417-420, 2018.

Krausz, A.; Friedman, A. J. Nitric oxide as a surgical adjuvant. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, article ID FSO56, 2015.

Levine, R. L.; Williams, J. A.; Stadtman, E. R.; Shacter, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

Lo Sicco, C.; Reverberi, D.; Balbi, C.; Ulivi, V.; Principi, E.; Pascucci, L.; Becherini, P.; Bosco, M. C.; Varesio, L.; Franzin, C.; Pozzobon, M.; Cancedda, R.; Tasso, R. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: endorsement of macrophage polarization. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 3, p. 1018-1028, 2017.

Matkar, P. N.; Ariyagunaratnam, R.; Leong-Poi, H.; Singh, K. K. Friends turned foes: Angiogenic growth factors beyond angiogenesis. **Biomolecules**, v. 7, n. 4, E74, 2017.

Miranda, K. M.; Espey, M. G.; Wink, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric oxide**, v. 5, n. 1, p. 62-71, 2001.

Muramatsu, M.; Yamada, M.; Takai, S.; Miyazaki, M. Suppression of basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis by a specific chymase inhibitor, BCEAB, through the chymase-angiogenesis-dependent pathway in hamster sponge granulomas. **British Journal of Pharmacology**, v. 137, n. 4, p. 554-560, 2002.

Naldaiz-Gatesi, N.; Goicoechea, M.; Alonso-Martín, S.; Aiastui, A.; López-Mayorga, M.; García-Belda, P.; Lacalle, J.; San José, C.; Araúzo-Bravo, M. J.; Trouilh, L.; Anton-Leberre, V.; Herrero, D.; Matheu, A.; Bernad, A.; García-Verdugo, J. M.; Carvajal, J. J.; Relaix, F.; de Munain, A. L.; García-Parra, P.; Izeta, A. Identification and characterization of the dermal panniculus carnosus muscle stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 7, n. 3, p. 411-424, 2016.

Naldaiz-Gatesi, N.; Bahri, O. A.; Munain, A. L.; McCullagh, K. J. A.; Izeta, A. The *panniculus carnosus* muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 3, p. 275-288, 2018.

Otrock, Z. K. Mahfouz, R. A. R.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood cells, molecules and diseases**, v. 39, n. 2, p. 212-220, 2007.

Pae, H. O.; Lee, Y. C.; Chung, H. T. Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide: emerging therapeutic targets in inflammation and allergy. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 159-165, 2008.

Pazzini, J. M.; Serafim, E. L.; Gärtner, F.; Amorim, I.; Faria, F.; Rêma, A.; Moraes, P. C.; de Nardi, A. B. Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1519-1525, 2017.

Pepper, M. S. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator–Plasmin Systems in Angiogenesis. **Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology**, v. 21, n. 7, p. 1104-1117, 2001.

Rabbani, S. A.; Mazar, A. P. The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. **Cancer Metastasis: Biological and Clinical Aspects**, v. 10, n. 2, p. 393-415, 2001.

Riccio, M.; Marchesini, A.; Zingaretti, N.; Carella, S.; Senesi, L.; Onesti, M. G.; Parodi, P. C.; Ribuffo, D.; Vaianti, L.; de Francesco, F. A multicentre study: the use of micrografts in the reconstruction of full-thickness posttraumatic skin defects of the limbs

- a whole innovative concept in regenerative surgery. **Stem Cells International**, v. 2019, article ID 5043518, 10 pages, 2019.

Richter, G. T.; Bowen III, T.; Boerma, M.; Fan, C. Y.; Hauer-Jensen, M.; Vural, E. Impact of vascular endothelial growth factor on skin graft survival in irradiated rats. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 11, n. 2, p. 110-113, 2009.

Rittié, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103-120, 2016.

Rose, L. F.; Wu, J. C.; Carlsson, A. H.; Tucker, D. I.; Leung, K. P.; Chan, R. K. Recipient wound bed characteristics affect scarring and skin graft contraction. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 2, p. 287-296, 2015.

Sakrak, T.; Köse, A. A.; Kivanç, Ö.; Özer, M C.; Cosan, D. T.; Soyocak, A.; Karabagli, Y.; Çetin, C. The effects of combined application of autogenous fibroblast cell culture and full-thickness skin graft (FTSG) on wound healing and contraction in full-thickness tissue defects. **Burns**, v. 38, n. 2, p. 225-231, 2012.

Semchyshyn, H. M. Reactive carbonyl species in vivo: generation and dual biological effects. **Scientific World Journal**, v. 2014, article ID 417842, 2014.

Stefansson, S.; Petitelerc, E.; Wong, M. K. K.; McMahon, G. A.; Brooks, P. C.; Lawrence, D. A. Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 8135-8141, 2001.

Tsuji, W.; Rubin, J. P.; Marra, K. G. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 312-321, 2014.

Uysal, C. A.; Ogawa, R.; Lu, F.; Hyakusoku, H.; Mizuno, H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 2, p. 237-244, 2010.

Uysal, C. A.; Tobita, M.; Hyakusoku, H.; Mizuno, H. The effect of bone-marrow-derived stem cells and adipose-derived stem cells on wound contraction and epithelization. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 6, p. 405-413, 2014.

Vidor, S. B.; Terraciano, P. B.; Valente, F. S.; Rolim, V. M.; Kuhl, C. P.; Ayres, L. S.; Garcez, T. N. A.; Lemos, N. E.; Kipper, C. E.; Pizzato, S. B.; Driemeier, D.; Cirne-Lima, E. O.; Contesini, E. A. Adipose-derived stem cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 336-344, 2019.

Vijayan, V.; Wagener, F. A. D. T. G.; Immenschuh, S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 153, p. 159-167, 2018.

Yang, T.; Peleli, M.; Zollbrecht, C.; Giulietti, A.; Terrando, N.; Lundberg, J. O.; Weitzberg, E.; Carlström, M. Inorganic nitrite attenuates NADPH oxidase-derived superoxide generation in activated macrophages via a nitric oxide-dependent mechanism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 83, p. 159-166, 2015.

Wang, J.; Hao, H.; Huang, H.; Chen, D.; Han, Y.; Han, W. The effect of adipose-derived stem cells on full-thickness skin grafts. **BioMed Research International**, v. 2016, article ID 1464725, 2016.

Wu, Y.; Chen, L.; Scott, P. G.; Tredget, E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.

FIGURES

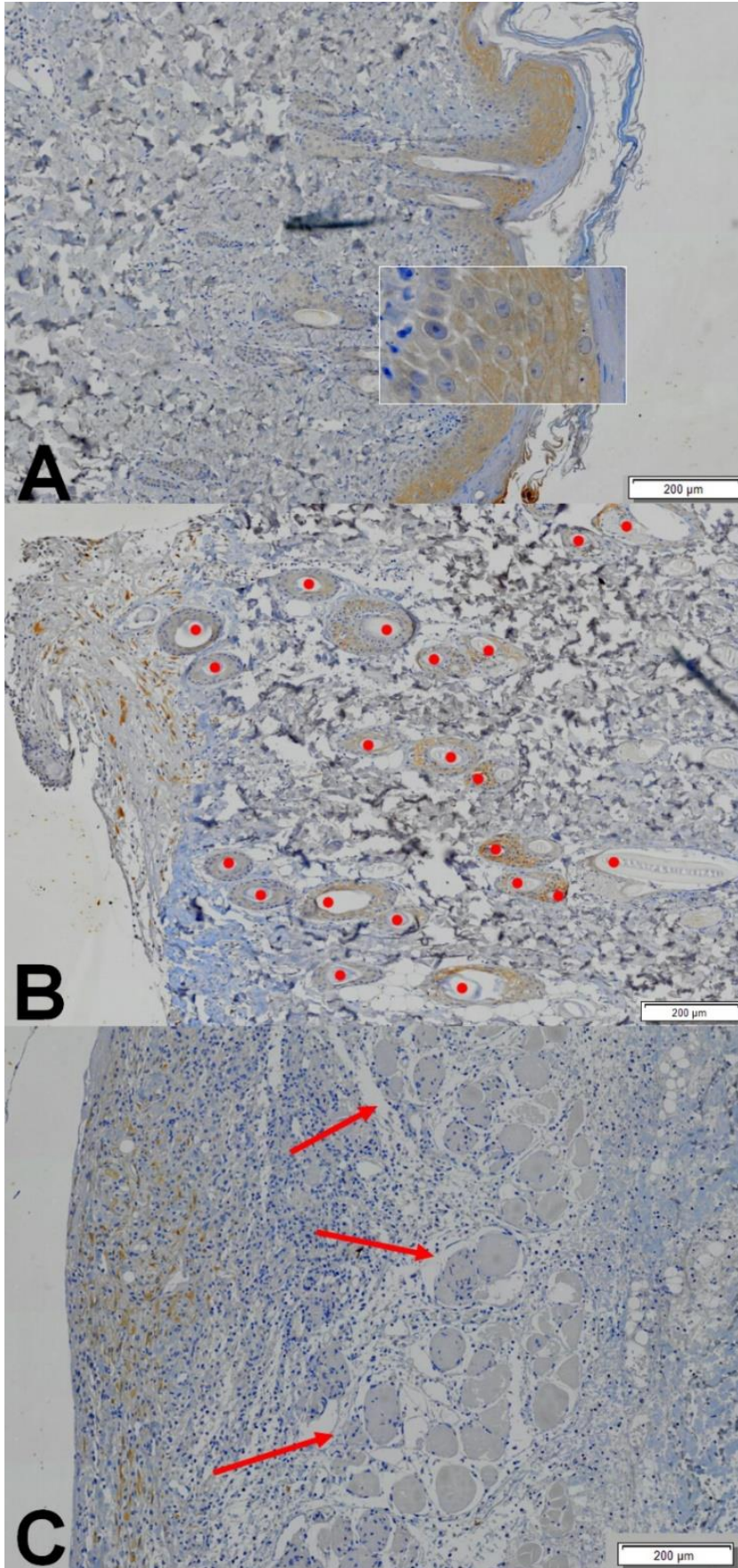


Figure 1. Immunostaining of FTSG reveals labeled ADSCs presence and location on days 3 and 5. (A) Epidermis and dermis presenting intense presence of ADSCs at 5d. **(B)** Dermis and hypodermis presenting high ADSC density at 3d. **(C)** Interstitial connective tissue revealing presence of ADSCs on deep skin graft layers at 3d. Red arrow indicates *Panniculus carnosus* in development. *Red dots indicate hair follicles and sebaceous glands, surrounded by ADSC.

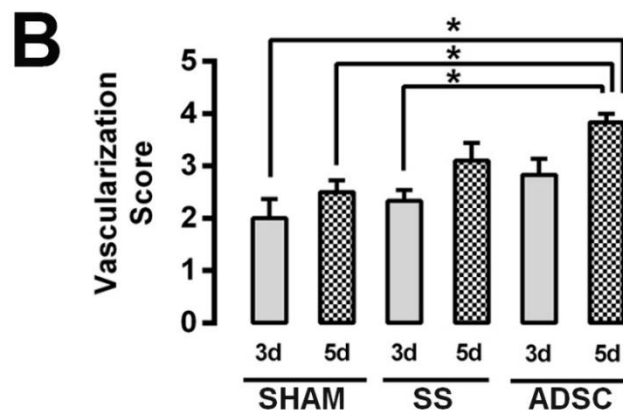
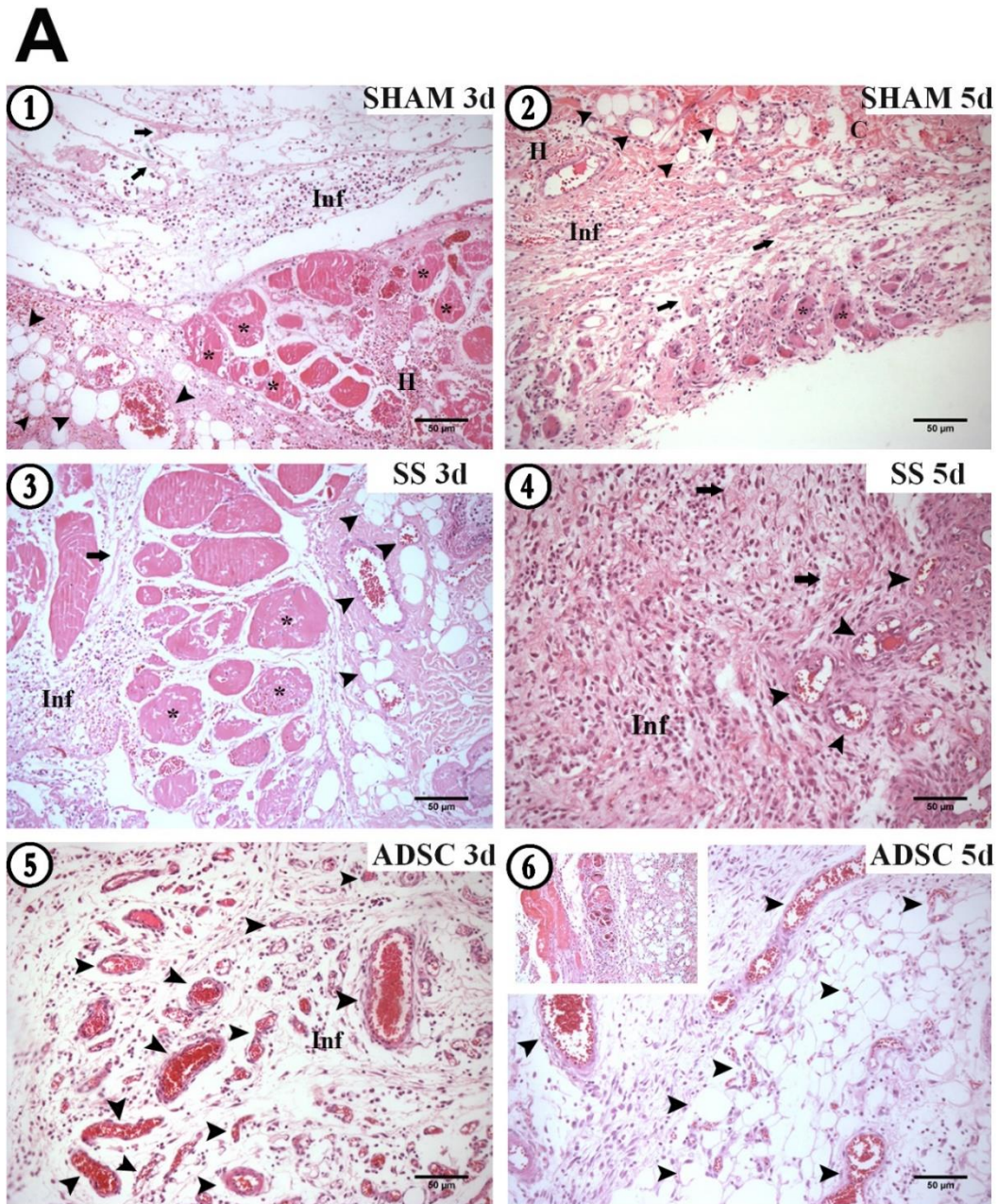


Figure 2. ADSC treated group revealed increased neovascularization on histopathological assessment. Skin grafts of rats treated with SS ADSC or those which were sham-operated was collected after 3 and 5 days (d) of transplantation. Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to assess neovascularization, inflammatory infiltrate, muscle and collagen fibers necrosis and epidermis and dermis necrosis. quantified with a scale from 0 to 4. Fibrin and hemorrhage were classified due to its presence or absence. **(A)** A1 and A2 represents SHAM group at 3d and 5d, respectively, indicating muscular fiber degeneration (*), hemorrhage (H), fibrin (arrows), mixed inflammatory infiltrate (Inf) and blood vessels (arrowheads). A3-A4 represent SS group at 3d and 5d, respectively, showing muscular fiber degeneration (*), fibrin (arrows), mixed inflammatory infiltrate (Inf) and blood vessels (arrowheads). A5-A6 represents ADSC group at 3d and 5d, respectively, presenting low mixed inflammatory infiltrate (Inf) and intense presence of blood vessels (arrowheads). A6 inset show muscular fiber regeneration at 5d. **(B)** Angiogenesis quantification represented by mean \pm SE. * $p < 0.05$ vs. SHAM (3 and 5d) and SS (3d).

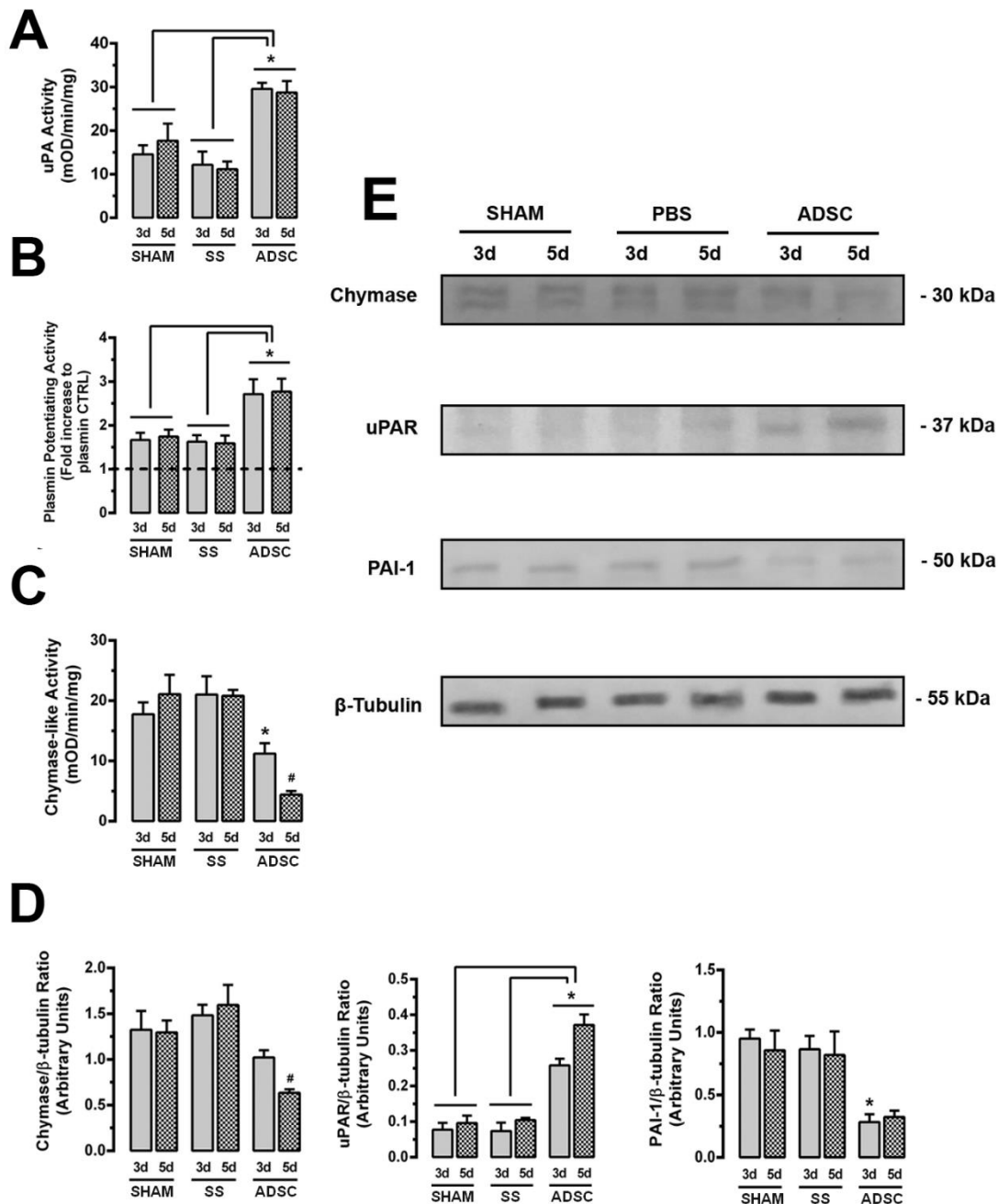


Figure 3. ADSC treatment up-regulates plasminogen-plasmin system promoting proangiogenic GF release and increased angiogenesis on skin grafts. Skin grafts of rats treated with SS, ADSC or those which were sham-operated was collected after 3 and 5 days (d) of transplantation. The following serine-proteinases of plasminogen-plasmin system was determined in skin graft homogenates: (A) Urokinase-type plasminogen activator activity (uPA), (B) Plasmin potentiating activity (PPA) and (C) chymase activity. (D) Quantitative data from immunoblots are presented as the relative density of chymase, uPAR and PAI-1 compared with that of β -tubulin. (E) Representative images

of immunoblots for rat mast cell chymase, urokinase-type plasminogen activator (uPAR), plasminogen activator inhibitor – 1 (PAI-1) and β -tubulin. Each bar depicts the means \pm standard error from n = 6 animals per group. *p < 0.05 vs SS (3d) or SHAM (3d) group, #p < 0.05 vs SS (5d) or SHAM (5d) group, §p < 0.05 vs ADSC (3d) or SHAM (3d).

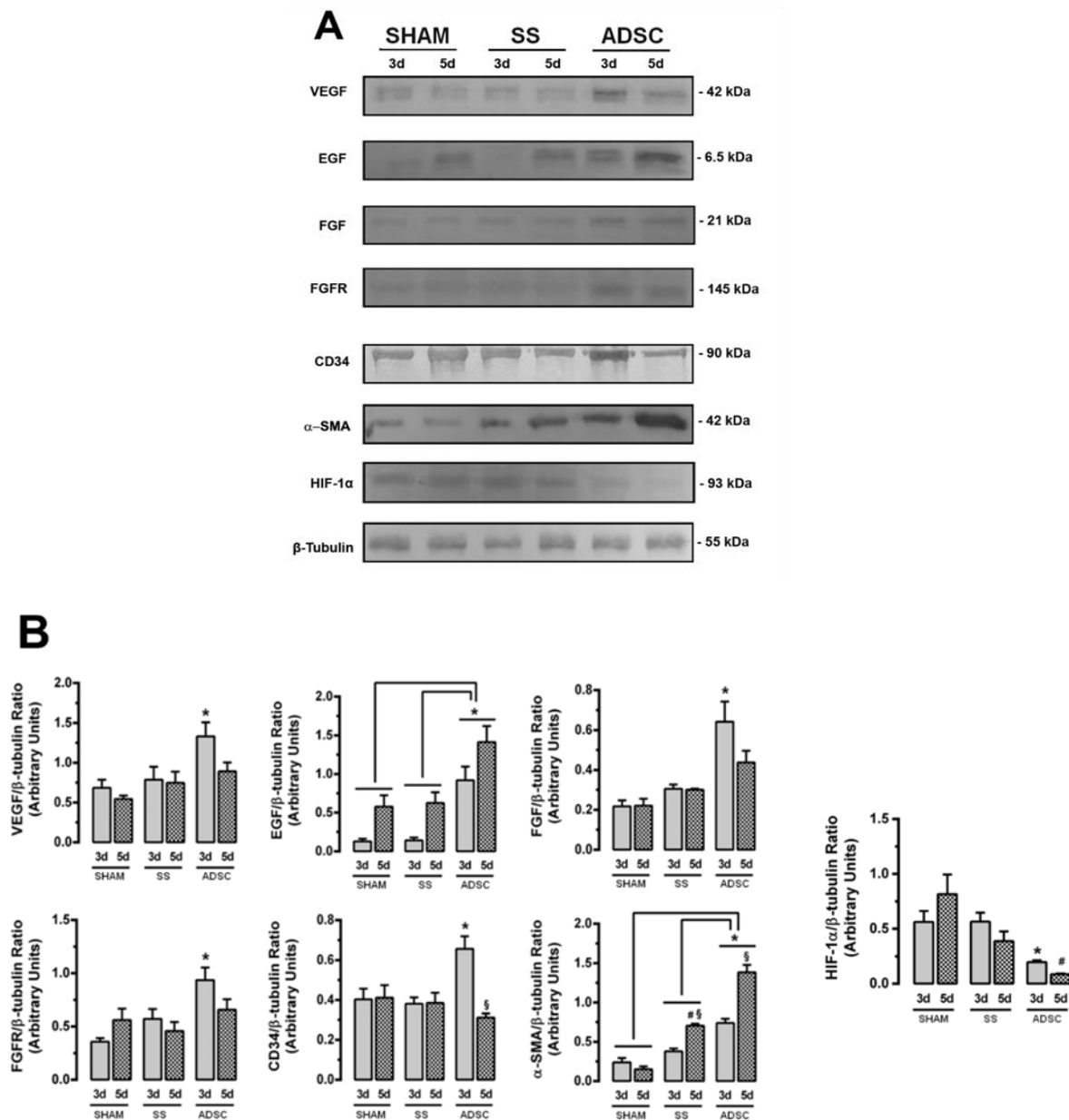


Figure 4. ADSC treatment improves angiogenesis in skin grafts after transplantation. Skin grafts of rats treated with SS, ADSC or those which were sham-operated were collected after 3 and 5 days (d) of transplantation and evaluated for protein expression of several growth factors and angiogenesis-related molecules. **(A)** Representative images of immunoblots for vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), fibroblast growth factor receptor (FGFR), CD34, α -smooth muscle actin (α -SMA), hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and β -tubulin. **(B)** Quantitative data from immunoblots are presented as the relative density of VEGF, EGF, FGF, FGFR, CD34, α -SMA and HIF-1 α compared with that of β -tubulin. Each bar depicts the means \pm standard error from $n = 6$ animals per

group. * $p < 0.05$ vs SS (3d) or SHAM (3d) group, # $p < 0.05$ vs SS (5d) or SHAM (5d) group, § $p < 0.05$ vs ADSC (3d) or SS (3d).

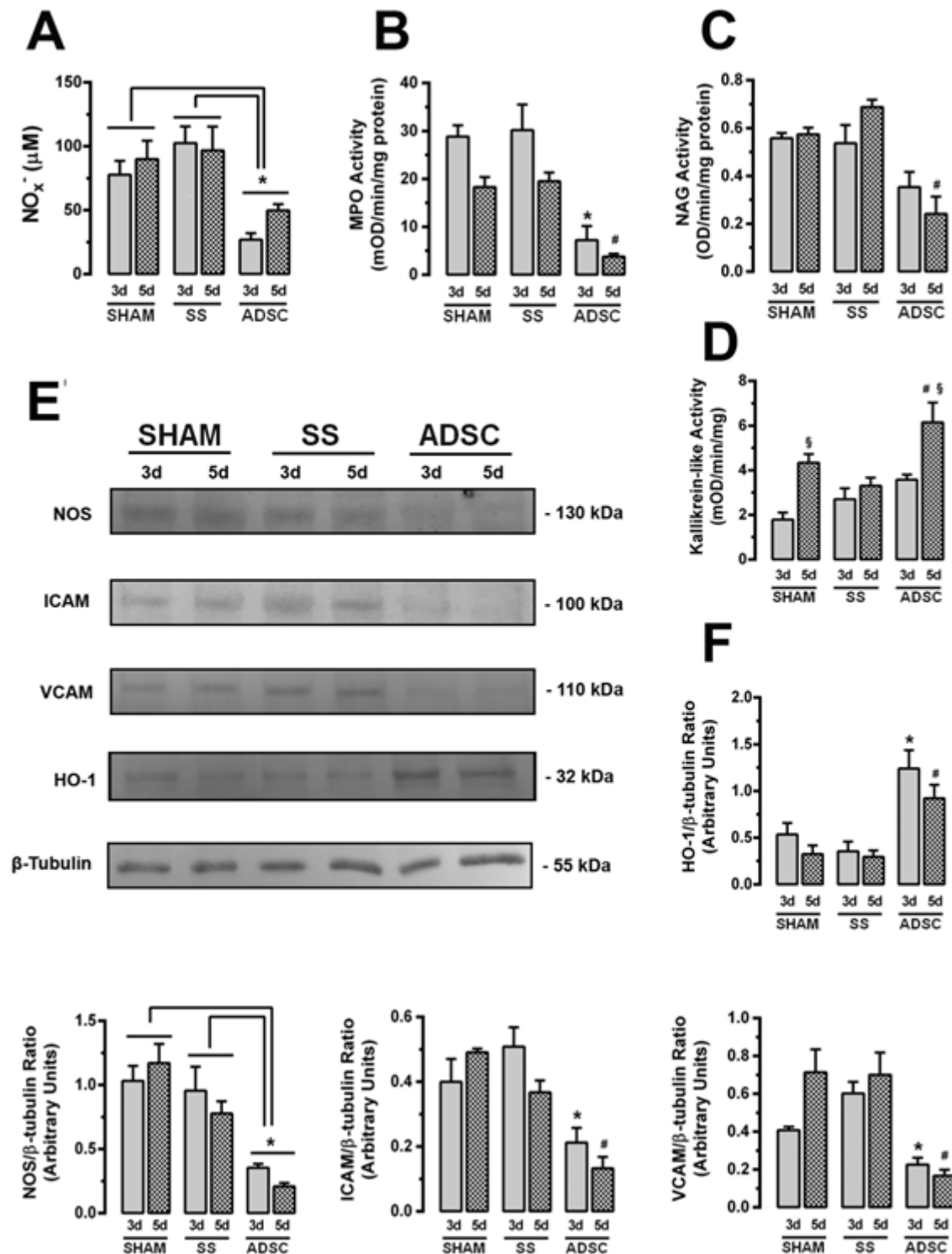


Figure 5. ADSC treatment attenuates inflammatory response in skin grafts. Skin grafts of rats treated with SS, ADSC or those which were sham-operated was collected after 3 and 5 days (d) of transplantation. Then, several molecular markers involved in

inflammatory response were determined. **(A)** Nitrate/nitrite levels (NOx) as an index of nitric oxide generation. **(B)** Levels of MPO (myeloperoxidase) activity, an index of neutrophil accumulation. **(C)** Levels of NAG (N-acetylglucosaminidase) activity, an index of macrophage accumulation. **(D)** Tissue kallikrein activity, an index of tissue inflammation and endothelial cell proliferation. **(E)** Representative images of immunoblots for inducible nitric oxide synthase (iNOS), intracellular adhesion molecule – 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule – 1 (VCAM-1), heme-oxygenase-1 (HO-1) and β -tubulin. **(F)** Quantitative data from immunoblots are presented as the relative density of HO-1, NOS, ICAM and VCAM compared with that of β -tubulin. Each bar depicts the means \pm standard error from $n = 6$ animals per group. * $p < 0.05$ vs SS (3d) or SHAM (3d) group, # $p < 0.05$ vs SS (5d) or SHAM (5d) group.

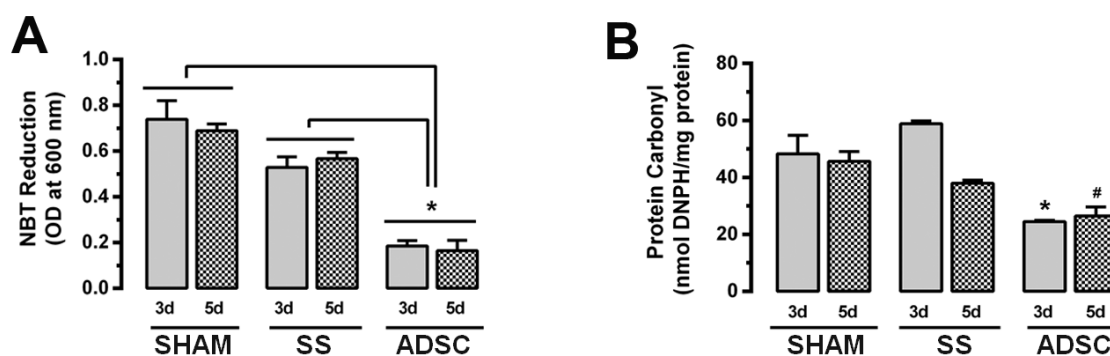


Figure 6. Adipose-derived stem cell (ADSC)- treatment prevented the early onset of oxidative damage in skin grafts. Skin grafts of rats treated with SS, ADSC or those which were sham-operated was collected after 3 and 5 days (d) of transplantation. Then, several markers of oxidative stress were determined. **(A)** Superoxide anion production (estimated through NBT reduction assay). **(B)** Total protein carbonyl levels (as an index of protein oxidative damage). Each bar depicts the means \pm standard error from $n = 6$ animals per group. * $p < 0.05$ vs SS (3d) or SHAM (3d) group, # $p < 0.05$ vs SS (5d) or SHAM (5d) group.

5 CONCLUSÕES

Com a análise dos dados obtidos a partir desse trabalho, foi possível concluir que:

1. A localização de ADSCs marcadas nos dois dias de avaliação demonstra que, após a liberação e regulação de fatores de crescimento, imunomodulação e mobilização

até o tecido lesado, as células demonstram uma maior preferência por tecidos em constante regeneração como folículos pilosos e epiderme

2. A utilização de ADSCs na fase inicial de cicatrização de enxertos cutâneos de espessura completa promove a neovascularização precoce, com dados obtidos a partir da análise molecular quanto ao aumento de expressão de VEGF, bFGF, FGFR, EGF, CD34, α -SMA e redução do fator de hipóxia HIF-1 α
3. Animais tratados com ADSC demonstraram menor taxa de contração dos enxertos cutâneos, fator capaz de reduzir a morbidade e necessidade de reintervenção cirúrgica de pacientes após a enxertia
4. A utilização de ADSCs não diminuiu significativamente as taxas de necrose, sangramento ou exsudato no grupo tratado quando comparado aos demais
5. Apesar de não demonstrar diferença significativa na avaliação histopatológica, através da análise molecular foi possível perceber redução da infiltração inflamatória no grupo tratado com ADSCs
6. Animais tratados com ADSCs demonstraram menor expressão de óxido nítrico, com dados obtidos a partir da atividade de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e seus metabólitos finais, nitrito e nitrato (NOx)
7. O grupo ADSC apresentou maior expressão dos componentes do sistema plasmina-plasminogênio, envolvido na liberação e regulação de fatores de crescimento pró-angiogênicos e redução na expressão de seu principal inibidor, PAI-1
8. Animais tratados com ADSCs demonstraram menor presença de marcadores relacionados ao stress e consequente dano oxidativo que os demais grupos.

Dessa forma, conclui-se que a aplicação de ADSCs em enxertos cutâneos de espessura completa demonstra revascularização precoce, se comparada aos demais grupos, possibilitando assim a redução das taxas de necrose e possibilitando uma melhor e mais rápida adesão do tecido enxertado ao seu leito receptor. A redução na inflamação e estresse oxidativo podem auxiliar no processo, promovendo uma menor fase inflamatória e progredindo às fases de revascularização do enxerto cutâneo.

Novos estudos são indicados, visando avaliar o aspecto final do enxerto e sua contração em períodos mais longos, compreendendo as demais fases de cicatrização.

6 REFERÊNCIAS

- ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clinics in Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 332-337, 2005.
- BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; McINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMANN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft *in vivo*. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.
- BILGEN, F.; URAL, A.; KURUTAS, E. B.; BEKERECIOGLU, M. The effect of oxidative stress and Raftlin levels on wound healing. **International Wound Journal**, v. 16, n. 5, p. 1178-1184, 2019.
- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. **Science**, v. 344, n. 6189, p. 1242281, 2014.
- BULLER, M.; LEE, T. J.; DAVIS, J.; WILHELMI, B. J. Bolstering skin grafts with a surgical scrub brush: a cost-effective solution. **Eplasty**, v. 17, e21, 2017.
- CAPLA, J. M.; CERADINI, D. J.; TEPPER, O. M.; CALLAGHAN, M. J.; BHATT, K. A.; GALIANO, R. D.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 3, p. 836-844, 2006.
- CLAY, L.; STARK, B.; GUNNARSSON, U.; STRIGÅRD, K. Full-thickness skin graft vs. synthetic mesh in the repair of giant incisional hernia: a randomized controlled multicenter study. **Hernia**, v. 22, n. 2, p. 325-332, 2018.
- DARRACH, H.; KOKOSIS, G.; BRIDGHAM, K.; STONE, J. P.; LANGE, J. R.; SACKS, J. M. Comparison of keystone flaps and skin grafts for oncologic reconstruction: A retrospective review. **Journal of Surgical Oncology**, v. 119, n. 7, p. 843-849, 2019.
- DE BEM, D. M.; MACIEL, C. D.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Histological analysis of healthy epithelium of Wistar rats *in vivo* irradiated with different intensities of therapeutic ultrasound. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 2, p. 114-120, 2010.
- DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, v. 174, n. 3, p. 101-109, 2003.

- DENU, R. A.; HEMATTI, P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, ID 2989076, 2016.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- ERWIN; ETRIWATI; GUNANTI; HANDHARYANI, E.; NOVIANA, D. Changes in histopathology and cytokeratin AE1/AE3 expression in skin graft with different time on Indonesian local cats. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 662-666, 2017.
- FENG, N.; JIA, Y.; HUANG, X. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate neural injury caused by microglia activation via suppressing NF-kB and MAPK pathway. **Journal of Neuroimmunology**, v. 334, ID 576996, 2019.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012.
- GAO, Y.; GAO, B.; ZHU, H.; YU, Q.; XIE, F.; CHEN, C.; LI, Q. Adipose-derived stem cells embedded in platelet-rich plasma scaffolds improve the texture of skin grafts in a rat full-thickness wound model. **Burns**, in press, 2019.
- GREAVES, N. S.; IQBAL, S. A.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. The role of skin substitutes in the management of chronic cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 2, p. 194-210, 2013.
- GUOGIENÉ, I.; KIEVISAS, M.; GRIGAITÉ, A.; BRAZIULIS, K.; RIMDEIKA, R. Split-thickness skin grafting: early outcomes of a clinical trial using different graft thickness. **Journal of Wound Care**, v. 27, n. 1, p. 5-13, 2018.
- HARPER, D.; YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 32, n. 9, p. 445-450, 2014.
- HARRISON, C. A.; MacNEIL, S. The mechanism of skin graft contraction: An update on current research and potential future therapies. **Burns**, v. 34, n. 2, p. 153-163, 2008.
- ISENBERG, J. S.; RIDNOUR, L. A.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A.; ROBERTS, D. A. Nitric oxide in wound healing. **Microsurgery**, v. 25, n. 5, p. 442-451, 2005.
- JALLER, J. A.; HERSKOVITZ, I.; BORDA, L. J.; MERVIS, J.; DARWIN, E.; HIRT, P. A.; LEV-TOV, H.; KIRSNER, R. S. Evaluation of donor site pain after fractional autologous full-thickness skin grafting. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 9, p. 309-314, 2018.

- JIANG, D.; QI, Y.; WALKER, N. G.; SINDRILARU, A.; HAINZL, A.; WLASCHEK, M.; MacNEIL, S.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 10, p. 2501-2515, 2013.
- KABASHIMA, K.; HONDA, T.; GINHOUX, F.; EGAWA, G. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews: Immunology**, v. 19, n. 1, p. 19-30, 2018.
- KAMRAN, A.; JAVAD, F. M.; SAHRAM, F.; JABER, M. S. A comparison of survival and secondary contraction in expanded versus conventional full-thickness skin grafts: an experimental study in rats. **Eplasty**, v. 12, e20, p. 188-193, 2012.
- KANJI, S.; DAS, H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, ID 5217967, 2017.
- KERN, B.; SUCHER, R. Ischemia and reperfusion injury in reconstructive transplantation. **Anaplastology**, v. 2, n. 2, ID 1000108, 2013.
- KIM, C. H.; LEE, J. H.; WON, J. H.; CHO, M. K. Mesenchymal stem cells improve wound healing *in vivo* via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 6, p. 726-733, 2011.
- KIM, P. J.; APPLEWHITE, A.; DARDANO, A. N.; FERNANDEZ, L.; HALL, K.; McELROY, E.; MENDEZ-EASTMAN, S.; OBST, M. A.; THOMAS, C.; WADDELL, L.; WIRTH, G.; TÉOT, L. Use of a novel foam dressing with negative pressure wound therapy and instillation: recommendations and clinical experience. **Wounds**, v. 30, n. 3, p. S1-S17, 2018.
- KING, A.; BALAJI, S.; KESWANI, S. G.; CROMBLEHOLME, T. M. The role of stem cells in wound angiogenesis. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 614-625, 2014.
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. In: MUEHLBAUER, P.; McGOWAN, C. **Site-Specific Cancer Series: Skin Cancer**. 3 ed. Pittsburgh: Oncology Nursing Society, 2009. cap. 1.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1-3, p. 93-98, 2010.
- KRAUSZ, A.; FRIEDMAN, A. J. Nitric oxide as a surgical adjuvant. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, FSO56, 2015.
- MACFARLANE, D. F. Current techniques in skin grafting. **Advances in Dermatology**, v. 22, p. 125-138, 2006.

- McCARTHY, M. E.; BROWN, T. A.; BUKOWSKA, J.; BUNNELL, B. A.; FRAZIER, T.; WU, X.; GIMBLE, J. M. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. **Current Stem Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 127-137, 2018.
- MIKESH, L. M.; ARAMADHAKA, L. R.; MOSKALUK, C.; ZIGRINO, P.; MAUCH, C.; FOX, J. W. Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 190-200, 2013.
- MINUTTI, C. M.; KNIPPER, J. A.; ALLEN, J. E.; ZAISS, D. M. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 61, p. 3-11, 2017.
- NALDAIZ-GATESI, N.; BAHRI, O. A.; MUNAIN, A. L.; McCULLAGH, K. J. A.; IZETA, A. The *panniculus carnosus* muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 3, p. 275-288, 2018.
- PAVLETIC, M. M. The skin. In: _____. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. 4 ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2018. cap. 1.
- PAZZINI, J. M.; SERAFIM, E. L.; GÄRTNER, F.; AMORIM, I.; FARIA, F.; RÊMA, A.; MORAES, P. C.; de NARDI, A. B. Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1519-1525, 2017.
- PLOCK, J. A.; SCHNIDER, J. T.; ZHANG, W.; SCHWEIZER, R.; TSUJI, W.; KOSTEREVA, N.; FANZIO, P. M.; RAVURI, S.; SOLARI, M. G.; CHENG, H. Y.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G.; GORANTLA, V. S. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells prolong graft survival in vascularized composite allotransplantation. **Transplantation**, v. 99, n. 9, p. 1765-1773, 2015.
- PLOCK, J. A.; SCHNIDER, J. T.; SCHWEIZER, R.; ZHANG, W.; TSUJI, W.; WALDNER, M.; SOLARI, M. G.; MARRA, K. G.; RUBIN, J. P.; GORANTLA, V. S. The influence of timing and frequency of adipose-derived mesenchymal stem cell therapy on immunomodulation outcomes after vascularized composite allotransplantation. **Transplantation**, v. 101, n. 1, p. e1-11, 2017.
- PORTOU, M. J.; BAKER, D.; ABRAHAM, D.; TSUI, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 31-36, 2015.

- RICCIO, M.; MARCHESINI, A.; ZINGARETTI, N.; CARELLA, S.; SENESI, L.; ONESTI, M. G.; PARODI, P. C.; RIBUFFO, D.; VAIENTI, L.; de FRANCESCO, F. A multicentre study: the use of micrografts in the reconstruction of full-thickness posttraumatic skin defects of the limbs - a whole innovative concept in regenerative surgery. **Stem Cells International**, v. 2019, article ID 5043518, 10 pages, 2019.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103-120, 2016.
- ROTH, D.; PIEKAREK, M.; PAULSSON, M.; CHRIST, H.; BLOCH, W.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M.; EMING, S. A. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p. 670-684, 2006.
- SERRA, R.; RIZZUTO, A.; ROSSI, A.; PERRI, P.; BARBETTA, A.; ABDALLA, K.; CAROLEO, S.; LONGO, C.; AMANTEA, B.; SAMMARCO, G.; de FRANCISCIS, S. Skin grafting for the treatment of chronic leg ulcers – a systematic review in evidence-based medicine. **International Wound Journal**, v. 14, n. 1, p. 149-157, 2017.
- SOM, P. M.; LAITMAN, J. T.; MAK, K. Embryology and anatomy of the skin, its appendages, and physiologic changes in the head and neck. **Neurographics**, v. 7, n. 5, p. 390-415, 2017.
- STANLEY, B. J.; PITT, K. A.; WEDER, C. D.; FRITZ, M. C.; HAUPTMAN, J. G.; STEFICEK, B. A. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 5, p. 511-522, 2013.
- SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 941-945, 2014.
- SUNDBERG, J. P.; BOOTH, C. J.; NANNEY, L. B.; FLECKMAN, P.; KING JR, L. E. Skin and adnexa. In: TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M.; MONTINE, K. S. **Comparative Anatomy and Histology**. 2 ed. Elsevier: Academic Press, 2018. cap. 24.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.
- TOMBA, P.; VIGANÒ, A.; RUGGIERI, P.; GASBARRINI, A. Gaspare Tagliacozzi, pioneer of plastic surgery and the spread of his technique throughout Europe in “*De Curtorum Chirurgia per Insitionem*”. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 445-450, 2014.

- TSUJI, W. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 312-321, 2014.
- TUNCALI, D.; YAVUZ, N.; CIGSAR, B.; GOKREM, S.; ASLAN, G. Effect of full-thickness skin graft initial dimension on secondary wound contraction: experimental study in rats. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 5, p. 542-545, 2005.
- UYSAL, C. A.; OGAWA, R.; LU, F.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 2, p. 237-244, 2010.
- VIDOR, S. B.; TERRACIANO, P. B.; VALENTE, F. S.; ROLIM, V. M.; KUHL, C. P.; AYRES, L. S.; GARCEZ, T. N. A.; LEMOS, N. E.; KIPPER, C. E.; PIZZATO, S. B.; DRIEMEIER, D.; CIRNE-LIMA, E. O.; CONTESINI, E. A. Adipose-derived stem cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 336-344, 2018.
- YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.
- WANG, J.; HAO, H.; HUANG, H.; CHEN, D.; HAN, Y.; HAN, W. The effect of adipose-derived stem cells on full-thickness skin grafts. **BioMed Research International**, v. 2016, ID 1464725, 2016.
- WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J. C.; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92-98, 2016.
- ZHU, Y.; WANG, Y.; JIA, Y.; XU, J.; CHAI, Y. Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, n. 4, p. 324-334, 2019.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

APÊNDICE A – Ficha de avaliação macroscópica utilizada aos 3 e 5 dias nos animais pertencentes aos grupos SS, SHAM e ADSC.

FICHA DE AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Animal: _____

Data: ____/____/2019

Grupo

() SS 3d

() SS 5d

() SHAM 3d

() SHAM 5d

() ADSC 3d

() ADSC 5d

Planimetria

Demarcação em transparência (OK)

Extensão da ferida C-C: _____

L-L: _____

Avaliação macro

Sangramento () Ausente () + () ++ () +++

Exsudato () Ausente () Presente

Tipo: _____

Grau () Pouco (+) () Moderado (++) () Acentuado (+++)

Localização () Margens () Generalizado

Necrose () Ausente () + () ++ () +++

* Observações:

APÊNDICE B – Ficha de avaliação durante análise imunohistoquímica de ADSCs GFP+ dos enxertos provenientes de animais pertencentes ao grupo ADSC aos 3 e 5 dias.

FICHA DE AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Lâmina: _____

Grupo

ADSC 3d

ADSC 5d

Possível localizar ADSCs?

Sim

Não

Distribuição

Epiderme

Derme

Hipoderme

Formato

Fibroblastoide

Arredondado

Presente nos folículos pilosos?

Sim

Não

* Observações:

APÊNDICE C – Ficha de avaliação utilizada na análise histopatológica de enxertos cutâneos provenientes dos três grupos de avaliação, ADSC, SS e SHAM, aos 3 e 5 dias.

FICHA DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLOGIA

Lâmina: _____

Neovascularização

() 0 (Ausente) () 1 (Ocasional) () 2 (Discreta)
() 3 (Moderada) () 4 (Intensa)

Infiltrado inflamatório

() Presente () Ausente

Tipo de infiltrado: _____

Deposição de fibrina

() Presente () Ausente

Hemorragia

() Presente () Ausente

Necrose de fibras musculares

() Presente () Ausente

Necrose de fibras colágenas

() Presente () Ausente

Necrose de epiderme

() Presente () Ausente

Necrose de derme

() Presente () Ausente

ANEXO 1



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2018/0590

Título: IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ADIPODERIVADAS NA ANGIOGÊNESE DURANTE A FASE INFLAMATÓRIA DE CICATRIZAÇÃO EM ENXERTOS CUTÂNEOS DE ESPESSURA COMPLETA

Pesquisador Responsável: FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Equipe de Pesquisa:

MARKUS BERGER OLIVEIRA	ISABEL CIRNE LIMA DE OLIVEIRA DURLI	LUCIANA GONÇALVES TEIXEIRA
EMANUELLE BORTOLOTTI	MATHEUS PIPPI	NATHALIA FRANCO
EMERSON ANTONIO CONTESINI	PAULA BARROS TERRACIANO	ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

Data de Aprovação:

Data de Término: 13/03/2020

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade
RATO ISOGÊNICO	M/8 Semana(s)	39

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ADITON PROLLA
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação:
10/01/2019 08:27:34