

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**

**Uso de células-tronco derivadas de tecido adiposo para redução de complicações da cicatrização cutânea em indivíduos tabagistas: Um modelo experimental em ratos**

Aluno: João Maximiliano Pedron Martins

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares

**Dissertação de Mestrado**

**Porto Alegre, 2019**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas**

**Uso de células-tronco derivadas de tecido adiposo para redução de complicações da cicatrização cutânea em indivíduos tabagistas: Um modelo experimental em ratos**

Aluno: João Maximiliano Pedron Martins

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Dissertação de Mestrado**

**Porto Alegre, 2019**

## RESUMO

**Objetivo:** Testar o uso das células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDA) para redução da área de necrose em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos, com injeção de nicotina subcutânea para simular um indivíduo tabagista.

**Métodos:** Em um estudo experimental, 30 ratos foram operados utilizando um modelo de retalho cutâneo isquêmico no dorso, à partir da injeção de nicotina subcutânea. Outros 10 ratos foram utilizados apenas para obtenção das CTDA. O primeiro grupo, de tratamento (n=15), recebeu injeção com CTDA ao final da cirurgia; o outro grupo, controle (n=15), não recebeu intervenções adicionais. Após a eutanásia, foi realizado um decalque de toda a área do retalho do dorso de ambos os grupos, definindo com exatidão a transição da necrose com a região saudável. Fotos de todos os animais foram tiradas e avaliadas por escalas padronizadas pelo programa Paint-Autocad-2015 para definir a área de necrose de retalho em cada rato. O teste T de Student foi usado para comparar os grupos, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Resultados calculado no SPSS IBM® versão 18.

**Resultados:** Por meio da análise das imagens pelo programa Paint-Autocad-2015 e área de decalque obtido pela folha transparente, obteve-se uma média de 46% de necrose da área total do retalho no grupo tratamento e 69,4% no grupo controle. Na análise descritiva, foi evidenciado no grupo tratamento uma média de 3,7cm de necrose IC 95% (3,2 - 4,2) e no grupo controle uma média de 5,56 cm IC 95% (5,2 – 5,9) com  $p < 0,001$ .

**Conclusões:** Concluímos que a aplicação das CTDA em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos com injeção de nicotina

subcutânea reduz o percentual de necrose nos mesmos.

**Palavras-chave:** Células-tronco, células-tronco derivadas de tecido adiposo, retalho cutâneo, retalho cutâneo isquêmico, tabagismo.

## ABSTRACT

**Objectives:** To test the use of adipose-derived stem cells (ADSC) in reducing the necrosis area in an experimental model of cutaneous ischemic flap in rats submitted to subcutaneous nicotine injection to simulate a smoker patient.

**Methods:** In an experimental study, 30 rats were enrolled. Divided into two experimental groups of 15 animals all submitted to a subcutaneous nicotine injection to create an ischemic cutaneous flap on their backs. Other 10 animals were used only to obtain adipose tissue derived stem cells (ADSC). The first group (n = 15) received ADSC treatment at the end of surgery while the other group, the control (n = 15), received no other interventions. After euthanasia, a decal was performed on the whole area of the flap, accurately defining the transition from necrosis to healthy region. Photos of all animals were collected and evaluated by scales standardized by PaintAutocad- 2015 software to define the area of flap necrosis in each rat. Student T test were performed to compare the groups, considering a  $p < 0.05$  significant. Data were analyzed using SPSS IBM® 18 version.

**Results:** Through the analysis of the images by the program Paint-Autocad-2015 and the area of decal obtained by the transparent sheet, we obtained a mean of 46% necrosis of the total area of the flap in the treatment group and 69.4% in the control group. In the descriptive analysis, a mean of 3.7 cm of necrosis CI95% (3.2 - 4.2) was evident in the treatment group whereas a mean value of 5.56 CI 95% (5.2 - 5.9) was found in control group, with p value  $< 0.001$  for this comparison.

**Conclusions:** We concluded that the application of ADSC reduces the percentage of necrosis in an experimental model of randomized cutaneous flap in rats submitted to subcutaneous nicotine injection.

**Key words:** Stem cells, stem cells derived from adipose tissue, skin flap, ischemic skin flap, smoking.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo em Português

Figura 1 (Molde do Retalho Cutâneo demarcado (8x2cm)).....	43
Figura 2 (Rato posicionado para o procedimento cirúrgico).....	43
Figura 3 (Barreira plástica adequadamente posicionada no momento da eutanásia. Rato à esquerda grupo tratamento, rato à direita grupo controle).....	44
Figura 4 (Rato do grupo controle no momento da eutanásia).....	45
Figura 5 (Rato do grupo tratamento no momento da eutanásia). .....	46
Figura 6. (Média e desvio-padrão em cm no grupo 1 (tratamento) e 2 (controle)).....	49

### Article in English

Figure 1 (Detached Cutaneous Retail Template (8x2cm)).....	67
Figure 2 (Mouse positioned for the surgical procedure) .....	67
Figure 3 (Plastic barrier properly positioned at the time of euthanasia. Rat left group treatment, right mouse control group.) .....	68
Figure 4 (Mouse of the control group at the time of euthanasia) .....	69
Figure 5 (Rat of the treatment group at the time of euthanasia). .....	69
Figure 6. (Mean and standard deviation in cm in group 1 (treatment) and 2 (control)).....	49

## LISTA DE TABELAS

### Artigo em Português

Tabela 1 .....	47
Tabela 2 .....	48
Tabela 3 .....	48

### Article in English

Table 1 .....	71
Table 2 .....	71
Table 3 .....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS

**CTDA** – Células-tronco derivadas de tecido adiposo

**ADSC**- Adipose derived stem cells

**PDGF** – Platelet-derived growth factor (Fator de crescimento derivado de plaquetas)

**TGF- $\alpha$**  – Transforming growth factor alfa (Fator de transformação de crescimento alfa)

**TGF- $\beta$**  – Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)

**cm** – Centímetro

**TNF- $\alpha$**  – Tumor necrosis factor alfa (Fator de necrose tumoral-alfa)

**FGF**– Fibroblast growth factor (Fator de crescimento fibroblástico)

**HIF-1** – Hypoxia-inducible factor 1 (Fator de indução de hipóxia)

**CTM** - Células-tronco mesenquimais

**CTH** - Células-tronco hematopoiéticas

**CTM-MO** – Células-tronco mesenquimais de medula óssea

**HGF** - Hepatocyte growth factor (Fator de crescimento de hepatócito)

**$\mu$** - Média

**IC 95%**- Intervalo de confiança de 95%

**CI 95%**- Confidence interval of 95%

**CONCEA**- Conselho nacional de controle de experimentação animal

**(PDE-5)**- Fosfodiesterase-5

## SUMÁRIO

RESUMO .....	3
ABSTRACT.....	5
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
AGRADECIMENTOS .....	11
INTRODUÇÃO .....	12
REVISÃO DA LITERATURA .....	14
1. FISIOLOGIA DA CICATRIZAÇÃO DA PELE.....	14
2. COMPLICAÇÕES NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM TABAGISTAS.....	16
3. MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO EM RATOS COM INJEÇÃO DE NICOTINA SUBCUTÂNEA.....	18
4. CÉLULAS-TRONCO .....	20
5. APLICAÇÕES DE TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA .....	23
REFERÊNCIAS.....	26
JUSTIFICATIVA.....	32
HIPÓTESE .....	33
OBJETIVO .....	34
ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS .....	35
ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS .....	60
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	85

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Serviço de Cirurgia Plástica do HCPA e seus membros** que me proporcionaram uma formação diferenciada tanto do ponto de vista pessoal como profissional.

Agradeço em especial ao **Prof. Dr. Marcus Vinicius Martins Collares**, por sempre ter me incentivado à pesquisa contribuindo de forma fundamental na minha formação como Cirurgião Plástico.

À Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em especial à Enfermeira Marta J. G. Cioato e à Veterinária Tuane Nerissa Alves Garcez.

Ao Centro de Terapia Celular do HCPA, em especial à Fernanda Oliveira dos Santos por toda ajuda e comprometimento com o trabalho.

## INTRODUÇÃO

A cicatrização cutânea é um fenômeno complexo, em que pequenas alterações podem levar a um indesejável desfecho patológico. As intercorrências nesse processo são frequentes em cirurgias plásticas, trazendo algumas vezes resultados pobres e que frequentemente demandam reintervenções. Uma complicação comum e bem descrita na literatura é a necrose cutânea secundária ao tabagismo crônico e a dificuldade dos pacientes em cessá-lo para a realização de uma cirurgia. Cerca de apenas 5% dos pacientes conseguem cessar o tabagismo antes de uma cirurgia, e este número aumenta para 15% após aconselhamento médico<sup>1</sup>. Se ativo no pré e no pós-operatório, o tabagismo gera um ambiente de isquemia e hipóxia da ferida cirúrgica, que dificulta a cicatrização e culmina com necrose e infecção<sup>2</sup>. A manutenção do tabagismo em um procedimento cirúrgico eletivo pode acarretar um risco de atraso na cicatrização, deiscência e infecção até três vezes maior em comparação aos não fumantes<sup>3</sup>. O tabagismo está associado a um aumento de duas vezes a mais de chances de complicações sistêmicas graves<sup>4</sup>.

Diversos estudos clínicos e modelos experimentais associando a necrose tecidual de retalhos ao hábito de fumar foram descritos<sup>5-9</sup>. Para permitir a avaliação dos danos causados pelo tabagismo, foram criados modelos experimentais que induzem a cicatrização patológica causada pelo tabagismo através da injeção subcutânea de nicotina, sem necessitar produzir fumaça tóxica, não gerando tabagismo passivo em funcionários ou pacientes que circulem nos laboratórios de pesquisa ou hospital<sup>10</sup>. A aplicação das células-tronco na ferida melhora a cicatrização cutânea por diferenciação celular

e sua importante melhora da ação parácrina. O objetivo deste trabalho é testar o uso das células-tronco derivadas de tecido adiposo, já consolidadas na literatura como ferramenta para melhorar a cicatrização cutânea, e avaliar o potencial para reduzir a taxa de complicações em um modelo experimental de com injeção de nicotina em ratos<sup>10</sup>. Com isso, poderá ser possível propor e testar, no futuro, protocolos para melhorar a cicatrização nos tabagistas crônicos, reduzindo a morbidade e os custos das complicações causadas pelo tabaco no processo de cicatrização cutânea. O tecido adiposo como fonte de células-tronco possibilita a utilização nas cirurgias com baixa morbidade de obtenção e baixo custo de preparo.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. FISILOGIA DA CICATRIZAÇÃO DA PELE

O objetivo da cicatrização é reestabelecer a continuidade da pele, bem como a sua tensão e sua função de barreira<sup>11</sup>. A cicatrização cutânea é um processo complexo que envolve diversos fatores e só termina com um bom resultado quando os eventos forem ordenados na sua forma correta. É didaticamente dividida em três fases: inflamatória, proliferação e remodelamento. Essas devem ocorrer em ordem fisiológica, e qualquer alteração pode resultar em uma cicatriz patológica<sup>12</sup>. Os eventos são organizados pela participação de diferentes tipos celulares como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais, as quais são influenciadas por diversos fatores de crescimento e citocinas<sup>13,14</sup>.

Na fase inflamatória, a perda da integridade tecidual leva à vasoconstrição seguida de vasodilatação, para que o plasma se extravase sobre a ferida. Quando o colágeno é exposto, ativa os sistemas de coagulação e do complemento<sup>15</sup>. As plaquetas e os monócitos liberam fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de transformação de crescimento-alfa (TGF- $\alpha$ ), que são quimiotáticos e favorecem a migração dos leucócitos<sup>16,17</sup>. Estes vão penetrar na ferida por diapedese<sup>18</sup>, para limpeza da mesma e liberação de fatores quimiotáticos<sup>15</sup>.

No início da fase inflamatória, o sistema de coagulação permite a hemostasia e, a partir da conversão da pró-trombina em trombina, ocorre a transformação do fibrinogênio em fibrina. Essa matriz extracelular forma um

tapete que serve de base para a migração de macrófagos e fibroblastos, de maneira que, sem ela, não ocorre cicatrização. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem na ferida para iniciar sua limpeza. Num estágio mais avançado, da fase inflamatória, os monócitos migram dos vasos e se convertem em macrófagos, atraídos pelo fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) e PDGF. Eles terminam a limpeza da ferida e promovem a proliferação dos fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos, além de coordenar a angiogênese através de fatores de crescimento como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e TGF- $\beta$  durante a fase proliferativa<sup>19-21</sup>.

No terceiro dia após o trauma, inicia-se a fase proliferativa, quando chegam os fibroblastos, atraídos por quimiotaxia através de mediadores inflamatórios liberados por plaquetas, leucócitos e macrófagos. Essas células têm como função produzir colágeno, que é o principal componente da matriz celular – na cicatrização, os produzidos em maior número são colágenos I e III (80% e 20%, respectivamente)<sup>15</sup>. Os queratinócitos liberam interleucinas que estimulam os fibroblastos a produzirem citocinas e fatores de crescimento importantes para a cicatrização<sup>22</sup>. Esses fatores também estimulam a proliferação dos queratinócitos, ocorrendo um feedback positivo<sup>23</sup>. Para a formação de cicatrizes com aspecto fisiológico, é necessário que os feixes de colágeno e os fibroblastos estejam alinhados no tecido de granulação<sup>24</sup>.

Outra função importante dos fibroblastos é diferenciarem-se em miofibroblastos, com capacidade de contração para a aproximação das bordas da ferida e a redução do tempo necessário para epitelização<sup>25</sup>. A angiogênese possui a função de nutrir o tecido recém formado<sup>26</sup>. É iniciada pela degranulação plaquetária e pela liberação de TGF- $\beta$  e PDGF, além da migração de

macrófagos e produção de TNF- $\alpha$  e FGF<sup>15</sup>. Além disso, um dos principais estimuladores é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fundamental para ativação de receptores e desencadear a formação de novos vasos<sup>27</sup>. Ao migrar para a lesão promove melhora da oxigenação e ao diminuir o ácido láctico, que é um potente estimulador da produção de colágeno, diminuí também a acidose. A forma de avaliar a melhora da oxigenação é quantificando a hipóxia através da dosagem da proteína chamada fator de indução de hipóxia (HIF-1). O HIF-1, em condições normais, é degradado pelo oxigênio, porém, em ambiente de hipóxia, seus níveis se elevam, sendo possível ser quantificado e avaliar o nível de hipóxia de uma ferida<sup>28</sup>.

Após 72 horas, as células epiteliais da borda da lesão começam a se multiplicar e migrar para o centro, cessando o movimento ao se deparar com outra célula, fenômeno descrito como inibição por contato<sup>29</sup>.

Após o vigésimo primeiro dia, dá-se a última fase – a remodelação, que pode se estender por mais de um ano. Nessa fase, o colágeno depositado na fase proliferativa será degradado e substituído por um colágeno de fibras mais densas e orientadas de acordo com as linhas de tensão da pele do local. Para que não ocorra uma cicatrização patológica, é necessário um equilíbrio entre a fibroplasia e colagenólise<sup>30</sup>. A força tênsil aumenta rapidamente entre a primeira e sexta semana, mas jamais retorna a ser a mesma<sup>31</sup>. Em adultos, uma cicatriz é considerada normal quando é linear, não eritematosa e plana<sup>32</sup>.

## **2. COMPLICAÇÕES NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM TABAGISTAS**

Pacientes tabagistas revelam-se um desafio pré-operatório, por serem



necessárias ao menos oito semanas de cessação do fumo para um estado cirúrgico adequado. Adicionalmente, já é comprovado que a maioria dos pacientes não consegue parar de fumar por esse período. Dessa forma, nesses casos, o processo cicatricial da pele não ocorre em sua sequência fisiológica e culmina em uma cicatriz insatisfatória<sup>12,34,35</sup>.

Cicatrizes cutâneas são uma preocupação constante nas cirurgias plásticas. Quando são queloidianas, hipertróficas ou com insuficiência vascular, existem poucos recursos realmente eficazes para seu tratamento e menos ainda para sua profilaxia.

A relação entre o tabagismo e as alterações significativas na cicatrização cutânea foi descrita pela primeira vez por Mosely e Finseth, que observaram problemas cicatriciais de uma ferida na mão de um fumante com arteriosclerose<sup>36</sup>. A partir desse momento, seguiram-se diversos estudos sobre as relações entre o tabagismo e as alterações no remodelamento do tecido, que resulta em uma cicatriz anormal<sup>37-39</sup>.

A fumaça do cigarro possui diversas substâncias tóxicas que, quando inaladas, vão diretamente ao sistema pulmonar e podem causar um dano direto local à proteção celular ou passar a barreira ciliar. Todas essas substâncias tóxicas resultam em uma relativa hipóxia tecidual e em uma cicatrização mais lenta devido a vasoconstrição, função celular anormal e trombogênese<sup>39</sup>.

A nicotina gera vasoconstrição direta e indiretamente<sup>40</sup>, e os componentes tóxicos do fumo do tabaco estão relacionados a lesões de células endoteliais do lúmen de pequenos vasos<sup>41</sup>. Além disso, a fumaça do cigarro é apontada como causadora de degradação de óxido nítrico, um dos responsáveis endógenos pela dilatação dos vasos<sup>42</sup>. Com a perda da proteção endotelial, reduz-se a função anti-espasmódica e anticoagulante do próprio vaso<sup>43</sup>. Assim, as plaquetas

aderem-se ao epitélio danificado e liberam tromboxano A<sub>2</sub>, que induzirá uma constrição vascular e espasmo arteriolar<sup>41</sup>. Concomitantemente, o cianeto de hidrogênio prejudica o transporte de oxigênio, diminuindo a capacidade de reparação celular e cicatrização de feridas<sup>43</sup>.

Quando o cianeto de hidrogênio é combinado com a acroleína, outro componente tóxico gasoso, ocorre a inibição da função dos leucócitos, o que prejudica ainda mais a fase inflamatória da cicatrização<sup>43</sup>. A nicotina também diminui a quantidade de macrófagos e fibroblastos, células essenciais para a cicatrização<sup>44</sup>. Além disso, quando unida às catecolaminas, estimula a produção de chalonas, hormônios responsáveis por retardar e diminuir a epitelização da ferida<sup>45</sup>. Nos fumantes, a deposição de colágeno também é reduzida<sup>46</sup>. A nicotina ao interferir nas prostaglandinas I<sub>2</sub>, facilita a trombogênese<sup>47</sup>. O monóxido de carbono é outra substância tóxica presente no fumo do tabaco, que reduz por competição o transporte de oxigênio, eleva os níveis de carboxihemoglobina e diminui a oxigenação dos tecidos – o que leva à uma cicatrização retardada<sup>39</sup>. O estado de hipóxia tecidual estimula a eritropoiese, agregação de células vermelhas e produção de fibrinogênio, assim, ocorre um aumento da viscosidade sanguínea, que facilita a formação de trombos<sup>48</sup>. Percebe-se, portanto, que há inúmeras substâncias tóxicas na fumaça do cigarro, que ao serem inaladas prejudicam a cicatrização fisiológica<sup>49-55</sup>.

### **3. MODELO EXPERIMENTAL DE RETALHO CUTÂNEO RANDÔMICO EM RATOS COM INJEÇÃO DE NICOTINA SUBCUTÂNEA**

Os retalhos cutâneos são amplamente utilizados em cirurgia plástica. As

principais complicações pós-operatórios são a isquemia e necrose secundária<sup>7</sup>. Quando se estuda a vascularização de retalhos cutâneos em tabagistas, a principal substância prejudicial é a nicotina devido reduzir a perfusão dos retalhos por meio de vasoconstrição, o aumento da adesividade plaquetária e a redução do tempo de coagulação. O retalho cutâneo é afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores extrínsecos podem ser sistêmicos (infecção, arteriosclerose, hipotensão e deficiência nutricional) ou locais (compressão, tensão ou trombose da anastomose). O principal fator intrínseco é o fluxo sanguíneo inadequado devido à insuficiência arterial na parte distal do retalho<sup>7</sup>.

<sup>8</sup>. O tratamento com nicotina em modelos experimentais de retalhos cutâneos determina vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo, principalmente para o retalho distal<sup>9</sup>. Cerca de apenas 5% dos pacientes conseguem cessar o tabagismo antes de uma cirurgia, e este número aumenta para 15% após aconselhamento médico<sup>1</sup>. Sendo assim, o estudo de tratamentos para reduzir suas complicações são indispensáveis. Diversos modelos experimentais foram propostos para o estudo do tabagismo<sup>6-10</sup>. Os ratos são os animais mais adequados para estes testes, pois apesar de serem animais de pequeno porte, possibilitam retalhos de tamanhos adequados para análise. Os modelos experimentais em ratos, para a análise do tabagismo, demonstram que se associa ao hábito de fumar à necrose tecidual de retalhos randômicos. A injeção subcutânea de nicotina apresenta efeito nocivo nos retalhos cutâneos em ratos<sup>10</sup>. As doses propostas nos artigos variam entre 1,2 mg/kg/dia até 2 mg/kg/dia para simular um paciente tabagista crônico. Para avaliação do retalho estão descritos retalhos cutâneos isquêmicos, em que a área de necrose do grupo controle segue um padrão, permitindo avaliar a redução ou não da mesma após algum tratamento. Os retalhos descritos são no dorso dos ratos com pedículo

interescapular variando seu comprimento de 8 cm a 10 cm e sua largura de 2 cm a 4 cm<sup>6-10,33</sup>. Assim, com estes modelos experimentais é possível estudar terapias profiláticas à cicatrização patológica induzida pelo tabagismo crônico, sem expor fumaça tóxica ao laboratório de pesquisa.

#### **4. CÉLULAS-TRONCO**

As células-tronco são fundamentais para o organismo. Possuem papel importante tanto para formar os órgãos na fase embrionária, como no indivíduo adulto para regenerar e reparar tecidos. Há duas propriedades fundamentais: são células não especializadas que se renovam por longos períodos através da divisão celular e podem se transformar em unidades com funções específicas <sup>56</sup>. Estas células podem ser classificadas em dois grandes grupos: as embrionárias e as adultas. As embrionárias são encontradas no embrião e são classificadas como totipotentes ou pluripotentes. Totipotência é a característica das células derivadas do zigoto que podem produzir todas as células embrionárias e extraembrionárias. Já as pluripotentes são as células que são retiradas do botão interno do blastocisto e originam tecidos correspondentes ao mesoderma, ectoderma e endoderma, sendo essa a capacidade de desenvolver-se em qualquer tipo celular necessária no desenvolvimento do feto. As células-tronco adultas são multipotentes, pois podem se diferenciar em muitos tipos de tecidos, porém de maneira mais limitada. Quando utilizadas na pesquisa, as células-tronco pluripotentes são derivadas de óvulos fertilizados in vitro e doados, com consentimento dos doadores. Estes embriões têm tipicamente 4 ou 5 dias de desenvolvimento, mas tais estudos ainda são limitados devido às questões éticas e de manipulação. Considerando essas dificuldades, a maior parte dos

pesquisadores têm realizado seus estudos com células-tronco adultas<sup>57</sup>. As células-tronco adultas são células indiferenciadas encontradas entre as células diferenciadas dentro dos tecidos de um organismo, podem se autorrenovar ou podem se tornar células especializadas. As células-tronco adultas incluem as células-tronco mesenquimais (CTM), hematopoiéticas (CTH) e outras tecido-específicas, podendo ser encontradas em diversos tecidos, como na medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, tecido muscular, tecido adiposo, entre outros<sup>58</sup>. As células-tronco adultas são classificadas em CTM, CTH e tecido específicas. As CTH foram as primeiras células-tronco descritas, identificadas por Till e McCulloch há mais de 40 anos. Estas células têm o potencial de dar origem a diversos tipos de células do sangue, tanto as de origem mielóide (macrófago e monócito) como as de origem linfóide (linfócitos B e T). As CTM têm habilidade de se diferenciar em linhagens de tecidos mesodérmicos, como o músculo esquelético, ossos, tendões, cartilagem e gordura, quando em condições de cultivo adequado<sup>59</sup>. Esta característica é chamada de plasticidade, uma vez que as células-tronco de um tecido estão habilitadas a originar tipos celulares de um tecido completamente diferente. As CTM têm muitas propriedades que sugerem alto potencial na terapia celular para diversas patologias. Sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos, tanto in vitro como in vivo, tem levado a sua aplicação clínica, por exemplo, em estudos para o tratamento de doenças ósseas hereditárias como a osteogênese imperfeita. Sua capacidade para promover a neovascularização após lesão isquêmica também levou a estudos pré-clínicos de isquemia miocárdica<sup>60</sup>. Os tecidos específicos são fontes de CTM com algumas variações de um tecido para outro, como o método de coleta, concentração de CTM no tecido e o grau de exposição do paciente para a retirada das células. Os estudos com células-

tronco adultas se iniciaram com células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTM-MO), porém, o procedimento cirúrgico simples, o acesso fácil e os simples procedimentos de isolamento com base em enzimas de digestão tecidual tornaram o tecido adiposo subcutâneo uma atraente fonte para obtenção de CTM para os pesquisadores e clínicos de quase todas as áreas da medicina. As células obtidas de tecido adiposo foram denominadas como células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDA). Portanto, as CTDA representam uma fonte alternativa de células-tronco adultas que podem ser obtidas repetidamente em grande quantidade, sob anestesia local, com um mínimo de desconforto ao paciente. Mais importante ainda, uma análise comparativa das CTM obtidas da medula óssea e tecido adiposo mostrou que CTDA não são diferentes em relação a sua morfologia, imunofenótipo, frequência na formação de colônias, plasticidade, podem render 500 vezes mais células a partir da mesma quantidade de tecido e são geneticamente mais estáveis em culturas a longo prazo <sup>61,62</sup>. Além disso, devido a grande quantidade de tecido disponível o lipoaspirado pode ser diretamente utilizado clinicamente sem cultura *in vitro*<sup>63</sup>. A utilização direta de lipoaspirado pode ser mais segura, uma vez que evita a manipulação *in vitro* de CTDA que poderiam alterar as suas funções biológicas. Outra vantagem de usar lipoaspirado sem passar por cultura são as questões regulatórias do manuseio de células-tronco e posterior aplicação clínica, extremamente rígidas, as quais demandam alto custo e uma equipe adequadamente treinada<sup>64</sup>. Outra vantagem já descrita é que as CTDA quando isoladas podem ser crio-preservedo por até 6 meses mantendo suas características e permitindo sua utilização terapêutica no futuro<sup>65</sup>. Quanto à escolha do local a extrair as CTDA, o tecido adiposo abdominal superficial é menos suscetível a apoptose em comparação com outros depósitos subcutâneos. Quando analisado as diferenças das CTDA com o envelhecimento

é observado que o potencial de diferenciação é mais significativo em todos depósitos de tecido adiposo de indivíduos jovens, em comparação com os idosos, onde a diferenciação é só substancial nos depósitos subcutâneos do braço e coxa<sup>66</sup>. O isolamento das CTDA é feito com tecido lipoaspirado retirado do paciente. O tecido é lavado com solução salina e em seguida é digerido com uma solução para digestão da matriz extracelular com o objetivo de liberação das CTDA. A solução de digestão contém uma enzima denominada colagenase que atua a 37°C. Após o período de incubação com a colagenase, o processo é interrompido com plasma autólogo. O conteúdo obtido do processo de digestão é centrifugado e o sedimento é ressuspendido. Após aproximadamente uma hora, pode ser injetado no paciente ou mantido em placas de cultura para expansão ou estudos in vitro<sup>67</sup>.

## **5. APLICAÇÕES DE TERAPIA COM CÉLULAS-TRONCO NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA**

Os trabalhos pioneiros começaram usando CTM-MO em lesões cutâneas<sup>68</sup>. O tratamento com CTM-MO aumenta significativamente a secreção de VEGF e Ang- 1 nas feridas. A secreção elevada dos fatores pró-angiogênicos acarreta a melhora da neovascularização. As CTM-MO aumentam a resistência e a tração no local da cicatriz<sup>69</sup> e podem se diferenciar em queratinócitos<sup>70</sup>. Contudo, o principal fator para a melhora da cicatrização parece ser a estimulação parácrina. Como relatado anteriormente, as células-tronco derivadas de tecido adiposo têm marcadores de superfície e perfil genético similar às CTM-MO, porém, seu acesso é menos invasivo e estão presentes em

maior quantidade, não necessitando sua expansão *in vitro* para uso em pacientes, o que as torna uma grande promessa para o uso no reparo e regeneração de tecidos. As CTDA reduzem significativamente o tamanho da ferida e aceleram a reepitelização a partir de sua borda<sup>71</sup>. As CTDA, após serem isoladas de regiões subcutâneas e colocadas na ferida, entram em contato com proteínas reguladoras e secretam fatores de crescimento como VEGF, fator de crescimento de hepatócito (HGF) e TGF- $\beta$ <sup>72</sup>. Além desses fatores, as CTDA também secretam PDGF (semelhante ao IGF) e KGF<sup>73</sup>. Vem sendo demonstrado que quando em cultura de hipóxia, as funções celulares das CTDA, melhoram por aumento da sua proliferação, por aumento da produção de VEGF em aproximadamente 5 vezes e por adequar a regulação de certos genes, nomeados fatores angiogênicos e anti-apoptóticos<sup>74-76</sup>. Em lesões isquêmicas, podem ser uma nova opção terapêutica para aumentar a angiogênese. As CTDA se diferenciam em células progenitoras endoteliais e contribuem para uma melhora da angiogênese no tecido isquêmico<sup>77</sup>. Outro estudo mostra que as CTDA residem em uma localização periendotelial e estabilizam as conexões endoteliais, sendo semelhantes a pericitos<sup>78</sup>.

As CTDA têm efeito também sobre os fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno e ativando sua proliferação e migração<sup>74</sup>. Portanto, as CTDA atuam na cicatrização acelerando e melhorando a angiogênese, estimulando a produção de colágeno e a contração da ferida. Resta claro que as CTDA vêm se tornando o centro de muitos experimentos clínicos, os quais vêm demonstrando uma melhora significativa da cicatrização cutânea com o tratamento a partir de CTDA<sup>79</sup>. Outros papéis para as células-tronco também têm sido explorados recentemente, como auxiliares em preenchimentos adiposos e enxertos de



gordura<sup>80</sup>. Fios de sutura têm sido enriquecidos com essas células, abrindo caminho para otimização de resultados através do emprego direto do material na área de interesse<sup>81</sup>.

Uma vez consolidado que as CTDA podem ser utilizadas como profilaxia para diminuir as complicações na cicatrização cutânea neste modelo experimental, poderão ser desenvolvidos estudos clínicos usando as CTDA para profilaxia em pacientes com risco de complicações cicatriciais em cirurgias, como os tabagistas. Estes poderão mostrar diminuição da morbidade para os pacientes, além de melhores resultados estético-funcionais e diminuição de custos ocasionados por reintervenções.

## REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society. Guide to quitting smoking. A word about success rates for quitting smoking. Disponível em: <http://www.cancer.org/healthy/stayawayfromtobacco/guidetoquittingsmoking/guide-to-quitting-smoking-success-rates>.
2. Jeffery K. Krueger, M.D., and Rodney J. Rohrich, M.D. Clearing the Smoke: The Scientific Rationale for Tobacco Abstinence with Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Sep 15;108(4):1063-73.
3. Sorensen L. Wound Healing and Infection in Surgery: The Clinical Impact of Smoking and Smoking Cessation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Surg*. 2012;147(4):373-383.
4. Alparslan Turan, M.D., Edward J. Mascha, Ph.D., Dmitry Roberman, M.S., Patricia L. Turner, M.D., Jing You, M.S., Andrea Kurz, M.D., Daniel I. Sessler, M.D., Leif Saager, M.D. Smoking and Perioperative Outcomes. *Anesthesiology* 2011;114(4):837-846.
5. Gravante G, Sorge R, Araco F, Delogu D, Cervelli V. Wound infections in aesthetic abdominoplasties: the role of smoking. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121:305e-310e.
6. Crig S, Ress TD. The effects of smoking on experimental skin flap in hamsters. *Plast Reconstr Surg* 1985;75:842-6.
7. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random-pattern skin-flap in the rat. *Br J Plast Surg* 1987;40(3):295-9..
8. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin-flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1991;87(3):518-28.
9. Kaufman T, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz J, Klain M. Tobacco smoking: impairment of experimental flap survival. *Ann Plast Surg* 1984;13:468-72.
10. Campos H, Ferreira LM, Santos WLC, Araújo MCM. Effects of nicotine in skin flaps in rats. *Acta Cir Bras*. 2001;16(4):206-10.
11. Singer A J, Thode H C J, McClain S A. Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. *Acad Emerg Med*. 2000;7:1083-1088.
12. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;10:738-46.
13. Martin, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.

14. Cardoso JF, Souza BR, Amadeu TP, Valença SS, Porto LC, Costa AM. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol.* 2007;35:890-896.
15. Mélega JM. Biologia da cicatrização. In: Mélega JM. *Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte, Princípios Gerais.* Medsi, 2002;2:9-12.
16. Szpaderska A, Egozi E, Gamelli R, Di Pietro L. The effect of thrombocytopenia on dermal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2003;120:1130-1137.
17. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham S N. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-[alpha]. *Nature.* 1996;381:77-80.
18. Lou O, Alcaide P, Luscinskas F W, Muller W A. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol.* 2007;178:1136-1143.
19. Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, et al. What is the physiological function of mast cells? *Exp. Dermatol.* 2003;12:886-910.
20. Weber A, Knop J, Maurer M. Pattern analysis of human cutaneous mast cell populations by total body surface mapping. *Br J Dermatol.* 2003;148:625-631.
21. Galli S J. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med.* 1993;328:257-265.
22. Boxman I, Ruwhof C, Boerman O, Lowik C, Ponc M. Role of fibroblasts in the regulation of pro-inflammatory interleukin IL-1, IL-6 and IL-8 levels induced by keratinocyte-derived IL-1. *Arch Dermatol Res.* 1996;288:391-398.
23. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127:998-1008.
24. Opalenik S R, Davidson J M. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J.* 2005;19:1561-1563.
25. Montesano R, Orci L. Transforming growth factor- $\beta$  stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U SA.* 1988;85:4894-4897.
26. Li W W, Talcott K E, Zhai A W, Kruger E A, Li V W. The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration. *Adv Skin Wound Care.* 2005;18:491-500.
27. Napoleone F. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 25(4):581–611
28. *Measurements in Wound Healing Science and Practice* Editors: Mani, Raj, Romanelli, Marco, Shukla, Vijay (Eds.) 2013 Springer
29. Peacock EE Jr, Cohen IK. Wound healing. In *Mc Carthy Plastic Surgery.* W.B. Saunders Company. 1990;321:161-83.

30. Gurtner G C, Werner S, Barrandon Y, Longaker M T. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314-321.
31. Adzick NS. Wound healing: biologic and clinical features. In: Sabiston, textbook of Surgery. The biological basis of modern surgical practice. 15 ed. W.B. Saunders Company, 1997.
32. Stewart K J. A quantitative ultrastructural study of collagen fibrils in human skin normal scars, and hypertrophic scars. *Clin Anatomy*. 1995;8:334-338.
33. Gomes HC, Campos JHO, Ferreira LM, Kobayashi LA. Experimental model to study the effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. *Acta Cir Bras*. 2004;19:65-8.
34. Aköz T1, Akan M, Yildirim S. If you continue to smoke, we may have a problem. *Aesthetic Plastic Surgery* 22:477- 482, 2002.
35. Antonino Araco. Wound Infections in Aesthetic Abdominoplasties: The Role of Smoking. *Plast Reconstr Surg*. 2008 May;121(5):305e-310e.
36. Mosely, L. H., and Finseth, F. (1977). Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *Hand* 9, 97–101.
37. Frick, W. G., and Seals, R. R., Jr. (1994). Smoking and wound healing: a review. *Tex Dent J* 111, 21–3.
38. Manassa, E. H., Hertl, C. H., and Olbrisch, R. R. (2003). Wound healing problems in smokers and nonsmokers after 132 abdominoplasties. *Plast Reconstr Surg* 111, 2082–7; discussion 8–9.
39. Silverstein, P. (1992). Smoking and wound healing. *Am J Med* 93, 22S–4S.
40. Krupski, W. C. The peripheral consequences of smoking. *Ann. Vasc. Surg.* 5:291, 1991.
41. Davis, J. W., Shelton, L., Eigenberg, D. A., and Hignite, C. E. Lack of effect of aspirin on cigarette smoke-induced increase in circulating endothelial cells. *Haemostasis* 17: 66, 1987.
42. Dattilo, J. B., and Makhoul, R. G. The role of nitric oxide in vascular biology and pathobiology. *Ann. Vasc. Surg.* 11: 307, 1997.
43. Eichel, B., and Shahrik, H. A. Tobacco smoke toxicity: Loss of human oral leukocyte function and fluid-cell metabolism. *Science* 166: 1424, 1969.
44. Sherwin, M. A., and Gastwirth, C. M. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J. Foot Surg.* 29: 84, 1990.
45. Mosley, L. H., Finseth, F., and Goody, M. Nicotine and its effect on wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 61:570, 1978.
46. Hunt, T. K., and Pai, M. P. Effect of varying ambient oxygen tensions on wound metabolism and collagen synthesis. *Surg. Gynecol. Obstet.* 135: 561, 1972.
47. Chang, L. D., Buncke, G., Slezak, S., and Buncke, H. J. Cigarette smoking, plastic surgery, and microsurgery. *J. Reconstr. Microsurg.* 12: 467, 1996.
48. Riefkohl, R., Wolfe, J. A., Cox, E. B., and McCarty, K. S., Jr. Association between cutaneous occlusive vascular disease, cigarette smoking, and skin slough after rhytidectomy. *Plast. Reconstr. Surg.* 77: 592, 1986.

49. Adrichen LN, Hovius SE, Strik R, Meulen JC. Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br J Plast Surg* 1992;45:9-11.
50. Nolan J, Jenkins RA, Kurihara K, Schultz RC. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1985;75:544-9.
51. Rees TD, Liverett DM, Guy CL. The effect of cigarette smoking on skin-flap survival in the face lift patient. *Plast Reconstr Surg* 1984;73(6):911-5.
52. Souza AST, Psillakis JM. O possível papel do fumo nas lesões isquêmicas de pele pós-ritidectomias. *Rev Soc Bras Cir Plast* 1989;4:105-7.
53. Van Adrichen LA, Hoegen R, Hovius SER, Kort WJ, Van Strik R, Vuzevski VD, Van Meulen JC. The effect of cigarette smoking on the survival of free vascularized and pedicled epigastrics flap in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1996;97:86-96.
54. Rohrich RJ, Coberly DM, Krueger JK, Brown SA. Planning elective operations on patients who smoke: survey of North American plastic surgeons. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(1):350-5.
55. Chang DW, Reece GP, Wang B, Robb GL, Miller JM, Evans GRD, Langtein HN, Kroll SS. Effect of smoking on complications in patients undergoing free TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(7):2374-80.
56. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 2011; 9: 12.
57. Yoshimura K, Suga H, Eto H. Adipose-derived stem/progenitor cells: roles in adipose tissue remodeling and potential use for soft tissue augmentation. *Regen Med* 2009; 4: 265–273.
58. Bernardo E, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1176: 101–117.
59. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* 2008;121: 401–410.
60. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* 2008; 60: 538–544.
61. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; (13):4279-95.
62. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009; (76): 56-66.
63. Lako M, Armstrong L, Stojkovic M. Induced Pluripotent Stem Cells: It Looks Simple but Can Looks Deceive? *Stem Cells* 2010; (28): 845–850.
64. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; (24): 1294-301.

65. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; (25):818–27.
66. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; (54): 132–41.
67. Dahl JA, Duggal S, Coulston N, Millar D, Melki J, Shahdadfar A, Brinchmann JE, Collas P. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Develop Biol* 2008;52:1033–1042.
68. Li H, Fu X, Ouyang Y, Cai C, Wang J, Sun T. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. *Cell Tissue Res* 2006; (326): 725–36.
69. McFarlin K, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen* 2006; (14):471–478.
70. Wang G, Bunnell BA, Painter RG, et al. Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; (102):186–191.
71. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. The Effect of Bone-Marrow-Derived Stem Cells and Adipose Derived Stem Cells on Wound Contraction and Epithelization. *Adv Wound Care* 2014 Jun; (6): 405–413.
72. Jeong JH. Adipose Stem Cells and Skin Repair. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2010; (5): 137–140.
73. Maxson S1, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Feb;1(2):142–9. doi: 10.5966/sctm.2011•0018.
74. Hassan WU1, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014 May-Jun;22(3):313–25. doi: 10.1111/wrr.12173.
75. Buravkova LB, Grinakovskaia OS, Andreeva EP, Zhambalova AP, Kozionova MP. [Characteristics of human lipoaspirate-isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension]. *Tsitologija* 2009; 51: 5–11.
76. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 948–53.

77. Park S, Moon YM, Kim SO, Jeong KS, Jeong JH. Therapeutic Effect of Endothelial Progenitor Cells from Human Adipose Tissue Derived Stem Cells on Ischemic Limb Model. *Tissue Eng Regen Med* 2008; (5): 903•9.
78. Traktuev DO, Merfeld•Clauss S, Li J, et al. A population of multipotent CD34•positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; (102): 77-85.
79. Yun IS, Jeon YR, Lee WJ, Lee JW, Rah DK, Tark KC, et al. effect of human adipose derived stem cells on scarformation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatol Surg* 2012 Oct; 38(10): 1678-88.
80. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose•derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep; Suppl 118(3):121S- 128S.
81. Reckhenrich AK, Kirsch BM, Wahl EA, Schenck TL, Rezaeian F, Harder Y, et al. Surgical sutures filled with adipose-derived stem cells promote wound healing. *PLoS One* 2014 Mar 13; 9(3): e91169.

## **JUSTIFICATIVA**

Não existem artigos na literatura avaliando o potencial terapêutico das células-tronco derivadas de tecido adiposo para reduzir as complicações cicatriciais causadas pelo tabagismo em retalhos cutâneos. A eventual eficácia das CTDA pode ter um grande impacto no tratamento de feridas cutâneas em pacientes tabagistas.



## **HIPÓTESE NULA H(0)**

Não há diferença entre a aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo, quando comparada à administração de soro fisiológico, para reduzir áreas de necrose em retalhos cutâneos randômicos em ratos submetidos à injeção subcutânea de nicotina.

## **OBJETIVO**

Testar o uso das CTDA, em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos, com injeção de nicotina subcutânea, para redução de área de necrose.

## ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

### Uso de células-tronco derivadas de tecido adiposo para redução de complicações da cicatrização cutânea em indivíduos tabagistas: um modelo experimental em ratos.

João Maximiliano Pedron Martins <sup>1, 2</sup>

Diego Dullius <sup>1</sup>

Fernanda Oliveira <sup>1</sup>

Elizabeth Cirne Lima<sup>1</sup>

Everton Hiraiwa <sup>1,3</sup>

Tulio Serrano <sup>1,3</sup>

Marcus Vinicius Martins Collares <sup>1-3</sup>

#### Endereço para correspondência:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. Porto Alegre / RS. Brasil. Tel: +55 51 33598232.

E-mail: [jmaximilianopm@gmail.com](mailto:jmaximilianopm@gmail.com)

<sup>1</sup> Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

## RESUMO

**Objetivo:** Testar o uso das células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDA) para redução da área de necrose em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos com injeção de nicotina subcutânea para simular um indivíduo tabagista.

**Métodos:** Em um estudo experimental, 30 ratos foram operados utilizando um modelo de retalho cutâneo isquêmico no dorso, à partir da injeção de nicotina subcutânea. Outros 10 ratos foram utilizados apenas para obtenção das CTDA. O primeiro grupo, de tratamento (n=15), recebeu injeção com CTDA ao final da cirurgia; o outro grupo, controle (n=15), não recebeu intervenções adicionais. Após a eutanásia, foi realizado um decalque de toda a área do retalho do dorso de ambos os grupos, definindo com exatidão a transição da necrose com a região saudável. Fotos de todos animais foram tiradas e avaliadas por escalas padronizadas pelo programa Paint-Autocad-2015 para definir a área de necrose de retalho em cada rato. O teste T de Student foi usado para comparar os grupos, sendo  $p < 0,05$  considerado significativo. Resultados calculado no SPSS IBM® versão 18.

**Resultados:** Por meio da análise das imagens pelo programa Paint-Autocad-2015 e área de decalque obtido pela folha transparente, obteve-se uma média de 46% de necrose da área total do retalho no grupo tratamento e 69,4% no grupo controle. Na análise descritiva, foi evidenciado no grupo tratamento uma média de 3,7 cm de necrose IC 95% (3,2 - 4,2) e no grupo controle uma média de 5,56 cm IC 95% (5,2 – 5,9) com  $p < 0,001$ .

**Conclusões:** Concluímos que a aplicação das CTDA em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos com injeção de nicotina

subcutânea reduz o percentual de necrose dos mesmos.

**Palavras-chave:** Células-tronco, células-tronco derivadas de tecido adiposo, retalho cutâneo, retalho cutâneo isquêmico, tabagismo.

## INTRODUÇÃO

A cicatrização cutânea é um fenômeno complexo, em que pequenas alterações podem levar a um indesejável desfecho patológico. As intercorrências, nesse processo, são frequentes em cirurgias plásticas, trazendo, algumas vezes, resultados inestéticos e que frequentemente demandam reintervenções. Uma complicação comum e bem descrita na literatura é a necrose cutânea secundária ao tabagismo crônico e a dificuldade dos pacientes em cessá-lo para a realização de uma cirurgia. Cerca de 5% dos pacientes conseguem cessar o tabagismo antes de uma cirurgia, e esse número aumenta para 15% após aconselhamento médico<sup>1</sup>. Se ativo no pré e no pós-operatório, o tabagismo gera um ambiente de isquemia e hipóxia da ferida cirúrgica. Principalmente devido à nicotina, que gera vasoconstrição na microcirculação da pele, diminui o fluxo sanguíneo distal nos retalhos, o que resulta em necrose cutânea e posterior infecção secundária<sup>2</sup>. A manutenção do tabagismo, em um procedimento cirúrgico eletivo, pode acarretar um risco de atraso na cicatrização, deiscência e infecção até três vezes maior em comparação aos não fumantes, o que frequentemente leva à perda parcial ou total dos retalhos, à cicatrização secundária e a um impacto negativo no desfecho estético<sup>3,4</sup>. Diversos estudos clínicos e modelos experimentais associando a necrose tecidual de retalhos ao hábito de fumar foram descritos<sup>5-8</sup>. Para permitir a avaliação dos danos causados pelo tabagismo, foram criados modelos experimentais que induzem as complicações causadas pelo tabagismo, em retalhos cutâneos, mediante injeção subcutânea de nicotina, sem necessitar produzir fumaça tóxica, facilitando a realização dos estudos<sup>9</sup>. A aplicação das células-tronco adiposo derivadas (CTDA) na ferida cutânea melhora a cicatrização por diferenciação celular e

principalmente por sua importante melhora da ação parácrina, aumentando o estímulo à neovascularização e regulando a cascata de coagulação<sup>10</sup>. O objetivo deste trabalho foi testar o uso das CTDA para redução de área de necrose, em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos com injeção de nicotina subcutânea.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Um estudo experimental, realizado no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, na Unidade de Experimentação Animal (UEA) e na Unidade de Patologia Experimental, localizados no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). No trabalho foram utilizados 30 ratos machos, *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia* da linhagem *Wistar*, peso de 250 a 300g adultos jovens, 4-8 semanas, obtidos conforme os critérios da Unidade de Experimentação Animal do HCPA. Os ratos foram alojados na UEA-HCPA, conforme padrão de utilização dessa unidade, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*, sob temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar ( $55\% \pm 5\%$ ) controladas e fotoperíodo de 12/12 horas. Antes de iniciar os procedimentos, os animais passaram por um período de quarentena e aclimação de, no mínimo, 15 dias. Os procedimentos *in vivo* foram realizados conforme a legislação vigente no Brasil, Lei 11.794 (Diário Oficial da União - 8/10/2008), que estabelece procedimentos para o uso científico de animais e regulamenta o registro dos Biotérios e Centros de Experimentação. Todos os procedimentos foram embasados na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2016). Os procedimentos de finalização seguem as normas indicadas pelas Diretrizes da

Prática de Eutanásia do conselho nacional de controle de experimentação animal (CONCEA (2013)).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre número 2018-0671.

### **Grupos experimentais**

Trinta ratos foram divididos em dois grupos experimentais de retalho cutâneo isquêmico em dorso de ratos com injeção de nicotina subcutânea e os outros dez foram utilizados para obtenção de células-tronco. O primeiro grupo (n=15) recebeu tratamento com CTDA ao final da cirurgia, e o outro grupo foi o controle (n=15). Ambos os grupos foram submetidos à eutanásia após 7 dias da cirurgia. O “n” deste trabalho foi definido a partir da média utilizada nos trabalhos que utilizaram o modelo experimental utilizado<sup>9,11,13-15</sup>.

### **Injeção de nicotina**

Os animais tratados com nicotina receberam injeção no tecido celular subcutâneo em uma dose de 1,2 mg/Kg/dia, o que é equivalente a um tabagista humano pesado, por um período de 7 dias, antes da cirurgia e, após a intervenção, até o dia da eutanásia sem interrupção<sup>11</sup>.

### **Coleta e processamento do tecido adiposo para obtenção das células-tronco mesenquimais**

Para a coleta do tecido adiposo foram utilizados 10 ratos, *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia* da linhagem *Wistar*, peso de 250 a 300g, adultos jovens, 4-8 semanas jovens, obtidos e mantidos conforme já descrito. Os animais tiveram tecido adiposo gonadal e abdominal coletados assepticamente, sob anestesia geral inalatória, com isoflurano, vaporizado em oxigênio 100%, na dose de 5% para indução e 2% para manutenção, em



0,5L/min. Após a coleta, a eutanásia foi realizada por sobredose anestésica com isoflurano até a promoção de parada cardiorrespiratória. Os fragmentos de tecido adiposo foram imediatamente encaminhados para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, onde foram submetidos à digestão enzimática, para o isolamento das CTDA.

### **Obtenção das CTDA**

Em capela de fluxo laminar, o tecido dos animais doadores foi incubado em solução de colagenase tipo I ( $1\text{mg.mL}^{-1}$  em DMEM 9mM HEPES) por um período de uma hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após, a enzima foi inativada pela adição de meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão de células foi centrifugada por 5 min a 2000 rpm, e o pellet formado foi ressuspendido em meio DMEM, suplementado e plaqueado. Realizado o isolamento, as células foram cultivadas em DMEM, contendo baixa concentração de glicose, suplementado com 15mM HEPES, 15% de SFB e solução antibiótica de  $100\text{ units.mL}^{-1}$  de penicilina e  $100\text{mg.mL}^{-1}$  de estreptomicina, a  $37^{\circ}\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 100% de umidade. Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi aspirado e meio fresco, adicionado. Quando a cultura celular atingiu confluência de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de 0,05% tripsina-EDTA e subcultivo em DMEM.

### **Modelo cirúrgico**

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória, com isoflurano, vaporizado em oxigênio 100%, na dose de 5% para indução e 2% para manutenção, em 0,5 L/min. Para analgesia, foi administrado cloridrato de tramadol ( $20\text{mg.kg}^{-1}$ ), por via intraperitoneal (IP) e após a indução das lesões, a cada 12 horas até eutanásia. Foi realizada a tricotomia ampla da região dorsal, e os animais posicionados em decúbito ventral para a realização da antissepsia do

campo cirúrgico com solução alcoólica de gliconato de clorexidina 2%. Foi utilizado um modelo experimental já descrito na literatura, retalho de base cranial, com 8cm de comprimento e 2cm de largura no dorso dos animais. Para realização dos retalhos se utilizou um molde para que nos trinta animais fossem realizados os retalhos exatamente do mesmo tamanho. O retalho tem como limites uma linha que une os ângulos inferiores das escápulas e as bordas superiores dos ossos da cintura pélvica. Os retalhos foram elevados a partir da fáscia superficial dos músculos esqueléticos contendo a pele e a tela subcutânea (Figura 1,2). Uma barreira plástica (poliéster/polietileno) com as mesmas dimensões (8x2 cm) foi interposta entre o retalho e o leito doador, impedindo a revascularização do retalho por meio dos vasos do leito (Figura 3). A seguir, o retalho foi suturado com pontos simples de fio de náilon monofilamentar 4-0 na mesma posição original ("área doadora"), separados com a distância de 1cm entre os pontos<sup>9,11-15</sup>. No grupo tratamento com CTDA, foram utilizadas células entre a 3ª a 5ª passagem, na concentração aproximada de  $1 \times 10^6$  células, suspensas em 1ml de NaCl 0,9%. Após finalizar a sutura ao longo de todo o retalho, foi injetado via intradérmica, com seringa de 1ml e agulha 27 Gauge, sendo 0,1ml a cada 1,5 cm na lateral do retalho, totalizando 0,4ml de cada lado do retalho e 0,2ml na porção distal do retalho. Após o procedimento, os animais foram observados a cada 8 horas durante as primeiras 48 horas e, após, diariamente durante o restante dos 7 dias de experimento. Foram anotados os padrões dos ratos após o procedimento para notificar qualquer mudança no apetite ou no comportamento. Foram estipuladas medidas de antecipação de morte, como procedimento de refinamento e proteção/preservação do bem-estar animal, se os animais apresentassem comportamento alterado, como perda de peso excessiva, anorexia, sinais de dor não passível de tratamento, seguindo as

recomendações do CONCEA (2013).



**Figura 1.** Molde do Retalho Cutâneo demarcado (8x2cm)



**Figura 2:** Rato posicionado para o procedimento cirúrgico



**Figura 3:** Barreira plástica adequadamente posicionada no momento da eutanásia. Rato a esquerda grupo tratamento, rato a direita grupo controle.

### **Eutanásia:**

Os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica com isoflurano, em dose cinco vezes maior que a dose terapêutica, até a promoção de parada cardiorrespiratória, confirmada por médico-veterinário capacitado.

### **Avaliação da área de necrose**

Após a eutanásia, foi realizado um decalque de toda a área do retalho, definindo com exatidão a transição da necrose com a região saudável por algum membro da pesquisa sem saber qual grupo pertencia o rato avaliado. Para isso, utilizou-se uma folha de plástico transparente posicionada sobre o dorso do animal com marcação com caneta. Então, a área que representa a necrose foi cortada e medida. Ao dividir o valor obtido para a necrose pela do retalho total e multiplicar o resultado por 100, a porcentagem de necrose é obtida. Além disso,

foram retiradas fotos de todos animais e avaliadas por escalas padronizadas pelo programa Paint-Autocad-2015, e realizada análise planimétrica dos retalhos, registrando em centímetros quadrados a área total, área de tecido vascularizado viável e área de tecido necrosado (Figura 4 e 5)<sup>16</sup>.



**Figura 4.** Rato do grupo controle no momento da eutanásia



**Figura 5.** Rato do grupo tratamento no momento da eutanásia

### **Análise Estatística**

Para análise estatística, foi utilizado software IBM SPSS versão 18 (SPSS Inc. IBM Company). A variável principal de desfecho foi a área de necrose, aferida em cm<sup>2</sup>. Para variáveis contínuas e de distribuição normal, utilizamos o teste T de Student. Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. Consideramos significativa uma diferença quando  $p < 0,05$  e o intervalo de confiança de 95% não cruza 1,00.

## **RESULTADOS**

Não houve nenhum caso que necessitou medidas de antecipação de morte por falha no protocolo de analgesia, seguindo as recomendações do CONCEA (2013). Não houve nenhuma perda de animal no pós-operatório. Dois animais

tiveram episódio de epistaxe após injeção de nicotina e um convulsionou, e recuperou rapidamente, sem necessidade de nenhuma intervenção.

Por meio da análise das imagens pelo programa Paint-Autocad-2015 e área de decalque obtido pela folha transparente, o comprimento da necrose variou de 2,4cm até 4,88cm no grupo tratamento, enquanto no grupo controle variou entre 4,87 até 6,9cm. Obteve-se uma média de 46% de necrose da área total do retalho no grupo tratamento e 69,4% no grupo controle (Tabela 1 e 2).

**Tabela 1:** Resultados da área de necrose nos ratos do grupo tratado com CTDA.

Rato (n=15)	Area de necrose (%)
1	35
2	56
3	50
4	33
5	59
6	56
7	56
8	42
9	58
10	34
11	50
12	61
13	30
14	40
15	39

**Tabela 2:** Resultados de área de necrose no grupo controle.

Rato (n=15)	Area de necrose (%)
1	61
2	64
3	74
4	61
5	81
6	64
7	66
8	69
9	66
10	71
11	62
12	74
13	76
14	86
15	67

Na análise descritiva, foi evidenciado com 95% de confiança no grupo tratamento uma média de 3,7cm de necrose (IC 3,2 - 4,2) e no grupo controle uma média de 5,56 (IC 5,2 – 5,9)  $p < 0,001$  (Tabela 3).

**Tabela 3:** Resultados da média do comprimento de necrose nos grupos tratado e controle.

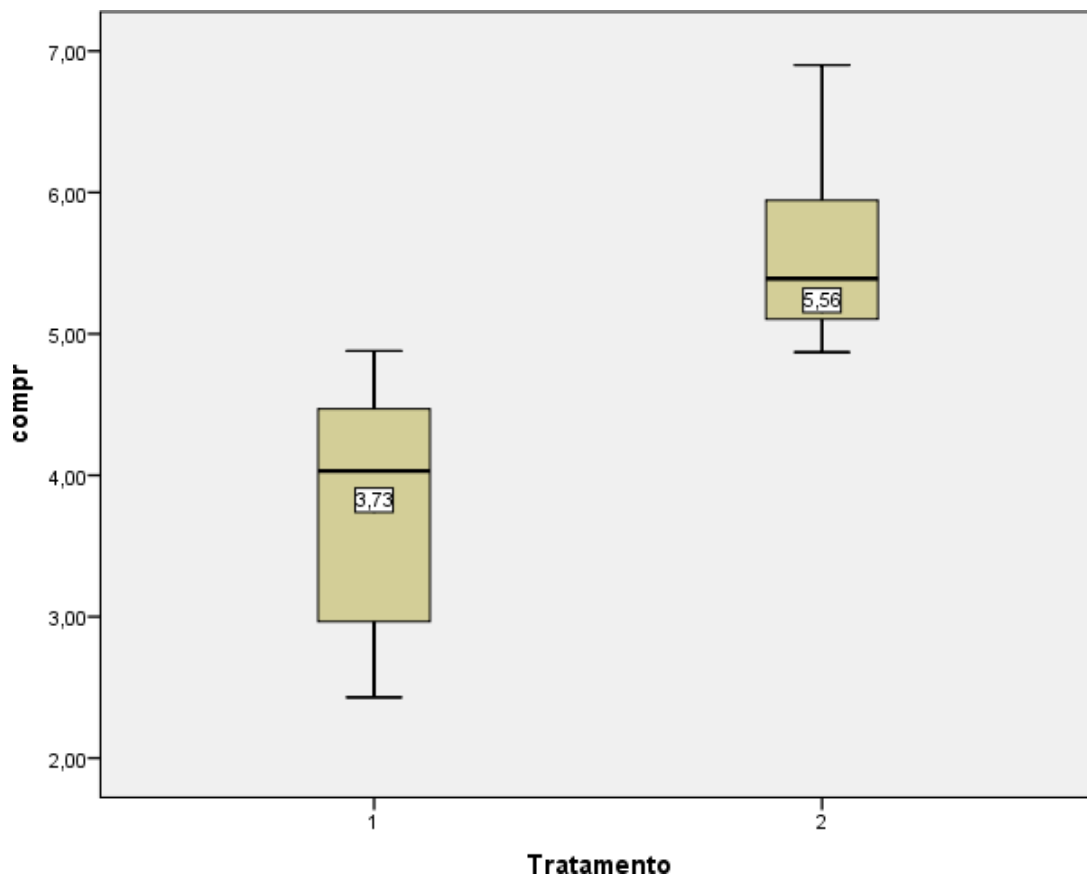
Variável	Tratamento $\mu$ (DP)	Controle $\mu$ (DP)	$p$
Comprimento de necrose (cm)	3,7 (+/-0,86)*	5,56 (0,61+/-)*	0,001**

\*Dados com distribuição normal representados por média e DP.

\*\*Dado obtido da comparação das médias dos grupos através do Teste T de Student.

A média e o desvio-padrão do comprimento de necrose do retalho no grupo tratamento e controle estão representados no gráfico Boxplot que foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados (Figura 6).





**Figura 6.** Média e desvio-padrão do comprimento de necrose do retalho em cm no grupo tratamento (1) e grupo controle (2).

## DISCUSSÃO

A fumaça do cigarro é composta de quase 4.000 substâncias químicas, a maioria é tóxica para o organismo. Quando se estuda a vascularização de retalhos cutâneos em tabagistas, a principal substância prejudicial é a nicotina devido a reduzir a perfusão dos retalhos por meio de vasoconstrição<sup>17</sup>, o aumento da adesividade plaquetária<sup>18</sup> e a redução do tempo de coagulação<sup>19</sup>. O retalho cutâneo é afetado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Fatores extrínsecos podem ser sistêmicos (infecção, arteriosclerose, hipotensão e deficiência nutricional) ou locais (compressão, tensão ou trombose da anastomose). O principal fator intrínseco é o fluxo sanguíneo inadequado devido à insuficiência arterial na parte distal do retalho. O tratamento com nicotina em modelos experimentais de retalhos cutâneos determina vasoconstrição, reduzindo o fluxo sanguíneo, principalmente para o retalho distal. Essa droga também prejudica a cicatrização de feridas nas fases inflamatória e epitelização<sup>11</sup>. Várias medidas vêm sendo descritas na tentativa de minimizar os efeitos deletérios do fumo na vascularização dos retalhos, devido ao seu potencial de dano e principalmente ao fato de que, mesmo após orientação, 85% dos pacientes seguem fumando antes e após a cirurgia<sup>1</sup>. Os autores utilizam o modelo experimental de retalhos cutâneos randômicos em ratos, bem estabelecido na literatura como base para testar novos tratamentos<sup>12</sup>, adicionando injeção nicotina no subcutâneo para simular um indivíduo tabagista crônico.

Russo *et al.* descreveram o uso da estimulação nervosa elétrica transcutânea(NTG) demonstrando aumento da viabilidade do retalho cutâneo

randômico em ratos tratados com nicotina, 45% de média de necrose no grupo controle e 21% no grupo exposto a NTG, devido à melhora do fluxo sanguíneo<sup>11</sup>. Leite M.R. *et al.* utilizaram Dimetil Sulfóxido como um bloqueador ao efeito deletério da nicotina demonstrando uma média de área de necrose de 20%, enquanto, no grupo controle, 40%, concluindo que, devido ao efeito antioxidante específico, o fármaco bloqueou o efeito nocivo da nicotina, agindo primariamente nos radicais hidroxila, diminuindo consideravelmente o efeito deletério da nicotina<sup>20</sup>. Uzun H. *et al.* testou o uso de Varenaclina antes de elevar os retalhos descrevendo uma melhora significativa na vascularização e percentual de necrose dos retalhos, 49% no grupo controle, e 22% no grupo tratado com Varenaclina. Também, evidenciou microangiograficamente que a vascularização foi menor no grupo nicotina e maior no grupo tratamento. Histologicamente, maiores áreas de necrose, inflamação mais grave e menor formação de vasos foram observadas no grupo da nicotina. Guimarães MVTN *et al.* descreveu que, com o tratamento com Arginina, na dose de 300mg/ kg, nos ratos expostos à nicotina, os vasos contados pela imuno-histoquímica com anti CD31 tiveram média menor(2,9), quando comparado ao grupo tratamento (4,3). A média de área de necrose no grupo tratado foi 17% enquanto a média do controle foi 45%. Atribuíram os efeitos da Arginina serem consequência da queda das concentrações sanguíneas de piruvato, lactato e corpos cetônicos<sup>16</sup>. Shah A. *et al.* testaram a capacidade do aumento da vasculogênese e do aumento do fluxo sanguíneo gerados pela inibição da fosfodiesterase-5 (PDE-5) em reduzir as complicações geradas pela nicotina. Concluíram que houve uma redução estatisticamente significativa na área de necrose do retalho cutâneo em ratos expostos à nicotina, e quando inibida a PDE-5, esse efeito foi dose dependente. Ao administrar sildenafil duas vezes ao dia, os animais expostos à nicotina

apresentaram uma redução superior a 50% na necrose do retalho cutâneo quando comparados ao grupo controle, de maneira estatisticamente significativa. Quando analisado o VEGF, as quantidades produzidas no grupo tratamento, média de 4.0, também foram estatisticamente maiores que no grupo controle, 2.9 de média<sup>22</sup>. Rinker B *et al.* testaram o efeito de bloqueadores dos canais de cálcio no percentual de área de necrose do retalho de pele induzido por tabagismo em ratos, concluíram que os bloqueadores dos canais de cálcio, tanto o Verapamil quanto a Nifedipina, administrados no momento da cirurgia e no pós-operatório imediato, reduzem significativamente a área de necrose dos retalhos cutâneos em animais expostos à nicotina, 27.2% e 26.3% respectivamente quando comparado ao controle 36.3% de média<sup>23</sup>. Selçuk CT *et al.* utilizaram a terapia com oxigenação hiperbárica para reduzir a área de necrose em retalhos cutâneos de ratos expostos à nicotina descrevendo redução com relevância estatística no grupo tratamento média de 35.9% e no grupo controle 53.9%<sup>24</sup>. Nezami BG *et al.* Demonstraram que doses únicas, locais e baixas de Tacrolimus reduzem a área de necrose de retalhos cutâneos em ratos tratados com nicotina significativamente, 28,3% no grupo tratamento e 53,9% no grupo controle pela redução do estresse oxidativo produzido pela nicotina<sup>25</sup>.

Este estudo teve por objetivo testar o uso das CTDA como profilaxia das complicações vasculares causadas pela nicotina em retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. A dificuldade dos pacientes em cessar o tabagismo segue um problema recorrente na rotina dos cirurgiões plásticos. Está comprovado tanto que a maioria dos pacientes segue fumando, mesmo após orientação pré-operatória, quanto às diversas complicações que o fumo gera na vascularização dos tecidos, cicatrização cutânea, podendo gerar complicações graves e necessidade de reoperação<sup>1-4</sup>. A aplicação das células-tronco na ferida gera

uma importante melhora da ação parácrina cicatricial, aumentando significativamente, em até cinco vezes, a secreção de VEGF e Ang-1 nas feridas. A elevação destes fatores pró-angiogênicos acarreta a melhora da neovascularização<sup>26-28</sup>. Assim, em retalhos com potencial isquêmico, como o dos tabagistas, pode ser utilizada como uma opção terapêutica para aumentar a neoangiogênese e reduzir a necrose secundária à vasoconstrição gerada pela nicotina.

Para o tratamento com células-tronco, optou-se pelas células derivadas do tecido adiposo. São de fácil acesso na rotina dos cirurgiões plásticos e menor morbidade, quando comparado à de medula óssea. Além disso, podem render 500 vezes mais células a partir da mesma quantidade de tecido, são geneticamente mais estáveis em culturas a longo prazo<sup>29,30</sup> e, devido à grande quantidade de tecido disponível, o lipoaspirado pode ser diretamente utilizado clinicamente sem cultura *in vitro*<sup>31</sup>. A utilização direta de lipoaspirado pode ser mais segura, uma vez que evita a manipulação *in vitro* de CTDA que poderia alterar as suas funções biológicas. Outra vantagem de usar lipoaspirado sem passar por cultura são as questões regulatórias do manuseio de células-tronco e posterior aplicação clínica, extremamente rígidas, as quais demandam alto custo e uma equipe adequadamente treinada<sup>32</sup>. Também, pode ser criopreservado por até 6 meses mantendo suas características e permitindo sua utilização terapêutica no futuro<sup>33</sup>. Sendo assim, provado o seu benefício seria mais factível sua aplicação clínica quando comparado às demais fontes de células-tronco.

Fez-se a opção por este modelo experimental após ter sido realizado um projeto-piloto onde foram testados retalhos de 10x4cm e 8x2cm, as concentrações de nicotina de 2mg/kg/dia e 1,2mg/kg/dia. Não foi possível o

manejo adequado da analgesia no grupo com retalhos de 10x4cm e ocorreram episódios de convulsão no grupo de 2mg/kg/dia de nicotina. Então optou-se por utilizar o modelo experimental de 8x2cm e a dose de nicotina de 1,2mg/kg/dia, a qual simula as concentrações de um tabagista pesado<sup>9,11-15</sup>.

Encontramos uma média maior de área de necrose dos retalhos 8x2cm realizados neste estudo quando comparado aos outros estudos descritos. Em um retalho cutâneo randômico em ratos de 10 x 4cm com injeção de nicotina subcutânea (proporção comprimento/base 2,5:1), é esperada uma necrose em média de 40% da área total do retalho cutâneo<sup>11</sup>. Entretanto, nos retalhos com 8cm de comprimento por 2cm de base, a proporção comprimento/base é maior 4:1. Então é esperado um percentual de necrose maior. Na literatura são descritos em média 40% sem adição de nicotina<sup>13-15</sup>. Não foi encontrado, na literatura, descrição de um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos de 8x2cm com adição de nicotina, o que explica o percentual de necrose da área total deste estudo ser maior que os demais descritos na literatura, 69,4%.

Com o tratamento com CTDA, reduzimos significativamente a área de necrose do retalho de 69,4% no grupo controle para 46% no grupo tratamento ( $p < 0,05$ ). Uma redução com média de 23,4% da área necrótica. Apesar de ter sido obtida uma redução significativa, a proporção de redução da área de necrose foi inferior aos demais estudos analisados. Neste estudo, houve uma redução de 69% para 46% da área total do retalho, o que representa uma redução de 34% da área de necrose no grupo tratamento, enquanto, nos outros estudos, a maioria obteve uma redução de necrose de 40% para 20% da área total do retalho, uma redução de 50% da área de necrose no grupo tratamento. Porém acreditamos que este modelo de retalho 8x2 com nicotina possa auxiliar

no teste de novos tratamentos. Uma vez que os ratos toleraram adequadamente maior área de necrose do retalho, conseqüentemente existe maior margem para avaliação de novos tratamentos e seu potencial de melhora da vascularização. Existem limitações neste estudo: embora a nicotina seja o principal subproduto do fumo do cigarro, a administração de nicotina no subcutâneo pode não representar as condições reais de um tabagista crônico, apenas os eventos agudos causados pela nicotina. Como alternativa, câmaras de tabagismo passivo poderiam ser utilizadas para garantir a presença de outros constituintes da fumaça de cigarros, porém o uso da câmara não foi aprovado pelo comitê de ética do hospital devido ao risco de a fumaça tóxica contaminar outros animais não envolvidos e os profissionais que participaram da pesquisa. Além disso, a frequência de exposição proposta nos modelos experimentais com fumo passivo não corresponde à dos fumantes, e o confinamento de animais em uma câmara pode resultar em hipóxia.

Devido à lipoaspiração de gordura ser uma prática recorrente na rotina do cirurgião plástico e de baixa morbidade, a aplicação de CTDA, sem isolamento e proliferação in vitro pré-tratamento, pode ser agregada na rotina como profilaxia de complicações em retalhos cutâneos, necessitando ainda de estudos clínicos para comprovar os achados encontrados neste modelo experimental.

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que a aplicação das CTDA em um modelo experimental de retalho cutâneo randômico em ratos com injeção de nicotina subcutânea reduz o percentual de necrose dos retalhos.

## REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society. Guide to quitting smoking. A word about success rates for quitting smoking. Disponível em: <http://www.cancer.org/healthy/stayawayfromtobacco/guidetoquittingsmoking/guide-to-quitting-smoking-success-rates>. Acessado em 21 de março, 2015.
2. Jeffery K. Krueger, M.D., and Rodney J. Rohrich, M.D.. Clearing the Smoke: The Scientific Rationale for Tobacco Abstinence with Plastic Surgery. PLASTIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY, September 15, 2001
3. Sorensen L. Wound Healing and Infection in Surgery: The Clinical Impact of Smoking and Smoking Cessation: A Systematic Review and Meta-analysis. Arch Surg. 2012;147(4):373-383. doi:10.1001/archsurg.2012.5
4. Gravante G, Sorge R, Araco F, Delogu D, Cervelli V. Wound infections in aesthetic abdominoplasties: the role of smoking. Plast Reconstr Surg. 2008;121:305e-310e.
5. Crig S, Riss TD. The effects of smoking on experimental skin flap in hamsters. Plast Reconstr Surg 1985;75:842-6.
6. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random-pattern skin-flap in the rat. Br J Plast Surg 1987;40(3):295-9..
7. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin-flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. Plast Reconstr Surg 1991;87(3):518-28.
8. Kaufman T, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz J, Klain M. Tobacco smoking: impairment of experimental flap survival. Ann Plast Surg 1984;13:468-72.
9. Campos H, Ferreira LM, Santos WLC, Araújo MCM. Effects of nicotine in skin flaps in rats. Acta Cir Bras. 2001;16(4):206-10.
10. Hassan WU1, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. Wound Repair Regen. 2014 MayJun;22(3):313-25. doi: 10.1111/wrr.12173
11. Russo CR, Leite MT, Gomes HC, Ferreira LM. Transcutaneous electrical nerve stimulation in viability of a random skin flap in nicotine-treated rats. Ann Plast Surg. 2006 Dec;57(6):670-2.
12. McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. Plast Reconstr Surg. 1965 Feb;35:177-82.



13. Rocha FP, Fagundes DJ, Rivoire HC, Rech FV, Almeida MW, Pires JA. Immunohistochemical expression of apoptosis and VEGF expression on random skin flaps in rats treated with hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine. *Undersea Hyperb Med.* 2011 May-Jun;38(3):167-74.
14. Rocha FP; Fagundes DJ,; Pires JA; Rocha FST. Efeito da oxigenação hiperbárica e da N-acetilcisteína na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. *Rev. Bras. Cir. Plást.* vol.26 no.4 São Paulo Oct./Nov./Dec. 2011
15. Rocha FP, Fagundes DJ,; Pires JA; Rocha FST . Does hyperbaric oxygenation have a protective effect on random skin flaps? An immunohistochemical study of cellular apoptosis and vascular endothelial growth factor. *Rev. Bras. Cir. Plást.* vol.28 no.2 São Paulo Apr./June 2013
16. Guimaraes, M.V.T. et al. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online]. 2013, vol.40, n.1, pp.49-54.
17. Van Adrichem, L. N. A., Hovious, S. E. R., van Strik, R., and van der Meulen, J. C. Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br. J. Plast. Surg.* 45: 9, 1992.
18. Dintenfass, L. Elevation of blood viscosity, aggregation of red cells, haematocrit values and fibrinogen levels in cigarette smokers. *Med. J. Aust.* 1: 617, 1975.
19. Ambrus, J. L., and Mink, I. B. Effect of cigarette smoking on blood coagulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 5: 428, 1964.
20. Leite MT1, Gomes HC, Percário S, Russo CR, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide as a block to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Dec;120(7):1819-22.
21. Uzun H, Bitik O, Çalış M, Aksöyler DY, Üstün GG, Kösemehmetoğlu K, Aksu AE. Varenicline increases random flap survival in rats submitted to nicotine. *J Plast Surg Hand Surg.* 2018 Jul 24:1-7.
22. Shah A1, Pfaff MJ, Assi R, Wu W, Steinbacher DM. PDE-5 inhibition improves skin flap viability in rats that are exposed to nicotine. *Microsurgery.* 2014 Jul;34(5):390-7.
23. Rinker B1, Fink BF, Barry NG, Fife JA, Milan ME. The effect of calcium channel blockers on smoking-induced skin flap necrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Mar;125(3):866-71.
24. Selçuk CT1, Kuvat SV, Bozkurt M, Yaşar Z, Gülsün N, İlgezdi S, Ula M, Ozalp B. The effect of hyperbaric oxygen therapy on the survival of random pattern skin flaps in nicotine-treated rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012 Apr;65(4):489-93.
25. Nezami BG, Rahimpour S, Sianati S, Kalbasi Anaraki D, Sadeghi M, Ghasemi M, Dehpour AR. Pharmacological preconditioning of random-pattern skin flaps with local FK506 in nicotine-treated rats: interaction with nitric oxide system. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 Dec;62(12):e643-4.
26. Hassan WU1, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014 May-Jun;22(3):313-25. doi: 10.1111/wrr.12173

27. Buravkova LB, Grinakovskaia OS, Andreeva EP, Zhambalova AP, Kozionova MP. [Characteristics of human lipoaspirate isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension]. *Tsitologiya* 2009; 51: 5–11
28. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 948–53
29. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; (13): 4279–95.
30. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009; (76): 56–66.
31. Lako M, Armstrong L, Stojkovic M. Induced Pluripotent Stem Cells : It Looks Simple but Can Looks Deceive? *Stem Cells* 2010; (28): 845–850
32. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; (24): 1294–301
33. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells •• basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; (25): 818–27.

## ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

### Use of derived adipose stem cells to reduce complications of cutaneous scarring in smokers: an experimental model in mice.

João Maximiliano Pedron Martins <sup>1, 2</sup>

Diego Dullius <sup>1</sup>

Fernanda Oliveira <sup>1</sup>

Elizabeth Cirne Lima<sup>1</sup>

Everton Hiraiwa <sup>1,3</sup>

Tulio Serrano <sup>1,3</sup>

Marcus Vinicius Martins Collares <sup>1-3</sup>

#### Corresponding author contact information:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro Santa Cecília. Porto Alegre / RS. Brasil. Tel: +55 51 33598232.

E-mail: [jmaximilianopm@gmail.com](mailto:jmaximilianopm@gmail.com)

<sup>1</sup> Plastic Surgery Department, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Post Graduate Program in Surgical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

<sup>3</sup> School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

## ABSTRACT

**Objectives:** To test the use of adipose-derived stem cells (ADSC) in reducing the necrosis area in an experimental model of cutaneous ischemic flap in rats submitted to subcutaneous nicotine injection to simulate a smoker patient.

**Methods:** In an experimental study, 30 rats were enrolled. Divided into two experimental groups of 15 animals all submitted to a subcutaneous nicotine injection to create an ischemic cutaneous flap on their backs. Other 10 animals were used only to obtain adipose tissue derived stem cells (ADSC). The first group (n = 15) received ADSC treatment at the end of surgery while the other group, the control (n = 15), received no other interventions. After euthanasia, a decal was performed on the whole area of the flap, accurately defining the transition from necrosis to healthy region. Photos of all animals were collected and evaluated by scales standardized by PaintAutocad- 2015 software to define the area of flap necrosis in each rat. Student T test were performed to compare the groups, considering a  $p < 0.05$  significant. Data were analyzed using SPSS IBM® 18 version.

**Results:** Through the analysis of the images by the program Paint-Autocad-2015 and the area of decal obtained by the transparent sheet, we obtained a mean of 46% necrosis of the total area of the flap in the treatment group and 69.4% in the control group. In the descriptive analysis, a mean of 3.7 cm of necrosis CI95% (3.2 - 4.2) was evident in the treatment group whereas a mean value of 5.56 CI 95% (5.2 - 5.9) was found in control group, with p value  $< 0.001$  for this comparison.

**Conclusions:** We concluded that the application of ADSC reduces the percentage of necrosis in an experimental model of randomized cutaneous flap in rats submitted to subcutaneous nicotine injection.

**Key words:** Stem cells, stem cells derived from adipose tissue, skin flap, ischemic skin flap, smoking.

## **Introduction:**

Cutaneous scarring is a complex phenomenon, in which small changes can lead to an undesirable pathological outcome. Intercurrences in this process are frequent in plastic surgeries, sometimes leading to unsightly results and frequently requiring reinterventions. A common and well-described complication in the literature is cutaneous necrosis secondary to chronic smoking and the patients' difficulty in stopping it for surgery. About 5% of patients are able to stop smoking before surgery, and this number increases to 15% after medical advice<sup>1</sup>. If active in the pre and postoperative periods, smoking generates an environment of ischemia and hypoxia of the surgical wound. Mainly because nicotine, which generates vasoconstriction in the microcirculation of the skin, decreases the distal blood flow in the flaps, which results in cutaneous necrosis and subsequent secondary infection<sup>2</sup>. Maintaining smoking in an elective surgical procedure can lead to a risk of delayed healing, dehiscence and infection up to three times higher in comparison to nonsmokers, which often leads to partial or total loss of flaps, secondary scarring and a negative impact on the aesthetic outcome<sup>3,4</sup>. Several clinical studies and experimental models associating tissue necrosis of flaps with smoking have been described<sup>5-8</sup>. To allow the evaluation of the damages caused by smoking, experimental models were created that induce the complications caused by smoking, in cutaneous flaps, through the subcutaneous injection of nicotine, without the need to produce toxic smoke, facilitating the realization of the studies. <sup>9</sup> The application of the Adipose Derived Stem Cells (ADSCs) in the cutaneous wound improves cicatrization by cell differentiation and mainly by its important improvement of paracrine action, increasing the stimulation to

neovascularization and regulating the coagulation cascade<sup>10</sup>. The objective of the study was to test the use of ADSCs in an experimental model of a randomized cutaneous flap in mice with subcutaneous nicotine injection to reduce necrosis area.

## **MATERIAL AND METHODS**

An experimental study, carried out at the Laboratory of Embryology and Cell Differentiation, at the Animal Experimentation Unit (UEA) and at the Experimental Pathology Unit, located at the Experimental Research Center of the Hospital. Forty male mice, *Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Wistar lineage Mammalia, weighing 250 to 300g young adults, 4-8 weeks, were obtained according to the criteria of the HCPA Animal Experimentation Unit. The rats were housed in the UEA-HCPA, according to the use pattern of this unit, where they received commercial ration and water ad libitum, under controlled temperature ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and air relative humidity ( $55\% \pm 5\%$ ) and photoperiod of 12 / 12 hours. Prior to initiating procedures, the animals were quarantined and acclimated for at least 15 days. In vivo procedures were carried out in accordance with Brazilian legislation, Law 11.794 (Official Gazette of the Union - 8/10/2008), which establishes procedures for the scientific use of animals and regulates the registration of Bioterrories and Experimental Centers. All procedures were based on the Brazilian Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes - DBCA (2016). The completion procedures follow the standards indicated by the CONCEA Guidelines for Euthanasia Practice (2013).

### **Experimental groups**

Thirty mice were divided into two experimental groups of ischemic cutaneous flap on the back of mice injected with subcutaneous nicotine. The first

group (n = 15) received ADSCs treatment at the end of surgery and the other group was the control group (n = 15). Both groups underwent euthanasia 7 days after surgery.

### **Nicotine Injection**

The animals treated with nicotine were injected into the subcutaneous tissue at a dose of 1.2 mg / kg / day, which corresponds to a dose equivalent to a heavy human smoker for a period of 7 days before surgery after the intervention , until the day of euthanasia without interruption. <sup>11</sup>

### **Collection and processing of adipose tissue to obtain mesenchymal stem cells**

For the collection of adipose tissue, 10 mice, *Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Wistar lineage Mammalia, weighing 250-300 g, young adults, 4-8 weeks young, were obtained and maintained as previously described. The animals had gonadal and abdominal adipose tissue collected aseptically, under general inhalation anesthesia, with Isoflurane, vaporized in 100% oxygen, at a dose of 5% for induction and 2% for maintenance, at 0.5L / min. After collection, euthanasia was performed through anesthetic overdose with isoflurane until the promotion of cardiorespiratory arrest. The fragments of adipose tissue were immediately sent to the Laboratory of Embryology and Cell Differentiation at the Experimental Research Center of HCPA, where they were submitted to enzymatic digestion for the isolation of ADSCs.

### **Obtaining MSC**

In a laminar flow hood, tissue from the donor animals was incubated in collagenase type I solution (1mg.mL<sup>-1</sup> in DMEM 9mM HEPES) for a period of one hour at 37 ° C. After, the enzyme was inactivated by the addition of



Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The cell suspension was centrifuged for 5 min at 2000 rpm, and the formed pellet was suspended again in DMEM medium, supplemented and plated. After isolation, the cells were cultured in DMEM, containing a low glucose concentration, supplemented with 15mM HEPES 9mM, 15% FBS and antibiotic solution of 100 units.mL<sup>-1</sup> of penicillin and 100mg.mL<sup>-1</sup> of streptomycin, at 37 ° C, in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity. After 24 hours of cultivation, the culture medium was aspirated and fresh medium added. When the cell culture reached 80% confluence, the adherent cells were removed with 0.05% trypsin-EDTA solution and subcultured in DMEM.

### **Surgical model**

The animals were submitted to general inhalation anesthesia with Isoflurane, vaporized in 100% oxygen, at a dose of 5% for induction and 2% for maintenance, at 0.5 L / min. For analgesia, tramadol hydrochloride (20mg.kg<sup>-1</sup>) was administered intraperitoneally (IP) and after induction of lesions, every 12 hours until euthanasia. A wide tricotomy of the dorsal region was performed, and the animals were placed in a ventral decubitus position to perform antisepsis of the surgical field with alcohol solution of 2% chlorhexidine gluconate. It was used an experimental model already described in the literature, cranial base flap, 8cm long and 2cm wide on the back of the animals. The flap is bounded by a line that joins the lower angles of the shoulder blades and the upper edges of the pelvic girdle bones. The flaps were raised from the superficial fascia of the skeletal muscles containing the skin and subcutaneous tissue (Figure 1.2). A plastic barrier (polyester / polyethylene) with the same dimensions (8x2) was interposed between the flap and the donor bed, preventing revascularization of the flap by

means of bedding vessels (Figure 3). Next, the flap was sutured with single stitches of 4-0 monofilament nylon thread in the same original position ("donor area"), spaced 1cm apart between stitches<sup>9,11-15</sup>. In the ADSCs treatment group, cells were used between the 3rd and 5th passage, in the approximate concentration of  $1 \times 10^6$  cells, suspended in 1ml of 0.9% NaCl. After finishing the suture throughout the flap was injected intradermally, with 1ml syringe and 27gauge needle, being 0.1ml every 1.5cm on the side of the flap, totalizing 0.4ml on each side of the flap and 0.2ml in the distal portion of the flap. After the procedure the animals were observed every 8 hours for the first 48 hours and thereafter daily for the remainder of the 7 day experiment. The mouse patterns were noted after the procedure to report any change in appetite or behavior. Death-anticipation measures were defined as a refinement procedure and protection / preservation of animal welfare, if the animals presented altered behavior, such as excessive weight loss, anorexia, signs of pain that could not be treated, following the recommendations of CONCEA (2013). There was no loss of the animal in the postoperative period or it was necessary to anticipate euthanasia due to failure of the analgesia protocol.



**Figure 1.** Detached Cutaneous Retail Template (8x2cm)



**Figure 2:** Mouse positioned for the surgical procedure



**Figure 3:** Plastic barrier properly positioned at the time of euthanasia. Rat left group treatment, right mouse control group.

### **Euthanasia:**

The animals were submitted to euthanasia with anesthetic overdose with Isoflurane, at a dose five times higher than the therapeutic dose, until the promotion of cardiorespiratory arrest, confirmed by a trained Veterinarian.

### **Necrosis area evaluation**

After euthanasia, a decal of the whole area of the flap will be performed, accurately defining the transition from necrosis to the healthy region. For this, a transparent plastic sheet was placed on the back of the animal with pen-marking. Then the area representing the necrosis will be cut and measured. By dividing the value obtained for necrosis by the total flap and multiplying the result by 100, the percentage of necrosis is obtained. In addition, all animals were photographed and evaluated by Scales standardized by the Paint-Autocad-2015

program and performed patchy patch analysis, recording in square centimeters the total area, area of viable vascularized tissue and area of necrotic tissue (Figure 5, 6) <sup>16</sup>.



**Figure 4.** Mouse of the control group at the time of euthanasia



## **Figure 5.** Rat of the treatment group at the time of euthanasia

### **Statistical analysis**

For statistical analysis, IBM SPSS version 18 software (SPSS Inc. IBM Company) was used. The main outcome variable was the area of necrosis, measured in cm<sup>2</sup>. For continuous and normal distribution variables, we used the Student's T test. The results were expressed as mean and standard deviation. We considered a significant difference when  $p < 0.05$  and the 95% confidence interval did not cross 1.00.

### **Results:**

#### **Comparison of the area of necrosis of the flap:**

30 *Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Wistar lineage mammalia were included in the study, which were submitted to ischemic cutaneous flaps on the back with subcutaneous nicotine injection. The weight ranged from 250 to 300g. All young adults between 4-8 weeks. There was no case that required measures of anticipation of death due to failure of the analgesia protocol, following CONCEA recommendations (2013). There was no loss of animal in the postoperative period. Two animals had episode of epistaxis after injection of nicotine and one convulsed, without need of any intervention.

Through the analysis of the images by the Paint-Autocad-2015 program and the decal area obtained by the transparent sheet, the necrosis length ranged from 2.4cm to 4.88cm in the treatment group, whereas in the control group it varied from 4.87 to 6 , 9cm. An average of 46% necrosis of the total flap area was obtained in the treatment group and 69.4% in the control group (TABLE 1 and 2).

**Table 1:** Results of the necrosis area in the rats of the ADSCs - treated group.

Rat (n=15)	Necrosis area (%)
1	35
2	56
3	50
4	33
5	59
6	56
7	56
8	42
9	58
10	34
11	50
12	61
13	30
14	40
15	39

**Table 2:** Results of the necrosis area in the rats of the ADSC - control group..

Rat (n=15)	Necrosis area (%)
1	61
2	64
3	74
4	61
5	81
6	64
7	66
8	69
9	66
10	71
11	62
12	74
13	76
14	86
15	67

In the descriptive analysis, a mean of 3.7 cm of necrosis (CI 3.2 - 4.2) and a mean of 5.56 (CI 5.2 - 5, 9)  $p < 0.001$  (TABLE 3).

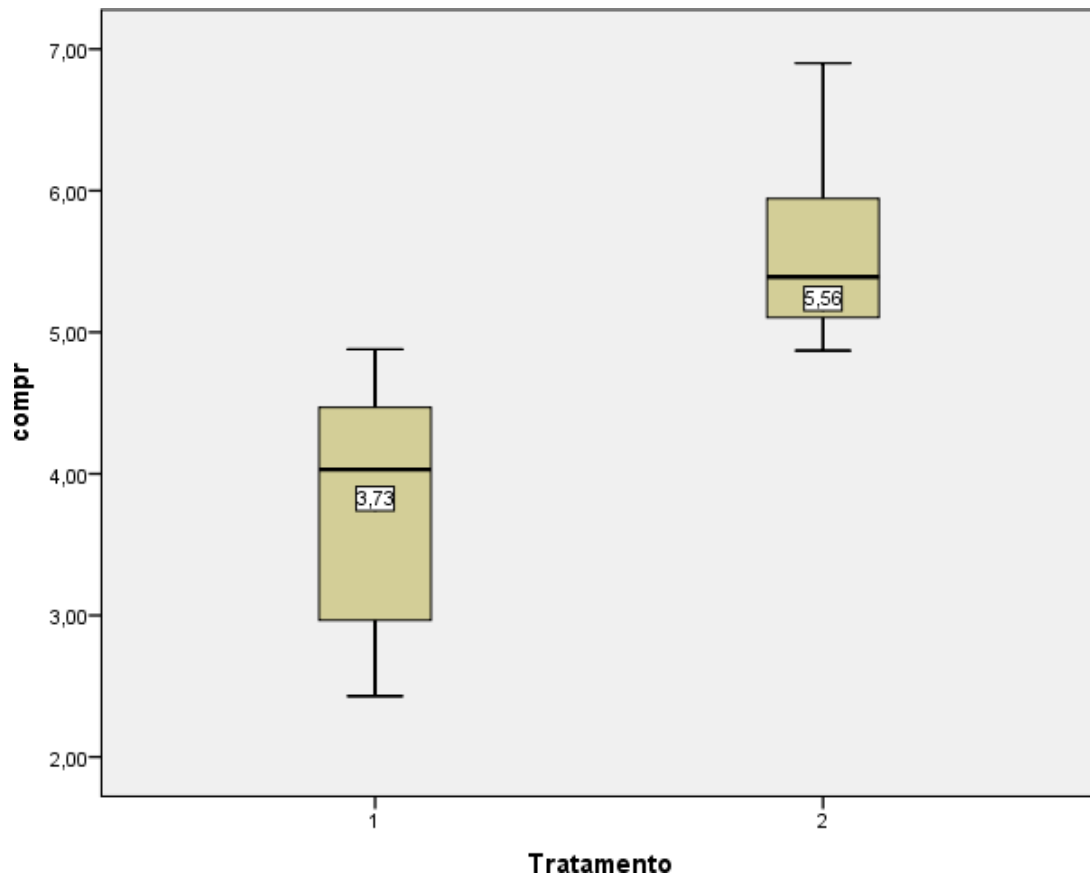
**Table 3:** Results of mean necrosis length in treated and control groups.

Variable	Treatment $\mu$ (DP)	Control $\mu$ (DP)	$\rho$
Length of necrosis (cm)	3,7 (+/-0,86)*	5,56 (0,61+/-)*	0,001**

\* Data with normal distribution represented by mean and DP.

\*\* Data obtained from the comparison of the means of the groups through Student's T-Test.

The mean and standard deviation of the necrosis area in the treatment and control group are plotted on the Boxplot graph which was used to evaluate the distribution of the data (FIGURE 6).



**Figure 6.** Mean and standard deviation in cm in the treatment group and



control group.

## **Discussion:**

Cigarette smoke is made up of nearly 4,000 chemicals, most of which are toxic to the body. When the skin flap vascularisation is studied in smokers, the main harmful substance is nicotine because it reduces perfusion of the flaps by vasoconstriction<sup>17</sup>, increased platelet adhesiveness<sup>18</sup> and reduced coagulation time<sup>19</sup>. The cutaneous flap is affected by intrinsic and extrinsic factors. Extrinsic factors can be systemic (infection, arteriosclerosis, hypotension and nutritional deficiency) or local (compression, tension or thrombosis of the anastomosis). The main intrinsic factor is inadequate blood flow due to arterial insufficiency in the distal part of the flap. Nicotine treatment in experimental skin flap models results in vasoconstriction, reducing blood flow, especially to the distal flap. This drug also impairs the healing of wounds in the inflammatory and epithelial phases<sup>11</sup>. Several measures have been described in an attempt to minimize the deleterious effects of smoking on the vascularization of the flaps, due to their potential for damage and mainly because even after counseling, 85% of patients continue to smoke before and after surgery<sup>1</sup>. The authors use the experimental model of mouse cutaneous flaps well established in the literature as a basis for testing new treatments<sup>12</sup>, adding nicotine injection in the subcutaneous to simulate a chronic smoker individual.

Russo et al described the use of transcutaneous electrical nerve stimulation (NTG) demonstrating increased viability of the cutaneous flap in mice treated with nicotine, 45% of mean necrosis in the control group and 21% in the group exposed to NTG, due to improvement of blood flow<sup>11</sup>. Leite MR et al.,

Used Dimethyl Sulfoxide as a blocker to the deleterious effect of nicotine demonstrating a mean area of necrosis of 20% while in the control group 40%, concluding that due to the specific antioxidant effect, the drug blocked the harmful effect of nicotine, acting primarily on the hydroxyl radicals, considerably reducing the deleterious effect of nicotine<sup>20</sup>. Uzun H. tested the use of Varenaclin before raising the flaps, describing a significant improvement in vascularization and percentage of flap necrosis, 49% in the control group and 22% in the Varenaclin group. Also, microangiographically showed that the vascularization was lower in the nicotine group and higher in the treatment group. Histologically, larger areas of necrosis, more severe inflammation and less vessel formation were observed in the nicotine group. Guimarães MVTN, described that with Arginine treatment at 300 mg / kg in mice exposed to nicotine, vessels counted through immunohistochemistry with anti-CD31 had a lower mean (2.9), when compared to the treatment group (4.3). The mean area of necrosis in the treated group was 17% while the mean of the control group was 45%. They attributed the effects of Arginine to a consequence of the drop in the blood concentrations of pyruvate, lactate and ketone bodies<sup>16</sup>. Shah A. et al. tested the ability of increased vasculogenesis and increased blood flow generated by the inhibition of phosphodiesterase-5 (PDE-5) in reducing the complications generated by nicotine. It concluded that there was a statistically significant reduction in the area of necrosis of the skin flap in mice exposed to nicotine when PDE-5 inhibited, this effect was dose dependent. When administered sildenafil twice daily, the animals exposed to nicotine had a reduction of more than 50% in cutaneous necrosis when compared to the control group, in a statistically significant way. When VEGF was analyzed, the amounts produced in the treatment group, mean of 4.0, were also statistically higher than in the control group, 2.9 of mean<sup>22</sup>. Rinker B et al.

tested the effect of calcium channel blockers on the percentage of necrosis area of the tobacco-induced skin flap in mice, concluded that calcium channel blockers, both Verapamil and Nifedipine, administered at the time of surgery and post- of the skin flap necrosis in animals exposed to nicotine, 27.2% and 26.3%, respectively, when compared to the control 36.3% of the mean <sup>23</sup>. Selçuk CT et al. used the therapy with hyperbaric oxygenation to reduce the area of necrosis in cutaneous flaps of mice exposed to nicotine, describing reduction with statistical relevance in the treatment group of 35.9% and in the control group 53.9%. Nezami BG et al. demonstrated that single, local and low doses of Tacrolimus reduced the area of skin flap necrosis in nicotine treated mice significantly, 28.3% in the treatment group and 53.9% in the control group by reducing the oxidative stress produced by nicotine<sup>25</sup>.

This study aims to test the use of ADSCs as a prophylaxis of vascular complications caused by nicotine in ischemic cutaneous flaps in mice. The difficulty of patients in stopping smoking follows a recurring problem in the routine of plastic surgeons. It is already proven that most of the patients continue smoking even after preoperative orientation, as well as the various complications that smoke generates in the vascularization of the tissues, cutaneous scarring, which can lead to serious complications and need for reoperation<sup>1-4</sup>. The application of the stem cells to the wound generates an important improvement of the cicatricial paracrine action, significantly increasing the secretion of VEGF and Ang1 in wounds up to five times. The elevation of these proangiogenic factors leads to the improvement of neovascularization<sup>26-28</sup>. Thus, in flaps with ischemic potential, such as that of smokers, can be used as a therapeutic option to increase neoangiogenesis and reduce necrosis secondary to vasoconstriction generated by nicotine.

For stem cell treatment, cells derived from adipose tissue were chosen. They are easily accessible in the routine of plastic surgeons and lower morbidity when compared to bone marrow. In addition, they can yield 500 times more cells from the same amount of tissue, are genetically more stable in long-term cultures<sup>29,30</sup> and because of the large amount of tissue available, liposuction can be directly used clinically without culture in vitro<sup>31</sup>. The direct use of liposuction can be safer, since it avoids the in vitro manipulation of ADSCs that could alter its biological functions. Another advantage of using liposuction without passing through culture are the extremely rigid regulatory issues of stem cell management and subsequent clinical application, which require high cost and a properly trained staff.<sup>32</sup> Also, they can be cryopreserved for up to 6 months while maintaining their characteristics and allowing its therapeutic use in the future<sup>33</sup>. Therefore, its benefit would be more feasible its clinical application when compared to the other sources of stem cells.

This experimental model was chosen after a pilot project where 10x4cm and 8x2cm flaps were tested and the nicotine concentrations of 2mg / kg / day and 1.2mg / kg / day were tested, as it was not possible to handle the analgesia in the group with 10x4cm flaps and frequent seizures in the 2mg / kg / day group of nicotine was chosen to use the 8x2cm experimental model and the nicotine dose of 1.2mg / kg / day, which simulates the concentrations of a heavy smoker<sup>9,11-15</sup>

We found a larger mean area of 8x2cm patch necrosis performed in this study when compared to the other studies described. In a random skin flap in 10 x 4cm mice with subcutaneous nicotine injection (2.5: 1 length / base ratio) a mean necrosis of 40% of the total cutaneous flap area is expected<sup>11</sup>. However, in the flaps with 8cm of length by 2cm of base the proportion length / base is greater

4: 1, then a higher percentage of necrosis is expected, in the literature they are described in average 40% without addition of nicotine<sup>13-15</sup>. A description of an experimental model of a rare cutaneous flap in 8x2cm mice with nicotine addition was not found in the literature, which explains the percentage of necrosis in the total area of this study being higher than the others reported in the literature, 69.4%.

With ADSCs treatment we significantly reduced the necrosis area of the flap from 69.4% in the control group to 46% in the treatment group ( $p < 0.05$ ). An average of 23.4% reduction of necrotic area. Although a significant reduction in the proportion of necrosis area reduction was obtained, it was lower than the other studies analyzed. In this study a reduction of 69% to 46% of the total area of the flap, representing a reduction of 34% of the area of necrosis in the treatment group, while in the other studies the majority obtained a reduction of necrosis from 40% to 20% of the total area of the flap, a 50% reduction of the area of necrosis in the treatment group. However, we believe that more studies are needed using the 8x2cm model with nicotine, since the rats adequately tolerated a greater area of necrosis of the flap, there is a greater margin for testing new treatments and their potential for vascularization improvement. There are limitations in this study, although nicotine is the major byproduct of cigarette smoke, nicotine administration in the subcutaneous may not represent the actual conditions of a smoker. Alternatively, passive smoking chambers could be used to ensure the presence of other constituents of cigarette smoke, but the use of the chamber was not approved by the hospital's ethics committee because of the risk of toxic smoke contaminating other non-involved animals and professionals who participated in the research. In addition, the exposure frequency proposed in experimental models with passive smoke does not correspond to that of

smokers, and confinement of animals in a chamber may result in hypoxia.

Because fat liposuction is a recurring practice in the plastic surgeon's routine and low morbidity, the application of ADSCs, without isolation and proliferation in vitro pre-treatment, can be routinely aggregated as prophylaxis of complications in cutaneous flaps, still requiring studies to verify the findings found in this experimental model.

## **CONCLUSION**

We conclude that the use of ADSCs in an experimental model of a randomized cutaneous flap in rats with subcutaneous nicotine injection reduces the percentage of necrosis of the flaps.

## REFERENCES

1. American Cancer Society. Guide to quitting smoking. A word about success rates for quitting smoking. Disponível em: <http://www.cancer.org/healthy/stayawayfromtobacco/guidetoquittingsmoking/guide-to-quitting-smoking-success-rates>. Acessado em 21 de março, 2015.
2. Jeffery K. Krueger, M.D., and Rodney J. Rohrich, M.D. Clearing the Smoke: The Scientific Rationale for Tobacco Abstinence with Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Sep 15;108(4):1063-73.
3. Sorensen L. Wound Healing and Infection in Surgery: The Clinical Impact of Smoking and Smoking Cessation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Surg*. 2012;147(4):373-383.
4. Gravante G, Sorge R, Araco F, Delogu D, Cervelli V. Wound infections in aesthetic abdominoplasties: the role of smoking. *Plast Reconstr Surg*. 2008;121:305e-310e.
5. Crig S, Rens TD. The effects of smoking on experimental skin flap in hamsters. *Plast Reconstr Surg* 1985;75:842-6.
6. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Dose and time effects of nicotine treatment on the capillary blood flow and viability of random-pattern skin-flap in the rat. *Br J Plast Surg* 1987;40(3):295-9.
7. Forest CR, Pang CY, Lindsay WK. Pathogenesis of ischemic necrosis in random-pattern skin-flaps induced by long-term low-dose nicotine treatment in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1991;87(3):518-28.
8. Kaufman T, Eichenlaub EH, Levin M, Hurwitz J, Klain M. Tobacco smoking: impairment of experimental flap survival. *Ann Plast Surg* 1984;13:468-72.
9. Campos H, Ferreira LM, Santos WLC, Araújo MCM. Effects of nicotine in skin flaps in rats. *Acta Cir Bras*. 2001;16(4):206-10.
10. Hassan WU1, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2014 MayJun;22(3):313-25.
11. Russo CR, Leite MT, Gomes HC, Ferreira LM. Transcutaneous electrical nerve stimulation in viability of a random skin flap in nicotine-treated rats. *Ann Plast Surg*. 2006 Dec;57(6):670-2.
12. McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg*. 1965 Feb;35:177-82.



13. Rocha FP, Fagundes DJ, Rivoire HC, Rech FV, Almeida MW, Pires JA. Immunohistochemical expression of apoptosis and VEGF expression on random skin flaps in rats treated with hyperbaric oxygen and N-acetylcysteine. *Undersea Hyperb Med.* 2011 May-Jun;38(3):167-74.
14. Rocha FP; Fagundes DJ,; Pires JA; Rocha FST. Efeito da oxigenação hiperbárica e da N-acetilcisteína na viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. *Rev. Bras. Cir. Plást.* vol.26 no.4 São Paulo Oct./Nov./Dec. 2011
15. Rocha FP, Fagundes DJ,; Pires JA; Rocha FST . Does hyperbaric oxygenation have a protective effect on random skin flaps? An immunohistochemical study of cellular apoptosis and vascular endothelial growth factor. *Rev. Bras. Cir. Plást.* vol.28 no.2 São Paulo Apr./June 2013
16. Guimaraes, M.V.T. et al. L-arginine action in cutaneous flap evolution under nicotine exposure in rats. *Rev. Col. Bras. Cir.* [online]. 2013, vol.40, n.1, pp.49-54.
17. Van Adrichem, L. N. A., Hovious, S. E. R., van Strik, R., and van der Meulen, J. C. Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br. J. Plast. Surg.* 45: 9, 1992.
18. Dintenfass, L. Elevation of blood viscosity, aggregation of red cells, haematocrit values and fibrinogen levels in cigarette smokers. *Med. J. Aust.* 1: 617, 1975.
19. Ambrus, J. L., and Mink, I. B. Effect of cigarette smoking on blood coagulation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 5: 428, 1964.
20. Leite MT1, Gomes HC, Percário S, Russo CR, Ferreira LM. Dimethyl sulfoxide as a block to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 2007 Dec;120(7):1819-22.
21. Uzun H, Bitik O, Çalış M, Aksöyler DY, Üstün GG, Kösemehmetoğlu K, Aksu AE. Varenicline increases random flap survival in rats submitted to nicotine. *J Plast Surg Hand Surg.* 2018 Jul 24:1-7.
22. Shah A1, Pfaff MJ, Assi R, Wu W, Steinbacher DM. PDE-5 inhibition improves skin flap viability in rats that are exposed to nicotine. *Microsurgery.* 2014 Jul;34(5):390-7.
23. Rinker B1, Fink BF, Barry NG, Fife JA, Milan ME. The effect of calcium channel blockers on smoking-induced skin flap necrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Mar;125(3):866-71.
24. Selçuk CT1, Kuvat SV, Bozkurt M, Yaşar Z, Gülsün N, İlgezdi S, Ula M, Ozalp B. The effect of hyperbaric oxygen therapy on the survival of random pattern skin flaps in nicotine-treated rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2012 Apr;65(4):489-93.
25. Nezami BG, Rahimpour S, Sianati S, Kalbasi Anaraki D, Sadeghi M, Ghasemi M, Dehpour AR. Pharmacological preconditioning of random-pattern skin flaps with local FK506 in nicotine-treated rats: interaction with nitric oxide system. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 Dec;62(12):e643-4.
26. Hassan WU1, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014 May-Jun;22(3):313-25. doi: 10.1111/wrr.12173.

27. Buravkova LB, Grinakovskaia OS, Andreeva EP, Zhambalova AP, Kozionova MP. [Characteristics of human lipoaspirate isolated mesenchymal stromal cells cultivated under a lower oxygen tension]. *Tsitologija* 2009; 51: 5–11.
28. Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 948–53.
29. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; (13): 4279–95.
30. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* 2009; (76): 56–66.
31. Lako M, Armstrong L, Stojkovic M. Induced Pluripotent Stem Cells : It Looks Simple but Can Looks Deceive? *Stem Cells* 2010; (28): 845–850.
32. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006; (24): 1294–301.
33. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue derived stromal cells basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; (25): 818–27.



## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo foi pioneiro no uso do tratamento com CTDA para as complicações causadas pela nicotina. Ainda não existem estudos clínicos abordando este assunto. O próximos estudos dessa linha de pesquisa serão destinados a testarem o uso das CTDA para tratamento das complicações isquêmicas causadas pelo tabagismo na cicatrização cutânea e posteriormente em retalhos cutâneos.