

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

**TERAPIA CELULAR APLICADA EM DIFERENTES FASES DA**  
**CICATRIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS**  
**WISTAR**

**FERNANDA REGINA LOSS**

**2018**

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

**TERAPIA CELULAR APLICADA EM DIFERENTES FASES DA  
CICATRIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS  
WISTAR**

**Autora: Fernanda Regina Loss**

**Orientador: Emerson Antonio Contesini**

**Co-orientador: Elizabeth Obino Cirne-Lima**

**Tese apresentada como requisito para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências  
Veterinárias, na área de concentração de  
Cirurgia Veterinária, na Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul.**

**Porto Alegre**

**2018**

## CIP - Catalogação na Publicação

Loss, Fernanda Regina

Terapia Celular aplicada em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas em ratos Wistar / Fernanda Regina Loss. -- 2018. 89 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientador: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Terapia Celular. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Ferida crônica. 4. Cicatrização de feridas. 5. Imunomodulação. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Cirne-Lima, Elizabeth Obino, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**TERAPIA CELULAR APLICADA EM DIFERENTES FASES DA  
CICATRIZAÇÃO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CRÔNICAS EM RATOS  
WISTAR**

Elaborada por

**Fernanda Regina Loss**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Doutor em Ciências Veterinárias**

**Comissão Examinadora**

---

**Emerson Antonio Contesini, Dr., UFRGS**

**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Ana Helena da Rosa Paz, Dra., UFRGS**

---

**Luciana Sonne, Dra., UFRGS**

---

**Fernanda dos Santos de Oliveira, Dra., HCPA**

## Agradecimentos

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-graduação de Ciências Veterinárias da UFRGS e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA, em especial ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, pela oportunidade, acolhida, pelos ensinamentos e ao Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos – FIPE, pelo apoio financeiro para que este estudo pudesse ser realizado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini, por ter me acolhido ao longo destes 8 anos e principalmente, pela confiança, pela amizade, pelo cuidado de “pai”, pelos ensinamentos, por ter podido conviver com alguém que tanto tem a ensinar e a orientar, não só profissionalmente, mas pessoalmente também. Foi um grande privilégio poder fazer parte disso tudo. Serei eternamente grata.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima por ter me recebido tão bem no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, desde 2011, pela orientação, pela amizade, pela parceria e confiança.

Aos meus pais Elton e Mari que mesmo sem a melhor condição financeira e morando longe, me apoiaram e me ajudaram da forma que puderam, sempre me incentivando na busca dos meus objetivos.

Ao meu amor, meu marido, meu melhor amigo e parceiro de vida Cesar Dias Freire. Obrigada por estar sempre ao meu lado, me apoiando, me incentivando, e torcendo pelas minhas conquistas, mais que eu mesma! Você é a minha vida! Gratidão eterna pela participação ímpar que tu tiveste em todos os sentidos, nestes quatro anos de doutorado. Obrigada por anestesiá-los meus ratinhos, fazendo com que eles não sentissem dor e tivessem o melhor pós-operatório! Te amo sempre!

À minha querida Profa. Dra. Adriana Costa da Motta, agradeço imensamente pela dedicação que tiveste na leitura das lâminas de HE, pelo incentivo, amizade e parceria.

À Unidade de Experimentação Animal do HCPA, a todos funcionários, em especial, a enfermeira Marta Justina Giotti, por estar sempre pronta a ajudar e pelo auxílio durante todo o período da fase experimental.

À minha querida amiga e colega de profissão, Daniela Campagnol, obrigada, por todo suporte, apoio, dedicação comigo e com este trabalho, por toda ajuda durante os

procedimentos. Tua amizade é muito importante, trouxe leveza, conforto e certamente fez toda diferença para que tudo ocorra da melhor forma.

Aos bolsistas de iniciação científica pelo apoio durante o experimento, pela parceria e amizade: Germano Filipe Grings, Calvin Braga Gnoatto, Martina Stapenhorst, Débora Zanini Gotardi e a todos os demais, que de uma forma ou de outra, participaram em alguma fase do experimento, ou ao longo destes 4 anos.

Às minhas queridas amigas e colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, pela ajuda em diversas fases do estudo, pelos ensinamentos, por cuidarem tão bem das “celulinhas”: Paula Barros Terraciano, Isabel Cirne-Lima, Laura Silveira Ayres e Fernanda dos Santos de Oliveira.

Ao Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, à Dra. Francine Hehn de Oliveira, à Emily Ferreira Salles Pillar e à Flávia, por toda contribuição, por estarem sempre dispostas a ajudar e pelo auxílio na confecção e padronização das lâminas de histologia e imunohistoquímica, pela leitura das lâminas de HE e pelo auxílio com as fotos e programa Image J.

Aos meus animais, em especial a Julinha, doce e companheira, participou de muitos momentos, sempre me dando amor, carinho e me transmitindo paz.

Aos animais, especialmente, os que doaram suas vidas em prol deste e de diversos outros estudos, sempre com ótimas contribuições científicas, com o objetivo de aprimorar e melhorar os tratamentos e qualidade de vida de animais e humanos.

Aos professores, membros da banca examinadora, por terem aceito o convite, pela disponibilidade e por todas as contribuições.

A todos os professores da UFRGS, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional, seja, no aprendizado transmitido durante as disciplinas, ou até mesmo, simplesmente sanando uma dúvida qualquer, nos corredores do HCV.

Meu sincero muito obrigada!

## **Terapia celular aplicada em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas em ratos wistar**

Autora: Fernanda Regina Loss

Orientador: Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima

### **RESUMO**

Células-tronco mesenquimais (CTMs) representam uma terapia promissora na medicina regenerativa, não apenas por sua capacidade de diferenciação, mas também pelo seu tropismo por lesões, por seus efeitos imunomodulatórios e por sua bioestabilidade quando cultivada e expandida *in vitro*. O benefício das CTMs na regeneração celular, tem sido bastante evidente, retratando melhora significativa da cicatrização cutânea, baseada no efeito parácrino destas células, que atuam principalmente na ação anti-inflamatória. Este estudo teve por objetivo avaliar a terapia celular aplicada nas diferentes fases da cicatrização de feridas cutâneas crônicas. Para isso, foram utilizados 96 ratos Wistar, machos, com oito semanas de idade, variando entre 250 a 300 gramas de peso. Do total de 96, 24 animais serviram como doadores de gordura gonadal para cultura e isolamento de CTMs. Os outros 72 foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: C (controle), CTM1 (1 aplicação de CTM) e CTM2 (2 aplicações de CTM). Estes grupos foram subdivididos em três diferentes períodos de tempo para avaliação: 7, 14 e 21 dias. Os tratamentos com CTM foram realizados aos 0 e 5 dias após a cronificação das feridas. Nos dias de eutanásia (7, 14 e 21 dias), foram coletados fragmentos de ferida para avaliação microscópica (HE e imunoistoquímica) e macroscópicas das feridas. O grupo CTM2-21 dias apresentou maior taxa de contração ( $p < 0,001$ ). O colágeno I, o colágeno III e o FGF apresentaram em média diferença estatisticamente significativa entre os grupos, independente do dia da avaliação ( $p < 0,001$ ). A taxa de contração (TC) e a marcação de Ki67 apresentaram em média diferentes comportamentos entre grupos e período de avaliação ( $p$  Interação = 0,039 e  $p$  Interação = 0,018 respectivamente). O grupo CTM1 apresentou menor frequência de úlcera ( $p < 0,05$ ). O grupo CTM1-7 dias apresentou maior índice de inflamação crônica, enquanto que os demais grupos apresentaram inflamação sub-aguda ( $p = 0,006$ ). Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a terapia celular beneficia a cicatrização de

feridas crônicas, e que duas aplicações de CTMs promovem maior taxa de contração, quando avaliadas no 21º dia.

**Palavras-chave:** ação parácrina, célula-tronco mesenquimal, cicatrização de feridas, ferida crônica, imunomodulação, rato, terapia celular



## **Cell therapy applied at different stages of healing in the treatment of chronic wounds in a murine model**

Author: Fernanda Regina Loss

Supervisor/Advisor: Emerson Antonio Contesini

Co-supervisor: Elizabeth Obino Cirne-Lima

### **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells are a promising therapy in regenerative medicine, not only because their differentiating ability, but also due to their tropism to lesions, their immunomodulatory effects and their biostability when cultured and expanded in vitro. The benefits of MSCs in cell regeneration has been quite evident promoting a significant increase in cutaneous healing, based on the paracrine effect, which acts mainly on the anti-inflammatory action. The aim of this study was to evaluate cell therapy applied in different cicatrization phases of cutaneous chronic wounds. For this were used 96 male Wistar rats, eight weeks old, weighing 250 to 300 grams. Of this total, 24 animals served as donors of gonadal fat for culture and isolation of MSCs. The other 72 were randomly divided into 3 groups: C (control), MSC1 (1 MSC application) and MSC2 (2 MSC applications). These groups were subdivided into three different time periods for evaluation: 7, 14 and 21 days. MSCs treatments were performed at 0 and 5 days after wound chronification. Wound and scar macroscopic evaluation was made, and wound fragments were collected for microscopic evaluation (HE and immunoistochemistry) at evaluation days. MSC2-21 days group had the biggest contraction rate ( $p < 0,001$ ). Mean collagen I, collagen III and FGF were significantly different between groups, in all evaluation days ( $p < 0,001$ ). Means contraction rate and Ki67 mark were different between groups and evaluation days ( $p_{\text{Interaction}} = 0,039$  and  $p_{\text{Interaction}} = 0,018$  respectively). MSC1 group had less frequent ulcer ( $p < 0,05$ ). MSC1-7 days had more chronic inflammation rate, while the other groups had subacute inflammation ( $p = 0,006$ ). The study results concludes that cell therapy benefits chronic wound healing, and two MSC application promotes greater contraction rate evaluated after 21 days of healing.

**Key-words:** cellular therapy, chronic wound, wound healing, immunomodulation, mesenchymal stem-cell, paracrine action, rat

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Coleta de tecido adiposo gonadal em rato Wistar .....48
<b>FIGURA 2</b>	Confecção da ferida cirúrgica, com auxílio de trépano corneal de 10cm de diâmetro .....51
<b>FIGURA 3</b>	Caracterização das ADSCs obtidas a partir de tecido adiposo gonadal de rato Wistar. <b>A)</b> Diferenciação adipogênica detectada pela coloração <i>Oil Red</i> . HE, 100X. <b>B)</b> Diferenciação condrogênica detectada pela coloração <i>Alcian Blue</i> . HE, 400X. <b>C)</b> Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin. HE, 400X .....53
<b>FIGURA 4</b>	Aspectos macroscópicos das feridas, nos diferentes momentos: primeira aplicação, segunda aplicação e eutanásia. Cada coluna contém fotos das feridas de cada grupo. As fotos demonstram que aos 21 dias de avaliação, as feridas estavam completamente cicatrizadas, inclusive apresentando cicatrizes esteticamente melhores .....55
<b>FIGURA 5</b>	<b>A)</b> Presença de úlcera, hemorragia e angiogênese abundantes em animal do grupo CTM2-14 dias. HE, 100X. <b>B)</b> Presença de fibrose e inflamação abundante em animal do grupo C-7 dias. HE, 100X .....58
<b>FIGURA 6</b>	<b>A)</b> Imunomarcção do colágeno III em animal do grupo CTM2- 21 dias. IMQ, 200X. <b>B)</b> Imunomarcção de colágeno I em animal do grupo CTM1-21 dias. IMQ, 200X .....61

**FIGURA 7** Imunomarcaç o do FGF em animal do grupo CTM1-14 dias.  
IMQ, 100X  
.....61

**FIGURA 8** Microscopia eletr nica de varredura (MEV) em animal do grupo  
CTM2-7 dias, demonstrando cicatriza o completa da ferida, com  
crescimento de f liculos pilosos  
.....61

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

<b>TABELA 1</b>	Resultado das comparações múltiplas da frequência de úlceras entre grupos e do tipo de inflamação entre grupos e dia de eutanásia.....56
<b>TABELA 2</b>	Descrição do tipo da inflamação segundo grupos e dia de eutanásia e resultado dos testes de associação .....57
<b>GRÁFICO 1</b>	Taxa de contração (TC) das feridas, dos diferentes grupos, ao longo dos períodos de avaliação. Percebe-se que o grupo CTM2, teve maior TC aos 21 dias de avaliação, seguido do grupo CTM1-14 dias, os quais demonstraram TC de mais de 95%. As TC avaliadas aos 7 dias de avaliação, independente do grupo, foram menores que os demais períodos avaliados .....55
<b>GRÁFICO 2</b>	Imunomarcção de VEGF. Observa-se maiores níveis de VEGF nos grupos Controle e CTM1, principalmente aos 7 e 14 dias (fases inflamatória e proliferativa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos .....57
<b>GRÁFICO 3</b>	Imunomarcção do Ki67. O grupo CTM1-7 e 14 dias, demonstra níveis estatisticamente maiores que no grupo controle ( $p = 0,013$ e $p = 0,011$ respectivamente). O grupo CTM1-14 dias apresentou maior valor médio de Ki67 que o grupo CTM2 ( $p < 0,001$ ) .....58
<b>GRÁFICO 4</b>	Imunomarcção do colágeno tipo I. O grupo CTM2 foi em média, estatisticamente menor que os demais grupos .....59

**GRÁFICO 5** Imunomarcção do colágeno tipo III. O grupo CTM2 foi em média, estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) .....60

**GRÁFICO 6** Imunomarcção do FGF. O FGF apresentou diferença média entre todos os grupos independente do dia da eutanásia ( $p < 0,001$ ), sendo menor no grupo CTM2 e maior no grupo controle .....60

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ADSC</b>	do inglês, <i>adipose derived stem cells</i>
<b>ATRA</b>	Ácido trans-retinóico
<b>C</b>	Controle
<b>C</b>	Contração
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética para Uso de Animais
<b>cm</b>	Centímetro
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CTM1</b>	Células-tronco mesenquimais (1 aplicação)
<b>CTM2</b>	Células-tronco mesenquimais (2 aplicações)
<b>CTMs</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>d0</b>	Dia zero
<b>d5</b>	Dia cinco
<b>d7</b>	Dia sete
<b>d14</b>	Dia 14
<b>d21</b>	Dia 21
<b>DMEM</b>	do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>

<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
<b>FGF</b>	Fator de crescimento de fibroblastos, do inglês <i>fibroblasts growth factor</i>
<b>FGF-2</b>	Fator de crescimento de fibroblasto II, do inglês <i>fibroblasts growth factor-2</i>
<b>GPx</b>	Glutationa peroxidase
<b>h</b>	Hora
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HE</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>HGF</b>	Fator de crescimento de hepatócitos, do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intercelular -1, do inglês <i>intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>ID</b>	Intradérmico
<b>IGF-1</b>	Fator 1 de crescimento semelhante à insulina, do inglês, <i>insulin-like growth factor-1</i>
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMQ</b>	Imunoistoquímica
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>KGF</b>	Fator de crescimento de queratinócitos, do inglês <i>keratinocyte growth factor</i>
<b>L/min</b>	Litros por minuto
<b>LB</b>	Linfócitos B
<b>LT</b>	Linfócitos T



<b>MC</b>	Método exclusivo mecânico
<b>MCP-1</b>	proteína quimiotática 1 para macrófago
<b>ME</b>	Método mecânico enzimático
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MHC</b>	Complexo maior de histocompatibilidade
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
<b>MLG</b>	Modelos lineares generalizados
<b>MMP</b>	Metaloproteinases de matriz
<b>MSC</b>	do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	do inglês, <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NK</b>	do inglês, <i>Natural Killers</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>°C</b>	graus
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfato, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SC</b>	Subcutâneo

<b>SDF-1</b>	Fator derivado de célula estromal, do inglês <i>stromal cell-derived factor</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SMA-<math>\alpha</math></b>	Actina do músculo liso, do inglês <i>alpha-actin-2</i>
<b>SOD</b>	Dismutase superóxido, do inglês <i>superoxide dismutase</i>
<b>STC-1</b>	do inglês <i>stanniocalcin-1</i>
<b>TC</b>	Taxa de contração
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador beta, do inglês <i>transforming growth factor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
<b>UEA</b>	Unidade de experimentação animal
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Micrograma
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. CAPÍTULO 1 - O uso da terapia celular no tratamento de feridas agudas e crônicas – Revisão .....</b>	<b>23</b>
<b>3. CAPÍTULO 2 - Células-tronco mesenquimais aplicadas em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas em ratos Wistar .....</b>	<b>43</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>82</b>
<b>5. ANEXOS 1 .....</b>	<b>83</b>
<b>6. ANEXOS 2 .....</b>	<b>88</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O estudo acerca de feridas cutâneas crônicas tem se mostrado cada vez mais importante. Tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária, é extremamente comum a ocorrência destas, que muitas vezes, apresentam difícil tratamento com a terapia convencional. As feridas crônicas ocorrem em cerca de 1 a 1,5% de toda população de países desenvolvidos. Na Europa, de 2 a 4% do orçamento de saúde é destinado à terapia de feridas crônicas (ZAHOREC et al., 2015). Estima-se que, no ocidente, de 1 a 2% da população irá desenvolver uma lesão crônica durante a vida (OTERO-VIÑAS; FALANGA, 2016). Estima-se ainda que no mundo todo, os custos para tratamentos de feridas crônicas irão ultrapassar os 22 bilhões por ano, até 2020 (BERTOZZI et al., 2017).

Ferida crônica é descrita como uma ruptura estrutural da pele, alterando sua arquitetura e funcionalidade (MARFIA et al., 2015). Feridas crônicas podem ser decorrentes de neuropatia, trauma, úlcera isquêmica, isquemia, doença arterial periférica (ZOU et al., 2012) e ainda, queimadura (RODGERS; JADHAV, 2017).

Células-tronco mesenquimais, (CTMs) são conhecidas pela sua multipotencialidade, pelo seu potencial de renovação e diferenciação em um vasto número de tipos celulares (OTERO-VIÑAS; FALANGA, 2016), bem como suas habilidades de imunomodulação e ação parácrina, que por meio de liberação de fatores de crescimento, promovem fechamento acelerado da lesão, aumento da proliferação da angiogênese, diminuição da inflamação, aumento do remodelamento da matriz extracelular, contribuindo assim, para a cicatrização de feridas, num tempo menor, e forma mais eficiente, devolvendo estrutura e funções normais da pele (LEE et al. 2016).

Se tem estudado a aplicação clínica da terapia celular, como uma opção de tratamento para feridas de difícil cicatrização. Embora ainda existam muitas dúvidas quanto aos mecanismos de ação desta terapia, alguns fatores podem ser citados como benéficos à regeneração e cicatrização: aumento dos níveis de colágeno dérmico, aumento do número de fibroblastos e angiogênese (LI et al., 2016), bem como aumento dos fatores pro-angiogênicos (BERTOZZI et al., 2017), e diminuição significativa da inflamação em decorrência da inibição das citocinas pró-inflamatórias (ZAHOREC et al., 2015).

Assim, esta tese teve por objetivos:

a) Geral

- ❑ Investigar os efeitos da terapia celular com CTMs, provenientes de tecido adiposo, aplicadas nas fases inflamatória e de proliferação, para tratamento de feridas crônicas induzidas por queimadura química em ratos Wistar.

b) Específicos

- ❑ Avaliar a evolução da taxa de contração de feridas crônicas tratadas com CTMs, através de medição com paquímetro digital;
- ❑ Registrar macroscopicamente a qualidade cicatricial por meio de imagens fotográficas;
- ❑ Analisar macroscopicamente a presença de sinais flogísticos como presença de secreções, infecção, crosta, edema, hemorragia, sinais de auto-mutilação;
- ❑ Avaliar o peso e comportamento dos animais, levando em consideração o estresse causado pela manipulação e isolamento;
- ❑ Avaliar microscopicamente, através de histopatologia, pela coloração de HE, presença de úlcera, inflamação, graduação da inflamação, fibrose, angiogênese e hemorragia, de feridas crônicas tratadas com CTMs;
- ❑ Quantificar microscopicamente, através de imunistoquímica, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), através do anticorpo FGF2, fator de crescimento endotelial vascular, através do anticorpo anti-VEGF, presença de colágeno I e III, através dos anticorpos específicos para colágenos do tipo I e III e proliferação celular através do antígeno Ki67;
- ❑ Determinar qual o melhor protocolo de aplicações de CTMs regeneram o tecido de forma mais rápida e esteticamente melhor;
- ❑ Comparar através dos resultados obtidos as terapias com uma e duas aplicações de CTM;

- ❑ Comparar os resultados obtidos e verificar qual a melhor terapia obteve resultados mais satisfatórios e que regeneraram mais rapidamente a ferida crônica.

Desta forma, a presente tese foi dividida em dois artigos formatados conforme o periódico ao qual cada um será submetido. O primeiro artigo refere-se a uma revisão bibliográfica sobre feridas de pele e terapia celular; e o segundo artigo refere-se a terapia celular como tratamento para ferida crônica induzida e a comparação entre uma e duas aplicações.

## 2. CAPÍTULO 1

### **O uso da terapia celular no tratamento de feridas agudas e crônicas – Revisão**

Fernanda Regina Loss, Paula Barros Terraciano, Cesar Dias Freire, Germano Filipe Grings, Clavin Braga, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Emerson Antonio Contesini

Manuscrito a ser submetido para a revista *Semina Ciências Agrárias*.

## **O uso da terapia celular no tratamento de feridas aguda e crônicas– Revisão**

### **Use of cell therapy in the treatment of acute and chronic wounds - Review**

**Fernanda Regina Loss<sup>1</sup>, Paula Barros Terraciano<sup>2</sup>, Cesar Dias Freire<sup>3</sup>, Germano Filipe Grings<sup>4</sup>, Calvin Braga Gnoatto<sup>4</sup>, Elizabeth Obino Cirne-Lima<sup>5</sup>, Emerson Antonio Contesini<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre-RS.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora, Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia (PPGGO), Hospital de Clínicas de Porto Alegre-RS.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Doutor, Anestesiista volante e pesquisador convidado, Porto Alegre-RS.

<sup>4</sup> Aluno de graduação do curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre-RS.

<sup>5</sup> Bióloga, Doutora, Professora na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre-RS.

<sup>6</sup> Médico Veterinário, Doutor, Professor na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre-RS.

## **RESUMO**

A terapia celular surgiu como uma promissora abordagem terapêutica, para uma série de alterações envolvendo o maior órgão do corpo humano: a pele. Células-tronco mesenquimais (CTMs), possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em linhagens distintas, e



muitos estudos comprovam sua capacidade de melhora da cicatrização através do seu efeito e sinalização parácrinas. Os mecanismos das CTMs, envolvidos no processo de reepitelização, ainda não são totalmente conhecidos e estabelecidos. No entanto, estudos mostram sua ação em todas as fases da cicatrização, inibição a resposta inflamatória, aumentando a angiogênese, remodelando a matriz extracelular, liberando fatores de crescimento que auxiliam positivamente no reparo, além de favorecer a regeneração tecidual. Desta maneira, o presente trabalho tem por objetivo trazer uma revisão bibliográfica sobre os estudos atuais, abordando aspectos da terapia celular como tratamento para feridas aguda e crônicas.

**Palavras-chave:** células-tronco mesenquimais, diferenciação celular, efeito parácrino, cicatrização de feridas

### **ABSTRACT**

Cell therapy emerged as a promising therapeutic approach to a series of injuries of the largest organ in the human body: the skin. Mesenchymal Stem Cells (MSC) have the capacity of self-renewal and differentiation in distinct lineages, and many studies confirm their capacity to improve wound healing through their paracrine signaling effects. The mechanisms of MSC involved in the reepithelization process are not fully known and established yet. However, studies describe its action in all stages of wound healing, inhibiting inflammatory response, increasing angiogenesis, remodeling extracellular matrix, releasing growth factors which helps positively the wound repair. The MSC also improves skin regeneration, normal organic functions and architecture restoration, even avoiding hypertrophic scars. The present study objectives to review current literature addressing cell therapy aspects as treatment for acute and chronic wounds.

**Key-words:** mesenchymal stem-cell, cellular differentiation, paracrine effect, wound healing

### **INTRODUÇÃO**

Os primeiros transplantes de células estaminais, ocorreram na década de 1950, nos quais utilizaram células de medula óssea no intuito de reconstituir a medula de pacientes submetidos à quimioterapia (HARMAN, 2013).

Atualmente, o termo célula-tronco se refere às células precursoras que possuem capacidade de diferenciação e autorrenovação, podendo originar vários tecidos (LI et al., 2015). Com relação à potencialidade dessas células denominam-se totipotentes, pluripotentes e multipotentes, (BLOW, 2008; AMORIN et al., 2012). As totipotentes correspondem à fase do embrião recém-formado, com até oito células e com capacidade de gerar um novo organismo inteiro, incluindo tanto os tecidos embrionários, quanto os extraembrionários. As pluripotentes podem gerar vários tipos celulares de um indivíduo adulto, ou seja, de todos os três folhetos embrionários: ectoderma (tecidos epidérmicos e nervosos), mesoderma (músculos, ossos e sangue) e endoderma (fígado, pâncreas, trato gastrointestinal e pulmões). Contudo, por não formarem tecidos extraembrionários, não possuem a capacidade de gerar um indivíduo completo. Células multipotentes apresentam capacidade de gerar uma quantidade limitada de tipos celulares (CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010).

O sangue de cordão umbilical (MALHOTRA et al., 2016) e a gordura da lipoaspiração (RAPOSIO; SIMONACCI; PERROTTA, 2017), também apresentam células aderentes com aspecto de CTM, sendo que células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) têm sido aplicadas no reparo de lesões cutâneas agudas e crônicas (OTERO-VIÑAS; FALANGA, 2016), e em cirurgias plásticas reconstrutivas (CHENG et al., 2013; DERBY et al., 2014).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein e colaboradores em 1966 (YANG et al., 2013) e têm sido alvo de uma infinidade de estudos e trabalhos experimentais devido a sua plasticidade, capacidade de auto-renovação e de diferenciação em células altamente especializadas como osteoblasto, adipócito, condrócito e miócito (LIU et al., 2017; MALHOTRA et al., 2016). Estas células correspondem a uma pequena população celular da medula óssea, compondo cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (ZAGO & COVAS, 2006). Entretanto, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência ou semi-induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de culturas definidas (MALHOTRA et al., 2016).

O tecido adiposo consiste em uma fonte alternativa para obtenção de CTMs adultas. Além de estarem presentes em grandes quantidades nestes tecidos, a coleta de

tecido gorduroso pode ser realizada sob o efeito de anestesia local, sendo rápida, segura e indolor para o paciente/doador (VÉRITER et al., 2015). Malhotra et al. (2016) sugeriram que doadores jovens são os mais indicados, pois possuem células com maior propensão à proliferação e maior vida útil, quando comparado a doadores mais velhos.

As CTMs, moléculas bioativas como as de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitem a interação com demais células, fazendo com que atuem modulando a resposta inflamatória, a angiogênese e a mitose das células envolvidas no processo de reparo tissular (CHEN et al., 2016; KUO et al., 2011).

## **DESENVOLVIMENTO**

### **Terapia celular na cicatrização**

As CTMs estão presentes nas fases inflamatória, de proliferação e de remodelamento da cicatrização (MALHOTRA et al., 2016). Sua taxa de diferenciação, a qual contribuiria para a regeneração do tecido, seria limitada por uma pequena quantidade de células que sobreviveriam no local da lesão, fazendo com que sua ação parácrina fosse o principal mecanismo para a redução da inflamação. Resultam na promoção da angiogênese, aumento da formação do tecido de granulação, aumento da reepitelização, regulação da matriz extracelular, induzindo assim, através de seu efeito imunomodulador e reparador, por meio dos efeitos regenerativos, o fechamento acelerado de feridas (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012a; KUO et al., 2011; LEE, D.E; AYOUB, N; AGRAWAL, 2016; MAXSON et al., 2012; UYSAL et al., 2014). O benefício das CTM na regeneração celular tem sido bastante evidente, retratando melhora significativa da cicatrização cutânea em estudos experimentais, baseado no efeito parácrino destas células (LEE, D.E; AYOUB, N; AGRAWAL, 2016).

Sendo assim, as CTMs apontam para grandes avanços na medicina regenerativa (BERTOZZI et al., 2017) não apenas por sua capacidade de diferenciação, mas também pelo seu tropismo por lesões, por seus efeitos imunomodulatórios e por sua bioestabilidade quando cultivada e expandida *in vitro* (WANG, et al., 2016).

Foram comparados diferentes métodos de isolamento de ADSCs, para aplicações clínicas. A pesquisa consistiu em comparar um método de cultivo mecânico enzimático (ME) e outro método, exclusivamente mecânico (MC), a fim de se determinar qual forma de cultivo iria isolar um maior número de CTMs. Com base nos resultados obtidos, o estudo determinou que o método ME, permitiu isolamento de um maior número de células, em relação ao MC (RAPOSIO; SIMONACCI; PERROTTA, 2017).

A terapia celular envolve estudos para tratamento de feridas crônicas (MARANDA; RODRIGUEZ-MENOCAL; BADIAVAS, 2016), lúpus e dermatomiosites (CERON et al., 2016; KHOSROTEHRANI, 2013; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013), dermatite atópica canina (FOSSUM, 2013) e também para queimaduras térmicas e radioativas (MARANDA; RODRIGUEZ-MENOCAL; BADIAVAS, 2016; RODGERS; JADHAV, 2017). A engenharia de tecidos também vem sendo bastante estudada e desenvolve um papel importante na terapia celular, pois combina o uso de biomateriais, fatores de crescimento e células-tronco, para reparar órgãos e tecidos que perderam sua estrutura e/ou função (BERTOZZI et al., 2017; OTERO-VIÑAS; FALANGA, 2016).

### **Modelos animais utilizados em estudos com terapia celular**

Muitos são os modelos animais utilizados para estudos em feridas agudas e crônicas. Dentre os mais utilizados é possível citar o camundongo (ARGOLO NETO et al., 2016; WANG et al., 2016), o rato (CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016; KAISANG et al., 2017; TAO et al., 2017), o suíno (BLANTON et al., 2009; FU et al., 2006), o coelho (OSTVAR et al., 2015; XIE et al., 2016) e ainda, em estudos clínicos, a espécie canina (KIM et al., 2013). Estes modelos servem tanto para a realização da coleta de gordura para posterior isolamento e cultivo, quanto para uso como terapia.

O modelo animal mais utilizado para o estudo de feridas é o camundongo, representando um total de 55% dos estudos avaliados; em segundo lugar, representando 22%, aparece o rato. Este mesmo estudo demonstrou que o modelo de ferida induzido, representando 65% dos estudos, é o excisional, seguido de lesão incisoral (13%) e queimadura (11%) (ISAKSON et al., 2015).

É importante salientar que estudos clínicos estão sendo realizados em humanos (BADIAVAS; FALANGA, 2013; LAFOSSE et al., 2015).

## **Estudos clínicos e experimentais desenvolvidos para tratamento de alterações cutâneas**

Foi avaliado o efeito da terapia celular com: ADSCs+plasma pobre em plaquetas (PPP); ADSCs+plasma rico em plaquetas (PRP); plasma rico em plaquetas (PRP); plasma pobre em plaquetas (PPP) e controle, em feridas induzidas em suínos. Eles não observaram diferenças significativas nas taxas de contração das feridas, porém, observaram aumento significativo de aproximadamente sete vezes mais, no crescimento de vasos endoteliais, no grupo ADSCs+plasma rico em plaquetas. Acredita-se que as células adiposas possuem células marcadoras associadas aos pericitos e por secretarem fatores pró-angiogênicos, como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e a angiopoetina, possam atuar na associação perivascular, contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos (BLANTON et al., 2009).

Foi desenvolvido um estudo onde isolaram e expandiram CTMs, oriundas de medula óssea, e fibroblastos, a partir de biópsia de pele, de pacientes humanos normais e compararam os mesmos processos, coletando as mesmas amostras, de pacientes não diabéticos, porém, com feridas crônicas há mais de dois anos, sem expectativas de cura. O estudo *in vitro* demonstrou que as CTMs desempenham um papel importante na cicatrização de feridas, estimulando a migração de fibroblastos de maneira dose-dependente, quando coletadas de pacientes normais; já as amostras de células, de pacientes com lesão crônica, demonstraram deficiência na proliferação de fibroblastos, pois se acredita que os mesmos não respondem de forma positiva, às citocinas e fatores de crescimento liberados pelas CTMs. De um modo geral, todo processo regenerativo, é afetado negativamente na presença de lesão crônica (MARANDA; RODRIGUEZ-MENOCAL; BADIAVAS, 2016).

Foi relatado a terapia com CTMs de cordão umbilical humano, combinada com gelatina de *Wharton* e micropartículas de pele, para tratamento de lesão de pele excisional em camundongos, relatando ser uma estratégia muito promissora, aumentando de forma significativa a regeneração tecidual a partir da formação de quatro camadas da epiderme, com folículos capilares, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, bem como, melhora na qualidade da cicatriz (ZHANG et al., 2012).

Optou-se pelo tratamento com terapia celular para três pacientes com feridas crônicas há mais de 12 meses. Os tratamentos convencionais já haviam sido testados e

não apresentaram quaisquer benefícios. A terapia com CTMs resultou em cicatrização completa das lesões, em apenas quatro meses após tratamento (BADIAVAS; FALANGA, 2013).

Foi observado através da expressão significativa de Ang-1/2 (angiopoietina 1 e 2), CD31 (*cluster* de diferenciação) e VEGF, bem como da alta densidade capilar, que as CTMs de medula óssea, podem efetivamente melhorar a cicatrização de lesão de pele por queimadura em camundongos, representando importante método de tratamento para queimaduras (XUE et al., 2013a).

Feridas experimentais de camundongos tratadas com CTMs de cordão umbilical humano, apresentaram em suas avaliações histopatológicas, níveis satisfatórios de epitélio escamoso, fibroblastos, glândulas sebáceas, além de capilares sanguíneos, demonstrando taxas de cicatrização muito mais rápidas, quando comparadas aos outros grupos sem o uso da terapia celular (WANG et al., 2016)

### **Locais de aplicação da terapia celular**

Os locais de aplicação de CTMs em feridas de pele incluíram vias tópicas com utilização de *spray*; por via intradérmica ao redor da lesão; intravenosa (CHEN; WONG; GURTNER, 2012) e também, via *scaffold*, com a utilização da Gelatina de *Wharton* como forma de arcabouço para as células-tronco (ZHANG et al., 2012).

Há relatos de modelos de estudos utilizando terapia celular para feridas de pele com aplicação no local da lesão via intradérmica (ICLI et al., 2016; KAISANG et al., 2017; NIE et al., 2011; XUE et al., 2013b). No entanto, é relatado que o potencial terapêutico dessa via pode ser limitado por conta do fraco potencial de retenção de células no local da lesão, sendo necessário um maior tempo de sobrevivência das CTMs para um melhor resultado cicatricial. Como exemplo, indica-se o uso de *scaffolds* (LEE, D.E; AYOUB, N; AGRAWAL, 2016).

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, aplicadas topicamente em feridas em orelhas de coelhos, aumentaram de forma significativa a formação de tecido de granulação (HONG et al., 2013)

Foi desenvolvido um estudo para determinar a sobrevivência, a angiogênese e a migração de células-tronco *in vitro* e em um modelo de ferida em ratos. As feridas foram tratadas com aplicações locais de: a) PBS (solução salina tamponada com

fosfato), b) CTMs suspensas em PBS e c) CTMs com ácido trans-retinóico (ATRA). Os resultados obtidos mostraram que o grupo tratado com CTMs suspensas em PBS se mostrou mais eficiente que o controle, ao passo que o grupo CTMs pré-condicionadas com ATRA, aumentou a eficácia da terapia celular, ocluindo a ferida em menor tempo que os outros grupos (POURJAFAR et al., 2017)

Com base nos estudos atuais em dermatologia, que abordam feridas agudas e crônicas, o que se pode perceber é que as aplicações da terapia são realizadas, na grande maioria das vezes topicamente, via intradérmica ou via subcutânea, no local ou a redor da lesão. Esta forma local de aplicação é considerada eficaz por favorecer a condução da regeneração tissular (ISAKSON et al., 2015).

O ambiente da ferida é um local bastante hostil e que muitos fatores como celularidade, moléculas de sinalização solúveis, matriz extracelular (ME), forças mecânicas, tensão de oxigênio ( $O_2$ ), podem afetar a ação das CTMs e seu potencial de regeneração. Por isso é importante a pesquisa contínua abordando os métodos de entrega, incluindo os estudos que envolvem os *scaffolds* (ISAKSON et al., 2015).

Chen e colaboradores (2012) afirmaram que a eficácia clínica pode ser totalmente dependente da quantidade de células aplicadas na lesão. Não há consenso de doses estabelecidas para nenhum tipo de terapia, no entanto, Isakson et al. (2015) citaram aproximadamente 15 trabalhos realizados com ratos e camundongos, com dose de  $1 \times 10^6$ , resultando em aumento da neovascularização, aumento da epitelização, aumento do tecido de granulação, aumento do número e densidade capilares, aumento significativo dos fatores de crescimento liberados pelas células-tronco: EGF (fator de crescimento epidermal), FGF (fator de crescimento de fibroblastos), VEGF, IL-1b, IL-4 (interleucinas 1-b e 4) e diminuição de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e fatores pró-inflamatórios. As doses utilizadas podem variar de  $2 \times 10^4$  (HOU et al., 2013) a  $1,4 \times 10^8$  (BORENA et al., 2010), para modelos de feridas excisionais e por queimadura. Há ainda a opção de realizar a entrega da terapia celular em dose por camada de pele (LIN et al., 2013). Todos esses estudos citados foram realizados em ratos ou camundongos.

Um estudo com terapia celular em feridas excisionais, na quantidade de  $1 \times 10^6$ , demonstrou resultados que promoveram a cicatrização, quando avaliadas até o sétimo dia (BEHEREGARAY et al., 2017).

Kuo et al. (2011) avaliou o uso de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, em feridas crônicas de camundongos diabéticos e determinaram que

duas aplicações, na dose de  $1 \times 10^7$ , uma no sétimo e outra no décimo dias de pós-operatório, foram mais eficientes do que uma única aplicação no sétimo dia.

Nie et al. (2013) fizeram uma única aplicação de células-tronco, derivadas de tecido adiposo, na dose  $1 \times 10^6$ , avaliando aos 3, 7, 10, 14 e 28 dias, evidenciando que a terapia celular não só contribuiu para a regeneração, mas também para a formação de novos vasos sanguíneos.

### **Mecanismos de ação das CTMs no processo de cicatrização**

O verdadeiro mecanismo de ação das CTMs ainda não é totalmente compreendido. Entretanto, o que se sabe é que elas, provavelmente, fornecem bases necessárias para a cicatrização, por meio de liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e fatores de crescimento, além das próprias células que participam de todo este processo, diferenciando-se ainda, em células do próprio ambiente onde estão agindo (ISAKSON et al., 2015).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que CTMs transplantadas podem se diferenciar em células do tecido residente. Após diferenciação *in vitro* de CTMs em uma estrutura de várias camadas semelhantes à epiderme, expressaram citoqueratina-10 e filagrina, considerados marcadores epidérmicos (MA et al., 2009).

Acredita-se que o efeito benéfico das CTMs em feridas se dá pela ação positiva em todas as fases da cicatrização (inflamatória, proliferativa e remodelamento), gerando aumento na migração epitelial, aumento na angiogênese, além de cicatrizes esteticamente melhores (HOCKING; GIBRAN; BOX, 2011; JACKSON; NESTI; TUAN, 2012b; MAXSON et al., 2012; WANG et al., 2016). As CTMs estimulam ainda, o processo cicatricial por meio de liberação de diversos fatores de crescimento através de efeito parácrino, entre eles: VEGF, KGF (fator de crescimento de queratinócitos), FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), HGF (fator de crescimento de hepatócitos), TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento beta), fibronectina, colágeno I95, sendo a neovascularização uma das principais ações que levam à rapidez cicatricial (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012b; KUO et al., 2011; WANG et al., 2016).

Otero-Viñas & Falanga (2016), da mesma forma, descrevem os efeitos parácrinos destas células, onde provavelmente, ocorreria secreção de fatores de crescimento como



VEGF, EGF, KGF, SDF-1 (fator derivado de célula estromal-1), IGF-1 (fator de crescimento de insulina) e angiopoetina-1, que facilitam o recrutamento de macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais para o leito da ferida. Ainda, contribuem para a regeneração, pois reduzem a inflamação no leito da ferida, liberando fatores imunossupressivos, inibindo a proliferação de LT e LB (linfócitos T e B) e as células NK (*natural killers*), e diferenciando-se em queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais.

Harmann (2013) relata que as CTMs promovem um ambiente anti-inflamatório, pois alteram o perfil de secreção de citocinas, células dendríticas e células T, além de liberarem fatores de crescimento, conforme já descritos anteriormente.

Harmann (2013) relata ainda em sua revisão, a redução significativa de apoptose celular, em eventos isquêmicos em um estudo com modelo animal.

Chen et al. (2016), afirmam que estudos desenvolvidos, demonstram que as CTM, além de terem ação antibacteriana, podem suprimir as células T, ativando macrófagos e recrutando neutrófilos, reduzindo assim, a resposta inflamatória. Outro fator que auxilia no processo de reparo é a mudança sofrida pelos macrófagos, que no momento da transição do estágio inflamatório para o de proliferação, faz com que sejam liberadas citocinas anti-inflamatórias. Com isso, promovem diminuição da inflamação, aumentam a angiogênese, auxiliam no processo de deposição de matriz extracelular e fatores de crescimento que ativam queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, além do efeito antibacteriano (CHEN et al., 2016).

Acredita-se que haja um consenso quanto à importância da angiogênese no processo cicatricial. A fração vascular estromal, extraída do tecido adiposo contém células progenitoras endoteliais, que promovem a angiogênese e neovascularização através da secreção de citocinas (HARMAN, 2013). Estudos com modelos de isquemia demonstraram aumento de fluxo sanguíneo associada à aumento da densidade vascular (HOU et al., 2013; XIE et al., 2016).

A fibrose é definida como um acúmulo de componentes da matriz extracelular (MEC), (predominantemente colágeno tipo I), que impedem a regeneração tecidual. Ocorre em decorrência de traumas, inflamação, toxicidade química e estresse oxidativo (SPEES; LEE; GREGORY, 2016). Para essa alteração, a terapia com CTM se mostra extremamente benéfica, principalmente na presença de inflamação, devido ao seu alto potencial antifibrótico (USUNIER et al., 2014).

Usunier et al. (2014) sugerem que a capacidade das CTMs de atuar sobre a fibrose, ocorra através de diferentes mecanismos: 1) modulação imunológica; 2) inibição do TGF $\beta$ ; 3) inibição da hipóxia e do estresse oxidativo e 4) restauração da degradação de ME.

Spees et al. (2016) relatam em sua revisão, que um estudo sobre fibrose renal, demonstrou que CTMs promoveram inibição da fibrose, através da proteína secretada *stanniocalcin-1* (STC-1). Madrigal et al (2014) relatam também o efeito anti-inflamatório e anti-apoptótico da STC-1.

Maranda et al. (2016) citam em sua revisão, um estudo onde se utilizou a bleomicina como fator de indução de fibrose. O estudo determinou a ação antioxidante das CTMs, além de reduzir a fibrose e aumentar o remodelamento tissular, confirmaram ainda o estímulo à produção de colágeno, organizado de uma forma muito semelhante à pele íntegra.

Desenvolveu-se um estudo para avaliar a ação das células-tronco derivadas de tecido adiposo em um modelo de queloide. Amostras de queloides foram coletadas de pacientes humanos, submetidos a cirurgias reconstrutivas. Estas amostras foram implantadas em camundongos atímicos e tratadas com a) ADSCs condicionadas em meio nutritivo pobre, b) *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e c) controle – sem tratamento. O grupo confirmou através de análises microscópicas que é evidente a ação destas células na fibrose, além do benéfico efeito oriundo da ação parácrina sobre fibroblastos, mas ainda ressaltam a importância de novos estudos abordando terapia celular para queloides (LIU et al., 2017).

## CONCLUSÃO

Embora existam muitos relatos de que as CTMs possuem um papel importante para a cicatrização de feridas agudas e crônicas, são ainda necessários muitos estudos experimentais para que se investiguem os mecanismos pelos quais essas células induzem a cicatrização, bem como o momento e a forma de aplicação adequada, levando em consideração a segurança para aplicações futuras, não somente como terapia experimental, mas como prática médica.

## REFERÊNCIAS

- AMORIN, B. et al. Immunological properties and clinical applications. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71-81, 2012.
- AN, Y. et al. Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 2, p. 58, 2018.
- ARGOLO NETO, N. M. et al. Role of the autologous mesenchymal stem cells compared with platelet rich plasma on cicatrization of cutaneous wounds in diabetic mice 1. **Pesq. Vet. Bras**, v. 36, n. 7, p. 617–624, 2016.
- BADIAVAS, E. V; FALANGA, V. Treatment of Chronic Wounds With Bone Marrow-Derived Cells. v. 139, 2013.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BEHEREGARAY, W. K. et al. Células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1591–1600, 2017.
- BERTOZZI, N. et al. The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 20, p. 41–48, 2017.
- BLANTON, M. W. et al. Adipose Stromal Cells and Platelet-Rich Plasma Therapies Synergistically Increase Revascularization during Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 123, n. Supplement, p. 56S–64S, 2009.
- BORENA, B. M. et al. Evaluation of autologous bone marrow-derived nucleated cells for healing of full-thickness skin wounds in rabbits. **International Wound Journal**, v. 7, n. 4, p. 249–260, 2010.
- BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/ stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–648, 2013.
- CALIARI-OLIVEIRA, C. et al. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 201–215, 2016.

- CERON, W. et al. **Células tronco mesenquimales: Definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales** *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v33n4/a22v33n4.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2017
- CHEN, D. et al. Insight into reepithelialization: How do mesenchymal stem cells perform? **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- CHEN, J. S.; WONG, V. W.; GURTNER, G. C. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUL, p. 1–9, 2012.
- CHENG, N.-C. et al. Short-Term Spheroid Formation Enhances the Regenerative Capacity of Adipose-Derived Stem Cells by Promoting Stemness, Angiogenesis, and Chemotaxis. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 2, n. 8, p. 584–594, 2013.
- DERBY, B. M. et al. Adipose-Derived Stem Cell to Epithelial Stem Cell Transdifferentiation: A Mechanism to Potentially Improve Understanding of Fat Grafting's Impact on Skin Rejuvenation. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 34, n. 1, p. 142–153, 2014.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation. **Wound healing**, v. 6, n. 265, p. 1–16, 2014.
- FU, X. et al. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 3, p. 325–335, 2006.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.
- HARMAN, R. J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.
- HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 3, p. 313–325, 2014.
- HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S.; BOX, C. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 14, p. 2213–2219, 2011.
- HONG, S. J. et al. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

- HOU, C. et al. The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the treatment of diabetic ischemic ulcer. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 112–120, 2013.
- HU, L. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 32993, 2016.
- HUANG, G. et al. Evaluation of Dermal Substitute in a Novel Co-Transplantation Model with Autologous Epidermal Sheet. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–10, 2012.
- HUANG, S. et al. Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice. **Cytotherapy**, v. 17, n. 7, p. 922–931, 2015.
- ICLI, B. et al. Regulation of impaired angiogenesis in diabetic dermal wound healing by microRNA-26a. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 91, p. 151–159, 2016.
- ISAKSON, M. et al. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.
- JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 3, p. 20, 2012a.
- JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 1, p. 44–50, 2012b.
- JOSÉ, A. et al. Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar. **Medicina**, v. 36, p. 69–75, 2007.
- KAISANG, L. et al. Adipose-derived stem cells seeded in Pluronic F-127 hydrogel promotes diabetic wound healing. **Journal of Surgical Research**, v. 217, p. 63–74, 2017.
- KHOSROTEHRANI, K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: Why and what for? **Experimental Dermatology**, v. 22, n. 5, p. 307–310, 2013.
- KIM, J. W. et al. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 2, 2013.
- KIM, Y. H.; TABATA, Y. Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 104,

n. 4, p. 942–956, 2016.

KING, A. et al. The Role of Stem Cells in Wound Angiogenesis. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 614–625, 2014.

KO, S. H. et al. PHD-2 Suppression in Mesenchymal Stromal Cells Enhances Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 141, n. 1, p. 55e–67e, 2018.

KUO, Y.-R. et al. Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Enhanced Diabetic Wound Healing through Recruitment of Tissue Regeneration in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 128, n. 4, p. 872–880, 2011.

LAFOSSE, A. et al. Autologous Adipose Stromal Cells Seeded onto a Human Collagen Matrix for Dermal Regeneration in Chronic Wounds. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 136, n. 2, p. 279–295, 2015.

LEE, D.E; AYOUB, N; AGRAWAL, D. . Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. **Stem cell research & therapy**, v. 37, n. 7, p. 2–8, 2016.

LI, M. et al. Mesenchymal stem cell based therapy for non-healing wounds: Today and tomorrow. **Wound Repair and Regeneration**, n. 1, p. n/a-n/a, 2015.

LI, Q. et al. Stromal cell-derived factor-1 promotes human adipose tissue-derived stem cell survival and chronic wound healing. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p. 45–50, 2016.

LIM, Y. et al. Involvement of PI3K and MMP1 in PDGF-induced Migration of Human Adipose-derived Stem Cells. **Development & Reproduction**, v. 21, n. 2, p. 167–180, 2017.

LIN, Y. C. et al. Evaluation of a multi-layer adipose-derived stem cell sheet in a full-thickness wound healing model. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 2, p. 5243–5250, 2013.

LIU, J. et al. Human adipose tissue-derived stem cells inhibit the activity of keloid fibroblasts and fibrosis in a keloid model by paracrine signaling. **Burns**, p. 1–16, 2017.

LOUGH, D. M. et al. Transplantation of the LGR6+ Epithelial Stem Cell into Full-Thickness Cutaneous Wounds Results in Enhanced Healing, Nascent Hair Follicle Development, and Augmentation of Angiogenic Analytes. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 133, n. 3, p. 579–590, 2014.

MA, K. et al. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3251–3258, 2009.

- MADRIGAL, M.; RAO, K. S.; RIORDAN, N. H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, n. 1, p. 260, 2014.
- MALHOTRA, S. et al. Mesenchymal Stromal Cells as Cell-Based Therapeutics for Wound Healing. **Stem Cells International**, v. 2016, n. Figure 1, p. 2–7, 2016.
- MARANDA, E.; RODRIGUEZ-MENOCAL, L.; BADIAVAS, E. Role of Mesenchymal Stem Cells in Dermal Repair in Burns and Diabetic Wounds. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 61–70, 2016.
- MARFIA, G. et al. Mesenchymal stem cells: Potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. **Organogenesis**, v. 11, n. 4, p. 183–206, 2015.
- MAXSON, S. et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 11, p. e54, 2013.
- NIE, C. et al. Locally administered Adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 2, p. 205–216, 2011.
- NUSCHKE, A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. **Organogenesis**, v. 10, n. 1, p. 29–37, 2014.
- OSTVAR, O. et al. RETRACTED ARTICLE: Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. **Diagnostic Pathology**, v. 10, n. 1, p. 85, 2015.
- OTERO-VIÑAS, M.; FALANGA, V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 4, p. 149–163, 2016.
- OWCZARCZYK-SACZONEK, A. et al. The Use of Adipose-Derived Stem Cells in Selected Skin Diseases (Vitiligo, Alopecia, and Nonhealing Wounds). **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.
- PELIZZO, G. et al. Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting. **Journal of translational medicine**, v. 13, p. 219, 2015.
- POURJAFAR, M. et al. All-trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound

- repair in vivo. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 1, p. 1–11, 2017.
- RAPOSIO, E.; SIMONACCI, F.; PERROTTA, R. E. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 20, p. 87–91, 2017.
- REGULSKI, M. J. Mesenchymal Stem Cells: “Guardians of Inflammation.” **Wounds**, v. 29, n. 1, p. 20–27, 2016.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.
- RIBEIRO, F. et al. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 60, n. 11, p. 22–26, 2015.
- RODGERS, K.; JADHAV, S. S. The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2017.
- SIMONETTI, O. Role of Daptomycin on Burn Wound Healing in an Animal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection Model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, n. July, 2017.
- SPEES, J. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 125, 2016.
- TAO, S.-C. et al. Chitosan Wound Dressings Incorporating Exosomes Derived from MicroRNA-126-Overexpressing Synovium Mesenchymal Stem Cells Provide Sustained Release of Exosomes and Heal Full-Thickness Skin Defects in a Diabetic Rat Model. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 6, n. 3, p. 736–747, 2017.
- URBAN, M. V.; RATH, T.; RADTKE, C. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): a review of its use in surgery. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, 2017.
- USUNIER, B. et al. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. **Stem cells international**, v. 2014, p. 340257, 2014.
- UYSAL, C. A. et al. The Effect of Bone-Marrow-Derived Stem Cells and Adipose-Derived Stem Cells on Wound Contraction and Epithelization. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 6, p. 405–413, 2014.
- VÉRITER, S. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells in cell therapy: Safety and feasibility in different “hospital exemption” clinical applications. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- VOLK, S. W.; BOHLING, M. W. Comparative wound healing - Are the small animal



- veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research? **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 372–381, 2013.
- WAN, J. et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 647107, 2013.
- WANG, S. et al. Wound dressing model of human umbilical cord mesenchymal stem cells-alginates complex promotes skin wound healing by paracrine signaling. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.
- WASSERBAUER, S.; PEREZ-MEZA, D.; CHAO, R. Hydrogen peroxide and wound healing: A theoretical and practical review for hair transplant surgeons. **Dermatologic Surgery**, v. 34, n. 6, p. 745–750, 2008.
- WINTERBOURN, C. C. **The biological chemistry of hydrogen peroxide**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 528
- XIE, P. et al. Topical Administration of Oxygenated Hemoglobin Improved Wound Healing in an Ischemic Rabbit Ear Model. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 137, n. 2, p. 534–543, 2016.
- XUE, L. et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. v. 6, n. 7, p. 1327–1336, 2013a.
- XUE, L. et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 6, n. 7, p. 1327–36, 2013b.
- XUE, L. et al. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model. **Int J ExpPathol**, v. 6, n. 7, p. 1327–1336, 2013c.
- YANESSELLI, K. M; KUHL, C.P.; TERRACIANO, P;B; OLIVEIRA, F. S; PIZZATO, S.B.; PAZZA, K; MAGRISSO, A.B; TORMAN, V; RIAL, A; MORENO, M; LLAMBÍ, S; CIRNE-LIMA, E.O; MAISONNAVE, J. Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers. **J Vet Sci**, v. 19, n. 1, p. 13–20, 2018.
- YANG, M. et al. Stem cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: Where do we stand? **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- ZAHOREC, P. et al. Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy. **Cell and tissue banking**, v. 16, n. 1, p. 19–26, 2015.
- ZHANG, Y. et al. Repair and Regeneration of Skin Injury by Transplanting Microparticles Mixed With Wharton's Jelly and MSCs From the Human Umbilical

Cord. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, 2012.

ZOU, J.-P. et al. Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 11, n. 4, p. 244–53, 2012.

### 3. CAPÍTULO 2

#### **Células-tronco mesenquimais aplicadas em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas em ratos Wistar**

Fernanda R Loss; Cesar D Freire; Paula B Terraciano; Adriana C Motta; Isabel CLO Durlí; Fernanda S de Oliveira; Martina C Stapenhorst; Débora HZ Gotardi; Elizabeth O Cirne-Lima, Emerson A Contesini

Manuscrito a ser submetido para o *Journal of Dermatological Science*.

## **Células-tronco mesenquimais aplicadas em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas em ratos Wistar**

Fernanda Regina Loss<sup>1</sup>; Cesar Dias Freire<sup>2</sup>; Paula Barros Terraciano<sup>3</sup>; Adriana Costa da Motta<sup>4</sup>; Isabel Cirne-Lima Oliveira Durli<sup>3</sup>; Fernanda dos Santos de Oliveira<sup>3</sup>; Martina Caroline Stapenhorst<sup>5</sup>; Débora Helena Zanini Gotardi<sup>5</sup>; Elizabeth Obino Cirne-Lima<sup>6</sup>,  
Emerson Anatonio Contesini<sup>7</sup>

### **Resumo**

*Antecedentes:* células-tronco mesenquimais (CTMs) tem sido utilizadaS para o tratamento de feridas crônicas, devido à sua ação anti-inflamatória e efeito imunomodulador sobre as células epiteliais.

*Objetivo:* Este estudo teve por objetivo avaliar a terapia celular aplicada nas diferentes fases da cicatrização de feridas cutâneas crônicas.

---

<sup>1</sup> Veterinary PhD student, Post Graduation Program of Veterinary Science (PPGCV), Veterinary College (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, CEP: 91540-000, Brazil. Correspondence author: [fe\\_loss@yahoo.com.br](mailto:fe_loss@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Veterinary, PhD, Autonomous Anesthesiologist, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Biologist, PhD, Laboratory of Embriology and cellular differentiation, Post Graduation Program in Health Sciences: gynecology and obstetrics (PPGGO), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Veterinary, PhD Professor, Departamet of Animal Patology, Veterinary College, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil. Rodovia BR 285, Km 292,7, s/n, Passo Fundo, RS, Brazil.

<sup>5</sup> Graduation student, Biomedicine College, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>6</sup> Biologist, PhD, Professor, Departament of Clinical Pathology. Laboratory of Embriology and cellular differentiation, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>7</sup> Veterinary, PhD Professor, Departamet of Animal Medicine, Veterinary College (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, CEP: 91540-000, Brazil.

*Métodos:* foram utilizados 96 ratos Wistar, machos, com oito semanas de idade, variando entre 250 a 300 gramas de peso. Do total de 96, 24 animais, serviram como doadores de gordura gonadal, para cultura e isolamento de CTMs, e os outros 72, foram aleatoriamente divididos em 3 grupos: C (controle), CTM1 (1 aplicação de CTM) e CTM2 (2 aplicações de CTM). Estes grupos foram subdivididos em três diferentes períodos de tempo para avaliação: 7, 14 e 21 dias. Os tratamentos com CTM foram realizados aos 0 e 5 dias após a cronificação das feridas. Foram coletados fragmentos de ferida para avaliação microscópica (HE e imunohistoquímica), bem como, avaliações macroscópicas das feridas.

*Resultados:* O grupo CTM2-21 dias apresentou maior taxa de contração ( $p < 0,001$ ). O colágeno I, o colágeno III e o FGF apresentaram em média diferença estatisticamente significativa entre os grupos, independente do dia da avaliação ( $p < 0,001$ ). A taxa de contração (TC) e a marcação de Ki67 apresentaram em média diferentes comportamentos entre grupos e período de avaliação ( $p$  Interação = 0,039 e  $p$  Interação = 0,018 respectivamente). O grupo CTM1 apresentou menor frequência de úlcera ( $p < 0,05$ ). O grupo CTM1-7 dias apresentou maior índice de inflamação crônica, enquanto que os demais grupos apresentaram inflamação sub-aguda ( $p = 0,006$ ).

*Conclusão:* Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a terapia celular beneficia a cicatrização de feridas crônicas, e que duas aplicações de CTMs promovem maior taxa de contração, quando avaliadas no 21º dia.

**Palavras-chave:** ferida crônica, fibroblastos, imunohistoquímica, inflamação, células-tronco mesenquimais, efeito parácrino.

## **Abstract**

*Background:* Mesenchymal stem cells (MSC) it has been used for treatment the chronic wounds, due to its anti-inflammatory action and immunomodulatory effects on epithelial cells.

*Objective:* The aim of this study was to evaluate cell therapy applied in different cicatrization phases of cutaneous chronic wounds.

*Methods:* were used 96 male Wistar rats, eight weeks old, weighing 250 to 300 grams. Of this total, 24 animals served as donors of gonadal fat for culture and isolation of MSCs. The other 72 were randomly divided into 3 groups: C (control), MSC1 (1 MSC application) and MSC2 (2 MSC applications). These groups were subdivided into three different time periods for evaluation: 7, 14 and 21 days. MSCs treatments were performed at 0 and 5 days after wound chronification. Wound and scar macroscopic evaluation was made, and wound fragments were collected for microscopic evaluation (HE and immunoistochemistry) at evaluation days.

*Results:* MSC2-21 days group had the biggest contraction rate ( $p < 0,001$ ). Mean collagen I, collagen III and FGF were significantly different between groups, in all evaluation days ( $p < 0,001$ ). Means contraction rate and Ki67 mark were different between groups and evaluation days ( $p_{\text{Interaction}} = 0,039$  and  $p_{\text{Interaction}} = 0,018$  respectively). MSC1 group had less frequent ulcer ( $p < 0,05$ ). MSC1-7 days had more chronic inflammation rate, while the other groups had subacute inflammation ( $p = 0,006$ ).

*Conclusion:* The study results concludes that cell therapy benefits chronic wound healing, and two MSC application promotes greater contraction rate evaluated after 21 days of healing.

**Keywords:** Chronic wound, Fibroblasts, Immunohistochemistry, Inflammation, Mesenchymal stem cell, Paracrine effect.

## 1. Introdução

O estudo da ferida cutânea crônica tem sido cada vez mais importante, uma vez que sua ocorrência é comum e afeta cerca de 1 a 1,5% da população de países desenvolvidos. Na Europa, de 2 a 4% do orçamento de saúde é destinado à terapia de feridas crônicas [1]. Estima-se que no Ocidente, 1 a 2% da população desenvolverá uma lesão crônica durante sua vida [2]. Calcula-se ainda que, em todo o mundo os custos dos tratamentos de feridas crônicas excedam os 22 bilhões de dólares ao ano até 2020 [3].

A ferida crônica é descrita como uma ruptura estrutural da pele, resultando negativamente na sua arquitetura e funcionalidade [4]. As feridas crônicas podem

ocorrer por neuropatia, trauma, úlcera isquêmica, isquemia, doença arterial periférica [5] e queimaduras [6].

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são conhecidas por sua multipotencialidade, potencial de renovação e diferenciação em um grande número de tipos de células [2], bem como suas habilidades de imunomodulação e ação parácrina, através da liberação de fatores de crescimento, promovendo o fechamento acelerado da lesão, o aumento da proliferação da angiogênese, a diminuição da inflamação e o aumento da remodelação da matriz extracelular, contribuindo assim para a cicatrização de feridas em um curto espaço de tempo e de forma mais eficiente, restaurando a estrutura e funções normais da pele [7,8].

Estudos recentes avaliam a aplicação clínica da terapia celular, como uma opção na terapia para feridas de difícil tratamento. Embora não haja ainda consenso sobre os mecanismos de ação desta terapia, alguns fatores podem ser citados como benéficos para a regeneração e cicatrização: níveis aumentados de colágeno dérmico, aumento do número de fibroblastos e angiogênese [9], bem como, aumento de fatores pro-angiogênicos [3,8] e diminuição significativa na inflamação devido à inibição de citocinas pró-inflamatórias [1,8].

O presente estudo objetiva o uso da terapia celular oriunda de tecido adiposo, no tratamento de feridas crônicas, previamente induzidas por queimadura química. As terapias do trabalho consistem em uma e duas aplicações de CTMs, em diferentes momentos da cicatrização, contemplando as fases inflamatória e proliferativa.

## **2. Material e métodos**

### **2.1 Animais e grupos**

Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e aprovado sob protocolo número 150273, seguindo os princípios e normas para o uso de animais experimentais. Os procedimentos que envolveram o uso de animais foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital Clínico de Porto Alegre (HCPA), e a cultura celular foi realizada no Laboratório de Diferenciação Celular e Embriologia, do HCPA.

Os procedimentos *in vivo* foram realizados conforme a legislação vigente no Brasil, Lei 11.794 - (Diário Oficial da União - 08/10/2008), 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 (NR 30 de 2016). Os procedimentos de finalização seguiram as normas indicadas pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA - NR 13 de 2013).

Foram utilizados 96 ratos Wistar machos, pesando em média 250-300g, com oito semanas de idade. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno retangulares, medindo 49x34x16cm, mantidos na UEA. Os animais foram alimentados com ração comercial e água *ad libidum*. A temperatura e a umidade relativa do ar foram controladas ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e 40-60%, respectivamente), bem como o ciclo da luz com foto-período de 12/12 horas.

Após adaptação de 14 dias, os animais foram isolados, individualmente, em gaiolas. Para evitar o estresse, devido ao isolamento e manipulação diária, foram fornecidos amendoim, sementes de girassol e toalhas de papel, para que tivessem atividade de picotear e descascar, com a finalidade principal de enriquecimento ambiental.

Do total de 96 animais, 24 foram doadores de gordura peritesticular para cultura e isolamento de CTM. Os outros 72 animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: C (controle), CTM1 (1 aplicação CTM) e CTM2 (2 aplicações CTM). Esses grupos foram novamente subdivididos em três períodos diferentes de avaliação: 7, 14 e 21 dias. Os tratamentos com CTM foram realizados aos 0 e 5 dias após a cronificação da ferida.

## **2.2 Isolamento e cultura das células-tronco mesenquimais (CTMs)**

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



Foi coletado tecido adiposo gonadal peritesticular de 24 ratos doadores adultos (Fig. 1). Os animais foram primeiramente eutanasiados com sobredose anestésica de isofluorano até a ocorrência de parada cardiorrespiratória.

Na sequência, o tecido adiposo gonadal foi coletado cirurgicamente por laparotomia, de ambos os testículos, resultando aproximadamente em quatro gramas de tecido adiposo por rato. Os fragmentos coletados foram acondicionados em tubo *Falcon* contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com penicilina e, imediatamente, encaminhados para o Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, onde foram submetidos à digestão enzimática, para o isolamento das CTMs.

**Fig. 1.** Coleta de tecido adiposo gonadal em rato Wistar.



### 2.2.2 Obtenção das células-tronco mesenquimais

O tecido adiposo coletado foi encaminhado ao Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular. Em capela de fluxo laminar, o tecido adiposo foi lavado duas vezes com solução de tampão fosfato-salino (PBS) e antibiótico (penicilina e estreptomicina). O tecido foi então colocado em uma placa de *Petry* e macerado com lâmina de bisturi. Foi novamente acondicionado em tubo *Falcon* com colagenase na proporção de 1ml de gordura para 1 ml de enzima, para a digestão do tecido adiposo e liberação das células-tronco. A suspensão foi mantida em banho-maria por 30 minutos com agitação a cada 5. Em seguida adicionou-se meio DMEM completo [20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina)] para inibir o efeito da colagenase. Essa suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm (rotações por minuto). As fases sobrenadantes sólidas de tecido adiposo e, líquida de meio de cultura e colagenase foram desprezadas. O *pellet* resultante é composto por

hemácias em sua porção mais escura e na porção mais clara obtiveram-se as células-tronco mesenquimais com outros tipos celulares oriundos da maceração da gordura (células de estroma e de série branca). Esse *pellet* foi ressuspensionado em meio DMEM completo e plaqueado (2 ml de meio por poço). A placa foi acondicionada em estufa a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e 100% de umidade. Após 24h, a placa foi analisada em microscópio para visualização de crescimento celular e presença de *debris*. A placa foi lavada duas vezes com PBS para descarte de componentes indesejados (hemácias, adipócitos). Os poços foram completados com meio DMEM completo fresco e acondicionados novamente em estufa. Quando a cultura celular atingiu confluência de 80-90%, as células aderentes foram removidas com solução de 0,05% tripsina - EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para posterior subcultivo em DMEM.

### 2.2.3 Caracterização das células-tronco mesenquimais

As CTMs foram caracterizadas por morfologia e diferenciações *in vitro*. Para tanto, foram realizados ensaios para a indução de diferenciação em linhagens condrogênicas, osteogênicas e adipogênicas. Para a diferenciação condrogênica, foi utilizado meio DMEM suplementado com 6,25µg/ml de insulina, 10ng/ml de TGF beta1 e 50mg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato (AsAP) por 21 dias. A detecção da diferenciação foi realizada por coloração com *Alcian Blue*, que possui afinidade pelos grupos aniônicos, presentes nos glicosaminoglicanos da matriz extracelular. A diferenciação adipogênica foi promovida pelo cultivo das CTMs em DMEM com 2,5µg/ml de insulina, 50µg/ml de indometacina e 8-10mol/ml de dexametasona. Foi evidenciada, 21 dias após o início do ensaio de diferenciação, por coloração com *Oil Red*, a qual tem a propriedade de corar os vacúolos de gordura. Foram realizados ensaios de citometria de fluxo para a caracterização da cultura celular como células-tronco. A cultura de CTMs foi caracterizada por imunofenotipagem a partir de testes de expressão dos marcadores de membrana CD29, CD90 (marcadores positivos) e CD11b e CD34 (marcadores negativos).

## 2.3 Procedimentos cirúrgicos

As feridas foram induzidas cirurgicamente em ratos submetidos à anestesia geral. Como medicação pré-anestésica foi administrado via intraperitoneal, cloridrato de tramadol (20 mg/kg). A anestesia geral inalatória foi realizada com isoflurano (4-5% para a indução e 1-2% para a manutenção), vaporizado em 100% de oxigênio (fluxo de O<sub>2</sub> de 0,5 l/min). Imediatamente após a indução, realizou-se ampla tricotomia na região cérvico-torácica dorsal e antissepsia do local com digluconato de clorexidina a 0,2%. O animal foi posicionado em decúbito ventral, e com o auxílio de um molde circular (trépano corneal 1cm), (Fig. 2), foi demarcada a forma do fragmento cutâneo, que foi removida da região dorsal, aproximadamente, à 1cm da borda escapular. A pele da área demarcada foi removida por dissecação. A profundidade da ferida incluiu a epiderme, a derme e a hipoderme (incluindo ainda o panículo carnosos), até a superfície externa das fâscias musculares.

Para cronificação, as feridas confeccionadas permaneceram abertas e receberam duas doses locais diárias de 50µl do agente indutor da queimadura química (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%), durante 15 dias, aplicadas com intervalos de sete horas, com o auxílio de micropipeta.

Após os 15 dias de indução da ferida crônica, os animais foram novamente anestesiados da mesma forma como descrito, anteriormente, para receber o tratamento com CTMs e NaCl 0,9%. O grupo controle recebeu como tratamento duas doses do veículo (NaCl 0,9%), em quatro pontos equidistantes da ferida nos momentos d0 e d5; o grupo CTM1 recebeu uma única dose de terapia celular; no momento d0 (1 dia após o final da cronificação das feridas), e NaCl 0,9% no momento d5; o grupo CTM2 recebeu duas doses de terapia celular nos momentos d0 e d5. Os animais foram mantidos conforme os períodos de avaliação: 7, 14 e 21 dias.

As CTMs foram administradas em d0 (1 dia após o final da cronificação das feridas), e d5, injetadas via intradérmica, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida. O volume de CTMs foi administrado com seringa de 1ml. As CTMs utilizadas variavam entre 3<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> passagem, na concentração de 1x10<sup>6</sup> células, suspensas em 0,2ml de NaCl 0,9%.

As datas de eutanásia, para coleta das feridas, para avaliações microscópicas, ocorreram aos 7, 14 e 21 dias após o início das aplicações dos tratamentos. Para isso, os animais foram novamente pré-medicados com cloridrato de tramadol (20mg/kg), administrado via intraperitoneal, e a eutanásia foi realizada com sobredose de isoflurano, até a parada cardiorrespiratória. A coleta dos fragmentos de tecido foi realizada englobando a ferida com uma fração de borda sadia. As amostras foram

acondicionadas em formaldeído tamponado a 10%, durante 24 horas, posteriormente incluídas em parafina e processadas de forma rotineira para análise histopatológica. Para avaliação da cicatrização de forma tridimensional, foi realizada microscopia eletrônica de varredura, e as amostras foram acondicionadas em glutaraldeído.

**Fig. 2.** Confecção da ferida cirúrgica, com auxílio de trépano corneal de 10cm de diâmetro.



#### 2.4 Análises macroscópicas

As feridas foram medidas com o auxílio de paquímetro digital antes da cronificação, no momento do tratamento das lesões  $d_0$  e  $d_3$ , e no momento das eutanásias:  $d_7$ ,  $d_{14}$  e  $d_{21}$ . Foram mensuradas em duas direções: o maior comprimento ( $c$ = medição crânio-caudal) e a maior largura ( $l$ = látero-lateral). A partir destes dados foi possível calcular a área da lesão e a taxa de contração em cada ferida. A área de contração da ferida ( $C$ ) foi calculada subtraindo-se a área inicial ( $A_1$ ), determinada no dia zero (dia do início do tratamento), da medida da área da lesão obtida nos dias de tratamento ( $d_0$  e  $d_5$ ) e de eutanásia ( $d_7$ ,  $d_{14}$  e  $d_{21}$ ), de forma que  $C = A_1 - A_{dx}$ . A taxa de contração cicatricial ( $TC$ ) foi avaliada a partir dos resultados prévios onde  $TC = C \times 100/A_1$ .

As feridas foram fotografadas e os ratos foram pesados em  $d_0$ ,  $d_5$ ,  $d_7$ ,  $d_{14}$  e  $d_{21}$ . Também foram registradas informações sobre o aspecto geral da ferida, da borda e da presença de sinais flogísticos da inflamação como edema, hiperemia, presença de crosta e exsudado; deformações da ferida; e aspectos da cicatrização; alterações comportamentais; bem como sinais de automutilação.

Todos os dados referentes às cirurgias, avaliações macroscópicas, eutanásia e coleta de biópsias foram documentados em fichas de controle.

## 2.5 Análises microscópicas

O estudo histopatológico com a coloração de HE foi realizado por três colaboradores, que não sabiam a qual grupo pertenciam os animais. O estudo imunohistoquímico foi avaliado pelo *software* de análise de imagens *Image J*, baseado na captura de dois campos aleatórios, com aumento de 200 vezes. Foram usados os seguintes imunomarcadores: anti-Ki67, VEGF, colágeno I, colágeno III e FGF.

## 2.6 Análise estatística

Foram descritos os parâmetros quantitativos de avaliação da cicatrização da ferida segundo grupos e dia da eutanásia com uso de medidas (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparados os parâmetros segundo grupos e dia da eutanásia com uso de análises de variâncias (ANOVA) com dois fatores. Os parâmetros qualitativos foram descritos segundo grupos e dia da eutanásia com uso de frequências absolutas e relativas e comparados com uso de modelos lineares generalizados (MLG) com distribuição Binomial e função de ligação logito para os parâmetros binários (parâmetros que estão presentes ou não na avaliação) e com distribuição Poisson e função de ligação identidade para os parâmetros que apresentam grau de gravidade na resposta.

Apenas o tipo da inflamação foi verificada associação com os grupos em cada tempo de eutanásia e foi verificada a associação com a eutanásia em cada grupo com uso de testes da razão de verossimilhanças, devido às múltiplas associações realizadas, essas análises devem ser avaliadas com nível descritivo de 0,008 (0,05/número de associações realizadas).

O peso dos animais foi descrito segundo grupos, dia de eutanásia e momentos de avaliações na evolução com uso de medidas resumo e comparado entre os parâmetros com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição normal e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações autorregressiva de primeira ordem entre os momentos da evolução.

As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para verificar onde ocorreram as diferenças entre grupos, dias de eutanásia quando significativas e para o peso também entre os momentos da evolução.

As análises foram realizadas com uso do *software* IBM-SPSS *for Windows* versão 20.0 e tabulados com uso do *software* Microsoft-Excel 2003 e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

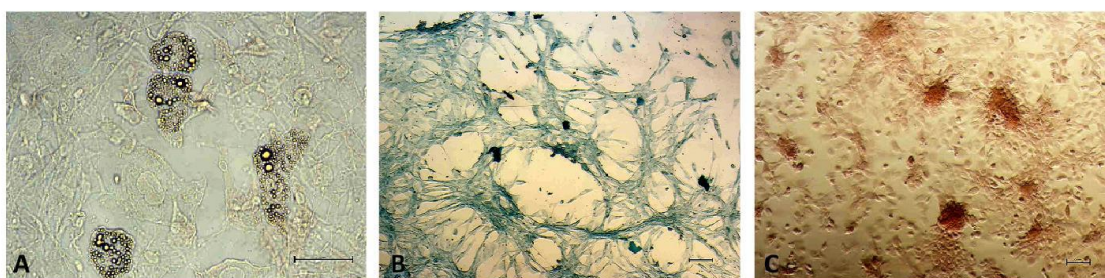
### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização das CTMs de tecido adiposo de ratos Wistar

A caracterização das CTMs realizada através do ensaio de indução de

**Fig. 3.** Caracterização das ADSCs obtidas a partir de tecido adiposo gonadal de rato Wistar. **A)** Diferenciação adipogênica detectada pela coloração *Oil Red*. HE, 100X. **B)** Diferenciação condrogênica detectada pela coloração *Alcian Blue*. HE, 400X **C)** Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin. HE, 400X.

diferenciação celular *in vitro*, obteve resultado positivo, pois estas foram capazes de se diferenciarem em linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica (Fig. 3).



#### 3.2 Aspectos técnicos do procedimento cirúrgico

Os procedimentos de anestesia geral e confecção das feridas nos ratos, foi satisfatório, pois foi considerado de fácil e rápido manuseio, atribuídos pela prática da equipe associado à docilidade dos animais. Ocorreram dois óbitos durante o

experimento, que foram considerados inconclusivos pela necropsia e histopatologia. Um deles, ocorreu no último dia de cronificação da ferida. O animal foi contabilizado como perda, já que não havia indicação para realização de toda a cronificação para um único animal.

A prática de confecção cirúrgica da ferida, com o uso do trépano corneal, foi considerada rápida e simples, além de ser eficiente molde circular para excisão da pele.

Ocorreram dois óbitos durante o experimento. Um deles no retorno anestésico, após indução da ferida. O outro, no 14º dia de cronificação.

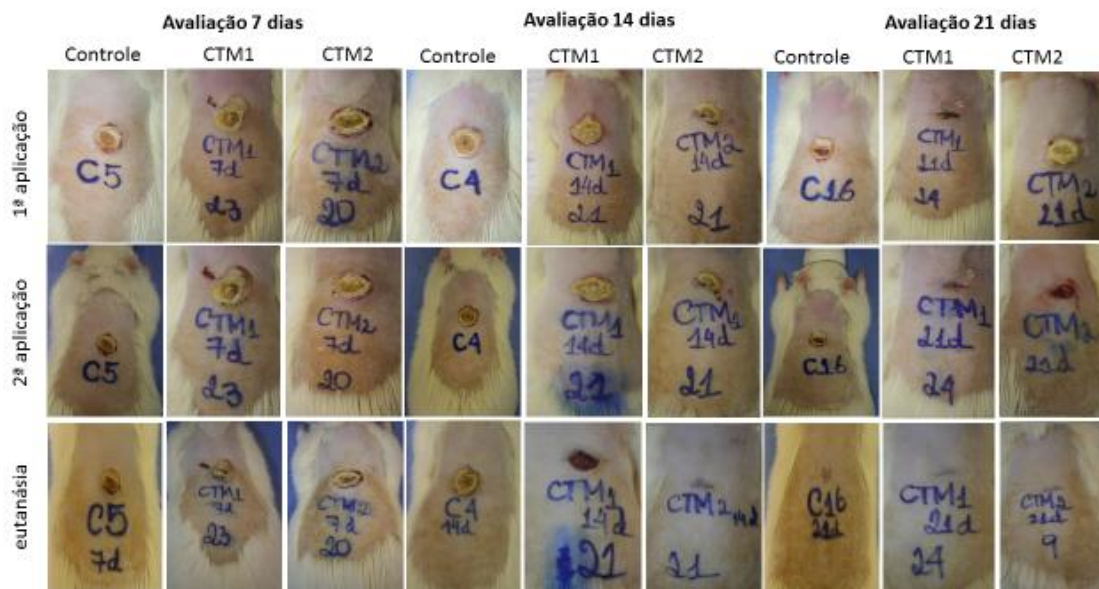
### *3.3 Avaliação macroscópica*

Macroscopicamente, os sinais flogísticos observados foram rubor e tumor presentes, principalmente, após a indução das feridas, durante o processo de cronificação até o início das terapias, além de crostas presentes nas feridas, perdurando durante todo o experimento, sendo menos evidente nos animais dos grupos CTM1 e CTM2, aos 21 dias de avaliação.

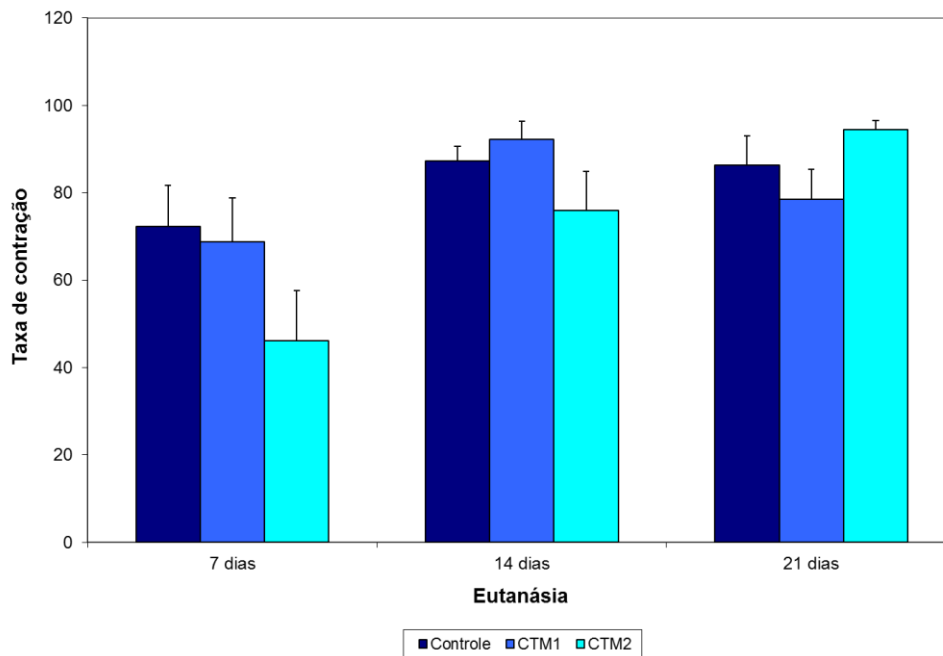
Aspectos macroscópicos das feridas são demonstrados na Fig. 4, representando os diferentes grupos, bem como momentos de aplicações e eutanásia.

O grupo CTM2-21 dias, apresentou em média maior taxa de contração que o grupo avaliado ao 7º dia ( $p < 0,001$ ) (gráfico 1).

**Fig. 4.** Aspectos macroscópicos das feridas, nos diferentes momentos: primeira aplicação, segunda aplicação e eutanásia. Cada coluna contém fotos das feridas de cada grupo. As fotos demonstram que aos 21 dias de avaliação, as feridas estavam completamente cicatrizadas, inclusive apresentando cicatrizes esteticamente melhores.



**Gráfico 1.** Taxa de contração (TC) das feridas, dos diferentes grupos, ao longo dos períodos de avaliação. Percebe-se que o grupo CTM2, teve maior TC aos 21 dias de avaliação, seguido do grupo CTM1-14 dias, os quais demonstraram TC de mais de 95%. As TC avaliadas aos 7 dias de avaliação, independente do grupo, foram menores que os demais períodos avaliados.



### 3.4 Peso dos animais



O peso médio dos animais apresentou comportamento, estatisticamente diferente ( $p < 0,001$ ), ao longo dos momentos de avaliação entre os grupos e conforme o dia de eutanásia. Os animais apresentaram ganho de peso médio normal compatíveis para as idades. Esse ganho de peso foi observado ao longo dos momentos de avaliação entre grupos e dia de eutanásia e foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

### 3.5 Avaliação microscópica

A frequência de úlcera demonstrada no HE foi estatisticamente diferente entre os grupos, independente do dia da eutanásia ( $p = 0,012$ ). Embora não tenham apresentado diferença estatística significativa, a fibrose foi mais intensa no grupo controle, principalmente na avaliação de 21 dias, corroborando com os resultados obtidos na avaliação do FGF. E, a angiogênese, foi mais evidente nos grupos controle e CTM2, nas avaliações de 7 e 14 dias, apresentando níveis de moderado à intenso.

**Tabela 1.** Resultado das comparações múltiplas da presença de úlceras entre grupos e do tipo de inflamação entre grupos e dia de eutanásia.

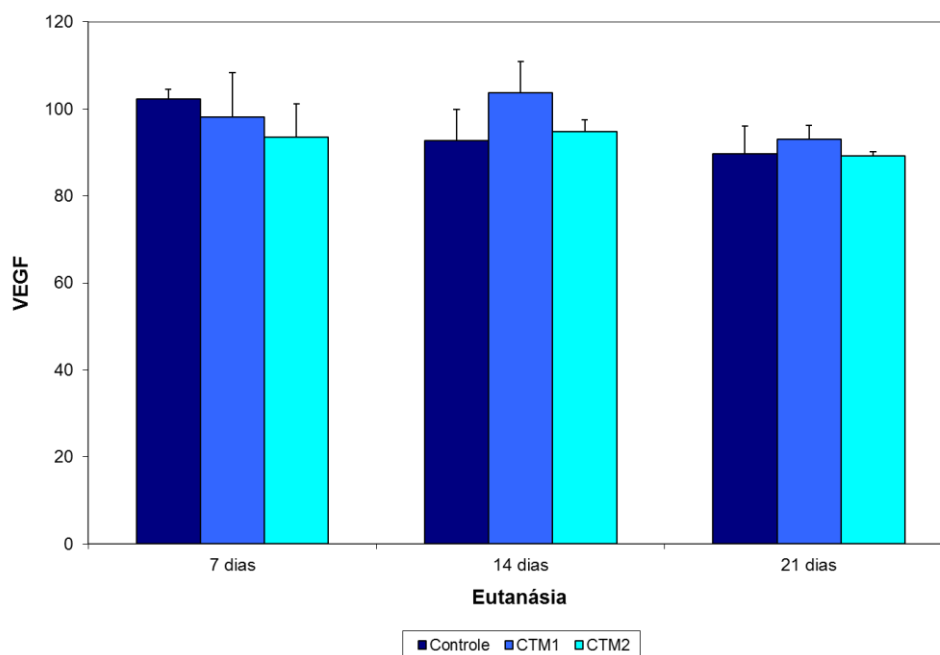
Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
HE - Úlcera (%)	Controle - CTM1	70,0	10,7	1	<b>&lt;0,001</b>	44,0	96,0
	Controle - CTM2	20,0	8,8	1	0,082	-2,0	41,0
	CTM1 - CTM2	-50,0	13,9	1	<b>0,001</b>	-84,0	-17,0

Comparações múltiplas de Bonferroni

O grupo CTM1 apresentou, estatisticamente menor frequência de úlcera que os demais grupos, independente do dia da eutanásia ( $p < 0,05$ ) (tabela 1) (Fig. 5A).

A avaliação do VEGF, não apresentou diferença estatisticamente significativa (gráfico 2).

**Gráfico 2.** Imunomarcção de VEGF. Observa-se maiores níveis de VEGF nos grupos Controle e CTM1, principalmente aos 7 e 14 dias (fases inflamatória e proliferativa). Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos, nem entre períodos de avaliação.



**Tabela 2.** Descrição do tipo da inflamação e dia de eutanásia.

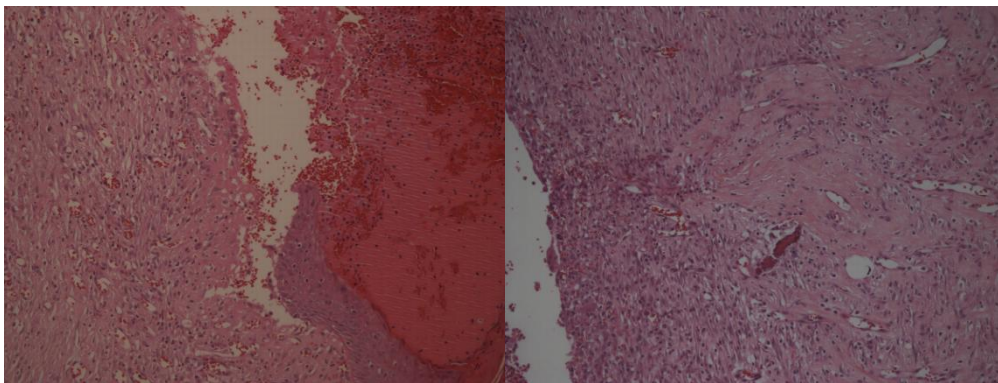
Variável	Controle			CTM1			CTM2		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
<b>HE - Tipo da inflamação</b>									
Não	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	4 (50)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	2 (25)
Aguda	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)
Crônica	1 (12,5)	2 (25)	6 (75)	5 (62,5)	2 (25)	2 (25)	0 (0)	1 (14,3)	2 (25)
Ambas	7 (87,5)	6 (75)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	8 (100)	5 (71,4)	4 (50)
<b>p*</b>		0,015			<b>0,006</b>			0,096	
<b>p#</b>		<b>0,006</b>			0,035			0,009	

\* Teste de associação entre HE-Tipo da inflamação e dia de eutanásia em cada grupo; # Associação entre HE-Tipo da inflamação e grupo em cada dia de eutanásia; Teste da razão de verossimilhanças

Houve associação entre o tipo da inflamação e o dia da eutanásia apenas no grupo CTM1 ( $p = 0,006$ ). Os animais sacrificados no 7º dia apresentaram, principalmente, mais inflamação crônica ou subaguda que os animais sacrificados nos demais dias (tabela 2).

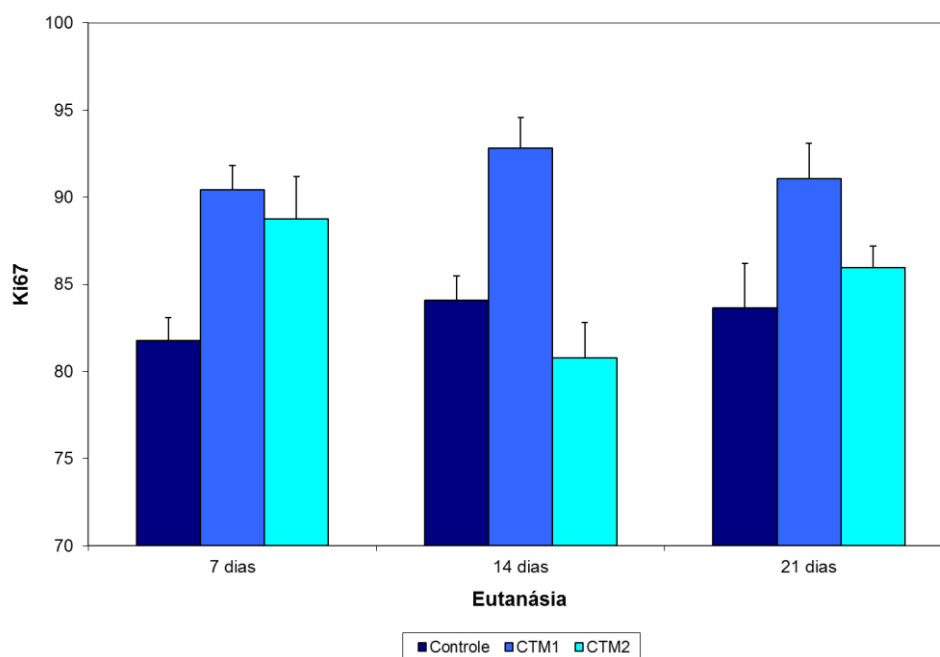
Houve associação, estatisticamente significativa, entre o tipo da inflamação e os grupos no 7º dia de avaliação ( $p = 0,006$ ), principalmente porque o grupo CTM1 apresentou maior frequência de inflamação crônica no dia da eutanásia. Os demais grupos apresentaram inflamação subaguda (Fig. 5B).

**Fig. 5.** A) Presença de úlcera, hemorragia e angiogênese abundantes em animal do grupo CTM2-14 dias. HE, 100X. B) Presença de fibrose e inflamação abundante em animal do grupo C-7 dias. HE, 100X.



A expressão do Ki67 no grupo CTM1 aos 7 e 14 dias, foi estatisticamente maior que no grupo controle (p = 0,013 e p = 0,011 respectivamente). O grupo CTM1-14 dias apresentou maior valor médio de Ki67 que o grupo CTM2 (p < 0,001).

**Gráfico 3.** Imunomarcção do Ki67. O grupo CTM1-7 e 14 dias, demonstra níveis estatisticamente maiores que o grupo controle (p = 0,013 e p = 0,011 respectivamente). O grupo CTM1-14 dias apresentou maior valor médio de Ki67 que o grupo CTM2 (p < 0,001).

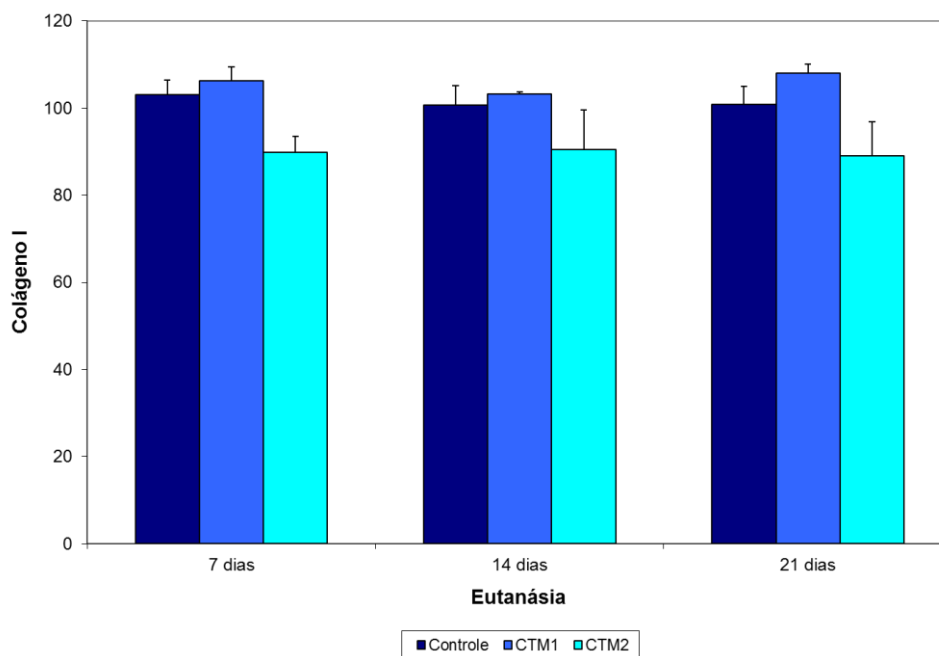


A expressão do colágeno I foi em média, estatisticamente, menor no grupo CTM2 que nos demais grupos (gráfico 4) (Fig. 6B), independente do dia da eutanásia. O

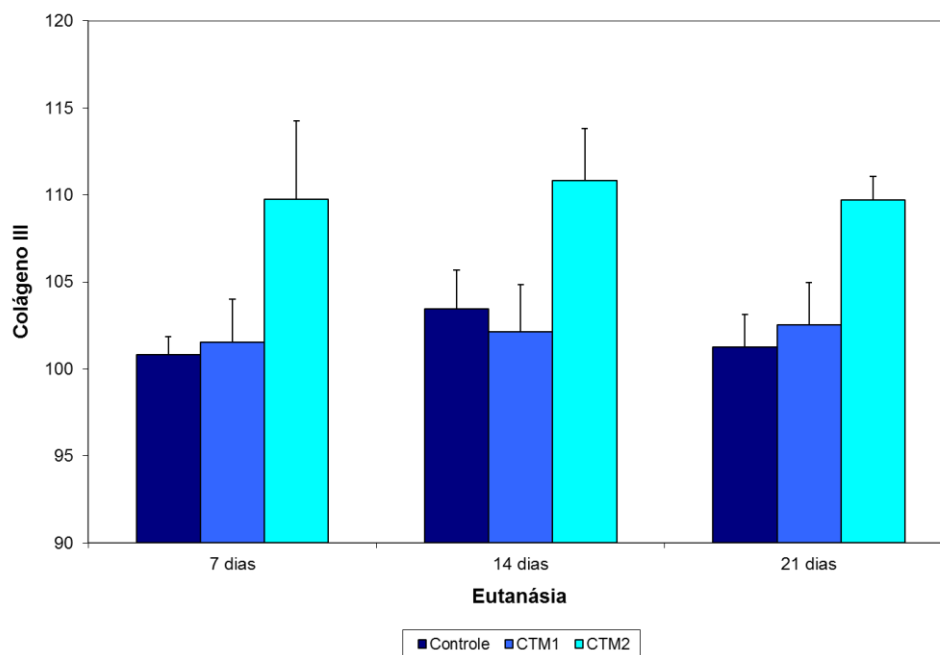
colágeno III foi em média, estatisticamente, maior nesse grupo que nos demais ( $p < 0,05$ ) (gráfico 5) (Fig. 6A).

O FGF apresentou diferença média entre todos os grupos independente do dia da eutanásia ( $p < 0,001$ ), sendo menor no grupo CTM2 e maior no grupo controle (gráfico 6) (Fig.7).

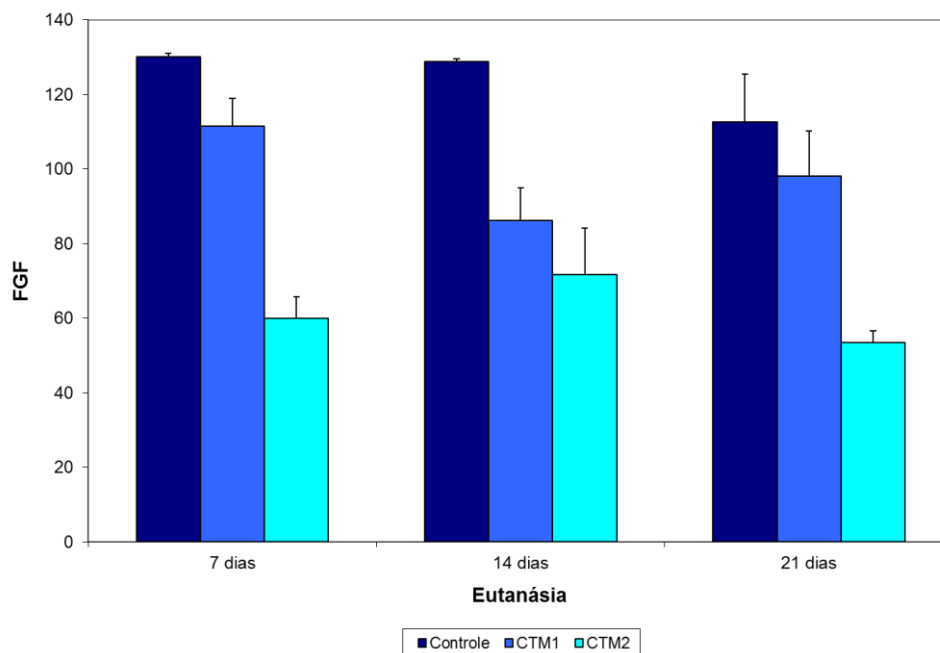
**Gráfico 4.** Imunomarcção do colágeno tipo I. O grupo CTM2 foi em média, estatisticamente menor que nos demais grupos.



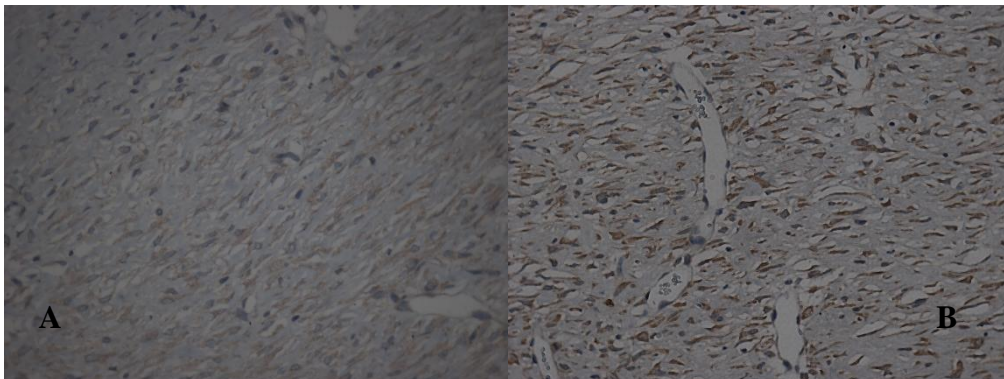
**Gráfico 5.** Imunomarcção do colágeno tipo III. O grupo CTM2 foi em média, estatisticamente, maior ( $p < 0,05$ ).



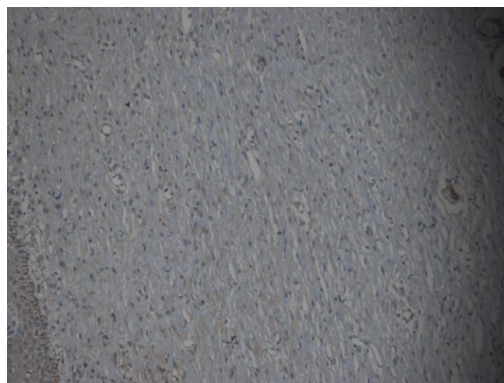
**Gráfico 6.** Imunomarcção do FGF. O FGF apresentou diferença média entre todos os grupos independente do dia da eutanásia ( $p < 0,001$ ), sendo menor no grupo CTM2 e maior no grupo controle.



**Fig. 6.** A) Imunomarcção do colágeno III em animal do grupo CTM2-21 dias. IMQ, 200X. B) Imunomarcção de colágeno I em animal do grupo CTM1-21 dias. IMQ, 200X.

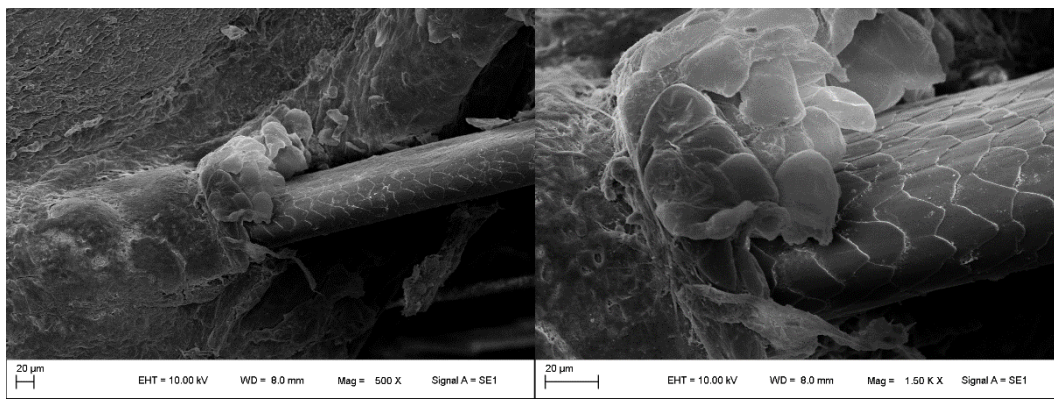


**Fig. 7.** Imunomarcção do FGF em animal do grupo CTM1-14 dias. IMQ, 100X.



A microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou crescimento de folículo piloso no grupo CTM2-7 dias (Fig 8).

**Fig. 8.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em animal do grupo CTM2-7 dias. Cicatrização completa da ferida com crescimento de folículos pilosos.



#### 4. Discussão

As CTMs derivadas de tecido adiposo apresentaram aderência ao plástico de cultivo, com morfologia semelhante aos fibroblastos e imunofenotipagem de acordo com critérios mínimos de caracterização de células-tronco mesenquimais. Após os ensaios específicos, foram capazes de diferenciar em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica [10].

O protocolo anestésico empregado foi adequado às necessidades inerentes à intervenção cirúrgica proposta, ou seja, rápida, não cruenta e de médio nível alérgico. A escolha das medicações pré e pós-operatórias, baseadas no uso de opióide (cloridrato de tramadol), foram consideradas satisfatórias, pois, não foram observados comportamentos relacionados à desconforto e/ ou dor dos animais. Esses parâmetros envolveram o regresso às atividades, logo após o retorno anestésico, avaliação diária de comportamento, questões relacionadas à alimentação e ingestão de água, bem como docilidade dos animais [11]. A eficiência do opióide deu-se pela promoção da analgesia, sem ser necessário o uso de anti-inflamatórios. Considerou-se a ação dos fatores anti-inflamatórios liberados pelas CTMs após o início das terapias [7].

O uso do trépano corneal, como molde para a confecção da ferida, se mostrou eficiente método de indução de ferida, pois possibilitou estabelecer uma lesão padrão, não sendo observado diferenças estatisticamente significativa entre elas [11].

Ocorreram dois óbitos durante os procedimentos. Um deles no momento do retorno anestésico, na etapa de indução da ferida e o outro, no último dia de cronificação. O primeiro óbito, acredita-se que tenha ocorrido por uma particularidade do animal, pois não foram observadas alterações que permitissem um diagnóstico à necropsia. Na necropsia do segundo óbito observou-se alterações em pulmão, que foram definidas como síndrome do desconforto respiratório agudo (SRDA). Possivelmente houve estresse crônico, causado pela manipulação, bem como pela cronificação, onde era realizado queimadura química com  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio a 35%), instilados no local da ferida. Pacientes com lesões crônicas podem ter a qualidade de vida fortemente afetada, levando ao sofrimento, incapacidade física e consequente morte [12]. Há relatado ainda, a toxicidade do  $H_2O_2$  que indica que se a pressão parcial de oxigênio excede a solubilidade máxima do oxigênio no sangue, pode ocorrer embolia gasosa resultando em insuficiência cerebral ou embolia pulmonar. Podendo promover ainda, dano tecidual, até a perfuração visceral quando ocorre liberação de oxigênio em cavidades do corpo [13]. Esse óbito poderia estar associado à este fator tóxico, já que a concentração do  $H_2O_2$  era alta. Embora o caso do óbito seja único, não se pode descartar essa possibilidade. O caso pode ainda ter sido agravado por estar associado aos outros fatores acima citados.

Macroscopicamente, foram avaliados os sinais cardinais presentes nas feridas durante todo o processo, desde a sua indução, momentos de terapia, até a eutanásia. Os sinais flogísticos observados em maior escala foram o rubor e o tumor, observados a partir da indução das feridas até o momento de início dos tratamentos. Observou-se também a presença de crostas de fibrina e algumas poucas escoriações, provenientes de lambadura por prurido, próximos ao local da ferida. Após o início das terapias, os sinais típicos de inflamação foram regredindo, principalmente nos grupos tratados com terapia celular, e a regressão mais evidente foi observada em todos os grupos, aos 21 dias. Houve ainda regressão das autolesões ocasionadas decorrentes de prurido. Por meio desta análise, foi possível constatar, macroscopicamente a ação anti-inflamatória das CTM. Essa ação ocorre da inibição de células inflamatórias, diminuição de interleucina-1 (IL-1) e TNF- $\alpha$ , diminuição ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e aumento do SOD (dismutase superóxido), bem como da GPx (glutathiona peroxidase), que agindo em



conjunto, diminuem de forma significativa o processo inflamatório local e sistêmico [2,7,12,14].

A avaliação do peso dos animais demonstrou que os grupos aumentaram, de forma significativa ( $p < 0,05$ ), em cada momento da avaliação. O período de cronificação gerava manipulação diária dos animais, nos turnos da manhã e final da tarde, para aplicação do analgésico e para a queimadura química, gerando estresse, mas ainda assim, aumentavam gradualmente o peso. Ao término das manipulações e início das terapias, eram manipulados apenas para troca de sala e indução anestésica, pois todos os procedimentos eram feitos sob anestesia geral. Isso gerou menos estresse, aumentou ainda mais a ingestão de alimento e água, obtendo-se assim ganho de peso médio considerado normal, para animais daquela idade.

As crostas de fibrina, compostas de ceratina, soro, detritos celulares e, frequentemente, restos de microrganismos, foram detectadas em, praticamente, todas as feridas. Considera-se que a presença destas, foi fundamental para o processo de cronificação, evitando a contração, conforme ocorre na cicatrização de roedores, diferentemente do processo fisiológico em humanos e modelos porcinos [15,16].

Com o início das terapias, todos os grupos apresentavam lento descolamento das crostas, iniciando com leve desprendimento da borda, mantendo uma pequena inserção, evoluindo para o total desprendimento. Isso foi bastante evidente ao longo das avaliações, principalmente nos grupos que receberam terapia celular, aos 14 e 21 dias.

Os animais que apresentavam crosta, também demonstraram maior grau de inflamação subaguda. Quando observa-se presença de crosta recobrendo a região lesada, há dissecação entre a MEC, porém, às custas de um retardo de velocidade de migração [17]. Conforme a lesão vai sendo preenchida por células epidermais, é acionado o mecanismo de “inibição por contato”. As células voltam a apresentar o fenótipo original, a membrana basal é recomposta e os hemidesmossomos e desmossomos são reconstituídos. Em seguida, o leito da ferida é totalmente preenchido pelo tecido de granulação e a circulação é restabelecida pela neovascularização. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, iniciando a aparência de cicatriz, devido ao acúmulo de massa fibrosa [18].

O grupo CTM2-21 dias apresentou os melhores índices de taxa de contração (TC), proporcionando a oclusão das lesões em menor período de tempo. Apresentou

ainda, cicatrizes esteticamente melhores, menos aparentes, quando comparadas ao grupo controle [11,19]. A terapia para cicatrização de feridas com CTMs em suínos jovens e saudáveis, não demonstrou melhora nas taxas cicatriciais, no entanto, demonstrou melhora em lesões mal vascularizadas. Isso sugere que a terapia celular teria uma eficácia maior quando utilizada em situações onde há interrupção da cicatrização. Por ação física e parácrina, as CTMs forneceriam melhora no suprimento sanguíneo, estimulando a angiogênese e atuando de forma benéfica no reparo, principalmente quando acompanhadas de fatores de crescimento [20].

A aplicação das CTMs foi local, intradérmica, em 4 pontos equidistantes da ferida, aplicada com seringa de 1ml e agulha de 0,34x13mm. Esse método foi considerado de fácil realização, pelo fato de o volume a ser aplicado ser mínimo (2ml = 1 milhão de células suspensas em 2ml de NaCl 0,9%) [21]. Entretanto, acredita-se que, a cada aplicação, tenha ocorrido uma agudização da ferida, pois o volume intradérmico injetado, embora sendo mínimo, gerou um leve inchaço nas bordas da ferida, ocasionando sinais típicos de inflamação aguda. Essa forma de aplicação é considerada facilitadora na condução da regeneração tissular, portanto, indicada para o tratamento de feridas [22]. A ação terapêutica dessa via pode ser limitada por conta do fraco potencial de retenção de células no local da lesão, sendo necessário um maior tempo de sobrevivência das CTMs para melhores resultados cicatriciais [7]. É importante considerar ainda, o ambiente da ferida como local hostil, onde fatores como celularidade, moléculas de sinalização solúveis, matriz extracelular (ME), forças mecânicas e tensão de oxigênio ( $O_2$ ), possam afetar a ação das CTMs e o seu potencial regenerativo [22].

A eficácia clínica pode ser totalmente dependente da quantidade de células aplicadas na lesão [23]. Não há consenso de doses estabelecidas. No entanto, Isakson et al. (2015) citam vários trabalhos realizados com ratos e camundongos, com quantidade de  $1 \times 10^6$ . As terapias com essa dosagem resultaram em aumento da neovascularização, aumento da epitelização, aumento do tecido de granulação, aumento do número e densidade capilares, aumento significativo dos fatores de crescimento liberados pelas células-tronco, como EGF, FGF, VEGF, IL-1b, IL-4 e diminuição de TNF- $\alpha$  e fatores pró-inflamatórios [24–27]. A quantidade de CTMs ( $1 \times 10^6$ ) utilizadas no presente estudo está de acordo com as doses que vêm sendo utilizadas, uma vez que podem variar de  $2 \times 10^4$  [28] a  $1,4 \times 10^8$  [29], para modelos de feridas excisionais e ocasionadas por

queimadura. O presente estudo demonstrou através dos resultados obtidos, que embora não apresentasse diferença estatisticamente significativa, os índices de VEGF, foram expressivos [18,19,30]. O grupo CTM2 obteve a melhor taxa de contração, corroborando com estudos que demonstram os efeitos benéficos das CTMs sobre a velocidade cicatricial [7,19,31,32].

A passagem das CTMs utilizadas no presente estudo, variaram de três a seis passagens e foram coletadas de gordura peritesticular de ratos. Um estudo realizado com tecido adiposo, coletado de sítio subcutâneo e visceral (periovariano), de fêmeas caninas durante ovarioossalpingohisterectomia (OHS), avaliou a quantidade proliferativa de CTMs. Os dados desse estudo demonstraram que células oriundas de tecido adiposo de tecido subcutâneo possuem vantagens em relação à outras fontes de células-tronco, como por exemplo a visceral. Preservam sua multipotencialidade até 8ª passagem, tem maior capacidade de sintetizar matriz óssea *in vitro* e consideraram ainda, sua extração menos invasiva [33]. Outro estudo que avaliou a senescência de células-tronco derivadas de tecido adiposo de gordura abdominal humana, entre 3ª e 7ª passagens, relatam viabilidade e multipotencialidade [34].

A presença de úlcera, que representa uma descontinuidade da pele, demonstrando diferença estatisticamente significativa quando comparada entre grupos foi mais evidente no grupo CTM2. Em feridas tratadas com CTMs, os fibroblastos produzem maior quantidade de fibras colágenas, gerando aumento da resistência da cicatriz, há menor contração da ferida e maior produção de matriz-metaloproteinase (MMP). Esses processos controlam a exacerbação da deposição de colágeno, induzindo melhor resultado estético da ferida ou da cicatriz, mantendo as funções normais da pele [23,35]. Cabe salientar que em cada fase da cicatrização há uma série de eventos celulares e que as CTMs têm efeitos em cada um desses momentos. Por isso, acredita-se que quando não houver a ação da CTM esperada, talvez a fase da cicatrização possa ter sido acelerada ou retardada, possivelmente pelo processo crônico e, por este motivo, não ocorreram os eventos esperados para aquela fase em questão, não significando que houve falha na conduta das CTMs [30].

Microscopicamente, houve associação estatisticamente significativa no tipo da inflamação entre grupos no 7º dia de eutanásia ( $p = 0,006$ ). Principalmente porque o grupo CTM1, apresentou maior frequência de inflamação crônica, enquanto que os

demais grupos apresentaram inflamação subaguda (aguda e crônica). A utilização da terapia celular, têm demonstrado o reparo acelerado da cicatrização, diminuindo significativamente a inflamação presente em feridas agudas [36–40]. No presente estudo, a ferida era crônica, tendo uma diferença no curso do reparo e na celularidade presente. Feridas crônicas tendem a ser mais difíceis de cicatrizar, demandando um tempo de reparo mais prolongado que feridas agudas. Pode-se perceber que o grupo CTM2, que recebeu terapia celular nas fases inflamatória e de proliferação, apresentou menos inflamação que o grupo CTM1, que recebeu terapia celular apenas na fase inflamatória. O ato de aplicar o veículo na borda da lesão, poderia ocasionar uma nova injúria tecidual, agudizando a ferida e, por conseguinte, a manteria inflamada por mais tempo. Pode ser ainda, devido à presença do agente indutor de cronicidade ( $H_2O_2$ ), que é considerado tóxico ao tecido e às células. O  $H_2O_2$  pode afetar a cicatrização, por meio da sua comprovada toxicidade, quando em altas concentrações, inibindo a proliferação celular, principalmente angiogênese, a liberação dos fatores de crescimento, importantes nesta fase da cicatrização, como também, causando hipóxia tecidual [13]. Essa situação é compatível com o estudo que sugere que as CTMs tem seu potencial máximo em lesões onde há falha na angiogênese [20]. Nesse caso, pode ter fornecido o suprimento sanguíneo, favorecido e evidenciando os expressivos índices de VEGF nos grupos tratados com terapia celular.

A angiogênese é um fator muito importante para a cicatrização de pele, sendo o VEGF e o FGF potentes fatores angiogênicos, uma vez que o restabelecimento do suprimento sanguíneo é obrigatório para a recuperação de tecidos lesados [3,20,42]. No presente estudo, não houve diferença significativa nos níveis de VEGF quando comparado entre grupos, porém, houve um aumento estatístico significativo nos níveis de FGF no grupo controle.

Tem sido observado aumento da secreção de fatores de crescimento, quando na presença de CTMs [3,20,30,43,44]. Esses fatores estimulariam, por ação parácrina das CTMs, o recrutamento, a migração e a proliferação de células endógenas no ambiente da lesão, fazendo, portanto, com que as CTMs promovessem angiogênese, epitelização e remodelação de feridas, contribuindo positivamente na cicatrização [3]. Embora não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, os dados obtidos revelaram níveis mais expressivos de angiogênese aos 7 e 14 dias, diferentemente do estudo que relata que aos 4 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo

controle e o que recebeu terapia celular, uma vez que foi detectada diminuição da angiogênese nesse intervalo [35]. Além disso, o aumento de produção de TGF- $\beta$ , que pode ocorrer por via endógena, bem como pela presença de CTMs, pode inibir a proliferação de LT, podendo afetar assim a produção dos fatores de crescimento, influenciando na proliferação de novos vasos sanguíneos, principalmente quando expostos à hipóxia [3].

Embora as CTMs tenham apresentado-se eficazes, no tratamento de feridas agudas e crônicas, seus mecanismos ainda não foram totalmente elucidados. Acredita-se que o aumento nas taxas de cicatrização ocorram por dois mecanismos: diferenciando-se em células da pele ou por secreção de fatores parácrinos, que podem iniciar o processo de cicatrização através do recrutamento de células-tronco endógenas e células endoteliais (ECs) ou regulação negativa à resposta inflamatória [45]. Não foram feitas análises possíveis de se descobrir por qual destes mecanismos as CTMs agiram, mas acredita-se que houve benefícios no reparo cicatricial, bem como na qualidade da cicatriz, principalmente pelos resultados positivos nos grupos CTM1 e CTM2.

Os níveis de VEGF foram expressivos e mais evidentes no grupo CTM1-14 dias, seguido do grupo controle-7 dias. Contudo não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Essa citocina está envolvida na formação de novos vasos sanguíneos e permeabilidade vascular, além de fazer parte de processos inflamatórios [32]. Além de ser um dos fatores de proangiogênese mais importantes que promovem a angiogênese, estimulam a migração e proliferação celular, retardam a senilidade, inibem a apoptose e promovem a sobrevivência celular [19,24]. Estudos sugerem que, na presença de CTMs, os níveis de proliferação dessa citocina sejam mais elevados [8,18,39–41,47]. Os resultados obtidos demonstram que, nas fases iniciais da cicatrização esses níveis foram maiores e, ao longo do tempo diminuíram. O grupo CTM2 demonstrou baixos níveis quando avaliado ao 21º dia. Esses resultados diferem de trabalhos [26,48] que relatam aumento significativo dos níveis de VEGF nos grupos tratados com uma e duas aplicações de CTMs. Esse fato pode ter ocorrido pelo aceleração da cicatrização neste grupo, já que aos 21 dias, seus níveis eram menores, quando comparado aos outros grupos. O processo de angiogênese é mais característico dos períodos inflamatório e proliferativo, e na fase final, surge o tecido de granulação [17]. À medida que a ferida cicatriza, a densidade de fibroblastos e macrófagos são reduzidas por apoptose. Com o tempo, o crescimento dos capilares cessa, o fluxo sanguíneo para a

área declina e a atividade metabólica diminui, resultando em uma ferida completamente cicatrizada [41].

O Ki67 é expresso em núcleos de células durante as fases de divisão celular, sendo considerado importante marcador de proliferação de células [26]. O presente estudo demonstrou níveis estatisticamente significativos da sua expressão no grupo CTM1. Há uma proliferação maior de células, como fibroblastos, células vasculares endoteliais, células basais e células epiteliais do folículo capilar, durante o processo de cicatrização, sugerindo, melhora na regeneração tissular [19]. No entanto, esperava-se que o grupo CTM2 apresentasse os maiores níveis de Ki67, pois recebeu duas doses de CTMs, nas duas primeiras fases do processo cicatricial. Esse resultado reforçaria os dados obtidos por Kuo *et al.* (2011), que relatam que duas aplicações de CTMs, seriam mais eficientes do que uma única aplicação, utilizando metodologia distinta. Um estudo comparando diferentes momentos de aplicação em feridas aguda, relata que não repercutiu diferenças singnificativas quando comparados os momentos de aplicação [11].

O grupo CTM1 apresentou maior expressão do Ki67, independente do momento da eutanásia, seguido do grupo CTM2 e Controle, evidenciando que a terapia aplicada no momento 0, foi mais eficiente, quando comparada ao grupo CTM2 e o grupo controle. Quanto ao colágeno I, houve maior proliferação no grupo CTM1, sugerindo feridas em processo de maturação. O grupo CTM2, evidenciou maior proliferação de colágeno III, sugerindo que aplicações de CTMs em momentos 0 e 5 podem ter estimulado ainda mais a proliferação de fibroblastos que produziram muito mais colágeno, indicando que ambas as terapias foram mais eficientes que grupo o controle. Esses resultados demonstram que a terapia celular, para estas avaliações, foi mais eficiente em promover a cicatrização na fase proliferativa, quando avaliada e comparada entre grupos.

O grupo CTM1 apresentou índices estatisticamente significativos de colágeno I, mais expressivo aos 21 dias, sugerindo que uma aplicação de terapia celular, na fase inflamatória, seria suficiente para que a deposição de colágeno maduro e melhor estruturado fosse adequada, quando comparada ao grupo CTM2. Esse resultado para o grupo CTM1 corrobora com a ideia de que em fase fibroblástica, o colágeno tipo III é mais abundante, pois aqui, se estendendo à fase de maturação, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, o que inicia o processo de cicatriz, devido ao acúmulo de massa fibrosa [17,41,49]. A segunda aplicação de terapia celular no grupo

CTM2, pode ter interferido na síntese do colágeno I, aumentando o tempo de permanência dessa proteína, até a sua maturação. Outro fator importante, é que o processo de fibroplasia depende da neovascularização para ocorrer. Quando há deficiência na angiogênese, a deposição de colágeno fica comprometida. Em feridas recentes, há o predomínio do colágeno tipo III, enquanto que no amadurecimento da ferida, vai sendo substituído pelo colágeno tipo I [23,49]. Isso evidencia um processo de agudização no grupo CTM2, que pode ter ocorrido pela aplicação da segunda dose da terapia, retardando o processo normal de transformação do colágeno III em I, desorganizando a evolução cicatricial normal. A presença do colágeno I no grupo CTM1, sugere feridas já em processo de maturação, sendo que sua produção é mais intensa por volta dos 7 ao 14 dias, atingindo sua produção máxima aos 21 dias, acordando com os dados da literatura [50,51].

Na fase proliferativa, as CTMs aumentam a produção de fatores de crescimento importantes para o reparo [23,35,41,42]. O FGF endógeno, tem uma função muito importante, sendo um potente agente mitogênico, quimioatrativo e pró-angiogênico. Promove portanto, o crescimento e a diferenciação de um amplo espectro de tipos celulares, incluindo fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e melanócitos [52]. Acelerador da cicatrização de feridas, melhora a qualidade cicatricial, regulando o equilíbrio da síntese de MEC, bem como sua degradação. É ainda, um agente estimulante para a formação de tecido de granulação [25,53]. Os grupos CTM2 e CTM1 demonstraram níveis de FGF compatíveis com processo cicatricial em maturação, ou seja, já não apresentavam fibroplasia. Estes eventos normalmente ocorrem na fase final da cicatrização (fase de reparo ou maturação), onde há aumento do número de fibroblastos ativos para produção de colágeno e a MEC começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico, e para isso seria fundamental a ocorrência em paralelo da neovascularização [17]. No entanto, os dados obtidos revelam que o processo cicatricial nos grupos CTM1 e CTM2 ocorreu de forma mais rápida que o grupo controle. Visto que esta diminuição da fibrose foi reduzindo a cada período de avaliação. Estes dados corroboram com estudos que indicam os fatores de crescimento como facilitadores e beneficiadores no processo de reparo de feridas por ação parácrina ou por fusão às células do local da lesão, otimizando o processo de reparo [3,41,54,55]. O FGF influencia a formação de tecido de granulação, epitelização e o reparo tecidual, mostrando resultados variáveis em ensaios clínicos de controle randomizados, resultando em processo cicatricial favorável no reparo de úlceras de pressão [56]. No

perfil de secreção de CTMs e verificou-se que as células segregavam TGF- $\beta$ , VEGF, KGF, FGF, PDGF, HGF, fibronectina e colágeno I95. Esses fatores demonstram estimular o processo de cicatrização de feridas agudas e crônicas, sugerindo que CTMs podem afetar outros tipos de células, especificamente na pele [45]. [45,57].

O método de cronificação das feridas foi realizado a partir de queimadura química, com o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em concentração de 35%, ou seja, o peróxido de hidrogênio praticamente puro em sua composição. Uma recente revisão de literatura descrevendo os usos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cirurgia, relata o efeito citotóxico, através da peroxidação lipídica desta substância na pele, e sua interferência na cicatrização [13]. Além disso, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno estimula a liberação de VEGF em modelos *in vitro*, de uma maneira dependente da dose. O uso de creme de peróxido de hidrogênio, como tratamento tópico para úlceras isquêmicas em cobaias, resultou em perfusão vascular significativamente maior em comparação com o creme de placebo, provavelmente devido ao aumento da atividade do VEGF [13].

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em baixas concentrações (1,5% - 3,5%) aumenta a proliferação de fibroblastos. No entanto, experimentos *in vitro* mostraram que altas concentrações ocasionam citotoxicidade de fibroblastos [58,59]. Há ainda, comprometimento dependente da dose, da viabilidade e migração dos queratinócitos em culturas celulares. Embora as concentrações menores que 0,02%, tenham mostrado apenas um menor impacto na viabilidade dos queratinócitos com mais de 80% deles permanecendo funcionais e intactos, levaram a uma redução irreversível na viabilidade dos queratinócitos [13]. Após lesão pulmonar aguda no tecido alveolar (*in vitro*), a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causou inibição do reparo epitelial e indução da apoptose de células epiteliais. A oclusão da ferida num período de 24h reduziu de 95% para 27%. A apoptose das células epiteliais alveolares foi cogitada como suspeita de ser o mecanismo pelo qual resultou na inibição do reparo epitelial [13].

A toxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em altas concentrações, pode ocorrer por três diferentes mecanismos: formação de oxigênio, dano corrosivo e peroxidação lipídica [13]. Se a pressão parcial de oxigênio exceder a solubilidade máxima do oxigênio no sangue, pode ocorrer embolia gasosa resultando em insuficiência cerebral ou embolia pulmonar, além de dano tecidual, até a perfuração visceral, quando ocorre liberação de oxigênio em cavidades do corpo [13].

Com base nos relatos da literatura, é possível afirmar que pode ter interferido na ação das CTMs, ocasionando o processo crônico e o retardo cicatricial nas avaliações de



7 dias, bem como na expressão de fatores de crescimento e VEGF que, sabidamente, tem ação imprescindível no reparo de feridas, principalmente nas fases de inflamação e de proliferação, no entanto, não foi capaz de inibir totalmente os efeitos da terapia.

É importante considerar que o ambiente da ferida é considerado um local bastante suscetível e hostil, onde fatores como celularidade, moléculas de sinalização solúveis, matriz extracelular (ME), forças mecânicas e tensão de oxigênio ( $O_2$ ), podem afetar de diversas formas a ação das CTMs e, por conseguinte, seu potencial de ação e regeneração local [22].

Ressalta-se, também, a dificuldade de comparação entre os dados presentes na literatura e os resultados deste estudo, considerando uma grande discrepância entre as formas de realização, uma vez que não há, ainda, protocolos padronizados, impossibilitando comparações diretas. Regulski (2016) considera que as CTMs seriam uma terapia ideal no tratamento de feridas crônicas. Assim, ainda são necessários outros estudos, principalmente, sobre os mecanismos de ação das CTMs, sua ação nos diferentes modelos animais, bem como repercussões em feridas agudas e crônicas de diferentes origens. O conhecimento destas questões básicas, possibilitariam melhores abordagens, com resultados mais precisos, e conseqüentemente, possibilitariam seu uso, não só em estudos experimentais, mas, também, como prática médica veterinária e humana.

## **5. Conclusão**

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os grupos CTM2 e CTM1 tiveram os melhores resultados, sendo os grupos que tiveram maiores taxas de cicatrização.

Esses dados comprovam que a terapia celular foi eficiente para promover cicatrização de feridas crônicas de forma mais rápida e eficiente, quando comparadas ao grupo controle, além de demonstrar que, duas aplicações de terapia celular, tem melhores resultados que uma única aplicação.

## 6. Referências

- [1] P. Zahorec, J. Koller, L. Danisovic, M. Bohac, Mesenchymal stem cells for chronic wounds therapy, *Cell Tissue Bank*. 16 (2015) 19–26.  
doi:10.1007/s10561-014-9440-2.
- [2] M. Otero-Viñas, V. Falanga, Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy, *Adv. Wound Care*. 5 (2016) 149–163. doi:10.1089/wound.2015.0627.
- [3] N. Bertozzi, F. Simonacci, M.P. Grieco, E. Grignaffini, E. Raposio, The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing, *Ann. Med. Surg.* 20 (2017) 41–48.  
doi:10.1016/j.amsu.2017.06.058.
- [4] G. Marfia, S.E. Navone, C. Di Vito, N. Ughi, S. Tabano, M. Miozzo, C. Tremolada, G. Bolla, C. Crotti, F. Ingegnoli, P. Rampini, L. Riboni, R. Gualtierotti, R. Campanella, Mesenchymal stem cells: Potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds, *Organogenesis*. 11 (2015) 183–206. doi:10.1080/15476278.2015.1126018.
- [5] J.-P. Zou, S. Huang, Y. Peng, H.-W. Liu, B. Cheng, X.-B. Fu, X.-F. Xiang, Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds., *Int. J. Low. Extrem. Wounds*. 11 (2012) 244–53. doi:10.1177/1534734612463935.
- [6] K. Rodgers, S.S. Jadhav, The application of mesenchymal stem cells to treat thermal and radiation burns, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2017).  
doi:10.1016/j.addr.2017.10.003.
- [7] D.. Lee, D.E; Ayoub, N; Agrawal, Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy, *Stem Cell Res. Ther.* 37 (2016) 2–8.
- [8] M.J. Regulski, Mesenchymal Stem Cells: “Guardians of Inflammation,” *Wounds*. 29 (2016) 20–27.
- [9] L. Hu, J. Wang, X. Zhou, Z. Xiong, J. Zhao, R. Yu, F. Huang, H. Zhang, L.

- Chen, Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32993. doi:10.1038/srep32993.
- [10] P. Bourin, B.A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A.J. Katz, K.L. March, H. Redl, J.P. Rubin, K. Yoshimura, J.M. Gimble, Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/ stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S, *Cytherapy*. 15 (2013) 641–648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.Stromal.
- [11] W.K. Beheregaray, G.C. Gianotti, F. Oliveira, P. Terraciano, S. Bianchi, S. Vidor, C.F. Marcolan, E.A. Contesini, E.O. Cirne-Lima, W.K. Beheregaray, G.C. Gianotti, F. Oliveira, P. Terraciano, S. Bianchi, S. Vidor, C.F. Marcolan, E.A. Contesini, E.O. Cirne-Lima, Células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas, *Arq. Bras. Med. Veterinária E Zootec.* 69 (2017) 1591–1600. doi:10.1590/1678-4162-9461.
- [12] A. Owczarczyk-Saczonek, A. Wociór, W. Placek, W. Maksymowicz, J. Wojtkiewicz, The Use of Adipose-Derived Stem Cells in Selected Skin Diseases (Vitiligo, Alopecia, and Nonhealing Wounds), *Stem Cells Int.* 2017 (2017). doi:10.1155/2017/4740709.
- [13] M.V. Urban, T. Rath, C. Radtke, Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): a review of its use in surgery, *Wiener Medizinische Wochenschrift.* (2017). doi:10.1007/s10354-017-0610-2.
- [14] M. Madrigal, K.S. Rao, N.H. Riordan, A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods, *J. Transl. Med.* 12 (2014) 260. doi:10.1186/s12967-014-0260-8.
- [15] S.W. Volk, M.W. Bohling, Comparative wound healing - Are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research?, *Wound Repair Regen.* 21 (2013) 372–381. doi:10.1111/wrr.12049.

- [16] A. José, R. Tramonte, D. Bürger, P.J. Bürger, Efeitos da quercetina na cicatrização de ferida cirúrgica contaminada em ratos Wistar, *Medicina (B. Aires)*. 36 (2007) 69–75.
- [17] C.A. Balbino, L.M. Pereira, R. Curi, Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, *Rev. Bras. Ciências Farm.* 41 (2005) 27–51. doi:10.1590/S1516-93322005000100004.
- [18] Y. An, W.J. Liu, P. Xue, Y. Ma, L.Q. Zhang, B. Zhu, M. Qi, L.Y. Li, Y.J. Zhang, Q.T. Wang, Y. Jin, Autophagy promotes MSC-mediated vascularization in cutaneous wound healing via regulation of VEGF secretion, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 58. doi:10.1038/s41419-017-0082-8.
- [19] J. Wan, L. Xia, W. Liang, Y. Liu, Q. Cai, Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats, *J Diabetes Res.* 2013 (2013) 647107. doi:10.1155/2013/647107.
- [20] M.W. Blanton, I. Hadad, B.H. Johnstone, J.A. Mund, P.I. Rogers, B.L. Eppley, K.L. March, Adipose Stromal Cells and Platelet-Rich Plasma Therapies Synergistically Increase Revascularization during Wound Healing, *Plast. Reconstr. Surg.* 123 (2009) 56S–64S. doi:10.1097/PRS.0b013e318191be2d.
- [21] M. Pourjafar, M. Saidijam, K. Mansouri, H. Ghasemibasir, F. Karimi dermani, R. Najafi, All-trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound repair in vivo, *Cell Prolif.* 50 (2017) 1–11. doi:10.1111/cpr.12315.
- [22] M. Isakson, C. de Blacam, D. Whelan, A. McArdle, A.J.P. Clover, Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential, *Stem Cells Int.* 2015 (2015) 1–12. doi:10.1155/2015/831095.
- [23] J.S. Chen, V.W. Wong, G.C. Gurtner, Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cutaneous wound healing, *Front. Immunol.* 3 (2012) 1–9. doi:10.3389/fimmu.2012.00192.
- [24] G. Huang, S. Ji, P. Luo, Y. Zhang, G. Wang, S. Zhu, S. Xiao, Z. Xia, Evaluation of Dermal Substitute in a Novel Co-Transplantation Model with Autologous Epidermal Sheet, *PLoS One.* 7 (2012) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0049448.

- [25] C. Nie, D. Yang, J. Xu, Z. Si, X. Jin, J. Zhang, Locally administered Adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis, *Cell Transplant.* 20 (2011) 205–216. doi:10.3727/096368910X520065.
- [26] L. Kaisang, W. Siyu, F. Lijun, P. Daoyan, C.J. Xian, S. Jie, Adipose-derived stem cells seeded in Pluronic F-127 hydrogel promotes diabetic wound healing, *J. Surg. Res.* 217 (2017) 63–74. doi:10.1016/j.jss.2017.04.032.
- [27] Q. Li, Y. Guo, F. Chen, J. Liu, P. Jin, Stromal cell-derived factor-1 promotes human adipose tissue-derived stem cell survival and chronic wound healing, *Exp. Ther. Med.* 12 (2016) 45–50. doi:10.3892/etm.2016.3309.
- [28] C. Hou, L. Shen, Q. Huang, J. Mi, Y. Wu, M. Yang, W. Zeng, L. Li, W. Chen, C. Zhu, The effect of heme oxygenase-1 complexed with collagen on MSC performance in the treatment of diabetic ischemic ulcer, *Biomaterials.* 34 (2013) 112–120. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.022.
- [29] B.M. Borena, A.M. Pawde, Amarpal, H.P. Aithal, P. Kinjavdekar, R. Singh, D. Kumar, Evaluation of autologous bone marrow-derived nucleated cells for healing of full-thickness skin wounds in rabbits, *Int. Wound J.* 7 (2010) 249–260. doi:10.1111/j.1742-481X.2010.00683.x.
- [30] W. Ceron, I. Lozada-Requena, K. Ventocilla, S. Jara, M. Pinto, M. Cabello, J.L. Aguilar, Células tronco mesenquimales: Definiciones, cultivo y aplicaciones potenciales, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* 33 (2016) 758–771. doi:10.17843/rpmesp.2016.334.2563.
- [31] B.M. Derby, H. Dai, J. Reichensperger, L. Cox, C. Harrison, N. Cosenza, M. Yang, R.A. Bueno, M.W. Neumeister, Adipose-Derived Stem Cell to Epithelial Stem Cell Transdifferentiation: A Mechanism to Potentially Improve Understanding of Fat Grafting’s Impact on Skin Rejuvenation, *Aesthetic Surg. J.* 34 (2014) 142–153. doi:10.1177/1090820X13515700.
- [32] P. Xie, S. Jia, R. Tye, W. Xu, A. Zhong, S.J. Hong, R.D. Galiano, T.A. Mustoe, Topical Administration of Oxygenated Hemoglobin Improved Wound Healing in an Ischemic Rabbit Ear Model, *Plast. Reconstr. Surg.* 137 (2016) 534–543.

doi:10.1097/01.prs.0000475763.94203.52.

- [33] J. Yanesselli, K. M; Kuhl, C.P.; Terraciano, P;B; Oliveira, F. S; Pizzato, S.B.; Pazza, K; Magrisso, A.B; Torman, V; Rial, A; Moreno, M; Llambí, S; Cirne-Lima, E.O; Maisonnave, Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers, *J Vet Sci.* 19 (2018) 13–20.  
doi:10.4142/jvs.2018.19.1.13.
- [34] Y. Lim, M. Lee, H. Jeong, H. Kim, Involvement of PI3K and MMP1 in PDGF-induced Migration of Human Adipose-derived Stem Cells, *Dev. Reprod.* 21 (2017) 167–180. doi:10.12717/DR.2017.21.2.167.
- [35] J.W. Kim, J.H. Lee, Y.S. Lyoo, D.I. Jung, H.M. Park, The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds, *Vet. Dermatol.* 24 (2013). doi:10.1111/vde.12011.
- [36] D.M. Lough, M. Yang, A. Blum, J.D. Reichensperger, N.M. Cosenza, N. Wetter, L.A. Cox, C.E. Harrison, M.W. Neumeister, Transplantation of the LGR6+ Epithelial Stem Cell into Full-Thickness Cutaneous Wounds Results in Enhanced Healing, Nascent Hair Follicle Development, and Augmentation of Angiogenic Analytes, *Plast. Reconstr. Surg.* 133 (2014) 579–590.  
doi:10.1097/PRS.0000000000000075.
- [37] Y.H. Kim, Y. Tabata, Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 104 (2016) 942–956. doi:10.1002/jbm.a.35635.
- [38] C. Caliari-Oliveira, J.N.U. Yaochite, L.N.Z. Ramalho, P.V.B. Palma, D. Carlos, F. de Q. Cunha, D.A. De Souza, M.A.C. Frade, D.T. Covas, K.C.R. Malmegrim, M.C. Oliveira, J.C. Voltarelli, Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model, *Cell Transplant.* 25 (2016) 201–215. doi:10.3727/096368915X688128.
- [39] G. Pelizzo, M.A. Avanzini, A. Icaro Cornaglia, M. Osti, P. Romano, L. Avolio, R. Maccario, M. Dominici, A. De Silvestri, E. Andreatta, F. Costanzo, M.

- Mantelli, D. Ingo, S. Piccinno, V. Calcaterra, Mesenchymal stromal cells for cutaneous wound healing in a rabbit model: pre-clinical study applicable in the pediatric surgical setting., *J. Transl. Med.* 13 (2015) 219. doi:10.1186/s12967-015-0580-3.
- [40] S.H. Ko, A.C. Nauta, S.D. Morrison, M.S. Hu, A.S. Zimmermann, M.T. Chung, J.P. Glotzbach, V.W. Wong, G.G. Walmsley, H. Peter Lorenz, D.A. Chan, G.C. Gurtner, A.J. Giaccia, M.T. Longaker, PHD-2 Suppression in Mesenchymal Stromal Cells Enhances Wound Healing, *Plast. Reconstr. Surg.* 141 (2018) 55e–67e. doi:10.1097/PRS.0000000000003959.
- [41] S. Maxson, E. a. Lopez, D. Yoo, a. Danilkovitch-Miagkova, M. a. LeRoux, Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair, *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 142–149. doi:10.5966/sctm.2011-0018.
- [42] C.A. Uysal, M. Tobita, H. Hyakusoku, H. Mizuno, The Effect of Bone-Marrow-Derived Stem Cells and Adipose-Derived Stem Cells on Wound Contraction and Epithelization, *Adv. Wound Care.* 3 (2014) 405–413. doi:10.1089/wound.2014.0539.
- [43] W.M. Jackson, L.J. Nesti, R.S. Tuan, Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells., *Stem Cells Transl. Med.* 1 (2012) 44–50. doi:10.5966/sctm.2011-0024.
- [44] E. Maranda, L. Rodriguez-Menocal, E. Badiavas, Role of Mesenchymal Stem Cells in Dermal Repair in Burns and Diabetic Wounds, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 12 (2016) 61–70. doi:10.2174/1574888X11666160714115926.
- [45] W.U. Hassan, U. Greiser, W. Wang, Role of adipose-derived stem cells in wound healing, *Wound Repair Regen.* 22 (2014) 313–325. doi:10.1111/wrr.12173.
- [46] A. King, S. Balaji, S.G. Keswani, T.M. Crombleholme, The Role of Stem Cells in Wound Angiogenesis, *Adv. Wound Care.* 3 (2014) 614–625. doi:10.1089/wound.2013.0497.
- [47] A. Nuschke, Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing, *Organogenesis.* 10 (2014) 29–37. doi:10.4161/org.27405.

- [48] Y.-R. Kuo, C.-T. Wang, J.-T. Cheng, F.-S. Wang, Y.-C. Chiang, C.-J. Wang, Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells Enhanced Diabetic Wound Healing through Recruitment of Tissue Regeneration in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes, *Plast. Reconstr. Surg.* 128 (2011) 872–880. doi:10.1097/PRS.0b013e3182174329.
- [49] J.M. Reinke, H. Sorg, Wound repair and regeneration, *Eur. Surg. Res.* 49 (2012) 35–43. doi:10.1159/000339613.
- [50] G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound repair and regeneration., *Nature.* 453 (2008) 314–321. doi:10.1038/nature07039.
- [51] F. Ribeiro, M. Carvalho, C. Pereira, D. Tateno, Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos, *Arq. Médicos Dos Hosp. E Da Fac. Ciências Médicas Da St. Casa São Paulo.* 60 (2015) 22–26.
- [52] O. Simonetti, Role of Daptomycin on Burn Wound Healing in an Animal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection Model, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017). doi:10.1128/AAC.00606-17.
- [53] L. Xue, Y. Xu, J. Xie, J. Tang, B. Shu, L. Chen, S. Qi, X. Liu, Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on burn injury healing in a mouse model, *Int J ExpPathol.* 6 (2013) 1327–1336.
- [54] S. Malhotra, M.S. Hu, C.D. Marshall, T. Leavitt, A.T.M. Cheung, J.G. Gonzalez, H. Kaur, H.P. Lorenz, M.T. Longaker, Mesenchymal Stromal Cells as Cell-Based Therapeutics for Wound Healing, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 2–7. doi:10.1155/2016/4157934.
- [55] J.L. Spees, R.H. Lee, C.A. Gregory, Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (2016) 125. doi:10.1186/s13287-016-0363-7.
- [56] S.A. Eming, P. Martin, M. Tomic-canic, STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation, *Wound Heal.* 6 (2014) 1–16. doi:10.1126/scitranslmed.3009337.



- [57] S. Huang, Y. Wu, D. Gao, X. Fu, Paracrine action of mesenchymal stromal cells delivered by microspheres contributes to cutaneous wound healing and prevents scar formation in mice, *Cytotherapy*. 17 (2015) 922–931. doi:10.1016/j.jcyt.2015.03.690.
- [58] S. Wasserbauer, D. Perez-Meza, R. Chao, Hydrogen peroxide and wound healing: A theoretical and practical review for hair transplant surgeons, *Dermatologic Surg.* 34 (2008) 745–750. doi:10.1111/j.1524-4725.2008.34141.x.
- [59] C.C. Winterbourn, *The biological chemistry of hydrogen peroxide*, 1st ed., Elsevier Inc., 2013. doi:10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições em que foi realizado este estudo e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- a) o grupo CTM2 apresentou maior taxa de contração (TC) aos 21 dias;
- b) com relação à TC, quando comparadas entre grupos, CTM2 foi maior que CTM1, que foi maior que o grupo controle;
- c) os grupos CTM1 e CTM2 apresentaram resultados microscópicos satisfatórios, quando comparados ao grupo controle;
- d) o momento de aplicação da terapia celular na fases inflamatória e proliferativa não repercutiu diferenças significativas nos resultados obtidos;
- e) CTMs influenciam positivamente na cicatrização de feridas crônicas, induzidas por queimadura.

Sendo assim, podemos concluir que a terapia celular tem efeito benéfico em lesões crônicas de pele e que duas aplicações de CTMs são melhores que uma única aplicação.

## **A N E X O S 1**

### **Dados estatísticos complementares (tabelas)**

**Tabela 1.** Descrição dos parâmetros quantitativos avaliados segundo grupos e dias de eutanásia e resultados das ANOVAs.

Variável	Controle (N = 8/dia)	CTM1 (N = 8/dia)	CTM2 (N = 8/dia)*	P Grupo	P Eutanásia	P Interação
<b>Taxa de contração em relação ao início dos tratamentos</b>				0,218	<0,001	0,039
<b>7 dias</b>						
média ± DP	72,3 ± 26,9	68,7 ± 28,3	46,2 ± 32,5			
mediana (mín; máx.)	81,5 (22,6; 100)	74,2 (27,3; 100)	30,8 (20,3; 100)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	87,3 ± 9,4	92,2 ± 11,9	76 ± 23,5			
mediana (mín; máx.)	87,5 (70,6; 100)	100 (71,2; 100)	80,8 (29,5; 100)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	86,3 ± 19	78,5 ± 19,5	94,4 ± 5,9			
mediana (mín; máx.)	98,4 (54,5; 100)	74,8 (45,1; 100)	95,7 (81,6; 100)			
<b>VEGF**</b>				0,445	0,207	0,686
<b>7 dias</b>						
média ± DP	102,2 ± 5,2	98,1 ± 14,4	93,6 ± 15,2			
mediana (mín; máx.)	102 (97; 109,6)	98,1 (87,9; 108,3)	89,9 (79,4; 115,1)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	92,7 ± 12,3	103,7 ± 17,4	94,8 ± 5,4			
mediana (mín; máx.)	92,5 (80,5; 105,2)	102,7 (84,9; 135,4)	94,7 (89,9; 100,1)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	89,7 ± 12,6	93 ± 8,5	89,2 ± 1,4			
mediana (mín; máx.)	86,6 (78,1; 107,5)	91,7 (82,9; 104,8)	89,2 (88,2; 90,1)			
<b>Ki67</b>				<0,001	0,694	0,018
<b>7 dias</b>						
média ± DP	81,8 ± 3,8	90,4 ± 4	88,8 ± 6,8			
mediana (mín; máx.)	81 (78,2; 87,8)	89,7 (84,9; 97,4)	85,4 (84,4; 103,4)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	84,1 ± 4	92,8 ± 5	80,8 ± 5,4			
mediana (mín; máx.)	84,6 (77; 89,4)	92,4 (86,8; 102,8)	81,3 (70; 87,2)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	83,7 ± 7,1	91,1 ± 5,7	86 ± 3,5			
mediana (mín; máx.)	82,2 (77; 99,3)	89,3 (85,5; 100,3)	85,6 (81; 91,4)			
<b>Colágeno I</b>				<0,001	0,900	0,962
<b>7 dias</b>						
média ± DP	103 ± 9,5	106,3 ± 8,8	89,9 ± 10,2			
mediana (mín; máx.)	107,5 (84,1; 110,5)	104,2 (97,4; 126,4)	89,9 (74,2; 111)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	100,7 ± 12,5	103,2 ± 1,5	90,5 ± 24,2			
mediana (mín; máx.)	100,4 (87,9; 123,7)	103,3 (100,9; 105,8)	89,2 (56,3; 128,7)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	100,9 ± 11,7	108 ± 5,7	89 ± 22,3			
mediana (mín; máx.)	103,9 (82,2; 114,2)	108,5 (100,6; 116)	87,3 (50,3; 119,1)			
<b>Colágeno III</b>				<0,001	0,764	0,985
<b>7 dias</b>						
média ± DP	100,8 ± 2,9	101,6 ± 7	109,8 ± 12,7			
mediana (mín; máx.)	100,4 (98,3; 107,2)	102 (92,8; 111,5)	107,2 (93,8; 131,5)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	103,5 ± 6,3	102,1 ± 7,7	110,8 ± 7,9			
mediana (mín; máx.)	103,2 (94,2; 114,8)	99,6 (93,9; 115,2)	109,5 (100,7; 122)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	101,2 ± 5,4	102,5 ± 6,9	109,7 ± 3,9			
mediana (mín; máx.)	99,5 (93,8; 107,8)	101,8 (92,2; 114,4)	109,2 (103,2; 116,6)			
<b>FGF</b>				<0,001	0,136	0,124
<b>7 dias</b>						
média ± DP	130,1 ± 2,3	111,6 ± 21	60 ± 16,5			
mediana (mín; máx.)	130,8 (125,4; 132,2)	124,6 (80; 129,5)	58,2 (40,3; 95,3)			
<b>14 dias</b>						
média ± DP	128,8 ± 2,4	86,2 ± 25,1	71,7 ± 32,9			
mediana (mín; máx.)	128,2 (125,4; 133,3)	82,6 (53,4; 131,4)	61,6 (43,5; 140,5)			
<b>21 dias</b>						
média ± DP	112,6 ± 36,5	98 ± 34,4	53,4 ± 9,2			
mediana (mín; máx.)	127 (24,2; 132,3)	108,6 (49,3; 133,2)	53,7 (41,7; 66,1)			

ANOVA com dois fatores; \* Somente 7 animais no grupo CTM2 aos 14 dias; \*\* Nem todos os animais foram avaliados

**Tabela 2.** Resultado das comparações múltiplas da taxa de contração entre grupos e dia da eutanásia.

Grupo/ Eutanásia	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Controle	7 dias - 14 dias	-14,98	10,00	1	>0,999	-46,95	17,00
	7 dias - 21 dias	-14,00	10,00	1	>0,999	-45,98	17,97
	14 dias - 21 dias	0,97	10,00	1	>0,999	-31,00	32,95
CTM1	7 dias - 14 dias	-23,48	10,00	1	0,680	-55,45	8,49
	7 dias - 21 dias	-9,80	10,00	1	>0,999	-41,78	22,17
	14 dias - 21 dias	13,68	10,00	1	>0,999	-18,30	45,65
CTM2	7 dias - 14 dias	-29,77	10,35	1	0,145	-62,87	3,32
	7 dias - 21 dias	-48,20	10,00	1	<b>&lt;0,001</b>	-80,18	-16,23
	14 dias - 21 dias	-18,43	10,35	1	>0,999	-51,53	14,67
7 dias	Controle - CTM1	3,54	10,00	1	>0,999	-28,44	35,51
	Controle - CTM2	26,06	10,00	1	0,330	-5,91	58,04
	CTM1 - CTM2	22,52	10,00	1	0,876	-9,45	54,50
14 dias	Controle - CTM1	-4,96	10,00	1	>0,999	-36,94	27,01
	Controle - CTM2	11,26	10,35	1	>0,999	-21,83	44,36
	CTM1 - CTM2	16,23	10,35	1	>0,999	-16,87	49,32
21 dias	Controle - CTM1	7,74	10,00	1	>0,999	-24,24	39,71
	Controle - CTM2	-8,14	10,00	1	>0,999	-40,11	23,84
	CTM1 - CTM2	-15,88	10,00	1	>0,999	-47,85	16,10

Comparações múltiplas de Bonferroni

**Tabela 3.** Resultado das comparações múltiplas do Ki67 entre grupos e dia da eutanásia.

Grupo/ Eutanásia	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Controle	7 dias - 14 dias	-2,31	2,42	1	>0,999	-10,06	5,44
	7 dias - 21 dias	-1,89	2,42	1	>0,999	-9,64	5,86
	14 dias - 21 dias	0,42	2,42	1	>0,999	-7,33	8,17
CTM1	7 dias - 14 dias	-2,42	2,42	1	>0,999	-10,17	5,33
	7 dias - 21 dias	-0,67	2,42	1	>0,999	-8,42	7,08
	14 dias - 21 dias	1,75	2,42	1	>0,999	-6,00	9,50
CTM2	7 dias - 14 dias	7,99	2,51	1	0,052	-0,03	16,01
	7 dias - 21 dias	2,79	2,42	1	>0,999	-4,96	10,53
	14 dias - 21 dias	-5,21	2,51	1	>0,999	-13,23	2,81
7 dias	Controle - CTM1	-8,64	2,42	1	<b>0,013</b>	-16,39	-0,89
	Controle - CTM2	-6,99	2,42	1	0,141	-14,74	0,76
	CTM1 - CTM2	1,65	2,42	1	>0,999	-6,10	9,40
14 dias	Controle - CTM1	-8,75	2,42	1	<b>0,011</b>	-16,50	-1,01
	Controle - CTM2	3,30	2,51	1	>0,999	-4,72	11,33
	CTM1 - CTM2	12,06	2,51	1	<b>&lt;0,001</b>	4,04	20,08
21 dias	Controle - CTM1	-7,42	2,42	1	0,079	-15,17	0,32
	Controle - CTM2	-2,32	2,42	1	>0,999	-10,07	5,43
	CTM1 - CTM2	5,10	2,42	1	>0,999	-2,65	12,85

Comparações múltiplas de Bonferroni

**Tabela 4.** Resultado das comparações múltiplas do colágeno I, III e FGF entre grupos.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
Colágeno I	Controle - CTM1	-4,33	3,62	1	0,697	-13,00	4,35
	Controle - CTM2	11,75	3,67	1	<b>0,004</b>	2,98	20,53
	CTM1 - CTM2	16,08	3,67	1	<b>&lt;0,001</b>	7,30	24,85
Colágeno III	Controle - CTM1	-0,22	1,95	1	>0,999	-4,88	4,45
	Controle - CTM2	-8,25	1,97	1	<b>&lt;0,001</b>	-12,97	-3,53
	CTM1 - CTM2	-8,03	1,97	1	<b>&lt;0,001</b>	-12,75	-3,31
FGF	Controle - CTM1	25,25	6,33	1	<b>&lt;0,001</b>	10,08	40,41
	Controle - CTM2	62,12	6,41	1	<b>&lt;0,001</b>	46,78	77,46
	CTM1 - CTM2	36,87	6,41	1	<b>&lt;0,001</b>	21,53	52,22

Comparações múltiplas de Bonferroni

**Tabela 5.** Descrição dos parâmetros qualitativos avaliados segundo grupos e dias de eutanásia e resultados das análises estatísticas

Variável	Controle			CTM1			CTM2			P Grupo	P Eutanásia	P Interação
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias			
<b>HE - Úlcera*</b>										<b>0,012</b>	>0,999	0,958
Não	0 (0)	0 (0)	6 (75)	3 (37,5)	6 (75)	7 (87,5)	1 (12,5)	1 (14,3)	3 (37,5)			
Sim	8 (100)	8 (100)	2 (25)	5 (62,5)	2 (25)	1 (12,5)	7 (87,5)	6 (85,7)	5 (62,5)			
<b>HE - Inflamação*</b>										>0,999	>0,999	>0,999
Não	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	4 (50)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	2 (25)			
Sim	8 (100)	8 (100)	7 (87,5)	8 (100)	4 (50)	2 (25)	8 (100)	7 (100)	6 (75)			
<b>HE - Fibrose</b>										0,573	0,657	0,524
Ausente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Leve	0 (0)	0 (0)	2 (25)	3 (37,5)	0 (0)	2 (25)	2 (25)	2 (28,6)	3 (37,5)			
Moderado	0 (0)	5 (62,5)	5 (62,5)	5 (62,5)	4 (50)	2 (25)	4 (50)	2 (28,6)	4 (50)			
Intenso	8 (100)	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0)	4 (50)	4 (50)	2 (25)	3 (42,9)	1 (12,5)			
<b>HE - Angiogênese</b>										0,482	0,065	0,997
Ausente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Leve	0 (0)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	5 (62,5)	0 (0)	0 (0)	2 (25)			
Moderado	3 (37,5)	4 (50)	5 (62,5)	3 (37,5)	7 (87,5)	3 (37,5)	2 (25)	4 (57,1)	5 (62,5)			
Intenso	5 (62,5)	4 (50)	0 (0)	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0)	6 (75)	3 (42,9)	1 (12,5)			
<b>HE - Hemorragia</b>										0,446	0,817	0,842
Ausente	3 (37,5)	2 (25)	8 (100)	5 (62,5)	6 (75)	7 (87,5)	0 (0)	1 (14,3)	3 (37,5)			
Leve	1 (12,5)	2 (25)	0 (0)	2 (25)	2 (25)	1 (12,5)	3 (37,5)	1 (14,3)	3 (37,5)			
Moderado	2 (25)	4 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)			
Intenso	2 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	5 (62,5)	4 (57,1)	2 (25)			
<b>HE - Acantose</b>										0,371	0,654	0,830
Ausente	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (50)	0 (0)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)			
Leve	4 (50)	4 (50)	7 (87,5)	2 (25)	5 (62,5)	4 (50)	2 (25)	4 (57,1)	4 (50)			
Moderado	4 (50)	4 (50)	0 (0)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)	5 (62,5)	3 (42,9)	3 (37,5)			
Intenso	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)			

Modelo linear generalizado com distribuição Poisson e ligação identidade; \* MLG com distribuição binomial e ligação logito

**Tabela 6.** Resultado das comparações múltiplas da frequência de úlceras entre grupos e do tipo de inflamação entre grupos e dia de eutanásia.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
HE - Úlcera (%)	Controle - CTM1	70,0	10,7	1	<b>&lt;0,001</b>	44,0	96,0
	Controle - CTM2	20,0	8,8	1	0,082	-2,0	41,0
	CTM1 - CTM2	-50,0	13,9	1	<b>0,001</b>	-84,0	-17,0

Comparações múltiplas de Bonferroni

**Tabela 7.** Descrição do tipo da inflamação segundo grupos e dia de eutanásia e resultado dos testes de associação.

Variável	Controle			CTM1			CTM2		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
<b>HE - Tipo da inflamação</b>									
Não	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	4 (50)	6 (75)	0 (0)	0 (0)	2 (25)
Aguda	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0 (0)
Crônica	1 (12,5)	2 (25)	6 (75)	5 (62,5)	2 (25)	2 (25)	0 (0)	1 (14,3)	2 (25)
Ambas	7 (87,5)	6 (75)	1 (12,5)	3 (37,5)	2 (25)	0 (0)	8 (100)	5 (71,4)	4 (50)
<b>p*</b>	0,015			<b>0,006</b>			0,096		
<b>p#</b>	<b>0,006</b>			0,035			0,009		

\* Teste de associação entre HE-Tipo da inflamação e dia de eutanásia em cada grupo; # Associação entre HE-Tipo da inflamação e grupo em cada dia de eutanásia; Teste da razão de verossimilhanças

**Tabela 9.** Resultado da comparação dos pesos dos animais entre grupos, dia de eutanásia e momentos de acompanhamento.

Variável	Estatística de teste (Wald)	gl	p
Grupo	15,40	2	<b>&lt;0,001</b>
Eutanásia	4,61	2	0,100
Grupo * Eutanásia	3,74	4	0,442
Momento	445,16	3	<b>&lt;0,001</b>
Grupo * Momento	51,44	6	<b>&lt;0,001</b>
Eutanásia * Momento	43,10	6	<b>&lt;0,001</b>
Grupo * Eutanásia * Momento	15,48	12	0,216

EEG com distribuição Normal e ligação identidade

**A N E X O S 2****Carta de aprovação projeto e adendo**



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 150273

**Data da Versão do Projeto:** 11/09/2015

**Pesquisadores:**

ELIZABETH OSINO CIRNE LIMA  
FERNANDA BOLDATELLI VALENTE  
FERNANDA REGINA LOBB  
PAULA BARROS TERRACIANO  
EMERSON ANTONIO CONTESINI

**Título:** Terapia celular no tratamento de feridas crônicas em ratos Wistar

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

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

Porto Alegre, 19 de outubro de 2015.

Biol. Michael Everton Andrade  
Coordenador CEUA/HCPA





**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS) como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 150273

Pesquisador Responsável

**ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA**

**Título:** Terapia celular aplicada em diferentes fases da cicatrização no tratamento de feridas crônicas experimentais em ratos Wistar


**Data da Versão:**

**ADENDO E NOVA VERSÃO DO PROJETO**

**01/03/2016**

Este documento referente ao projeto acima foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 17 de março de 2016.

  
 Biol. Michael Everton Andrade  
 Coordenador CEFIA/HCPA