

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

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM MODELO DE LESÃO CUTÂNEA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR NITROGÊNIO LÍQUIDO EM
RATOS WISTAR**

Fernanda Soldatelli Valente

Porto Alegre

2018

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

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM MODELO DE LESÃO CUTÂNEA
INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR NITROGÊNIO LÍQUIDO EM
RATOS WISTAR**

Autora: Fernanda Soldatelli Valente

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Curvello de Mendonça Müller

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Valente, Fernanda Soldatelli

Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar / Fernanda Soldatelli Valente. -- 2018.

139 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientador: Daniel Curvello de Mendonça Müller.

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. cicatrização. 2. criocirurgia. 3. frostbite. 4. terapia celular. 5. célula-tronco mesenquimal de origem adiposa. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. Müller, Daniel Curvello de Mendonça, coorient. III. Título.

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

Fernanda Soldatelli Valente

Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar.

Aprovada em 29 de março de 2018.

APROVADO POR:

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. CRISTIANO GOMES
Membro da Comissão (UFRGS)

Prof^ª. PhD. DOMINGUITA LUHERS GRAÇA
Membro da Comissão (UFSM)

Prof^ª. Dra. ELIZABETH OBINO CIRNE-LIMA
Membro da Comissão (HCPA-UFRGS)

Prof. Dr. SAULO TADEU LEMOS PINTO FILHO
Membro da Comissão (UFSM)

Prof^ª. Dra. ANELISE BONILLA TRINDADE GERARDI
Membro Suplente da Comissão (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Meus eternos e sinceros agradecimentos...

A Deus, pelo dom da vida, por sempre guiar meus passos com sua luz divina, colocando pessoas especiais no meu caminho, que contribuíram para me tornar quem sou, e me proporcionando todas as coisas boas que conquistei até hoje.

Ao meu pai Rudimar e a minha mãe Noelí por sempre cuidarem de mim com tanto amor e carinho e me passarem os valores que carrego tentando ser uma pessoa cada vez melhor. Por me incentivarem incansavelmente a seguir meus sonhos e me apoiarem em todos os momentos difíceis com suas presenças ao meu lado e conselhos tranquilizadores. Amo vocês noite e dia!

As minhas irmãs Raquel e Patricia por serem minhas melhores amigas, minhas fiéis conselheiras, meu porto seguro, o laço mais belo da minha vida! Por me proporcionarem sempre os melhores momentos juntas, por estarem sempre disponíveis nos momentos difíceis e de desânimo para uma conversa, um abraço apertado, um beijo carinhoso. Amo vocês noite e dia!

Aos meus cunhados Bruno e Diego pela parceria nos momentos alegres e pelos momentos de descontração sempre tão agradáveis e necessários durante esse período.

Ao meu orientador, Professor Emerson Antonio Contesini, por despertar em mim o interesse pela pesquisa durante a residência, por compartilhar comigo suas experiências, conhecimentos e muitas vezes me aconselhar carinhosamente durante esses oito anos de convivência!

Ao meu co-orientador, Professor Daniel Curvello de Mendonça Müller, por prontamente aceitar o desafio de me co-orientar no meio do doutorado, em uma fase de muitas mudanças na minha vida pessoal e profissional, sempre me transmitindo tranquilidade e positivismo para continuar, colocando ao meu dispor o Laboratório de Terapia Celular e Regenerativa.

Às colegas e amigas Amanda Oliveira de Andrades, Cibele Lima Lhamas, Nathalia Franco, Emanuelle Degregori, Bruna Berres e Francisca Bonfada por estarem sempre disponíveis para me auxiliar com os procedimentos nos animais, cuidarem deles com tanto carinho e respeito durante todo o experimento e nunca medirem esforços para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Obrigada por fazerem dessa equipe de trabalho, um grupo de amigas tão especial para mim!

Ao colega Matheus Pippi da Rosa por aceitar participar desse trabalho, demonstrando muita competência e dedicação durante toda a execução do experimento *in vitro*, compartilhando comigo a sua experiência e conhecimento no cultivo das células-tronco mesenquimais.

À Professora Glaucia Denise Kommers e seu doutorando Alex dos Santos pelo auxílio, profissionalismo e dedicação imensurável no processamento das biópsias para a confecção das lâminas, sempre demonstrando uma enorme preocupação e perfeccionismo na execução de toda a técnica e cuidado com todas as amostras.

À Professora Dominguita Luhrs Graça pela disponibilidade e gentileza em me ajudar nas avaliações histopatológicas, por compartilhar comigo seus conhecimentos, por sempre demonstrar interesse e preocupação com o meu trabalho, pelas conversas e companhia agradabilíssima nos momentos que passamos juntas e por sempre ser para mim um exemplo de profissional a quem me espelhar.

Aos Professores Cristiane Cademartori Danesi, Roberto Marinho Maciel e Luisa Barin pela acessibilidade, ensinamentos e comprometimento imensurável durante as análises imunohistoquímicas.

À amiga e colega Silvana Bellini Vidor pelo auxílio incansável e pela paciência nos ensinamentos e interpretação das avaliações estatísticas.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal (BIOREP) da UFSM, em especial ao Professor Paulo Bayard que abriu as portas do laboratório para mim, disponibilizando auxílio técnico e fornecendo alguns materiais para o cultivo celular, os quais viabilizaram a execução desse trabalho.

À Professora Clarice Madalena Bueno Rolim por me incentivar permanentemente à conclusão do meu doutorado e responsável pelo Laboratório Biofarmacêutico de Controle de Qualidade (LABCQ) da UFSM, o qual forneceu materiais para a execução do estudo *in vitro* com as células-tronco.

À Professora Nance Beyer Nardi pela gentileza, acessibilidade e realização da citometria de fluxo no Laboratório de Células-tronco e Engenharia de Tecidos da ULBRA-Canoas/RS, disponibilizando os anticorpos necessários para a imunofenotipagem das células-tronco. Ao Professor Lindolfo da Silva Meirelles pela sua essencial contribuição e auxílio técnico durante as análises no citômetro de fluxo.

À equipe do Biotério Central da UFSM por toda a ajuda durante as fases *in vivo*, *in vitro* e de elaboração desse trabalho, em especial à colega médica veterinária Dra.

Ligia Gomes Miyazato pelo companheirismo e compreensão nos momentos que precisei me ausentar do setor e apoio durante as conversas e desabafos.

Aos Professores William Schoenau e Eliane Maria Zanchet pela prontidão em me ajudar, viabilizando a utilização do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia para a manutenção dos animais durante o período experimental.

A equipe de funcionários do Hospital Veterinário Universitário (HVU) e do Bloco Cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM por me auxiliar sempre da melhor forma possível, possibilitando a execução de forma ética e tranquila dos procedimentos com os animais.

Aos Professores Cristiano Gomes, Dominguita Luhers Graça, Elizabeth Obino Cirne-Lima, Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho e Anelise Bonilla Trindade Gerardi pela disponibilidade em participar da minha banca examinadora e contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo ensino de qualidade e oportunidades oferecidas.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo acolhimento e disposição de espaço físico e recursos humanos para a execução do meu doutorado.

Às minhas amigas Fernanda Réquia, Lauren Steffen, Mariani Gracioli, Alana Machado, Roberta Scremin e Beatriz Braun que apesar de toda a correria, nunca permitiram que eu deixasse de lado o meu bem-estar físico e mental, me proporcionando momentos alegres e muito agradáveis de lazer e atividade física, os quais foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Aos animais, fundamentais para a realização da maioria das pesquisas biomédicas, que inocentes doam suas vidas para o aprendizado, desenvolvimento e melhoria da vida dos seres humanos e de outros animais.

A todos que de uma forma ou outra contribuíram para tornar esse trabalho possível!

Muito Obrigada!!!

**“O período de maior ganho em
conhecimento e experiência é o período
mais difícil da vida de alguém.”**

Dalai Lama

RESUMO

A criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas e órgãos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, sendo sua maior indicação o tratamento de dermatopatias. Contudo, efeitos adversos como a cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional, são relatados após a aplicação da substância criogênica. Ainda, existem as lesões que ocorrem naturalmente pela exposição ao frio extremo, afetando principalmente o nariz, dedos das mãos e pés ou orelhas. Na maioria das vezes resultam em gangrena e são bem comuns nos habitantes dos polos, turistas e praticantes de modalidades na neve. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência das células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) na cicatrização de feridas cutâneas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos em duas fases da cicatrização cutânea: fase de proliferação e fase de remodelação. Utilizaram-se 83 ratos Wistar, machos, hípidos, com oito semanas de idade, sendo três animais usados como doadores de tecido adiposo para posterior obtenção das ADSCs e, 80 animais divididos aleatoriamente em oito grupos de tratamento (n=10). Através da aplicação do nitrogênio líquido pela técnica do *spray* aberto, realizou-se a indução de uma ferida, de aproximadamente 15 mm de diâmetro, na região dorsal de cada rato. A ferida recebeu o tratamento de acordo com o grupo ao qual pertencia: a) aplicação das ADSCs, por via subcutânea, no 15º dia (T1), no 30º dia (T2) ou nos dois tempos mencionados (T3) após a indução da lesão; b) aplicação da solução cloreto de sódio 0,9%, por via subcutânea, no 15º dia (S1), no 30º dia (S2) ou nesses dois tempos (S3) após a indução da lesão; c) nenhuma intervenção até o momento da eutanásia dos animais no 45º dia (C1) ou no 60º dia (C2). Macroscopicamente, a cada cinco dias, analisaram-se as medidas das lesões e calculou-se a área e a taxa de contração cicatricial das mesmas. No 45º ou no 60º dia pós-operatório, procedeu-se à coleta das biópsias para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica. Com base nos resultados obtidos concluiu-se que: 1) o grupo T1 apresenta as maiores taxas de contração média das feridas no 20º e 25º dia; 2) o grupo T3 obteve a maior taxa de contração média das feridas no 30º dia pós-operatório; 3) o grupo T2 apresenta as maiores taxas de contração média das feridas no 55º e 60º dia; 4) o grupo T1 obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *sham* (S3) quanto à neovascularização, avaliada pela técnica de imuno-histoquímica com o VEGF; 5) o grupo *sham* (S1) obteve diferença estatística significativa em relação aos grupos tratados com as ADSCs (T2 e T3) quanto à proliferação epitelial, avaliada pela técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo Ki-67; 6) a terapia com as ADSCs proporciona uma relevante evolução clínica das feridas, podendo ser constatada ao final do período de avaliação por cicatrizes mais estreitas e compridas com as medidas da área final inferiores às cicatrizes dos grupos controle (C1 e C2) e *sham* (S1, S2 e S3). Propõem-se a necessidade de novos estudos com as ADSCs na cicatrização de lesões cutâneas provocadas pela criocirurgia ou por outra modalidade de congelamento, realizando biópsias com análises histopatológicas e imuno-histoquímicas em períodos de tempo menores e maiores aos realizados nesse estudo, a fim de detectar, respectivamente, diferenças no processo de cicatrização imediatamente após a aplicação das ADSCs e, também, acompanhar o remodelamento da cicatriz por um período mais longo.

Palavras-chave: pele, cicatrização, criocirurgia, lesão causada por congelamento, terapia celular, célula-tronco mesenquimal de origem adiposa

ABSTRACT

Cryosurgery has been used to treat different diseases of systems and organs in both human and veterinary medicine. Although treatment of skin disorders is the leading indication, adverse effects such as delayed wound healing, large scars, esthetical deformation and functional impairment have been reported from administration of cryogenic substance. Beside that there are injuries caused naturally by the exposure to extreme cold weather conditions, which affect specially nose, fingers, toes and ears, mostly resulting in gangrene. These frostbites are very common in people who live in the Poles, tourists and snowboarders. This study aims to evaluate the influence of adipose-derived stem cells (ADSCs) on cutaneous wound healing that were standardized and induced by liquid nitrogen in rats according to two phases of cutaneous healing: proliferation phase and remodelling phase. For research purposes, 83 male, healthy and eight-weeks-old Wistar rats were required. Among 83 rats, three were used as adipose tissue donor for later ADSCs obtention and 80 Wistar rats were randomly divided in eight treatment groups (n=10). Through the application of liquid nitrogen by spraying technique, a 15 millimetres in diameter lesion was produced in the dorsal region of each rat. The wound received treatment according to the group it belonged: a) subcutaneously ADSCs application on the 15th day (T1), on the 30th day (T2) or in both periods mentioned (T3) after wound induction; b) subcutaneously application of 0.9% sodium chloride solution on the 15th day (S1), on the 30th day (S2) or in both periods mentioned (S3) after wound induction; c) no intervention until euthanasia on the 45th day (C1) or 60th day (C2). Macroscopically, every five days, the wounds were measured to calculate their area and healing rate. On the 45th and 60th postoperative day, biopsies were performed for histopathological and immunohistochemical evaluations. By the obtained results, the study concludes that: 1) T1 group shows the highest wound average contraction rate on the 20th and 25th day; 2) T3 group presents the highest wound average contraction rate on the 30th postoperative day; 3) T2 group has the highest wound average contraction rate on the 55th and 60th day; 4) T1 group got a significant statistical difference in relation to sham group (S3) when it refers to neovascularization, which was evaluated by immunohistochemical technique with VEGF; 5) sham group (S1) obtained a significant statistical difference when compared to ADSCs groups (T2 and T3) with respect to epithelial proliferation, that was evaluated by immunohistochemical technique using antibody Ki-67; 6) the ADSCs therapy provides an important clinical evolution of wounds. This was verified at the end of evaluation period through narrower and longer scars with bottom end area measurements inferior to control group scars (C1 and C2) and sham group scars (S1, S2 and S3). Lastly, this paper proposes the necessity of new studies about the uses of ADSCs for cutaneous wound healing caused by cryosurgery or other sort of freeze. Furthermore it is opportune taking an action on studies that do biopsies with histopathological and immunohistochemical analyses using shorter and longer periods of time that those executed on this paper. Thus it will be possible to find out, respectively, differences on the healing process immediately after applying ADSCs and also follow up the scar remodelling for a longer period.

Key words: *skin, healing process, cryosurgery, frostbite, cell therapy, adipose-derived stem cells.*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Diagrama esquemático da estrutura da pele dos animais domésticos. FONTE: BANKS, 1992 27
- FIGURA 2 – Diagrama esquemático da cicatrização em mamíferos. FONTE: SEIFERT *et al.*, 2012 28
- FIGURA 3 – Classificação das lesões causadas pelo frio. FONTE: MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH, 2018 36
- FIGURA 4 – Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco. FONTE: COVAS, 2006 50
- FIGURA 5 – Diagrama com as fases da cicatrização e as funções exercidas pelas células-tronco mesenquimais em cada uma delas. FONTE: MAXSON *et al.*, 2012 55
- FIGURA 6 – Procedimento para coleta de tecido adiposo perigonadal. À esquerda, laparotomia na linha média de um rato Wistar, macho, 60 dias, para coleta da gordura. À direita, uma placa de Petri contendo o tecido coletado para ser processado 59
- FIGURA 7 – Processamento do tecido adiposo de ratos Wistar para cultivo das ADSCs. **A)** Fragmentação da gordura com lâminas de bisturi em placa de Petri contendo colagenase. **B)** Centrifugação do tecido adiposo em tubo Falcon, após a incubação do mesmo em banho-maria. **C)** Suspensão celular contendo as células mesenquimais e hemácias, visualizada no fundo do tubo Falcon, obtida após a centrifugação. **D)** Frascos de cultura com área de superfície de 25 cm² contendo meio de cultura completo e as células provenientes da suspensão celular..... 60
- FIGURA 8 – Fotomicroscopia das ADSCs de rato Wistar. **A)** Cultivo celular dois dias após o isolamento do tecido adiposo. **B)** Cultivo celular cinco dias após a primeira passagem. **C)** Cultivo celular sete dias após a

- segunda passagem (80% de confluência). **D)** Células com 100% de confluência, 10 dias após a terceira passagem 62
- FIGURA 9 – Preparo das ADSCs de rato Wistar para a aplicação. **A)** Suspensão celular obtida após a centrifugação, visualizada no fundo de cada tubo Falcon. **B)** Contagem das ADSCs em microscópio óptico (ABM 102i) e câmara de Neubauer com o auxílio de contador manual de células. **C)** Quatro seringas totalizando 1×10^6 ADSCs ressuspensas em NaCl 0,9% para a aplicação subcutânea nos animais experimentais 62
- FIGURA 10 – Rato Wistar, decúbito ventral. À esquerda, observa-se a indução da lesão, no dorso, pelo nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia e delimitação do jato de *spray* através de um cone de neoprene de 15 mm. À direita, visualização do halo de gelo formado e delimitado pelo cone de neoprene 65
- FIGURA 11 – Rato Wistar, decúbito ventral. Aplicação por via subcutânea das ADSCs nas bordas da ferida. **A)** Observa-se a aplicação na borda inferior no 15º dia após a indução da lesão (crosta começando a se desprender). **B)** Aplicação na borda lateral esquerda da lesão, após 30 dias da realização do procedimento criocirúrgico 66
- FIGURA 12 – Delineamento experimental evidenciando os tratamentos recebidos por cada um dos oito grupos68
- FIGURA 13 – Avaliação macroscópica das lesões. À esquerda, contenção manual do rato para avaliação clínica da evolução da ferida. À direita, mensuração crânio-caudal da lesão com paquímetro digital 69
- FIGURA 14 – Rato Wistar, decúbito dorsal. **A)** Aplicação intraperitoneal de cloridrato de tramadol, no quadrante abdominal inferior direito, após indução anestésica com isoflurano. **B)** Coleta de sangue por punção cardíaca externa após a aplicação de analgesia e com o animal sob anestesia inalatória profunda 70

- FIGURA 15 – Procedimento de biópsia das cicatrizes cutâneas no 45° ou 60° dia. À esquerda, incisão de pele com bisturi, demarcando a área total a ser biopsiada. À direita, dissecação com pinça e tesoura do fragmento previamente delimitado 72
- FIGURA 16 – Biópsia de pele com área de cicatriz. A) Amostra coletada imediatamente após a eutanásia do animal e marcada com nankin no lado direito. B) Corte do tecido coletado em três secções látero-laterais, englobando pele sadia em ambos os lados da cicatriz, após 12 horas de fixação no formol 72
- FIGURA 17 – Contagem das células da camada basal da epiderme marcadas pelo anticorpo Ki-67. As células aparecem coradas em marrom com pontos vermelhos no centro para facilitar a contagem após a captura dos campos (25 células neste campo). IHQ, Obj. 40 74
- FIGURA 18 – Contagem dos vasos sanguíneos na derme marcados pelo VEGF. Os vasos aparecem com pontos pretos no centro para facilitar a contagem após a captura dos campos (10 vasos neste campo). IHQ, Obj. 40. 74
- FIGURA 19 – Ensaio de diferenciação *in vitro* das ADSCs de ratos Wistar. Fotomicroscopia das ADSCs no estágio de indiferenciação (Controle) e submetidas à diferenciação adipogênica e osteogênica no 2° (D2), 8° (D8) e 12° (D12) dia após o início da indução das diferenciações. No 16° dia (D16), coloração com *Oil Red O* evidenciando os vacúolos de gordura corados de vermelho na diferenciação adipogênica. No 18° dia (D18) coloração com *Alizarin Red O* demonstrando o depósito de cálcio corado de vermelho na matriz extracelular da diferenciação osteogênica e sem marcação nas ADSCs não diferenciadas do controle77
- FIGURA 20 – Demonstração gráfica dos marcadores de superfície celular durante ensaio de citometria de fluxo. O gráfico 1 (controle) tem complexidade das células no eixo Y e tamanho no eixo X, mostrando a população de células total e o gate estabelecido a partir do qual

foram coletados 10.000 eventos. Os demais gráficos, um para cada anticorpo, mostra o controle negativo em preto (células não marcadas) e a marcação com cada anticorpo em vermelho. Nota-se que apenas a população marcada com o CD44 teve resultado positivo e para as demais populações não houve marcação78

- FIGURA 21 – Lesões provocadas por automutilação próxima à crionecrose no 10º dia após o procedimento criocirúrgico81
- FIGURA 22 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução (d0), aos cinco, 15, 30, 35 e 45 dias de pós-operatório. C1 = Controle 1, S1 = *Sham* 1 e T1 = Tratamento 182
- FIGURA 23 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução (d0), aos cinco, 15, 30, 35, 45 e 60 dias de pós-operatório. C2 = Controle 2, S2 = *Sham* 2, T2 = Tratamento 2, S3 = *Sham* 3 e T3 = Tratamento 383
- FIGURA 24 – Crionecroses se desprendendo após 12-15 dias da indução da lesão. **A)** Crosta começando a se desprender na porção caudal da ferida. **B)** Crosta solta em todas as bordas, presa apenas no centro da ferida. **C)** Visualização do tecido de granulação exuberante logo abaixo da crosta84
- FIGURA 25 – Demonstração gráfica das médias das taxas de cicatrização com o erro padrão em cada grupo avaliado. O eixo X representa os grupos e o eixo Y representa as médias das taxas de cicatrização das feridas. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 386
- FIGURA 26 – Demonstração gráfica da evolução da taxa de cicatrização média de cada grupo em relação aos dias de avaliações. O eixo X representa as avaliações pós-cirúrgicas, a cada cinco dias, e o eixo Y representa os valores médios das taxas de cicatrização das feridas. Nota-se que nos grupos C1, S1 e T1 a última avaliação foi a nove, pois a eutanásia nesses grupos ocorreu no 45º dia, enquanto nos demais foi no 60º dia.

C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 386

FIGURA 27 – Demonstração gráfica dos valores do escore histológico. O eixo X representa os oito grupos estudados e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos S1, S2 e T3 apresentaram valores *outliers*. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 388

FIGURA 28 – Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 1. Epiderme hiperplásica (E), apresentando papilas dérmicas (PD) e cristas interpapilares (CI). HE, Obj. 1090

FIGURA 29 – Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 3. Presença de abertura de folículos pilosos (→) no centro da região cicatrizada. HE, Obj. 590

FIGURA 30 – Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 2. Epiderme com várias camadas, completamente reepitelizada (E) e ceratinizada (C). HE, Obj. 2091

FIGURA 31 – Pele reparada, rato Wistar, grupo *sham* 3. Extensa área cicatrizada com anexos na interface com a pele sadia em ambos os lados (→) e derme rica em fibras colágenas (C). Masson, Obj. 592

FIGURA 32 – Pele, rato Wistar, grupo tratamento 1. Pele reparada com derme rica em fibras colágenas organizadas, compactadas e, na sua maioria, dispostas paralelas a superfície. Masson, Obj. 1092

FIGURA 33 – Demonstração gráfica dos valores do Ki-67. O eixo X representa os oito grupos estudados, e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos C1, C2, S3, T1 e T3 apresentaram valores *outliers*. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 393

- FIGURA 34 – Marcação das células da camada basal da epiderme pelo anticorpo Ki-67 (→). A) Pele reparada de um animal do grupo T2 apresentando pouca marcação pelo Ki-67. B) Pele reparada de um animal do grupo S1 apresentando bastante marcação pelo Ki-67. IHQ, Contra coloração: Hematoxilina de Harris, Obj. 4094
- FIGURA 35 – Demonstração gráfica dos valores do VEGF. O eixo X representa os oito grupos estudados, e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos S1, T2 e T3 apresentaram valores *outliers* muito maiores que os outros do mesmo grupo. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 395
- FIGURA 36 – Marcação dos vasos neoformados na derme pelo anticorpo anti-VEGF (→). **A)** À esquerda, derme de um animal do grupo T1 apresentando 14 vasos neoformados. **B)** À direita, derme de um animal do grupo S3 apresentando seis vasos neoformados. IHQ, Contra coloração: Hematoxilina de Harris, Obj. 4096

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Dia da queda da primeira e da última crionecrose com o número de animais que perderam a crosta naquele dia após a indução da lesão, de cada grupo avaliado. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 384
- TABELA 2 – Dia do aparecimento da primeira e da última cicatriz após o procedimento criocirúrgico e o número de animais em cada grupo avaliado. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 385
- TABELA 3 – Taxa de cicatrização média obtida a cada cinco dias no período pós-cirúrgico durante as avaliações morfométricas e a média final com o erro padrão dos grupos analisados. Nota-se que nos grupos C1, S1 e T1 a última avaliação foi a nove, pois a eutanásia nesses grupos ocorreu no 45º dia, enquanto nos demais foi no 60º dia. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 387
- TABELA 4 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do escore histológico nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 389
- TABELA 5 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do Ki-67 nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 394

TABELA 6 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do VEGF nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 395

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitros
μM	micromolar
a.C	antes de Cristo
ADSC	Células-tronco mesenquimais de origem adiposa, do inglês, <i>Adipose Derived Stem Cells</i>
BC	Biotério Central
C1	Grupo Controle 1, eutanásia aos 45 dias
C2	Grupo Controle 2, eutanásia aos 60 dias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	centímetros
CO_2	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
d.C	depois de Cristo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês, <i>Epidermal Growth Fator</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto, do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor</i>
g	gramas
GEE	Equações de Estimativa Generalizadas
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina-Eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos, do inglês, <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama

IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, do inglês, <i>Insulin-like Growth Factor-1</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
IP	Intraperitoneal
Kg	quilogramas
KGF	Fator de crescimento de ceratinócitos, do inglês, <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
LACE	Laboratório de Cirurgia Experimental
mg	miligramas
mL	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
MSC	Células-tronco mesenquimais, do inglês, <i>mesenchymal stem cells</i>
NaCl	Cloreto de sódio 0,9%
NK	<i>Natural Killers</i>
°C	Graus Celsius
P3	Terceira passagem do cultivo celular
P4	Quarta passagem do cultivo celular
P7	Sétima passagem do cultivo celular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês, <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
pH	potencial Hidrogeniônico
r.p.m.	rotações por minuto
S1	Grupo <i>Sham</i> 1, aplicação de NaCl aos 15 dias, eutanásia aos 45 dias
S2	Grupo <i>Sham</i> 2, aplicação de NaCl aos 30 dias, eutanásia aos 60 dias
S3	Grupo <i>Sham</i> 3, aplicação de NaCl aos 15 e aos 30 dias, eutanásia aos 60 dias

SC	Subcutâneo
SDF-1	Fator derivado do estroma 1, do inglês, <i>Stromal Cell-derived factor-1</i>
T1	Grupo Tratamento 1, aplicação de ADSCs aos 15 dias, eutanásia aos 45 dias
T2	Grupo Tratamento 2, aplicação de ADSCs aos 30 dias, eutanásia aos 60 dias
T3	Grupo Tratamento 3, aplicação de ADSCs aos 15 e aos 30 dias, eutanásia aos 60 dias
TC	Taxa de Contração cicatricial
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta, do inglês, <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TM	Tricômico de Masson
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial, do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 O animal experimental	25
3.2 A pele e os mecanismos de reparo tecidual	25
3.2.1 Anatomia e fisiologia da pele	25
3.2.2 Cicatrização cutânea	27
3.3 Lesões causadas pelo congelamento (<i>Frostbites</i>)	32
3.3.1 Histórico	32
3.3.2 Exposição ao frio	34
3.3.3 Classificação das lesões causadas pelo congelamento	35
3.3.4 Patofisiologia das lesões causadas pelo congelamento	37
3.3.5 Complicações e sequelas	38
3.3.6 Tratamento	38
3.4 Criocirurgia	39
3.4.1 Histórico	39
3.4.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio (crionecrose)	41
3.4.3 Agentes criógenos	44
3.4.4 Equipamentos e técnicas	45
3.4.5 Tratamento criocirúrgico	46
3.4.6 Indicações terapêuticas	47
3.4.7 Vantagens e desvantagens	48
3.4.8 Complicações e sequelas	49
3.5 Células-tronco mesenquimais	49
3.5.1 Células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs)	52
3.5.2 Células-tronco mesenquimais na cicatrização cutânea	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 Animais experimentais	58
4.2 Coleta e cultivo das células-tronco mesenquimais	59
4.3 Diferenciação e caracterização das células-tronco mesenquimais	63

4.4 Procedimento anestésico	63
4.5 Procedimento cirúrgico	64
4.6 Procedimento pós-operatório	65
4.7 Tratamentos	66
4.8 Grupos experimentais	67
4.9 Avaliação macroscópica	68
4.10 Avaliação morfométrica	69
4.11 Eutanásia dos animais	70
4.12 Obtenção das amostras	71
4.13 Avaliação microscópica	72
4.14 Análise estatística	75
5 RESULTADOS	76
5.1 O animal experimental	76
5.2 Coleta e cultivo das células-tronco mesenquimais	76
5.3 Diferenciação e caracterização das células-tronco mesenquimais	76
5.4 Procedimento anestésico	79
5.5 Procedimento cirúrgico	79
5.6 Procedimento pós-operatório	80
5.7 Tratamentos	80
5.8 Avaliação macroscópica	81
5.9 Avaliação morfométrica	85
5.10 Avaliação microscópica	88
6 DISCUSSÃO	97
7 CONCLUSÕES	115
REFERÊNCIAS	117
APÊNDICE A – Ficha de controle cirúrgico	130
APÊNDICE B – Ficha de avaliação macroscópica das feridas	131
APÊNDICE C – Ficha de controle biópsia	132
ANEXO A – Carta de aprovação do projeto 3468300117	133
ANEXO B – Protocolo de coloração técnica histoquímica de HE	134
ANEXO C – Protocolo de coloração técnica histoquímica de TM	135
ANEXO D – Protocolo técnica de imuno-histoquímica	136

1 INTRODUÇÃO

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido podendo ser, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica que aciona as frentes de defesa orgânica. A forma como as feridas cutâneas são tratadas afeta diretamente a taxa de cura, o tempo de cicatrização, o retorno a função normal e a aparência cosmética final.

A cicatrização de feridas é um evento complexo e multifatorial que envolve interação do processo de inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação e reepitelização. Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de buscar alternativas que possibilitem acelerar a cicatrização de lesões cutâneas. Nessas pesquisas, as células-tronco, em especial as mesenquimais, têm se mostrado uma alternativa terapêutica possível. A tendência atual de se pesquisar células-tronco mesenquimais vem, sobretudo, da esperança de que essas células auxiliem incrementando beneficemente as formas de tratamentos convencionais de enfermidades, abrindo novos caminhos para a medicina regenerativa.

Alguns estudos vêm demonstrando que o uso das células-tronco mesenquimais em feridas, tanto agudas como crônicas, resultam em uma aceleração no processo cicatricial, decorrente do impacto benéfico que elas trazem para todas as fases da cicatrização (inflamatória, proliferação e remodelação). Eles relatam um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de cicatrização, além da conformação de uma cicatriz menos evidente.

A criocirurgia é uma técnica rápida de tratamento quando comparada à excisão cirúrgica tradicional. Apresenta menor potencial de invasividade e menor risco de morbidade do paciente. Porém, alguns autores e pesquisadores da área referem como efeitos adversos a cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional importante, após a aplicação da substância criogênica. O procedimento criocirúrgico tem sido utilizado no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas ou órgãos, embora ainda haja um maior emprego no tratamento de dermatopatias. Na medicina é indicada para o tratamento de mais de 60 tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de quinze tipos de neoplasias malignas. Na medicina veterinária, a criocirurgia também tem sido mais aplicada em dermatologia, como, por

exemplo, nos granulomas de origem infecciosa ou estéreis, piodermites profundas, hiperplasias, cistos, fístulas e neoplasias benignas e malignas.

A patofisiologia das lesões causadas pelo congelamento ou “*frostbites*” é praticamente idêntica à das lesões provocadas pelo procedimento criocirúrgico. Apresenta quatro fases patológicas que se sobrepõem: pré-congelamento, congelamento-descongelamento, estase vascular e fase isquêmica tardia. Elas ocorrem com maior frequência nas extremidades (mãos e pés) e na região da cabeça (nariz e orelhas) e estão relacionadas principalmente com atividades ocupacionais ou exposição ao frio intenso durante o lazer. Assim como as queimaduras causadas pelo calor, as lesões causadas pelo frio apresentam quatro graus dependendo da profundidade que atingem e dos tecidos lesados. Embora, antigamente, as lesões causadas pelo congelamento fossem uma condição que atingia principalmente militares e exploradores dos polos Ártico e Antártico, atualmente vem se tornando cada vez mais prevalente na população em geral, devido ao crescente interesse por atividades praticadas na neve como esqui, patinação, alpinismo e, também, pela maior procura pelo turismo nas regiões polares.

No entanto, mesmo com todas as indicações para o tratamento criocirúrgico nas áreas da saúde humana e animal, e do crescente aumento da incidência de lesões causadas pelo congelamento que ocorrem naturalmente pela exposição ao frio extremo, não foram encontrados trabalhos sobre a utilização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) como tratamento adjuvante durante o processo cicatricial nesse tipo de lesão. Dessa forma, desconhece-se a influência que tal terapia poderia ter frente à cicatrização de lesões cutâneas causadas pelo frio, tanto no que diz respeito à diminuição do tempo de reparo tecidual como na qualidade da cicatriz formada.

Através deste estudo, pretende-se avaliar a cicatrização de feridas cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos e a influência das ADSCs nesse processo. Esta pesquisa visa testar a aplicação das ADSCs em duas fases consecutivas da cicatrização: a fase de proliferação e a fase de remodelação. A partir do conhecimento dos resultados obtidos neste trabalho, almeja-se uma aplicação clínica rotineira no tratamento de pacientes, sejam eles humanos ou animais, portadores de defeitos cutâneos causados pela exposição ao frio extremo ou após sessões de criocirurgia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a influência das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) de ratos Wistar em duas fases da cicatrização cutânea de feridas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos Wistar.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência do tratamento com as ADSCs aplicadas no 15º dia após a indução das lesões com nitrogênio líquido (fase de proliferação ou de reparo);
- Avaliar a eficiência do tratamento com as ADSCs aplicadas no 30º dia após a indução das lesões com nitrogênio líquido (fase de remodelação ou maturação);
- Avaliar a eficiência do tratamento com as ADSCs aplicadas no 15º e no 30º dia após a indução das lesões com nitrogênio líquido (fase de proliferação e fase de remodelação);
- Comparar as diferenças obtidas entre os grupos pesquisados.

Estas avaliações e comparações serão baseadas na resposta aos seguintes testes:

- Cálculo da taxa de contração cicatricial por meio da medida da ferida com a utilização de paquímetro nos dias zero (indução da lesão), cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 pós-cirúrgicos;
- Avaliação dos achados histopatológicos e imuno-histoquímicos nas amostras coletadas no 45º ou no 60º dia após a indução da lesão;
- Acompanhamento da evolução dos tratamentos através de imagens fotográficas das lesões em processo de cicatrização nos dias zero, cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 pós-operatórios.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O animal experimental

O animal experimental adotado para este estudo foi o rato (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), pertencente à ordem *Rodentia* e à família *Muridae*.

O *Rattus norvegicus* foi o primeiro mamífero a ser domesticado com propósitos científicos. O primeiro trabalho de pesquisa utilizando esse animal foi realizado na França, em 1856, para estudar os efeitos da adrenalectomia, por um pesquisador chamado Philipeaux. A linhagem Wistar, usada no mundo todo, foi desenvolvida no mais antigo Instituto de Pesquisa dos Estados Unidos, o Instituto Wistar, na Filadélfia. O fato de uma mesma linhagem ser utilizada em vários laboratórios é importante porque permite a repetição de um mesmo experimento, em diferentes centros de pesquisa no mundo (LAPCHIK *et al.*, 2009).

O rato Wistar vem sendo utilizado para diversos propósitos, incluindo estudos de regeneração tecidual, reumatologia e endocrinologia (TUFIK *et al.*, 2004). Atualmente, diversas pesquisas têm sido realizadas na área de cicatrização cutânea e cirurgia plástica utilizando esse animal como experimental (BUSNARDO & BIONDO-SIMÕES, 2010; SHUMAKOV *et al.*, 2003; MCFARLIN *et al.*, 2006; RASULOV *et al.*, 2006; PIMENTEL, 2011; PESSOA *et al.*, 2012; LOSS, 2013; WAN *et al.*, 2013; VALENTE, 2014; YANG *et al.*, 2014; VIDOR, 2015).

3.2 A pele e os mecanismos de reparo tecidual

3.2.1 Anatomia e fisiologia da pele

A pele é a principal barreira de proteção do organismo e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger da ação de agentes externos, sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares, agir como órgão do sentido e participar da termorregulação corpórea (SMELTZER & BARE, 2005).

A pele é o maior órgão do corpo, recobrimdo-o em sua totalidade. Continua-se com as membranas mucosas que revestem os sistemas digestório, respiratório e urogenital, nos locais onde estes se abrem para a superfície. Histologicamente, é dividida em duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si. A epiderme é a camada mais externa, composta por quatro diferentes linhagens celulares: os ceratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel. A derme é a camada mais profunda e é formada por tecido conjuntivo (DYCE *et al.*, 1990; BANKS, 1992; BLANES, 2004).

A epiderme organiza-se em camadas e, à medida que as mais superficiais são eliminadas, as camadas mais profundas são restauradas por divisão celular. Nos animais domésticos, é constituída por cinco estratos (Figura 1): córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal, do mais externo ao mais interno (DYCE *et al.*, 1990; BANKS, 1992; PAVLETIC, 2010). O estrato basal é o mais profundo e faz limite com a derme. O estrato córneo, o mais superficial, é constituído por células cheias de ceratina, que proporcionam proteção contra traumas físicos e químicos. As várias camadas de ceratinócitos intimamente unidos uns aos outros, fornecem barreira contra a invasão de microorganismos e água. O pigmento melanina na epiderme protege os tecidos subjacentes dos efeitos nocivos da luz ultravioleta (BANKS, 1992; BLANES, 2004).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo que se estende da epiderme até o tecido subcutâneo. É composta principalmente por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, apresentando-se bastante vascularizada e inervada, podendo, também, conter glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos. Pode ser dividida em camada papilar, mais externa, e camada reticular, mais interna (BANKS, 1992; BLANES, 2004). A derme contém muitos tipos diferentes de células, incluindo fibroblastos e fibrócitos, macrófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos. Esta camada fornece uma base firme para a epiderme e para os anexos cutâneos (DYCE *et al.*, 1990).

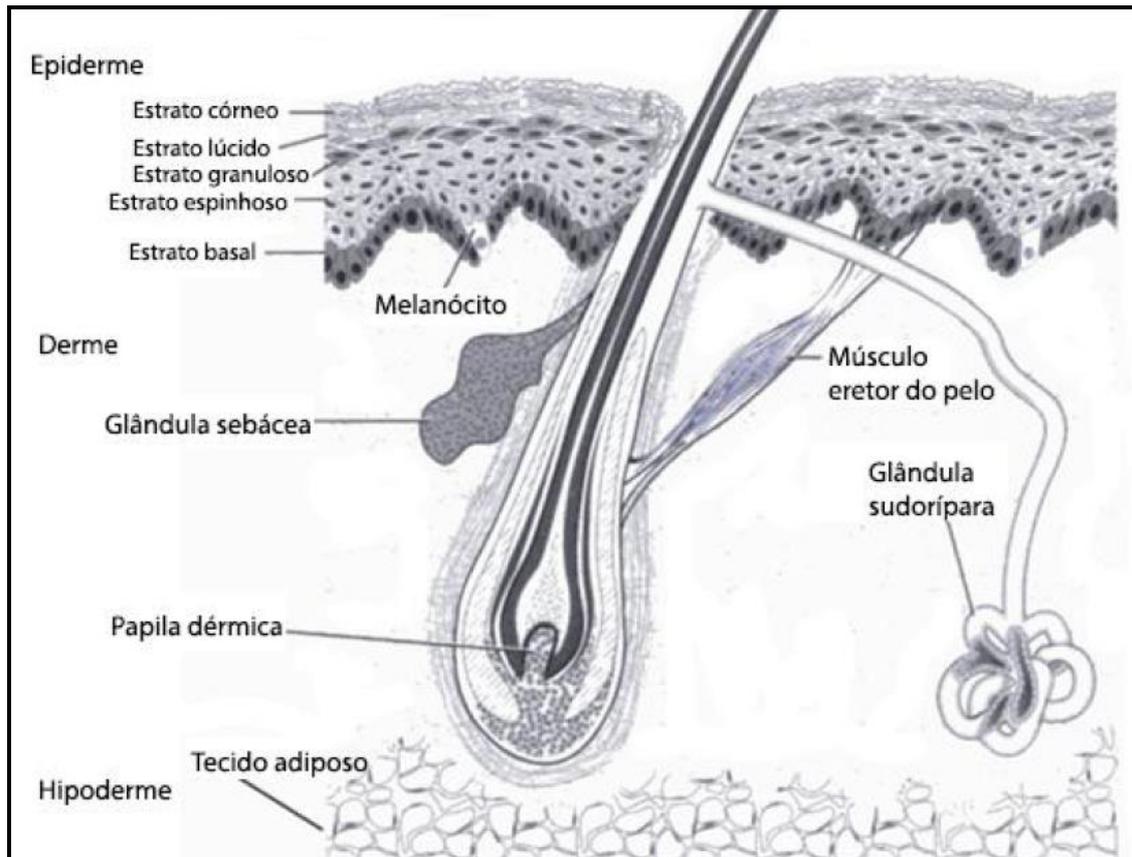


Figura 1 - Diagrama esquemático da estrutura da pele dos animais domésticos. FONTE: BANKS, 1992.

3.2.2 Cicatrização cutânea

A cicatrização de ferimentos começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restaura um tecido ferido (HEDLUND, 2005). O processo de cicatrização é contínuo e cada fase é crucial para o resultado final, pois cada uma delas influencia no desenvolvimento e na duração da fase seguinte. Portanto, o mais rápido reparo será o mais funcional e cosmeticamente aceitável (SWAIN & HENDERSON, 1997).

A cicatrização pode ser dividida em fases baseadas nas características microscópicas apresentadas, sendo estas iniciadas, mediadas e sustentadas por eventos bioquímicos complexos que têm como mediadores citocinas e fatores de crescimento. Este processo envolve uma regulada cascata de eventos, iniciada pela interação entre alguns tipos celulares, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (NWOMEH *et al.*, 1998). Recrutamento de células inflamatórias, angiogênese, formação de tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e migração de

ceratinócitos contribuem para restaurar a integridade funcional e anatômica do tecido. A perfeita interação de todos esses fatores determina a qualidade e a velocidade de cicatrização de uma lesão (ROH & LYLE, 2006).

A cicatrização, para ser mais bem compreendida, pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamatória, de proliferação (ou fase de reparo) e de maturação (ou fase de remodelamento) (Figura 2). O reconhecimento dessas fases, com base nas características macroscópicas, permite ao clínico fazer uma associação entre os eventos microscópicos e bioquímicos; o conhecimento desses eventos direciona ao manejo apropriado da ferida (HOSGOOD, 2006). A fase inflamatória é iniciada logo após a lesão e as fases subsequentes são dependentes de cada fase anterior (DYSON, 1997; LIPTAK, 1997; PAVLETIC, 2010).

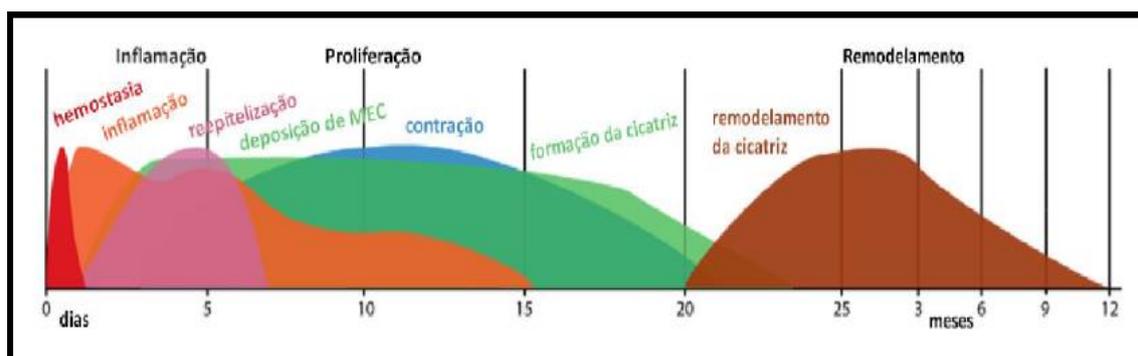


Figura 2 – Diagrama esquemático da cicatrização em mamíferos. FONTE: SEIFERT *et al.*, 2012.

Na fase **inflamatória** (0 a 3 dias) ocorre a vasoconstrição reflexa e oclusão de pequenos vasos, com acúmulo plaquetário e deposição de coágulos de fibrina. Essa vasoconstrição tem duração de 5 a 10 minutos e é seguida por uma vasodilatação que permite a passagem de células e fluidos através das paredes dos vasos sanguíneos para o espaço extravascular, diluindo substâncias tóxicas e favorecendo a diapedese leucocitária (HEDLUND, 2005; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Esta vasodilatação com extravasamento de elementos para o exterior do vaso forma um exsudato, traduzido clinicamente por tumor, calor, rubor e dor, cuja intensidade correlaciona-se com o tipo e grau de agressão. Juntamente com todas estas alterações, que correspondem à resposta vascular, existe uma resposta celular. Algumas células são

importantes nesta fase: os neutrófilos são responsáveis pela digestão de bactérias e tecidos desvitalizados e os monócitos transformam-se em macrófagos e auxiliam na fagocitose de bactérias e restos celulares. Após o trauma, são liberados mediadores celulares, os quais estimulam a elaboração de substâncias, que desenvolvem o fenômeno inflamatório (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e tromboxanos, linfocinas, interleucina 1 e 2) (BLANES, 2004; HEDLUND, 2005). A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea produzem um coágulo que sela os vasos rompidos e impede o extravasamento sanguíneo adicional (DYSON, 1997). O coágulo, formado por plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos, também é responsável por estabilizar as bordas da ferida e fornecer a ela uma resistência mínima (HOSGOOD, 2006).

Os neutrófilos possuem vida curta, fagocitam microorganismos e após, degeneram e morrem. Dessa forma, liberam enzimas que auxiliam os monócitos a retirar os restos necróticos do local. As plaquetas são as primeiras células reparadoras a aparecerem em uma ferida, e elas produzem alguns dos fatores de crescimento que cumprem um importante papel na fase reparadora da cicatrização, tais como: EGF, fator plaquetário IV, IGF-1 e TGF- β (SWAIN & HENDERSON, 1997). Os monócitos são essenciais à cicatrização. Privada de outros elementos celulares, as feridas continuam cicatrizando; contudo, se privada dos monócitos e suas funções, as feridas não cicatrizam (SWAIN & HENDERSON, 1997; BALBINO *et al.*, 2005). Os monócitos atraem fibroblastos para a ferida, estimulando estes para a maturação da síntese de colágeno e tornam-se macrófagos quando ingressam na ferida, fagocitando tecidos e fragmentos mortos (RAISER, 1995; ANDERSON, 1996; PAVLETIC, 2010). Quando se diferenciam em macrófagos, sintetizam e liberam proteases debridantes que retiram coágulos de fibrina e colágeno, restos e fragmentos de células mortas. Liberam fatores de crescimento de células endoteliais que atraem mais fibroblastos para a ferida. A chegada dos linfócitos coincide com a chegada dos macrófagos, e existe uma interação entre eles. A duração desta fase depende da quantidade de fragmentos e infecção, sendo então importante o debridamento cirúrgico, hemostasia e drenagem da lesão. Quanto mais infectada e mais restos de tecidos mortos restarem na ferida, mais tempo durarão as fases inflamatória e de debridamento, levando a um retardo no processo cicatricial (ANDERSON, 1996; SWAIN & HENDERSON, 1997; HATANAKA & CURI, 2007).

A fase de **proliferação** ou **fibroblástica** ou **de reparo** (3 a 14 dias) é composta pelos seguintes processos: proliferação fibroblástica, infiltração capilar e, proliferação e migração epitelial. Nessa fase ocorre intensa migração e proliferação celular, principalmente de fibroblastos e ceratinócitos (SEPHÉL & WOODWARD, 2006), que atuam para o reparo do tecido conjuntivo e do epitélio. Os fibroblastos surgem por volta do segundo e terceiro dia após o trauma. São células importantes na produção de componentes da substância fundamental e colágeno. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia e sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, da neovascularização da região (HARTLAPP *et al.*, 2001; HATANAKA & CURI, 2007).

Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida (THEORET, 2005; STOCUM, 2006). A indução da angiogênese ocorre principalmente pela ação direta de fatores de crescimento sobre as células endoteliais (BALBINO *et al.*, 2005; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009). Por volta do quarto dia, com a fibroplasia e a angiogênese, inicia-se a formação do tecido de granulação, o qual é constituído por macrófagos, fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares, os quais são sustentados pela matriz extracelular. Esse tecido é edematoso, exsudativo e caracteriza-se pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos (BAUM & ARPEY, 2005; HATANAKA & CURI, 2007). Durante o amadurecimento fenotípico dos fibroblastos em células produtoras de colágeno, o processo de contração da ferida alcança sua eficiência máxima. Isto ocorre devido à diferenciação de alguns fibroblastos das margens das feridas em miofibroblastos, células com características funcionais semelhantes às células do músculo liso (THEORET, 2005; SEPHÉL & WOODWARD, 2006).

A formação do epitélio ocorre pelo aumento de tamanho, da divisão e da migração das células da camada basal da epiderme sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Nas feridas com perda total da derme, a epitelização se faz apenas das margens da mesma, pois não há anexos cutâneos remanescentes. A ineficiência do processo mitótico destas células nas etapas iniciais é devido à inexistência de substrato adequado na região da ferida, que somente é fornecido quando

o tecido de granulação alcança o nível da epiderme (BALBINO *et al.*, 2005). Em feridas suturadas, células epiteliais podem cobrir a ferida em 12 a 24 horas. Já em feridas abertas com espessura total, um leito de granulação deve formar-se antes da epitelização; sendo assim, ocorre um intervalo de quatro a cinco dias (PAVLETIC, 2010).

Os fatores mais importantes que influenciam a epitelização são os fatores de crescimento de macrófagos e plaquetas. Fatores de crescimento epidermal também são importantes para a proliferação fibroblástica e de tecido de granulação. O excesso de lactato, sintetizado por macrófagos, também estimula a deposição de colágeno. A migração epitelial é guiada pelas fibras de colágeno (HEDLUND, 2005; PAVLETIC, 2010). O teor de água no leito da ferida aparentemente facilita a migração epitelial, pois feridas com tecidos adequadamente úmidos reparam mais rapidamente do que feridas ressecadas (HANKS & SPODNICK, 2005). Enquanto as células epiteliais se deslocam, há a liberação de colagenase para facilitar sua migração abaixo da crosta, que será posteriormente separada da superfície da ferida devido à ação dessa enzima. O contato entre as células epiteliais em todos os lados resulta na inibição de uma migração celular adicional (inibição densidade dependente) (HEDLUND, 2005; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

A fase de **maturação** ou **remodelação** (14 dias a um ano) é a fase final da cicatrização de uma ferida e corresponde a remodelação e restauração da estrutura normal de tecidos (ANDERSON, 1996). A transição da matriz extracelular em cicatriz requer o remodelamento do tecido conjuntivo presente na lesão (HOSGOOD, 2006). Ocorre então o remodelamento do colágeno, com um equilíbrio entre a deposição e o catabolismo deste, e a substituição do colágeno tipo III, que gradualmente se reduz, pelo colágeno tipo I, que aumenta. Enzimas colagenase específicas (metaloproteinases) produzidas pelos macrófagos, fibroblastos e células epidérmicas degradam os colágenos tipos I, II, III, X e XIII e as fibras de colágeno não-funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida (PAVLETIC, 2010). Durante essa fase, a quantidade de fibronectina e ácido hialurônico da matriz extracelular são reduzidos e a quantidade de proteoglicanos se eleva. Os proteoglicanos são responsáveis pelo aumento na elasticidade da ferida (DYSON, 1997). Conforme a maturação da ferida progride, a densa rede de capilares do tecido de granulação saudável declina, assim como sua celularidade, devido a apoptose

das células. O resultado é a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, concluindo o reparo da lesão. Em feridas crônicas, há o desenvolvimento de uma matriz fibrosa marcada pela deposição de colágeno e uma diminuição na quantidade de capilares (DYSON, 1997; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

De um modo geral, as feridas agudas respondem de maneira rápida, cicatrizam sem maiores complicações, enquanto as feridas crônicas são de longa duração, podendo reincidir frequentemente. Uma característica marcante de inflamação crônica é a proliferação de monócitos. Isso acontece quando há presença de um "provocador da lesão", como material estranho ou até mesmo bactérias, desencadeando então uma proliferação dos monócitos (HOSGOOD, 2007). Os fatores que retardam a cicatrização são: infecções, tecido de granulação excessivo, mudanças repetidas de curativos, hipotermia, hipoproteinemia, baixa tensão de oxigênio, dissecação da superfície da ferida, anemia, uremia, diabetes, hiperadrenocorticismos, doença hepática, fármacos citotóxicos, anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE'S) e corticosteroides (ANDERSON, 1996; HOSGOOD, 2007).

3.3 Lesões causadas pelo congelamento (*Frostbites*)

3.3.1 Histórico

Os ferimentos provocados pelo frio são divididos em “lesões congelantes”, “lesões não congelantes” e hipotermia (HASSI & MÄKINEN, 2000; IKÄHEIMO & HASSI, 2011). *Frostbite* é a condição médica onde o dano é causado à pele e a outros tecidos como resultado do congelamento do tecido. *Frostnip* é uma lesão fria superficial associada à vasoconstrição intensa na pele exposta. Nesse caso, os cristais de gelo não se formam no tecido e, assim, não ocorre a perda do mesmo, diferentemente do que ocorre na *frostbite*. As “lesões não congelantes” geralmente ocorrem como resultado da exposição prolongada a temperaturas frias, mas que não causam o congelamento e estão associadas a condições úmidas. Os exemplos mais comuns são *trenchfoot* (uma condição dolorosa nos pés causada por longa imersão em água fria ou lama que provoca escurecimento e morte da pele superficial) e *chilblains* (inchaço doloroso e prurido nas

mãos ou nos pés causado pela má circulação na pele devido ao frio) (IKÄHEIMO & HASSI, 2011).

Frostbites ocorrem com maior frequência nas extremidades (mãos e pés) e na região da cabeça (nariz e orelhas) (HASSI & MÄKINEN, 2000; IKÄHEIMO & HASSI, 2011). Há relatos também dessas “lesões congelantes” envolvendo os órgãos genitais em operações militares no Ártico (TRAVIS & ROBERTS, 1989).

As lesões causadas pelo frio podem ser gerais ou locais. Na condição geral, também conhecida como hipotermia, considera-se que o corpo todo do indivíduo sofreu à exposição ao frio. As lesões locais causadas pelo frio são conhecidas como *frostbite*, quando ocorre o congelamento dos tecidos e cristais de gelo se formam entre as células. Uma lesão local causada pelo frio pode ou não estar associada com a hipotermia (WARD, 1974).

As áreas próximas aos círculos polares são caracterizadas por consideráveis flutuações de temperatura e fotoperíodo com invernos longos, frios e escuros e verões curtos. O inverno, que é definido pelo número de dias nos quais a temperatura média diária fica abaixo de 0°C, é a estação mais longa nos ambientes em altas altitudes, perdurando por vários meses dependendo da região. As condições ambientais frias no inverno são muitas vezes agravadas pelo vento e pelas precipitações. Além disso, a escuridão, a neve e o gelo modificam ainda mais o ambiente e os riscos já associados a ele (MÄKINEN, 2007). O frio faz parte do cotidiano das pessoas que residem nos países dos círculos polares ou próximos a eles. A exposição ao frio pode resultar em diminuição do desempenho, ferimentos que causam diferentes tipos de limitações funcionais, hospitalizações, aumento da morbidade e, até mesmo, levar o paciente a óbito (MÄKINEN, 2007; MÄKINEN & HASSI, 2009; YOUNG & MÄKINEN, 2010).

Antigamente, as lesões causadas pelo congelamento eram uma condição que atingia, principalmente, os militares. Durante as guerras, a *frostbite* foi muito comum e frequentemente ocorria como uma complicação de feridas ou outras doenças. Nos anos anteriores há 1920, os viajantes polares sofreram de forma severa e comumente com as lesões causadas pelo frio (WARD, 1974). A *frostbite* é um tema muito comum nas descrições históricas dos exploradores do Ártico. Essas expedições envolviam vários agentes estressores, incluindo fadiga, déficits nutricionais, desidratação, mudanças hormonais e distúrbios psicológicos, além do ambiente extremamente frio com vento e neve (IKÄHEIMO & HASSI, 2011). Estudos mais recentes investigaram a

incidência em exploradores numa expedição para a Antártida e verificaram que a ocorrência de *frostbites* foi de 65,6 para cada 1.000 feridas por ano (PROVIC, 1998). O aumento do conhecimento e a produção de melhores equipamentos reduziram a incidência dessas lesões nas regiões polares; entretanto, elas ainda ocorrem com frequência entre os alpinistas que escalam altas altitudes (WARD, 1974).

Atualmente, as lesões causadas pelo congelamento têm se tornando cada vez mais prevalente na população em geral. A frequência de exposição das pessoas ao frio extremo aumentou nas últimas décadas, devido ao crescente interesse pelo turismo em regiões mais frias e por atividades ao ar livre e praticadas na neve, como esqui, patinação, montanhismo/alpinismo, entre outras (HAIK *et al.*, 2016).

O aquecimento global e as mudanças climáticas favorecem não apenas o surgimento de temperaturas médias mais quentes, mas uma maior frequência de eventos climáticos extremos, mudanças nas coberturas de gelo e aumento da quantidade de precipitações, que contribuem direta ou indiretamente para a saúde humana. Portanto, é relevante a necessidade de gestão dos riscos nessas áreas para prevenir as lesões causadas pelo frio. As populações que sofrem um risco maior com *frostbites* são crianças, idosos, “sem-teto” ou pessoas com doenças crônicas (IKÄHEIMO & HASSI, 2011).

3.3.2 Exposição ao frio

Os seres vivos (humanos ou animais) podem experimentar o frio das seguintes maneiras: expostos ao ar frio, imersos na água fria/gelada ou através do contato com superfícies frias. Esse resfriamento é direcionado para as diferentes áreas do corpo ou pode envolver regiões específicas do corpo. A exposição prolongada ao frio, muitas vezes associada ao vestuário insuficiente ou à atividade física prolongada, pode resultar em resfriamento total do corpo e diminuição da sua temperatura geral (hipotermia), o que pode ser agravado pelo vento ou água fria, os quais aumentam a perda de calor do corpo para o ambiente. O resfriamento também pode ficar restrito às extremidades (cabeça, mãos e pés), podendo piorar quando superfícies frias são tocadas ou objetos frios são manipulados. Este tipo de resfriamento é muito comum em atividades

ocupacionais e de lazer e representa um risco significativo para o desenvolvimento de lesões locais causadas pelo frio (IKÄHEIMO & HASSI, 2011).

A exposição ao frio ocorre, geralmente, por períodos curtos, mas repetidos e inclui deslocamentos para o trabalho, atividades ocupacionais e exposição durante o lazer. O grau de exposição ao frio depende de vários fatores, como ocupação, gênero, idade, saúde, atividade física e educação. Para os trabalhadores internos, a exposição ao frio se limita, provavelmente, ao deslocamento para o trabalho e em atividades de lazer. Já, para os trabalhadores de indústrias com atividades relacionadas à agricultura, silvicultura, mineração, transporte, obras e construções civis, a exposição ao frio é substancial (MÄKINEN *et al.*, 2006). Nas populações nativas do norte, a exposição a temperaturas extremamente negativas também é significativa, uma vez que realizam atividades de caça e pesca e pastoreio de renas, entre outras ao ar livre. Um grupo populacional que também está exposto ao frio intenso é o militar. A duração da exposição ao frio no inverno durante o treinamento ou operações militares ao ar livre pode ser igual ou superior a dos trabalhadores que possuem atividades diárias durante o ano inteiro em ambientes externos (IKÄHEIMO & HASSI, 2011).

A exposição significativa ao frio durante o tempo de lazer ocorre em diferentes atividades esportivas ao ar livre, como durante o “esqui” nos Alpes e países Nórdicos, corridas, montanhismo, ciclismo, patinação ou outros esportes praticados ao ar livre. As lesões causadas pelo frio são muito frequentes durante o alpinismo. Estudos epidemiológicos apontam que o risco de *frostbites* aumenta claramente em altitudes acima de 5.182 metros (HARIRCHI *et al.*, 2005). O aumento do turismo para as regiões polares também aumentou a incidência de “lesões congelantes” (PROVIC, 1998).

3.3.3 Classificação das lesões causadas pelo congelamento

As lesões causadas pelo congelamento são frequentemente classificadas pela profundidade e pela quantidade de danos aos tecidos com base nos sinais clínicos agudos e no diagnóstico por imagem avançado após o reaquecimento do tecido. Uma lesão de primeiro grau é caracterizada por congelamento parcial da pele, eritema, edema leve, sem aparecimento de bolhas e ocasional descamação da pele após alguns dias. O paciente pode relatar a sensação de picadas, queimação e latejamento. Uma lesão de

segundo grau é caracterizada pelo congelamento da pele englobando toda a epiderme e porção superficial da derme com edema, eritema e formação de bolhas claras ricas em tromboxanos e prostaglandinas. As bolhas desaparecem e formam escaras duras e pretas que permanecem durante vários dias. Uma lesão de terceiro grau é caracterizada por danos que se estendem além da derme reticular e do plexo vascular dérmico. Formam-se bolhas hemorrágicas, seguidas de uma coloração azul-acinzentada e necrose da pele. Uma lesão de quarto grau é caracterizada por extensão do congelamento para os tecidos subcutâneos, músculo, osso e tendão. Há pouco edema, a pele fica cianótica e, geralmente, forma uma escara profunda, seca, negra e mumificada (HASSI & MÄKINEN, 2000; MCINTOSH *et al.*, 2011) (Figura 3).

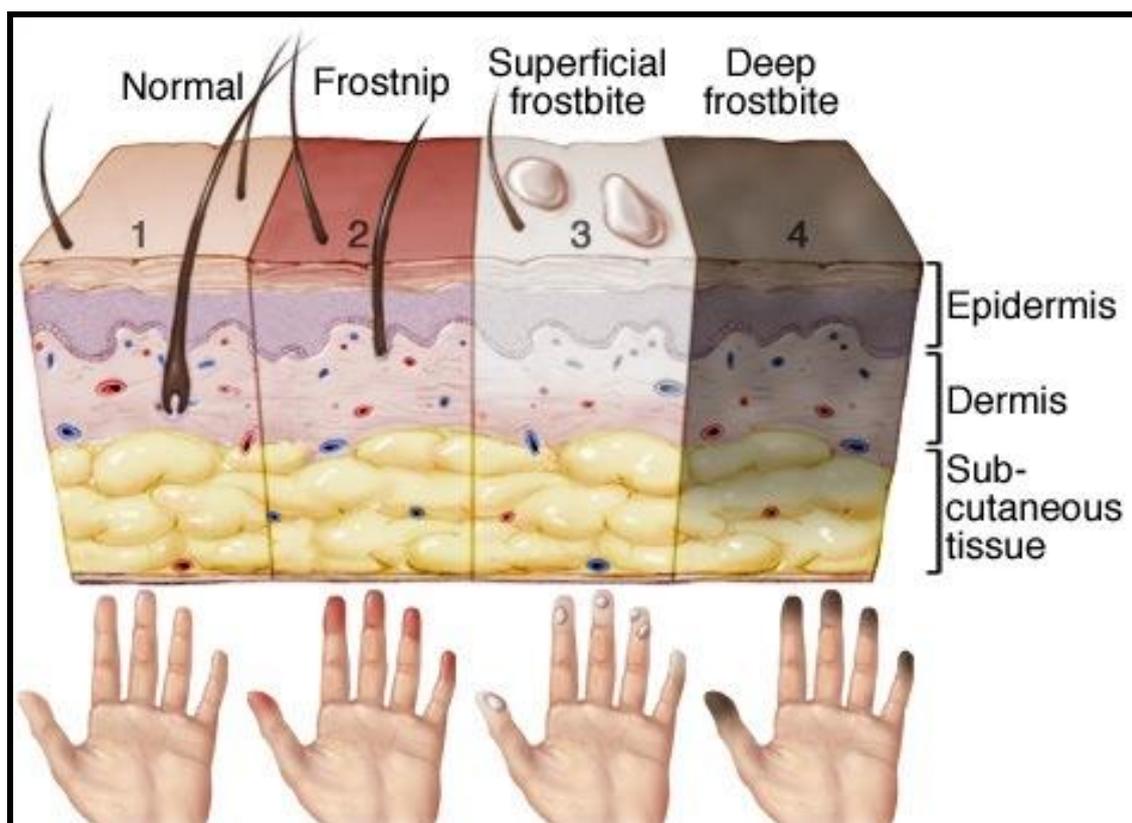


Figura 3 – Classificação das lesões causadas pelo frio. FONTE: MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH, 2018.

3.3.4 Patofisiologia das lesões causadas pelo congelamento

A patofisiologia da *frostbite* pode ser dividida em quatro fases patológicas que se sobrepõem: pré-congelamento, congelamento-descongelamento, estase vascular e fase isquêmica tardia. O pré-congelamento é caracterizado por uma diminuição considerável no fluxo de sangue como resultado do resfriamento da pele e vasoconstrição. No entanto, esta fase não envolve a formação de cristais de gelo. Na fase de congelamento-descongelamento, os cristais de gelo se formam intra ou extracelularmente, causando degeneração de lipídios e proteínas, distúrbios celulares eletrolíticos e desidratação, bem como a lise da membrana celular e, por fim, a morte da célula. O processo de descongelamento pode iniciar, também, uma lesão por isquemia-reperfusão e a resposta inflamatória. Na fase de estase vascular, os vasos se contraem e dilatam e o sangue pode extravasar para fora dos vasos sanguíneos. A fase tardia de uma lesão por congelamento é caracterizada por isquemia tecidual e infarto devido à resposta inflamatória, constrição intermitente das arteríolas e vênulas, e lesão de perfusão contínua (MCINTOSH *et al.*, 2011). A necrose do tecido após o congelamento deve-se a injúria celular e a lesão vascular (HASSI & MÄKINEN, 2000).

As “lesões não congelantes” causadas pelo frio, diferentemente da *frostbite* clássica, são caracterizadas por uma diminuição lenta na temperatura dos tecidos sem o congelamento direto. O organismo procura manter a perfusão local e a temperatura sistêmica por meio de uma cascata de processos como os tremores e vasoconstrição periférica. Quando o tecido apresenta uma temperatura de 15°C aproximadamente, tem-se a vasoconstrição máxima. Se a temperatura tecidual cair ainda mais (por exemplo, 10°C) ou a exposição ao frio continuar, a vasoconstrição é interrompida por fases de vasodilatação como uma tentativa do organismo de evitar a perda completa da perfusão na área afetada. Se a exposição ao frio persistir ainda mais, o dano endotelial ocorre com a formação de microtrombos, oclusão dos capilares, resultando em isquemia, degranulação de mastócitos com liberação de histamina e subsequente edema. O aquecimento do local causa dano por isquemia-reperfusão. As prostaglandinas e tromboxanos causam a agregação de trombócitos e, assim, a extensão da área de isquemia (HALLAM *et al.*, 2010).

3.3.5 Complicações e sequelas

Além da lesão aguda, as *frostbites* são frequentemente associadas a diferentes complicações pós-lesão que incluem função vasomotora alterada, cicatrizes extensas e esteticamente insatisfatórias, neuropatias, patologias na cartilagem articular e nas articulações e, nas crianças, crescimento defeituoso causado pelo dano na placa epifisária. Estas sequelas causam limitações funcionais e desconforto relevantes para os pacientes, podendo persistir por vários anos (IKÄHEIMO & HASSI, 2011).

Dependendo do tipo de “lesão congelante”, hipersensibilidade ao frio, perda sensorial, dor crônica, hiperidrose, distúrbios na placa de crescimento e osteoartrite podem se desenvolver (SACHS *et al.*, 2015). Essas sequelas podem ter um impacto negativo considerável na qualidade de vida. Para as forças armadas, essas sequelas podem comprometer a capacidade operacional futura de um soldado (NORHEIM *et al.*, 2017).

3.3.6 Tratamento

Os pacientes com *frostbites* ou outro trauma induzido pelo frio devem ser tratados em centros especializados para queimados. No entanto, apesar da semelhança nos achados clínicos, as diferenças na etiologia e fisiopatologia entre queimaduras induzidas pelo frio e pelo calor afetam o tratamento e o prognóstico. Ambos os tipos de lesões levam a danos ou mesmo a perda da pele e do subcutâneo. Dependendo do local e da gravidade da lesão induzida pelo frio, o espectro do tratamento se estende desde uma terapia conservadora até uma reconstrução cirúrgica complexa. O resultado pode variar desde a recuperação total sem sequelas até a morte por hipotermia ou infecções. As feridas extensas exigem um tratamento estéril. Há semelhanças no tratamento cirúrgico de queimaduras pelo calor e induzidas pelo frio, desde um debridamento superficial da pele morta até uma amputação nos casos mais severos (SACHS *et al.*, 2015).

Apesar das semelhanças clínicas entre queimaduras pelo calor e pelo frio, existem também diferenças. Por exemplo, a angiogênese começa muito mais cedo nas lesões por congelamento e a inflamação é menos acentuada do que nas queimaduras,

mas persiste por muito mais tempo. As partes do corpo mais expostas e com uma fina cobertura de pele e tecidos moles, como os dedos das mãos e dos pés, as orelhas e o nariz estão particularmente sob risco aumentado de desenvolver *frostbites* (HALLAM *et al.*, 2010; SACHS *et al.*, 2015).

O tratamento de *frostbites* tem se tornado um problema grave não apenas para médicos rurais de climas extremos, mas também para muitos hospitais urbanos. Enquanto no passado, o tecido afetado foi tratado apenas com métodos tradicionais, hoje terapias adjuvantes, como o oxigênio hiperbárico, agentes trombolíticos e análogo de prostaciclina com propriedades vasodilatadoras também estão sendo sugeridas (HAIK *et al.*, 2016). Isso porque, adicionalmente à lesão aguda, a *frostbite* está frequentemente associada a sequelas de longo prazo. Essas sequelas são menos estudadas e o tratamento é, muitas vezes, difícil (NORHEIM *et al.*, 2017).

3.4 Criocirurgia

3.4.1 Histórico

O uso do frio pela medicina é muito antigo. Inicialmente utilizado de forma empírica, teve grandes avanços nos séculos XIX e XX com a evolução da Física e, principalmente, do conhecimento que se adquiriu sobre a liquefação dos gases. Pode-se utilizar o frio de duas maneiras, aparentemente paradoxais: a conservação e a destruição. O conhecimento de diferentes técnicas permite a manutenção pelo frio chamada de criopreservação (de medula óssea, de sangue e de gametas), enquanto a destruição de tecidos é promovida pela crionecrose. Entre esses dois polos extremos, alguns autores consideram como crioterapia a utilização de baixas temperaturas na fisioterapia para tratamento de processos mórbidos articulares e musculares (LUCAS & LARSSON, 2007).

A criocirurgia também denominada de crioablação, crioterapia ou cirurgia por congelamento, é uma modalidade terapêutica onde as baixas temperaturas são utilizadas para destruir tecidos comprometidos. Etimologicamente, o prefixo “crio” deriva do grego “kruos” significando frio. Inicialmente, foi conceituada por Cooper (1963) como a aplicação do frio com fins terapêuticos visando o congelamento dos tecidos

biológicos, o que acarretaria inibição fisiológica ou a destruição tecidual. Já, segundo Goldstein & Hess (1977) seria o procedimento no qual haveria a destruição seletiva de tecidos quando da interposição em alternância de ciclos de congelamento e de descongelamento. Withrow (1980) referiu-se a tal modalidade de terapia como sendo o uso de baixas temperaturas, induzindo a morte celular. Finalmente, ainda em termos conceituais, Hong & Rubinsky (1994) a definiram como a destruição “*in situ*” de tecidos cancerígenos pelo emprego do congelamento localizado.

Este tipo de terapia já fora referido na literatura médica que antecede a era cristã. Homero (900 a.C.) e Hipócrates (400 d.C.) descreveram os efeitos benéficos do frio no controle local de hemorragias e na diminuição de edemas quando do tratamento de ferimentos (PODKONJAK, 1982). Cornelio Celso (25 d.C.) foi o primeiro a descrever lesões provocadas pelo frio, classificando-as desde graus leves até a gangrena. Galeno (70 d.C.) menciona a diminuição de sensibilidade dolorosa após o tratamento de lesões pelo frio, em seu manuscrito intitulado “Pain as a means of diagnostic” (MARQUES, 1989).

Em 1899, White descreveu a utilização do então recentemente desenvolvido “ar líquido” no tratamento de lesões superficiais de pele e de doenças dermatológicas como o lúpus, os epiteliomas e alguns cânceres (BAXTER, 1977; PODKONJAK, 1982). Allington (1950) utilizou zaragatoas embebidas em nitrogênio no tratamento de doenças de pele (SEIM, 1980). O primeiro aparelho capaz de conduzir o nitrogênio por uma sonda e propiciar o congelamento controlado de tecidos foi desenvolvido pelo médico Irving Cooper e pelo engenheiro Arnold Lee, o qual serviu de protótipo e deu origem aos equipamentos empregados até os dias atuais (KUFLIK *et al.*, 2000).

Entre 1961 e 1970, a criocirurgia foi utilizada em distintos tratamentos de diferentes especialidades, encontrando aplicação em ginecologia, neurologia, proctologia e ortopedia, dentre outras (RUBINSKY, 2000). Essa técnica foi, provavelmente, a primeira pouco invasiva para o tratamento de tecidos neoplásicos, fato este que propiciou seu grande desenvolvimento na década de 1960. Entretanto, esta mesma natureza pouco invasiva criou obstáculos para o preciso controle deste procedimento, principalmente quando aplicado em lesões de grandes dimensões ou em órgãos internos. Esta falta de precisão foi decisiva para o decréscimo da sua utilização e substituição por outras técnicas, na década de 1980, restringindo, novamente, o seu emprego à dermatologia e à ginecologia. Porém, na década de 1990, o avanço de

modelos matemáticos e o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética, propiciaram o “renascimento” e novas indicações para a aplicação do frio na medicina (SANDISON, 2002; BUTTS *et al.*, 2003; ESCUDERO *et al.*, 2003).

Comparando os relatos do emprego da criocirurgia na medicina veterinária com aqueles da medicina humana, pode-se verificar que até meados deste século eram raros os trabalhos relativos ao emprego de agentes criógenos em lesões evidenciadas em animais. O trabalho pioneiro foi de Openchowski, em 1883, que realizou estudos de fisiologia utilizando-se do congelamento localizado na região do córtex cerebral de cães. Balthasar, em 1957, desenvolveu estudo semelhante em cérebros de gatos, concluindo que o frio seria um excelente método para produzir necrose tecidual aliando-se a esta observação à baixa ocorrência de hemorragia (PODKONJAK, 1982; MARQUES, 1989). Em 1975, Farrell tratou, pela primeira vez, um caso de sarcóide equino com gelo seco (PODKONJAK, 1982). Na década de 1970, veterinários ingleses e americanos, passaram a publicar trabalhos, retratando a experiência obtida, em animais de guarda e companhia (GREINER *et al.*, 1975).

3.4.2 Mecanismos de morte celular induzida pelo frio (crionecrose)

A crionecrose é a lesão celular direta, que ocorre em resposta à exposição à temperatura negativa extrema. A célula desidrata e ocorre alta concentração dos solutos que causam danos à membrana celular e às enzimas e proteínas intracelulares. Outro mecanismo é a injúria vascular, porque com o congelamento ocorre estase vascular, principalmente na microcirculação. Como resultado há isquemia com posterior necrose tissular (NISHIDA *et al.*, 2011). A ocorrência da crionecrose pode ser classificada de acordo com o tempo em fase imediata, retardada e tardia (SEIM, 1980).

A **fase imediata** ocorre ainda durante o ciclo de congelamento/descongelamento, no qual as células são destruídas instantaneamente em decorrência de quatro eventos simultâneos (CASTRO *et al.*, 2013).

O primeiro evento ocorre com o congelamento da água contida nos tecidos, especialmente a água intersticial livre, que forma cristais extracelulares. Dessa forma se produz um ambiente hiperosmolar, fazendo com que a água do meio intracelular seja

deslocada para o meio extracelular, o que conduz a desidratação celular e a concentração tóxica de eletrólitos, que causam um dano irreparável à célula (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

O segundo evento é a formação de cristais de gelo, intra ou extracelular, dependendo do ciclo, ou seja, da velocidade com que o tecido é congelado e, em seguida, descongelado. O congelamento lento produz grandes cristais principalmente no meio extracelular, onde são menos letais, mas provocam desequilíbrio osmótico. Para manter o equilíbrio, a célula acaba perdendo água para o interstício, o que conduz a uma concentração de eletrólitos dentro das células e uma série de alterações. À medida que esta concentração vai aumentando, maior será a morte celular (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002). Entretanto, quando o congelamento ocorre rapidamente, a célula não é capaz de perder água para o meio externo para manter o equilíbrio, formando-se então, cristais intracelulares. Se na sequência ocorrer um descongelamento lento, os pequenos cristais inicialmente inócuos se transformarão em grandes cristais, causando ruptura de organelas e membranas, levando à morte celular (GREINER *et al.*, 1975; NISHIDA *et al.*, 2011). Caso o descongelamento ocorra rapidamente, os pequenos cristais irão apenas derreter (HOFFMANN & BISCHOF, 2002). Portanto, pode-se dizer que maior será a destruição celular quando o ciclo for de congelamento rápido seguido de descongelamento lento (SEIM, 1980).

O terceiro evento é a desnaturação de proteínas, a partir de complexos lipoproteicos das membranas celulares, que têm ligações instáveis e sensíveis às mudanças físicas causadas pelo congelamento, o que desencadeia dano e destruição das membranas celulares. A perda de fosfolipídio aumenta a permeabilidade da membrana celular, leva ao aumento no volume e posterior lise, podendo ocorrer tanto durante o congelamento quanto no descongelamento (GAGE & BAUST, 1998). Todas as membranas de uma célula, como as das mitocôndrias, microsomas e núcleo sofrem danos pelo congelamento, devido à desnaturação dos complexos lipoproteicos. Além disso, as alterações eletrolíticas que ocorrem durante o congelamento causam danos às proteínas e aos sistemas enzimáticos (NISHIDA *et al.*, 2011).

O quarto evento é o choque térmico, que se refere à lesão celular causada pela mudança brusca de temperatura, independente dos efeitos diretos do congelamento. Supõe-se, que o choque térmico aconteça pela variação da capacidade de expansão das

membranas dos vários componentes celulares, que se rompem durante essa mudança de temperatura (SEIM, 1980; NISHIDA *et al.*, 2011).

A **fase retardada** ocorre algumas horas após o fim do ciclo, na área de exposição ao agente criógeno. É caracterizada pelos efeitos da estase vascular, sendo muito estudada em lesões cutâneas causadas pela neve. A principal alteração que ocorre nessa fase é a aglutinação, tamponamento e aderência de células vermelhas entre si e à parede do vaso. Como resultado da estase vascular ocorre trombose e isquemia, seguidas de hipóxia ou até mesmo anóxia, mudança de pH e morte celular (GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

A anóxia celular consequente da perda de circulação é considerada o principal mecanismo de lesão na criocirurgia. Após o descongelamento dos tecidos, a estase microcirculatória se desenvolve rapidamente. A resposta inicial à refrigeração do tecido é a vasoconstrição, redução e até interrupção do fluxo sanguíneo, quando o congelamento é completo (GAGE & BAUST, 1998; NISHIDA *et al.*, 2011).

Durante o descongelamento, quando a temperatura se aproxima de 0°C, há o retorno da circulação, nessa fase com vasodilatação, hiperemia e aumento da permeabilidade vascular, o que causa um edema que progride por algumas horas. Ocorre, na sequência, lesão na junção endotelial pela destruição celular e distensão vascular provocada pelo congelamento e liberação de radicais livres no momento da reperfusão tecidual. Como os tecidos ficam privados de sangue durante o congelamento, as células liberam fatores vasoativos após o descongelamento, causando vasodilatação e reperfusão tecidual. As lesões endoteliais além de agravarem o aumento da permeabilidade e edema já presentes, provocam agregação plaquetária, formando microtrombos e consequente interrupção da circulação em, aproximadamente, 30-35 minutos a contar do descongelamento. A perda de suprimento sanguíneo priva o tecido de qualquer possibilidade de vida, resultando em necrose uniforme, exceto na periferia da área submetida ao congelamento (HOFFMANN & BISCHOF, 2002; NISHIDA *et al.*, 2011).

Após 30 minutos de submissão à temperatura de 20°C negativos toda a circulação se encontra interrompida, havendo trombose completa dos vasos, com sinais de necrose isquêmica do tecido adjacente. A área deficientemente perfundida é sempre menor que a área congelada e será ainda menor se próximo a ela estiver situada uma grande artéria (MARQUES, 1989). Histologicamente, todo este processo assemelha-se

a um infarto, havendo uma tênue linha de divisão entre o tecido normal e aquele congelado. Apenas a microcirculação é comprometida, as grandes artérias manterão sua função mesmo após o seu congelamento (WITHROW *et al.*, 1975).

A **fase tardia** ou imunológica é de especial interesse no tratamento de neoplasias malignas. Este fenômeno ocorre devido à formação de anticorpos antineoplásicos, resultantes da criocirurgia, o que alteraria a constituição antigênica celular. De acordo com esta hipótese, após a criocirurgia, o sistema imune seria sensibilizado pelo tecido destruído e estimulado a combater células remanescentes, que não foram totalmente destruídas pelo procedimento criocirúrgico (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; KUFLIK *et al.*, 2000; RUBINSKY, 2000; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

Neel *et al.* (1971) verificaram que a resposta imunológica a tumores multifocais é maior após a destruição de um tumor “*in situ*” por congelamento, do que quando removido por excisão cirúrgica. Isso ocorreria porque a crionecrose liberaria, nas circulações sanguínea e linfática, antígenos localizados nos tumores e provocaria uma resposta imunológica mais específica. Dawber (2002) e Tanaka *et al.* (2001) observaram a diminuição na ocorrência de metástases a distância. Hoffmann & Bischof (2002) descreveram a respeito do efeito deletério da hipotermia na periferia da lesão criotratada, provocando aumento da apoptose e destruindo, assim, clones de células neoplásicas.

Nem todas as células de uma determinada área, submetida à criocirurgia, são destruídas em um único ciclo de congelamento/descongelamento. Para que se tenha mais êxito nesses procedimentos, deve-se levar em consideração alguns pontos tais como: criógeno utilizado, equipamento e técnicas de aplicação, duração e temperatura do congelamento, relação entre os tempos de congelamento e descongelamento, número de ciclos e fatores intrínsecos ao próprio paciente (LUCAS, 2004).

3.4.3 Agentes criógenos

Os agentes criógenos são gases que podem ser convertidos ao estado líquido e têm a capacidade de extrair calor de tecidos vivos. Diferentes gases atingem distintas temperaturas e pontos de ebulição e essas características ditam sua adequação ao uso na

criocirurgia, pois o tecido alvo deve chegar rapidamente a no mínimo -20°C (GREINER *et al.*, 1975; BOJRAB, 1978). Os criógenos mais frequentemente utilizados são o nitrogênio líquido e o argônio. O óxido nitroso, dióxido de carbono, “freons”, oxigênio e propano líquido, são substâncias que foram gradativamente abandonadas por atingirem temperaturas pouco agressivas ou, ainda, por apresentarem um risco potencial durante a manipulação (GREINER *et al.*, 1975).

O nitrogênio líquido é, dentre os agentes criógenos, o de escolha na criocirurgia, pois atinge a temperatura de $-195,8^{\circ}\text{C}$ e é efetivo tanto em lesões benignas quanto malignas. Ele é incolor, inodoro, não inflamável, atóxico e inerte e, embora seja extremamente potente, é considerado seguro à manipulação, desde que sejam tomadas precauções básicas. Comparado aos outros agentes, é o mais barato, tem a maior capacidade de penetração e promove um congelamento rápido (BOJRAB, 1978; DAWBER, 1999).

3.4.4 Equipamentos e técnicas

O nitrogênio líquido pode ser aplicado através de *spray*, por sondas abertas ou fechadas e, menos frequentemente, por *swabs* e derramamento direto na lesão. Cada uma das técnicas é mais apropriada para uma determinada lesão; porém, há lesões que podem ser tratadas por mais de uma técnica, em função da preferência pessoal e da experiência do profissional (LUCAS, 2004). A escolha da forma de aplicação é feita através da avaliação da lesão, porém na rotina clínica, o *spray* tem sido o mais comumente utilizado, devido a sua praticidade e por apresentar taxas de sucesso tanto em lesões benignas quanto malignas (QUEIROZ *et al.*, 2008).

Na aplicação através de *spray*, o nitrogênio líquido quando confinado em recipiente fechado, tem sua pressão aumentada, e tende a buscar a abertura existente (LANE, 1974; GREINER *et al.*, 1975; WITHROW *et al.*, 1975; GOLDSTEIN & HESS, 1977). A velocidade de saída do nitrogênio é controlada por um gatilho e, o gás é liberado através de uma cânula, onde são acopladas as ponteiros com diferentes diâmetros. A pressão do jato é inversamente proporcional ao diâmetro do orifício de saída (DAWBER, 2002). Esse método possibilita o tratamento de lesões planas, em relevo ou pedunculadas, com aplicação no ponto médio da lesão (LUCAS &

LARSSON, 2007); de lesões lineares, nas quais se faz um movimento de vai-e-vem; ou, de lesões geográficas, onde a aplicação é de modo circular ou em movimentos em espiral (DAWBER, 1999).

O emprego do *spray* inclui-se no chamado sistema aberto, quando o jato é direcionado para a lesão sem nenhum aparato para contê-lo. Pode ser chamado de confinado, quando se utiliza algum utensílio para direcionar o jato ou para se controlar o diâmetro do congelamento (por exemplo, ponteiros de cone confinado ou cones de neoprene). Denomina-se sistema fechado quando se recorre a cilindros fechados, em uma das extremidades, denominados de sondas (LUCAS & LARSSON, 2007; CASTRO *et al.*, 2013).

3.4.5 Tratamento criocirúrgico

À temperatura de no mínimo -20°C , por pelo menos um minuto, todos os tecidos vivos sofrem crionecrose. Porém, quanto mais longo for o período do congelamento, maior será a extensão de área necrosada. Deve-se levar em consideração que se desejam temperaturas mais baixas em regiões onde não existam estruturas importantes próximas à lesão que se pretende congelar (LANE, 1974; GREINER *et al.*, 1975; GOLDSTEIN & HESS, 1977; PODKONJAK, 1982; WITHROW, 1989).

Segundo Goldstein & Hess (1977), a temperatura ideal a ser alcançada é de pelo menos 25°C negativos, para que se obtenha crionecrose adequada. Todavia, é muito difícil precisar uma única temperatura como aquela ideal, já que o congelamento se dá em distintas temperaturas em função do tecido considerado, principalmente em função do teor hídrico. Assim, os osteócitos são destruídos a uma temperatura de 0°C ; células do epitélio tegumentar e das glândulas de mucosas são destruídas a -10°C ; e, os melanócitos são destruídos numa faixa térmica de -3°C a -14°C (GAGE & BAUST, 1998). Considera-se que a temperatura de -50°C é aquela ideal para tratamento de neoplasias malignas (ZACARIAN, 1985; GILBERT *et al.*, 1997).

Os melanócitos são células de grande sensibilidade, mesmo em um tempo curto de congelamento com nitrogênio líquido, o que resulta em alterações na cor da pele. São as células mais sensíveis ao frio, seguidas, em ordem decrescente, por células epiteliais, do estroma fibroso, das grandes artérias, dos nervos, de cartilagens e do tecido ósseo

(DAWBER, 1999). As células e os tecidos com grande conteúdo de água são mais sensíveis ao congelamento do que aqueles com menos (tendões e ossos). Os tecidos neoplásicos possuem mais água do que os normais (HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

De acordo com Greiner *et al.* (1975), o tempo ideal para o descongelamento é de 20 a 30 minutos, mas Seim (1980) definiu que o descongelamento lento deve ocorrer naturalmente à temperatura ambiente. Não há um consenso entre os autores sobre o tempo em que o tecido deve permanecer congelado, variando de 30 segundos a 20 minutos (KUFLIK, 2004). Quando os procedimentos estão relacionados a tratamentos de dermatopatias neoplásicas, hiperplásicas e degenerativas raramente os tempos ultrapassam 90 segundos (DAWBER, 2002; LUCAS & LARSSON, 2002; KUFLIK, 2004). Porém, para o tratamento de neoplasias em órgãos internos como fígado, pâncreas, próstata e ossos, os tempos necessários para o congelamento podem variar de 5 a 40 minutos (SILVERMAN *et al.*, 2000; KORPAN, 2001).

Dawber (2002) sugeriu dividir o tempo de aplicação recomendado para a lesão, entre o necessário para se atingir o halo desejado e o resto do tempo para mantê-lo. Assim, uma lesão que deve ser congelada por 60 segundos, o tempo pode ser dividido da seguinte forma: de 10 a 15 segundos para se atingir o halo desejado e, os 45 a 50 segundos restantes para manter o halo de congelamento. Da mesma maneira, para se determinar o tempo ideal de descongelamento total, sugere-se que este deve ser igual ou maior a duas vezes o tempo de congelamento total ($TDT \geq 2 \times TCT$) (DAWBER, 2002; KUFLIK, 2004; LUCAS & LARSSON, 2007).

De modo geral, são necessários dois ciclos para se atingir uma maior taxa de mortalidade celular, pelo aumento da condutividade térmica em tecidos já congelados. Nos casos em que não há risco de perda de estruturas vitais ou em neoplasias malignas, no mínimo dois ciclos devem ser realizados e, em lesões benignas, até dois ciclos são suficientes (SEIM, 1980; GAGE & BAUST, 1998; HOFFMANN & BISCHOF, 2002).

3.4.6 Indicações terapêuticas

Devido ao seu caráter destrutivo, a criocirurgia tem sido utilizada para o tratamento de diferentes enfermidades de sistemas ou órgãos. Historicamente, há uma maior indicação para o sistema tegumentar, devido à facilidade de aplicação por

equipamentos e métodos simples. Dawber (2002) indicou o procedimento para mais de sessenta tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de quinze indicações para neoplasias malignas. Kuflik (2004) também recomendou a criocirurgia para mais de quarenta tipos de dermatopatias. Todos os autores que se utilizam desta forma de tratamento relatam o grande êxito em termos de resultados. No contexto da medicina veterinária a criocirurgia, igualmente, tem maiores possibilidades de emprego na dermatologia (LUCAS, 2004).

Contudo, com o avanço tecnológico houve o grande desenvolvimento da aplicação desta modalidade terapêutica em diferentes neoplasias, tanto em medicina veterinária como na medicina humana, de outros órgãos tais como a próstata, fígado, pâncreas, pulmão, linfonodos, bem como de diferentes tecidos (ósseo e nervoso), além do tratamento de casos recidivantes ou avançados de neoplasias genitais e da glândula mamária (HOFFMANN & BISCHOF, 2002; BUTTS *et al.*, 2003; ESCUDERO *et al.*, 2003).

3.4.7 Vantagens e desvantagens

As vantagens e desvantagens da criocirurgia são frequentemente apontadas por alguns autores. As principais vantagens incluem: rapidez da técnica quando comparada aos métodos tradicionais de excisão cirúrgica; segurança para pacientes debilitados e/ou idosos, principalmente; diminuição da dor em decorrência da destruição das terminações nervosas; presença de poucos sangramentos ou até ausência de hemorragias; tratamento múltiplo, pois enquanto se espera o descongelamento de uma lesão pode-se congelar outra; acessibilidade em lesões orais, interdigitais, retais e perianais, que são locais com restrição de acesso; custo baixo do tratamento e facilidade da técnica quando comparada à cirurgia tradicional. São descritas como principais desvantagens: custo inicial do equipamento; evaporação do agente criógeno; efeito estético indesejável no pós-cirúrgico a curto e médio prazo, em virtude da ocorrência de crostas hemorrágicas, necrose e odor exalado que se sucedem, e despigmentação da área que sofreu a criocirurgia, resultando em insatisfação dos proprietários (LUCAS & LARSSON, 2007).

3.4.8 Complicações e sequelas

O procedimento criocirúrgico pode provocar alterações transitórias ou definitivas na região exposta à crioterapia. As complicações temporárias que podem ser observadas são: dor, eritema, edema, hemorragia após 60 a 120 minutos da aplicação, lesões vesicobolhosas, crosta, enfisema (que quando ocorre deve ser seguido pela interrupção do tratamento), lesões neurológicas, hiperpigmentação da periferia das lesões e fraturas patológicas. O nitrogênio pode invadir órgãos e cavidades, causando lesões severas ou mesmo a morte, como a embolia quando adentra grandes vasos, o pneumoperitônio em casos de fístulas perianais, e ruptura pulmonar quando do tratamento de carcinomas nasais. As complicações dermatológicas permanentes, chamadas de sequelas são: cicatriz e perda tecidual, leucodermia, leucotriquia e alopecia (LUCAS & LARSSON, 2007).

3.5 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco possuem a capacidade de autorrenovação e, ao mesmo tempo, diferenciam-se em pelo menos um tipo de célula altamente especializada (MEIRELLES *et al.*, 2006). Com divisão assimétrica (Figura 4), podem originar células precursoras com capacidade de diferenciação específica de um determinado tecido, ao mesmo tempo em que produzem outras células indiferenciadas, para repor a população de células-tronco (COVAS, 2006; CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010; CHENG *et al.*, 2011).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein e colaboradores em 1966 (COVAS, 2006; YANG *et al.*, 2013). São células multipotentes adultas, ou células-tronco somáticas (GOMILLION & BURG, 2006; GEBLER *et al.*, 2012), capazes de diferenciação na maioria dos tipos celulares com o objetivo de manter e reparar o organismo. Residem em múltiplos locais como tecido adiposo (GEBLER *et al.*, 2012; GINANI *et al.*, 2012), medula óssea, cordão umbilical, membrana amniótica, rins, fígado, baço, pulmões, pâncreas, tendões, membranas sinoviais, placenta, fluido amniótico e polpa dentária (GEBLER *et al.*, 2012; YANG *et*

al., 2013). Por serem facilmente isoladas e cultivadas em laboratório, são uma opção viável para uso em terapia celular (GOMILLION & BURG, 2006).

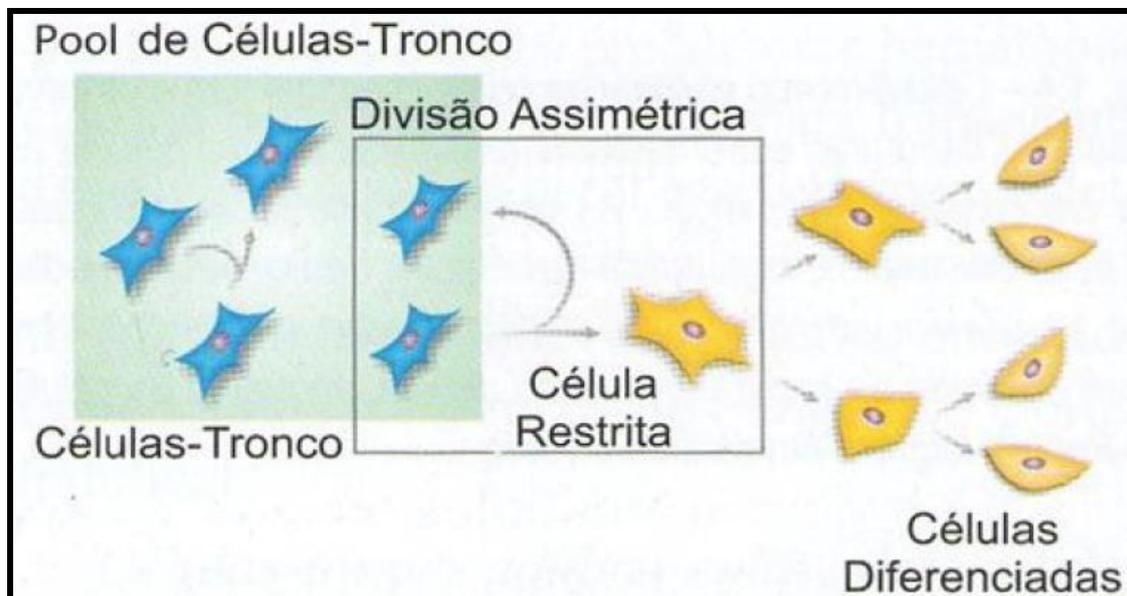


Figura 4 – Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células-tronco. FONTE: COVAS, 2006.

Quanto à sua origem, podem ser embrionárias, quando isoladas de estágios iniciais do embrião, ou adultas, se obtidas de tecidos adultos (CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010; CHENG *et al.*, 2011), com o objetivo de renovação e regeneração (MEIRELLES *et al.*, 2006). De acordo com a sua plasticidade, as células-tronco são classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. 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 todos os tipos de células 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, não formam tecidos extraembrionários, não possuindo 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).

As MSCs secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem a migração e a expansão celular, exercem atividades imunomoduladoras, modulam a angiogênese e a apoptose celular e suportam a migração e a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (GEBLER *et al.*, 2012). Sua capacidade de secreção de citocinas e outros fatores parácrinos no sítio da lesão pode melhorar significativamente a cicatrização de pele (GAO *et al.*, 2014). Suas características imunossupressoras e seu potencial de diferenciação legitimaram sua aplicação clínica em doenças imunomediadas e inflamatórias, mas problemas como a indução de tumores de células autólogas ou a transmissão de infecções por células heterólogas ainda necessitam estudos adicionais (GEBLER *et al.*, 2012). A idade do doador também pode ser um fator limitante para a utilização das MSCs, pois, com o avanço da idade, a senescência e a apoptose, podem induzir o declínio da sua função multiplicativa (YARAK & OKAMOTO, 2010).

As MSCs são capazes de responder e modular suas funções, quando expostas a células ou fatores característicos do ambiente de lesão (JACKSON *et al.*, 2012). Sua capacidade de atração para áreas de inflamação (KHOSROTEHRANI, 2013; JACKSON *et al.*, 2012) ou de tumores pelas moléculas CCL21 ou HMGB1, é conhecida como *homing*. Na falta dessa sinalização, são atraídas em ordem de preferência para os pulmões, fígado e baço (KHOSROTEHRANI, 2013). Demonstram quimiotaxia *in vitro* pelo SDF1, PDGF, IGF-1, IL-8 e TNF α . Em modelos murinos, as MSCs aplicadas pela via sistêmica são capazes de chegar aos tecidos lesionados (JACKSON *et al.*, 2012). Adicionalmente, sabe-se que as MSCs cultivadas a partir de camundongos GFP (Green Fluorescent Protein) diminuem rapidamente sua quantidade no sítio da lesão, indicando que podem não sobreviver muito tempo ao ambiente alterado (SKARDAL *et al.*, 2012).

A Sociedade Internacional de Terapia celular definiu para a comunidade científica, em 2006, três critérios mínimos para a identificação das MSCs humanas: (1) apresentar aderência às placas de cultivo; (2) demonstrar o potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos em condições padrão de cultura; (3) expressar os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 (mínimo 95% da população celular estudada) e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II (máximo 2% da população) em ensaio por citometria de fluxo (DOMINICI *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2013). Posteriormente outros autores

complementaram essa caracterização com a expressão de novos marcadores, como CD13, CD44, CD54, 106 e Stro-1, e a não expressão de CD31 (GEBLER *et al.*, 2012) e a apresentação de morfologia celular semelhante a fibroblastos (GOMILLION & BURG, 2006; GEBLER *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, as MSCs humanas são isoladas a partir da medula óssea. Mas com a limitação da quantidade de células obtidas para os ensaios clínicos, fez-se necessário estudar outras fontes como as células do cordão umbilical ou do tecido adiposo (AL-NBAHEEN *et al.*, 2013). Nos últimos anos, populações celulares similares às MSCs derivadas da medula óssea estão sendo obtidas de diferentes tecidos como: tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2002), pele, sangue, sangue do cordão umbilical, pâncreas e fígado (KHOSROTEHRANI, 2013). Ao comparar diferentes origens de células estromais (medula óssea, tecido adiposo e pele), sugere-se levar em conta o tratamento proposto para a escolha apropriada da fonte doadora (AL-NBAHEEN *et al.*, 2013).

3.5.1 Células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs)

Van e Roncari (1977) relataram que o tecido adiposo de ratos adultos continha células com capacidade de proliferação e de diferenciação em adipócitos. Apontaram para a possibilidade de haver células precursoras de adipócitos no tecido de um animal adulto, que poderiam ser expandidas em cultura celular. Em 2001, as ADSCs foram identificadas e, desde então, são estudadas para uso na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (ZUK *et al.*, 2002; STERODIMAS *et al.*, 2010; TSUJI *et al.*, 2014).

As células-tronco de origem adiposa (do inglês, *adipose derived stem cell* – ADSC) são também conhecidas como células-tronco adultas derivadas de gordura (*adipose derived adult stem cells* – ADAS), células tronco multipotentes derivadas de gordura (*human multipotent adipose derived stem cells* – hMADS), células processadas de lipoaspirado (*processed lipoaspirate cells* – PLA), células estromais derivadas de tecido adiposo (*adipose tissue derived stromal cells*) (FRASER *et al.*, 2006) e pré-adipócitos (TSUJI *et al.*, 2014).

A medula óssea e o tecido adiposo são as principais fontes de MSCs usadas em estudos pré-clínicos e clínicos. O lipoaspirado é uma fonte de MSCs, a partir do qual é

isolada uma fração que contém as ADSCs. Ele têm se mostrado muito eficientes em vários tipos de terapias incluindo o tratamento de lesões de pele e outras cirurgias plásticas (ZUK *et al.*, 2002; RIGOTTI *et al.*, 2007; OTTO & WRIGHT, 2011).

O tecido adiposo representa uma fonte abundante de tecido do doador para a substituição de células autólogas (ZUK *et al.*, 2002; FRASER *et al.*, 2006; KERN *et al.*, 2006; NAKAGAMI *et al.*, 2006; STERODIMAS *et al.*, 2010; YARAK & OKAMOTO, 2010; GINANI *et al.*, 2012; TSUJI *et al.*, 2014). As ADSCs são células multipotentes com propriedades similares, porém não idênticas às das MSCs (FRASER *et al.*, 2006; NAKAGAMI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2011; GINANI *et al.*, 2012; AL-NBAHEEN *et al.*, 2013), com a vantagem de estarem presentes em muito maior volume no organismo, apresentarem maior expansibilidade relativa e causar menor morbidade na colheita, além de conter menor potencial oncogênico (ZUK *et al.*, 2002; FRASER *et al.*, 2006; GOMILLION & BURG, 2006; KERN *et al.*, 2006; STERODIMAS *et al.*, 2010; YARAK & OKAMOTO, 2010; GINANI *et al.*, 2012; TSUJI *et al.*, 2014). Tanto as ADSCs quanto as MSCs são a fração de células estromais isoladas a partir de um depósito adiposo, pertencentes ao tecido subcutâneo ou à medula óssea respectivamente, que aderem ao plástico de cultivo (ZUK *et al.*, 2002; NAKAGAMI *et al.*, 2006) e possuem morfologia fibroblástica (STERODIMAS *et al.*, 2010).

O tecido adiposo encontra vantagens incontestáveis como fonte de MSCs indiferenciadas por causa de sua fácil obtenção (por meio de lipoaspiração ou lipectomia), baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento (HASSAN *et al.*, 2014). Com um grama de tecido de medula óssea de um paciente hígido é possível isolar 5×10^4 MSCs, enquanto que com o mesmo volume de tecido adiposo, é possível isolar entre $3,5 \times 10^5$ e 1×10^6 ADSCs (TSUJI *et al.*, 2014). Outras fontes de coleta vêm sendo estudadas como, por exemplo, o trabalho demonstrando que os folículos pilosos são uma alternativa promissora para obtenção de células-tronco (WANG *et al.*, 2013).

Em condições de cultura *in vitro*, as ADSCs apresentam similaridade com as MSCs na maioria dos marcadores de superfície e na maior parte do perfil de expressão gênica (ZUK *et al.*, 2002; FRASER *et al.*, 2006; GOMILLION & BURG, 2006; KERN *et al.*, 2006; NAKAGAMI *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2011; AL-NBAHEEN *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013). Dessa forma, a caracterização do fenótipo das ADSCs geralmente segue o critério proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. No entanto, há ainda dúvidas se elas são CD34 positivas ou negativas, assim ambas as

marcações são aceitas. Alguns trabalhos atestam que as ADSCs CD34+ apresentam grande capacidade de proliferação, enquanto as CD34-, grande capacidade de diferenciação (MIZUNO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013).

As ADSCs podem reduzir sinais severos de atrofia, retração, fibrose e ulceração da pele causadas por radioterapia (RICHTER *et al.*, 2009; STERODIMAS *et al.*, 2010). Possuem um grande potencial para o reparo e a regeneração tecidual na cirurgia plástica reconstrutiva (STERODIMAS *et al.*, 2010), aumentando a neovascularização e a viabilidade de flapes de pele (LU *et al.*, 2008). Pacientes diabéticos com feridas isquêmicas apresentaram maiores taxas de sobrevida e menores quantidades de amputações dos membros acometidos, quando tratados com ADSCs (KIM *et al.*, 2011). Contudo, longos períodos de expansão e múltiplos procedimentos ainda são obstáculos, pois aumentam a possibilidade de infecção. Por isso, as ADSCs ainda devem ser exaustivamente estudadas para a aplicação clínica rotineira (YANG *et al.*, 2013).

3.5.2 Células-tronco mesenquimais na cicatrização cutânea

As MSCs agem, em vários níveis, nas três fases da cicatrização: inflamatória, de proliferação e de remodelamento (Figura 5). Alguns estudos sugerem que a diferenciação das MSCs, que contribuiria para a regeneração do tecido, é limitada pela pequena taxa de sobrevivência destas células no local da lesão. Assim, a sinalização parácrina é o principal mecanismo das MSCs, reduzindo a inflamação, promovendo a angiogênese e induzindo a migração e a proliferação celular (MAXSON *et al.*, 2012). Uysal e colaboradores (2014) sugerem que a diferenciação das MSCs em ceratinócitos e células endoteliais assumem o mesmo papel da sinalização parácrina para acelerar a neovascularização e a reepitelização de feridas.

Na fase inflamatória (1 a 3 dias), a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 são aumentadas, enquanto as citocinas pró-inflamatórias IL-2, TNF- α e IFN- γ são diminuídas, causando a supressão da reação inflamatória local. Adicionalmente, há o bloqueio da proliferação de linfócitos T (KIM *et al.*, 2013; MAXSON *et al.*, 2012). A diminuição do TNF- α também favorece a reepitelização posteriormente na fase de

proliferação (KIM *et al.*, 2013). A ação antimicrobiana das MSCs também é importante para limitar a ocorrência de infecção (MAXSON *et al.*, 2012).

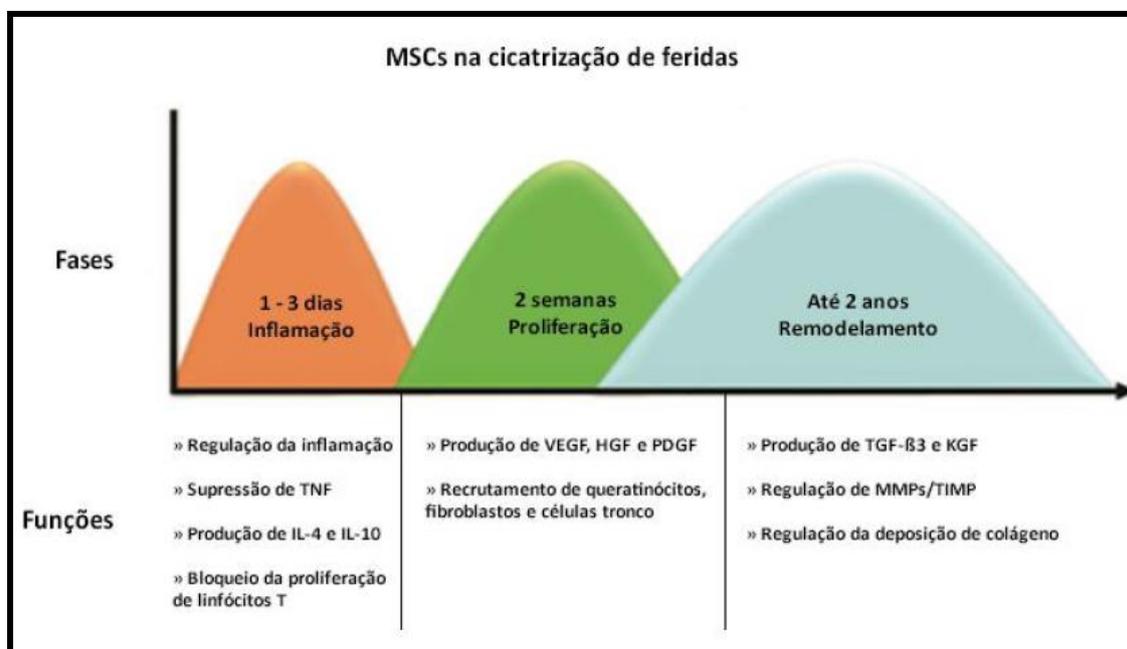


Figura 5 – Diagrama com as fases da cicatrização e as funções exercidas pelas células-tronco mesenquimais em cada uma delas. FONTE: MAXSON *et al.*, 2012.

Na fase proliferativa (14 dias), é aumentada a produção de VEGF, FGF, EGF, KGF, HGF, PDGF e TGF-β. Através de sua ação parácrina, as MSCs aumentam a migração e a proliferação de ceratinócitos, células endoteliais e epiteliais. A proliferação de fibroblastos também é aumentada, assim como a formação de vasos sanguíneos. Dessa forma, há um crescimento maior de um tecido de granulação mais exuberante. A angiogênese é um fator muito importante para a cicatrização de pele; o VEGF e o FGF são potentes fatores angiogênicos (CHEN *et al.*, 2012; MAXSON *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; UYSAL *et al.*, 2014).

Ao mesmo tempo que os fibroblastos produzem fibras colágenas em maior quantidade e mais densas, gerando aumento da resistência da cicatriz, a menor contração da ferida e a maior produção de matriz-metaloproteinases controlam a exacerbação da deposição do colágeno, melhorando o resultado estético e mantendo a função da pele (CHEN *et al.*, 2012; MAXSON *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013). Contribuem ainda para o remodelamento apropriado da cicatriz, o aumento da secreção

de VEGF e HGF e o balanço adequado entre TGF- β 1 e TGF- β 3 (MAXSON *et al.*, 2012). Outra característica importante para o processo de regeneração tecidual é a propriedade imunorreguladora destas células, as quais são capazes de modular a função imunológica de várias populações celulares, tais como: células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B e as células NK (*Natural Killers*) (RASMUSSEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2012; MAXSON *et al.*, 2012).

Assim como existem muitas similaridades entre as MSCs e as ADSCs, sabe-se que essas semelhanças também ocorrem em seus efeitos terapêuticos. Assim como as MSCs, as ADSCs promovem a proliferação celular, a neovascularização e o recrutamento celular para a ferida, a síntese de colágeno e a secreção de fatores de crescimento, principalmente os pró-angiogênicos (CHEN *et al.*, 2008; UYSAL *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013). Além disso, promovem o remodelamento do tecido (PARK *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2013) e a diferenciação das células endoteliais (PARK *et al.*, 2004; UYSAL *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013). Tanto as MSCs quanto as ADSCs podem diminuir o tempo de cicatrização, melhorar a qualidade da cicatriz, além de diferenciar-se em células endoteliais e ceratinócitos em modelos de segunda intenção (UYSAL *et al.*, 2010).

As MSCs aplicadas por via sistêmica são capazes de migrar e se enxertar na região do tecido lesionado (JACKSON *et al.*, 2012). Essa migração ocorre em resposta aos sinais quimiotáticos modulando a inflamação, reparando os danos teciduais e facilitando a regeneração (MAXSON *et al.*, 2012). A partir dessas características, aplicações de MSCs locais ou sistêmicas apresentam resultados semelhantes na cicatrização de feridas (MCFARLIN *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2007).

Existem pelos menos duas possibilidades pelas quais as MSCs podem promover a cicatrização: por sinalização parácrina e por diferenciação. A primeira mostra que elas têm a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Pode ser que após a migração para a ferida, elas sejam ativadas ao encontrar o meio repleto de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das MSCs poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no microambiente da ferida secretando fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a enorme plasticidade e habilidade que essas células têm para se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos. Portanto, as MSCs facilitariam a cicatrização de feridas pela diferenciação

em múltiplas células que residem na pele (ceratinócitos, pericitos e células endoteliais) (MCFARLIN *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2008; SORRELL & CAPLAN, 2010; KIM *et al.*, 2011; HASSAN *et al.*, 2014). Contudo, a parcela de contribuição de cada um desses mecanismos de atuação das MSCs não é totalmente conhecida, sendo ainda objeto de pesquisa (BROWER *et al.*, 2011).

Hassan e colaboradores (2014) verificaram em experimento *in vitro* que as MSCs podem se transdiferenciar em células epidérmicas, tais como ceratinócitos e células endoteliais microvasculares. Assim, as MSCs também podem transdiferenciar-se em ceratinócitos quando em condições que lhes permitam interagir com as células epidérmicas da própria pele lesada. Esse estudo sugere que as MSCs poderiam participar diretamente na regeneração estrutural dos tecidos dérmicos e epidérmicos, representando, assim, um mecanismo adicional pelo qual elas podem promover a cicatrização de feridas cutâneas.

Kim e colaboradores (2013) demonstraram que transplantes de MSCs experimentais em cães aceleram a cicatrização da pele, aumentam a deposição de colágeno, a proliferação celular e a angiogênese, ao mesmo tempo que obtiveram menor expressão de citocinas pró-inflamatórias. McFarlin *et al.* (2006) utilizaram MSCs para cicatrização de feridas cutâneas criadas experimentalmente e observaram aumento da resistência da cicatriz devido ao aumento da produção de colágeno e mais rápida maturação histológica quando comparada ao grupo controle.

Definir a forma mais adequada para permitir que as MSCs atuem no local do dano tecidual tornou-se um ponto chave na investigação da terapia celular. Considerando que a capacidade das MSCs de recircular é extremamente enfraquecida pela microcirculação e que, em outros locais pode ocorrer perda de função ou ativação da inflamação, diversos estudos têm relatado os efeitos benéficos destas células quando injetadas diretamente na região da lesão (ZONTA *et al.*, 2010). O período em que são administradas também deve ser considerado, pois as MSCs devem interagir com células cruciais presentes nos diferentes estágios do processo de cicatrização. Exatamente o que são essas interações e quando elas ocorrem são, ainda, áreas de pesquisa a serem exploradas (SORREL & CAPLAN, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados 89 ratos Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, machos, hípidos, com oito semanas de idade, pesando em média 250-300g, provenientes do Biotério Central (BC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Dos 89 ratos utilizados, 86 foram para o protocolo de indução das lesões e três para a coleta das ADSCs. Os animais foram alojados em caixas-moradias de polipropileno medindo 40cm X 32cm X 17cm, cada uma acomodando cinco animais, durante quinze dias, antes do início dos procedimentos para aclimação e quarentena no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM. A temperatura e a umidade relativa do ar foram controladas (20-26°C e 40-60%, respectivamente) e fotoperíodo de 12/12 horas. A alimentação fornecida era à base de ração comercial peletizada específica para a espécie e água *ad libitum*.

Após o período de adaptação, os animais foram separados aleatoriamente e mantidos nas mesmas caixas-moradias, porém individuais ou em pares, onde permaneceram até o término do período experimental. A fim de minimizar o estresse provocado pelo isolamento e manipulações frequentes, era fornecido a eles, semanalmente, porções de amendoim com casca, semente de girassol e papel toalha para estimular comportamentos naturais da espécie como descascar, rasgar e roer, contribuindo para seu enriquecimento ambiental e alimentar.

Os animais foram mantidos e manipulados segundo a Lei Federal 11.794 (Diário Oficial da União – 08/10/2008), as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Este projeto foi avaliado e aprovado pela CEUA da UFSM, onde se encontra registrado sob o protocolo número 3468300117 (Anexo A).

4.2 Coleta e cultivo das células-tronco mesenquimais

A coleta, o cultivo e a diferenciação das ADSCs ocorreram no Laboratório de Terapia Celular e Regenerativa vinculado ao Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM.

As células-tronco mesenquimais foram isoladas a partir da gordura intra-abdominal perigonadal de três ratos Wistar machos, hígidos, com oito semanas de idade, pesando em média 250-300g, provenientes do BC da UFSM. Os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica do agente inalatório isoflurano. Após a confirmação da morte por parada cardiorrespiratória e ausência total de reflexos, realizou-se uma tricotomia ampla na linha média, antissepsia com álcool e laparotomia para coleta asséptica da gordura perigonadal. O tecido adiposo coletado, com auxílio de pinça e tesoura delicadas e esterilizadas, foi colocado em placa de Petri estéril e processado em capela de fluxo laminar (Figura 6).



Figura 6 – Procedimento para coleta de tecido adiposo perigonadal. À esquerda, laparotomia na linha média de um rato Wistar, macho, 60 dias, para coleta da gordura. À direita, uma placa de Petri contendo o tecido coletado para ser processado.

Dentro da capela de fluxo laminar, o tecido adiposo foi cortado em pequenos fragmentos com o auxílio de duas lâminas de bisturi. Estes fragmentos foram colocados em um tubo Falcon de 15 mL juntamente com 2% de colagenase do tipo 1, a fim de promover a degradação do tecido. Os tubos permaneceram em banho-maria a uma temperatura de 37°C por 40 minutos sendo agitados manualmente a cada 10 minutos. Após este processo, os tubos foram encaminhados para o fluxo laminar novamente e

completados com o meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Low Glucose) para cada parte de colagenase (1:1) para neutralizar a colagenase, dada a sua citotoxicidade. Os tubos foram centrifugados a 1900 r.p.m. durante dez minutos. O sobrenadante (fração adiposa) foi descartado e um novo meio completo (DMEM-Low Glucose suplementado com 1% de Penicilina/Streptomicina e 20% de soro fetal bovino) foi adicionado ao *pellet* de células (fração estromal), sendo homogeneizado com o auxílio de uma pipeta. Essa suspensão celular foi dividida e transferida para dois frascos de cultura de células de 25 cm². Os frascos foram mantidos em uma estufa a 37°C e concentração de 5% de CO₂ (Figura 7).

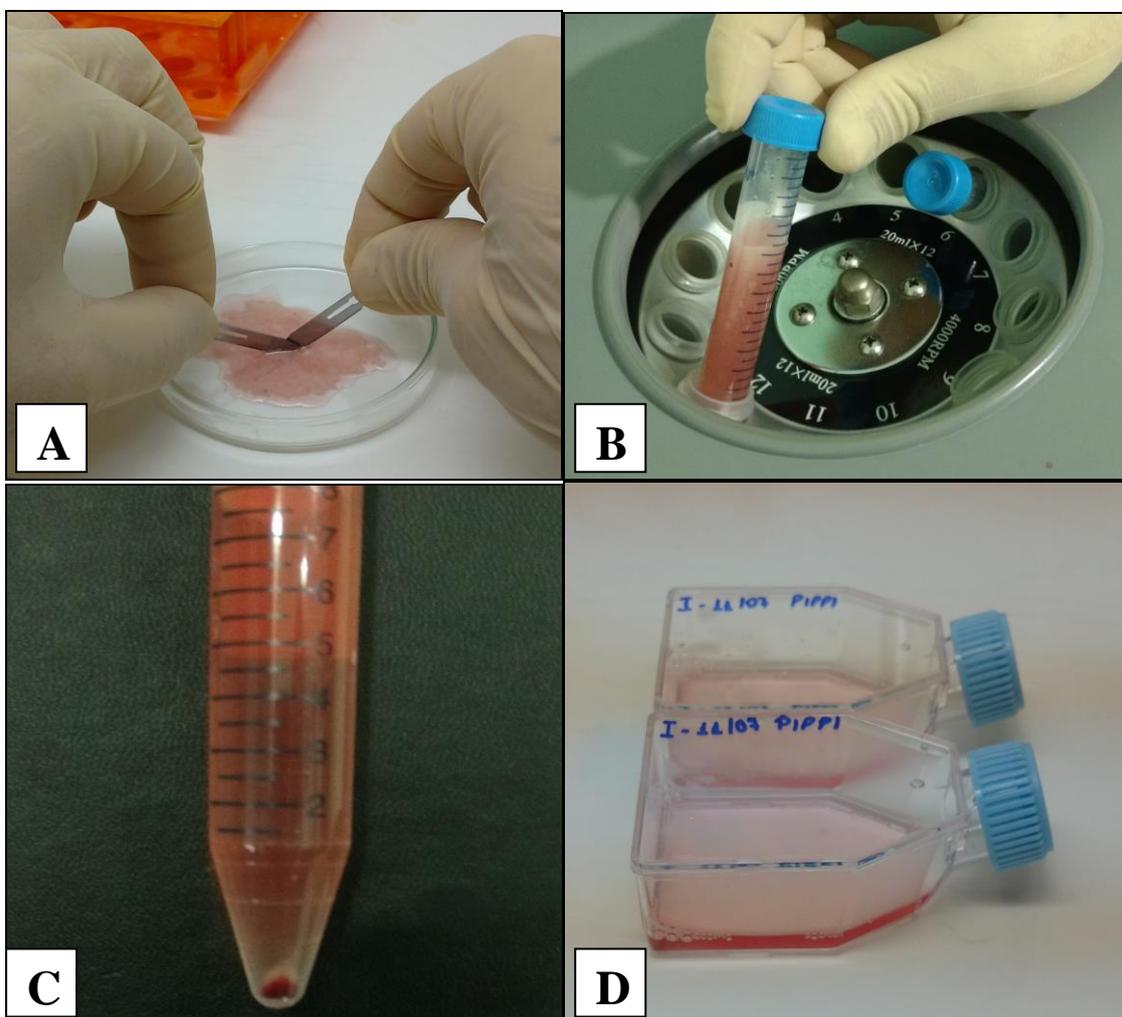


Figura 7 – Processamento do tecido adiposo de ratos Wistar para cultivo das ADSCs. **A)** Fragmentação da gordura com lâminas de bisturi em placa de Petri contendo colagenase. **B)** Centrifugação do tecido adiposo em tubo Falcon, após a incubação do mesmo em banho-maria. **C)** Suspensão celular contendo as células mesenquimais e hemácias, visualizada no fundo do tubo Falcon, obtida após a centrifugação. **D)** Frascos de cultura com área de superfície de 25 cm² contendo meio de cultura completo e as células provenientes da suspensão celular.

A primeira troca do meio foi realizada depois de 24 horas, e as trocas seguintes foram realizadas a cada 72 horas. As células foram submetidas a três ou quatro passagens (P3-P4) e o tempo de cada passagem variou de acordo com o crescimento celular. Quando o frasco atingia 80-90% de confluência celular, era feita uma nova passagem. Para a realização de cada passagem, era feita a remoção completa do meio de cultura e adicionado 2,5 mg/mL de tripsina no frasco para remover as células aderidas no plástico. Os frascos eram posteriormente colocados na estufa de CO₂ durante cinco minutos. Após, um novo meio completo era colocado para inativar a tripsina. A solução do frasco de cultura foi, então, transferida para tubos Falcon e centrifugada durante cinco minutos a uma velocidade de 1900 r.p.m. O precipitado obtido foi alocado em frasco de cultura celular com área de superfície de 75 cm² juntamente com o meio completo. As células permaneceram em cultivo até a P3 ou P4 quando, então, foram ressuspendidas para a aplicação nos animais experimentais (Figura 8 e 9).

Para a aplicação nos animais, o número de células foi contado utilizando uma câmara de Neubauer. Para isso, 20 µL da solução celular foi colocado num micro tubo de 1 mL e adicionou-se 20 µL do corante Azul de Tripán 0,4%. As células foram contadas na câmara de Neubauer e a estimativa foi realizada utilizando a seguinte fórmula: Número de células por mL = Número de células contadas X coeficiente de diluição X 10⁴. O número de células contadas foi dividido pelo número de quadrantes contados. O coeficiente de diluição foi definido pela taxa de suspensão celular e a quantidade do corante (isto é, 1:1) que resulta em dois.

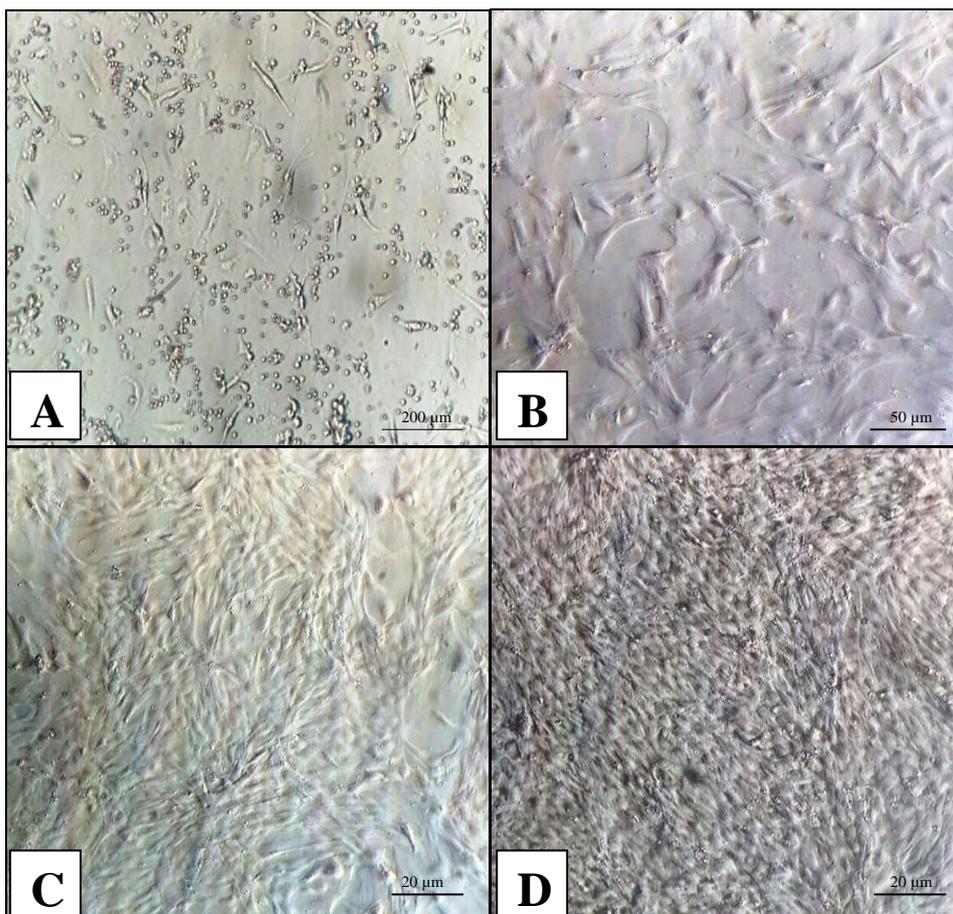


Figura 8 – Fotomicroscopia das ADSCs de rato Wistar. **A)** Cultivo celular dois dias após o isolamento do tecido adiposo. **B)** Cultivo celular cinco dias após a primeira passagem. **C)** Cultivo celular sete dias após a segunda passagem (80% de confluência). **D)** Células com 100% de confluência, 10 dias após a terceira passagem.

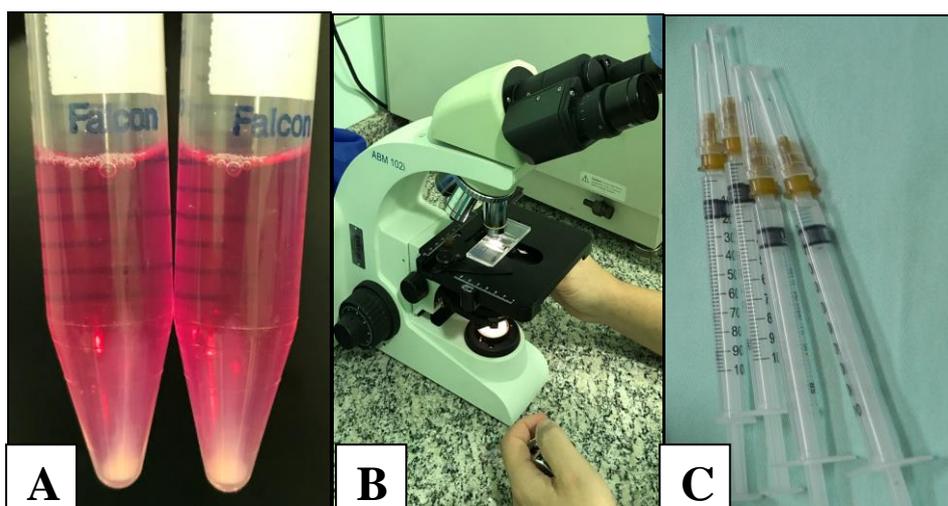


Figura 9 – Preparo das ADSCs de rato Wistar para a aplicação. **A)** Suspensão celular obtida após a centrifugação, visualizada no fundo de cada tubo Falcon. **B)** Contagem das ADSCs em microscópio óptico (ABM 102i) e câmara de Neubauer com o auxílio de contador manual de células. **C)** Quatro seringas totalizando 1×10^6 ADSCs ressuspendidas em NaCl 0,9% para a aplicação subcutânea nos animais.

4.3 Diferenciação e caracterização das células-tronco mesenquimais

As células foram diferenciadas na terceira passagem (P3) em adipócitos e osteócitos. Foi utilizada uma placa para cultura de células de seis poços (volume de 3 mL em cada poço) e uma concentração de 5×10^3 células/cm². A troca do meio de cultura era feita a cada 48 horas e os agentes indutores eram adicionados ao meio completo de cultura no momento da troca.

O procedimento para indução da diferenciação em osteócitos foi realizado de acordo com o protocolo de Deus *et al.* (2012) da seguinte maneira: ao meio completo de cultura foram adicionados 10 mM de β -glicerolfosfato, 10 mM de dexametasona e 0,2 mM de Ácido Ascórbico Fosfatado. Após 18 dias, foi realizada a detecção da diferenciação pela coloração com *Alizarin Red S*, que corou os depósitos de cálcio, presentes na matriz extracelular dos osteócitos.

Para o ensaio de indução da diferenciação em adipócitos foram adicionados ao meio completo de cultura: 1,72 μ M de insulina, 0,2 mM de indometacina, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e 1 μ M de dexametasona, conforme o protocolo de Deus *et al.* (2012). Após 16 dias, a detecção da diferenciação foi evidenciada pela coloração com *Oil Red O*, a qual corou os vacúolos de gordura, tipicamente encontrados nos adipócitos.

As ADSCs foram imunofenotipadas por citometria de fluxo na quarta passagem (P4), para caracterização de proteínas de superfície. As culturas foram tripsinizadas, lavadas e as células foram incubadas por 20 minutos com anticorpos específicos para CD44 e CD106 de camundongo, e CD31, CD45 e MHC classe II de rato conjugados aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) (eBioscience, La Jolla, CA, EUA). Após lavagem para remoção do excesso de anticorpos, as amostras foram lidas em citômetro BD Accuri™ C6 (Becton–Dickinson Biosciences, San Diego, CA, EUA) com o software BD Accuri C6. Foi estabelecido um *gate* na população de células coletadas, sendo lidos 10.000 eventos.

4.4 Procedimento anestésico

Os procedimentos anestésico-cirúrgicos foram realizados no Bloco Cirúrgico do LACE da UFSM.

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória, sendo utilizado como agente anestésico o isoflurano, vaporizado em oxigênio 100%, ao efeito, administrado por meio de máscara facial. A analgesia foi iniciada previamente à indução das lesões com cloridrato de tramadol ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), por via intraperitoneal.

Com o animal sob anestesia geral inalatória, realizou-se a pesagem do mesmo e tricotomia ampla da região dorsal, desde o espaço compreendido entre as escápulas até o final das costelas. Após, procedeu-se à antisepsia de todo o campo cirúrgico com gluconato de clorexidina 2%.

Durante o período transoperatório, os animais foram monitorados pelo anestesista quanto às frequências cardíaca e respiratória, coloração das mucosas/superfícies digitais, resposta a estímulos dolorosos e temperatura corporal. Ao término do procedimento cirúrgico, foram observados até a completa recuperação anestésica, sendo então recolocados em suas caixas-moradias individualmente ou em duplas.

4.5 Procedimento cirúrgico

Com o animal sob anestesia geral inalatória e posicionado em decúbito esternal, delimitou-se, com o auxílio de uma régua, o local de confecção da ferida bem centralizado na região dorsal, a 10 mm caudal das bordas escapulares direita e esquerda.

A lesão foi induzida pela aplicação de nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia Package Cryogun® e a área da ferida foi delimitada através de um Cryocone® de 15 mm de diâmetro. Utilizou-se a técnica do *spray* aberto durante um minuto, em jato contínuo (15 segundos) até a formação do halo de gelo do diâmetro desejado e, após, jatos intermitentes a cada cinco segundos (totalizando 45 segundos) para a manutenção do congelamento e não extensão do halo de gelo (Figura 10). Esses tempos foram mensurados com o auxílio de um cronômetro digital e todos os dados anotados em uma ficha de controle cirúrgico (Apêndice A).

Nos animais que foram mantidos em pares nas caixas-moradias, foi realizada uma marcação permanente, ou seja, uma pequena incisão em uma das orelhas ainda sob o efeito da anestesia. O rato número ímpar recebeu um corte na orelha direita, enquanto

o número par recebeu uma incisão na orelha esquerda, a fim de evitar qualquer equívoco durante as avaliações clínicas e procedimentos subsequentes.



Figura 10 – Rato Wistar, decúbito ventral. À esquerda, observa-se a indução da lesão, no dorso, pelo nitrogênio líquido com auxílio do aparelho de criocirurgia e delimitação do jato de *spray* através de um cone de neoprene de 15 mm. À direita, visualização do halo de gelo formado e delimitado pelo cone de neoprene.

4.6 Procedimento pós-operatório

Os animais receberam no pós-operatório cloridrato de tramadol, na dose de 10 mg.kg⁻¹, por via intraperitoneal, a cada 12 horas, durante 2 dias. As lesões permaneceram abertas, ou seja, não receberam nenhum curativo oclusivo, a fim de que esses não interferissem com a queda da crosta (crionecrose) causada pelo procedimento criocirúrgico.

4.7 Tratamentos

Decorridos 15 ou 30 dias de indução da lesão por criocirurgia, os animais foram anestesiados e submetidos ao mesmo protocolo analgésico, conforme descrito anteriormente, para receber o tratamento com as ADSCs ou apenas o veículo utilizado na ressuspensão das mesmas (Figura 11).

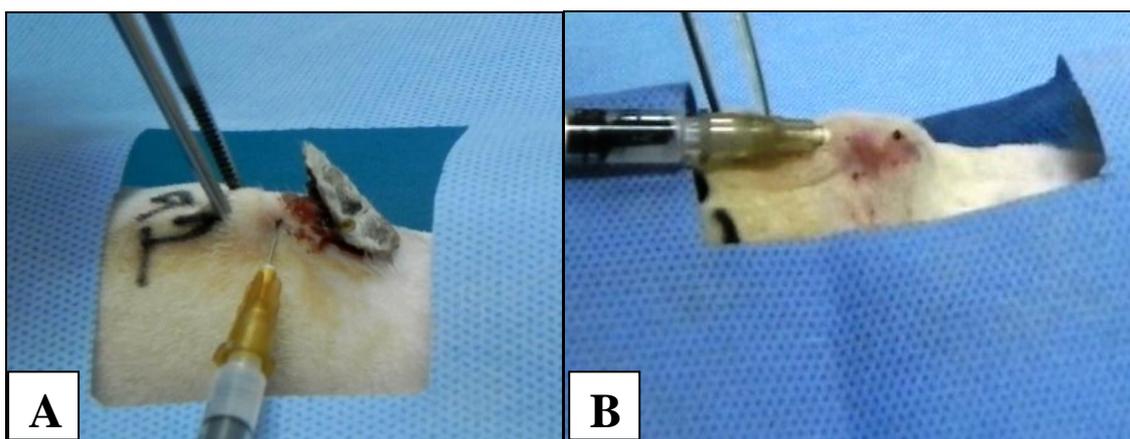


Figura 11 – Rato Wistar, decúbito ventral. Aplicação por via subcutânea das ADSCs nas bordas da ferida. **A)** Observa-se a aplicação na borda inferior no 15º dia após a indução da lesão (crosta começando a se desprender). **B)** Aplicação na borda lateral esquerda da lesão, após 30 dias da realização do procedimento criocirúrgico.

Os tratamentos ocorreram da seguinte forma: os grupos controles não receberam tratamento algum após a indução da lesão. Os grupos *shams* receberam uma ou duas aplicações do veículo de diluição das ADSCs (solução cloreto de sódio 0,9%), via subcutânea, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida. E, os grupos tratamentos receberam uma ou duas aplicações de ADSCs diluídas em solução cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, via subcutânea, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida. As aplicações subcutâneas foram realizadas com auxílio de uma seringa de 1000 μL . As ADSCs foram utilizadas em terceira ou quarta passagem, na concentração de 1×10^6 diluídas em 400 μL de NaCl 0,9%. Essa concentração e volume foi dividida em quatro partes iguais, de modo que cada animal recebeu quatro seringas contendo 25×10^4 células diluídas em 100 μL de NaCl 0,9%, uma para cada aplicação em cada borda da lesão.

4.8 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em oito grupos experimentais, perfazendo um total de dez animais por grupo, conforme descrito a seguir (Figura 12):

Grupo Controle 1 (C1): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), sem mais qualquer intervenção até o 45° dia de avaliação e eutanásia;

Grupo Controle 2 (C2): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), sem mais qualquer intervenção até o 60° dia de avaliação e eutanásia;

Grupo Sham 1 (S1): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 15° dia após a criocirurgia e eutanásia no 45° dia;

Grupo Sham 2 (S2): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 30° dia após a criocirurgia e eutanásia no 60° dia;

Grupo Sham 3 (S3): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 15° dia e, também, no 30° dia após a criocirurgia e eutanásia no 60° dia;

Grupo Tratamento 1 (T1): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 1×10^6 de ADSCs diluídas em 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 15° dia após a criocirurgia e eutanásia no 45° dia;

Grupo Tratamento 2 (T2): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 1×10^6 de ADSCs diluídas em 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 30° dia após a criocirurgia e eutanásia no 60° dia;

Grupo Tratamento 3 (T3): indução da lesão com nitrogênio líquido (dia 0), aplicação de 1×10^6 de ADSCs diluídas em 400 µL de NaCl 0,9% em quatro pontos equidistantes da lesão no 15° dia e, também, no 30° dia após a criocirurgia e eutanásia no 60° dia.

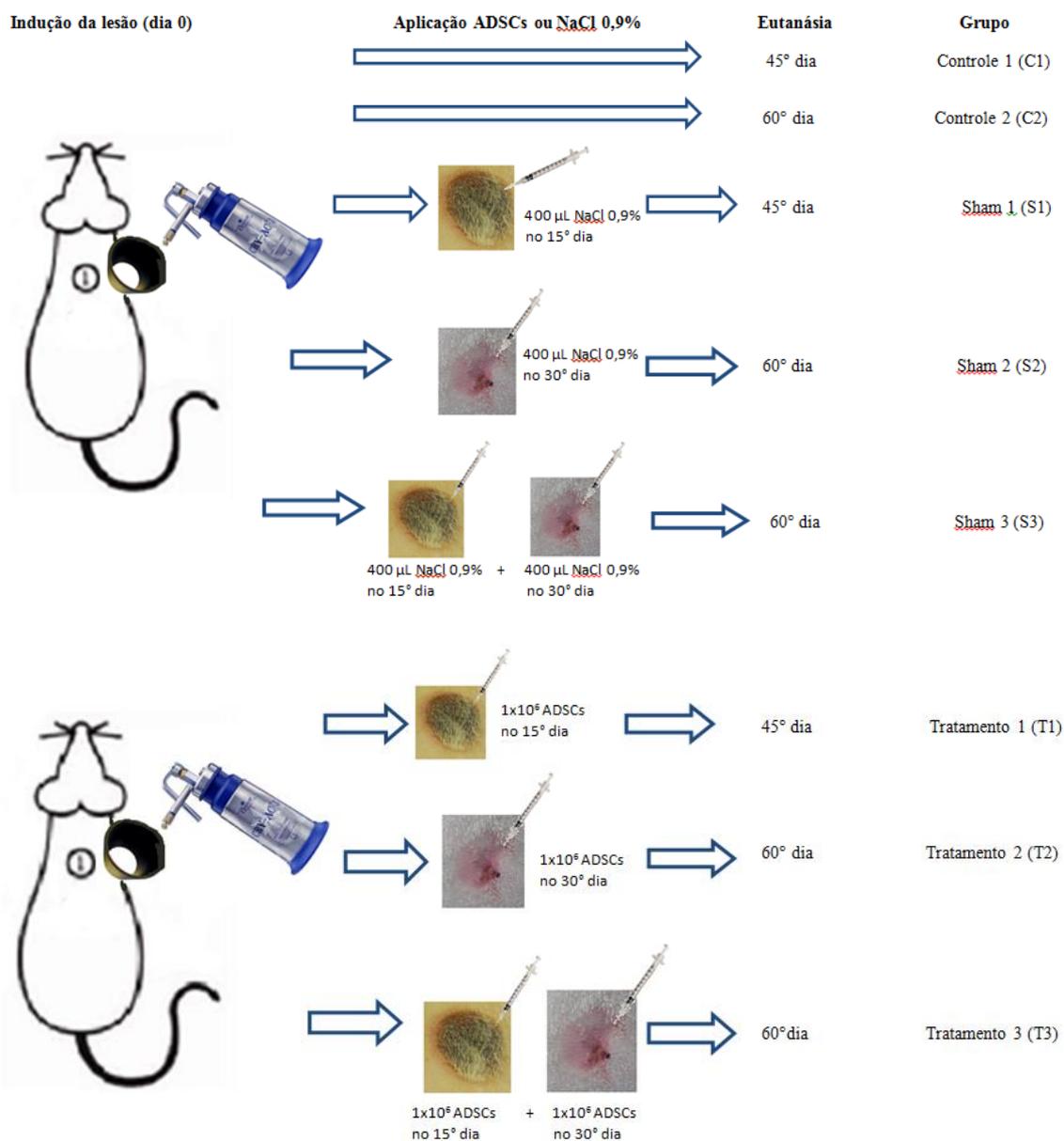


Figura 12 – Delineamento experimental evidenciando os tratamentos recebidos por cada um dos oito grupos.

4.9 Avaliação macroscópica

As avaliações macroscópicas foram realizadas no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM, em uma sala designada para procedimentos clínicos pouco invasivos e agendada para uso exclusivo de um pesquisador com seus animais experimentais por vez.

Os ratos foram inspecionados, por visualização direta sem contenção manual, diariamente, durante todo o período experimental, quanto à presença de sangramento, secreções, edema, eritema, prurido, sinais de dor local, formação de crosta (crionecrose), aspectos das bordas, queda da crosta, presença de tecido de granulação entre outras alterações possíveis.

A anotação desses dados clínicos e os registros fotográficos das lesões foram realizados juntamente com a avaliação morfométrica a cada cinco dias, quando se fazia necessária à contenção manual dos animais (Apêndice B). As imagens fotográficas sempre eram realizadas de modo que a lente da câmera ficasse a uma distância de 30 cm do dorso do animal, onde se encontrava a ferida em cicatrização (Figura 13).



Figura 13 – Avaliação macroscópica das lesões. À esquerda, contenção manual do rato para avaliação clínica da evolução da ferida. À direita, mensuração crânio-caudal da lesão com paquímetro digital.

4.10 Avaliação morfométrica

As feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento (c = crânio-caudal) pela maior largura (l = látero-lateral), com o auxílio de um paquímetro digital nos dias zero (indução da lesão), cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 (eutanásia dos grupos controle 1, *sham* 1, tratamento 1), 50, 55 e 60 (eutanásia dos grupos controle 2, *sham* 2 e 3, tratamento 2 e 3). A partir desses dados foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação ($A = c \times l$). A área de contração da ferida (C) foi calculada subtraindo da área inicial (A_0) determinada no dia zero (dia da indução da lesão), a

medida da área da lesão obtida nos dias subsequentes de avaliação (A_1) (cinco, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60) de forma que $C = A_0 - A_1$. A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada a partir dos resultados prévios, onde $TC = C \times 100 / A_0$.

4.11 Eutanásia dos animais

As eutanásias foram realizadas no Bloco Cirúrgico do LACE da UFSM. Ao término do período de avaliação (45 ou 60 dias), os animais foram submetidos à eutanásia por exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia profunda com o agente inalatório isoflurano até a promoção de parada cardiorespiratória, conforme recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018). Previamente à punção cardíaca foi aplicado cloridrato de tramadol, na dose de 20 mg.kg^{-1} , por via intraperitoneal, e confirmada a ausência de resposta a estímulos dolorosos (Figura 14).

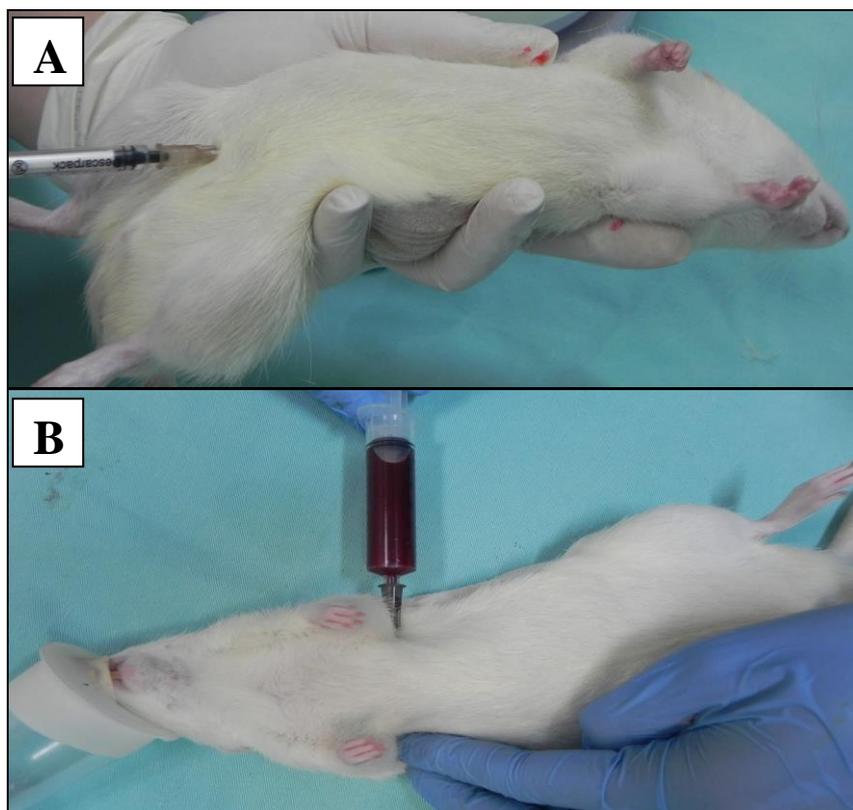


Figura 14 – Rato Wistar, decúbito dorsal. **A)** Aplicação intraperitoneal de cloridrato de tramadol, no quadrante abdominal inferior direito, após indução anestésica com isoflurano. **B)** Coleta de sangue por punção cardíaca externa após a aplicação de analgesia e com o animal sob anestesia inalatória profunda.

4.12 Obtenção das amostras

Após a confirmação da morte dos animais, foi realizada a remoção da área total da cicatriz, incluindo 2 mm além da interface entre o tecido sadio e a cicatriz em toda sua extensão (Figura 15) (Apêndice C).

Os fragmentos de pele foram marcados sutilmente com nanquin no lado direito, colocados em um cassete identificado quanto ao animal que pertencia e fixados em formol tamponado a 10%. Aproximadamente 12 horas após, já com a pele mais fixada pelo formol para facilitar os cortes, foram realizadas três secções de cada fragmento e colocados em cassetes separados (Figura 16). Todos os cassetes retornaram para o formol tamponado a 10% até completar 24 horas, para, então, serem processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. A confecção dos blocos ocorreu no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM. As lâminas foram confeccionadas na Unidade de Patologia Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O sangue coletado por punção cardíaca foi colocado em um tubo para coleta sanguínea sem EDTA devidamente identificado com o número do animal. Após, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa de Patologia Clínica Veterinária (BIOOX), onde foram centrifugadas por 15 minutos a 1300 r.p.m. O soro resultante de cada tubo foi pipetado em cinco *ependorfs* (aproximadamente 200 µL em cada um) e armazenado em *freezer* -80°C com a finalidade da realização de análises de citocinas pró (IL-2 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) em momento oportuno (outro estudo).

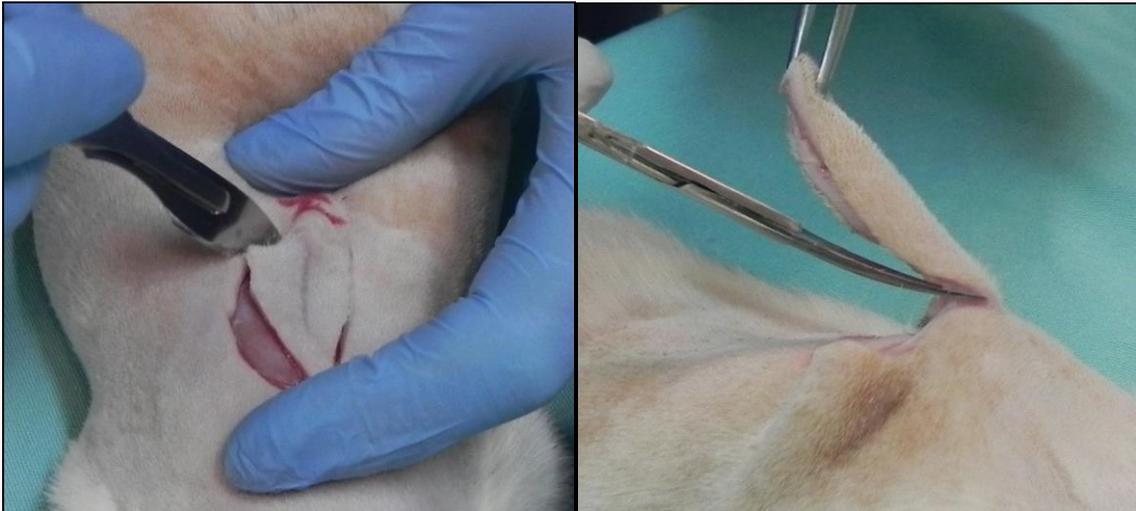


Figura 15 – Procedimento de biópsia das cicatrizes cutâneas no 45° ou 60° dia. À esquerda, incisão de pele com bisturi, demarcando a área total a ser biopsiada. À direita, dissecação com pinça e tesoura do fragmento previamente delimitado.

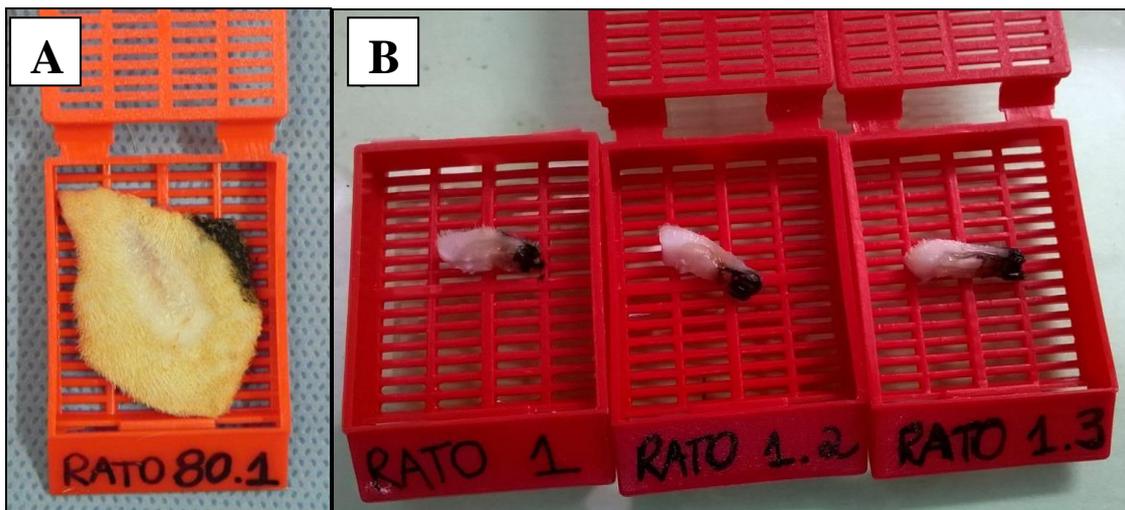


Figura 16 – Biópsia de pele com área de cicatriz. **A)** Amostra coletada imediatamente após a eutanásia do animal e marcada com nankin no lado direito. **B)** Corte do tecido coletado em três secções látero-laterais, englobando pele sadia em ambos os lados da cicatriz, após 12 horas de fixação no formol.

4.13 Avaliação microscópica

Os cortes histológicos com espessura de 3-5 micrômetros foram corados pelas técnicas histoquímicas de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricômico de Masson (TM) e, pelas técnicas de imuno-histoquímica com o anticorpo Ki-67 e Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) na Unidade de Patologia Experimental do HCPA.

Os cortes histológicos foram corados pela técnica de HE para a avaliação da qualidade cicatricial e pelo TM para a análise das fibras colágenas existentes. Na avaliação das características microscópicas da cicatrização foram consideradas: hiperplasia da epiderme, papilas dérmicas e cristas interpapilares, colagenização, anexos cutâneos na área neoformada ou na interfase com a área de tecido sadio, reepitelização e ceratinização. Foram realizados testes imuno-histoquímicos com o objetivo de avaliar o perfil proliferativo da epiderme (anticorpo Ki-67) e a angiogênese na derme durante o processo cicatricial (anticorpo VEGF).

As lâminas foram examinadas por três profissionais qualificados que desconheciam a qual grupo pertencia cada amostra. As análises imuno-histoquímicas foram realizadas através de um microscópio de luz (Binocular Optical Microscope ZEISS, Axio Lab.A1, Alemanha), as imagens foram capturadas por uma câmera (AxioCam, ERc 5S, Alemanha) com monitor acoplado e para as leituras foi utilizado um software (ZEN 2011 edição azul, 1.0 Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

O escore histológico de cada amostra foi obtido pela soma das seguintes variáveis observadas na técnica de HE e TM: 1) hiperplasia da epiderme; 2) papilas dérmicas e cristas interpapilares; 3) anexos cutâneos; 4) colagenização; 5) reepitelização; 6) ceratinização. A presença de cada um desses seis parâmetros recebeu o valor igual a 1 e a sua ausência teve o valor igual a 0.

Para analisar a proliferação celular da epiderme na área da lesão, empregou-se a técnica de imuno-histoquímica com o anticorpo Ki-67, positivo em núcleos comprometidos a entrar em mitose. Foram capturados cinco campos aleatoriamente da epiderme, seguindo da esquerda para a direita e englobando toda a extensão da área cicatricial, de cada lâmina em um aumento de 40x (BOND *et al.*, 2011). Efetuou-se a contagem das células marcadas na camada basal e, após, foi realizada a média dos cinco valores obtidos para cada amostra (Figura 17).

A contagem dos novos vasos sanguíneos (angiogênese) foi através da técnica do VEGF. Para isso, procedeu-se a captura de cinco campos aleatoriamente da derme, seguindo da esquerda para a direita e englobando toda a extensão da área cicatricial, de cada lâmina em um aumento de 40x (PESSOA *et al.*, 2012). Efetuou-se a contagem dos vasos neoformados e, após, foi realizada a média dos cinco valores obtidos para cada amostra (Figura 18).

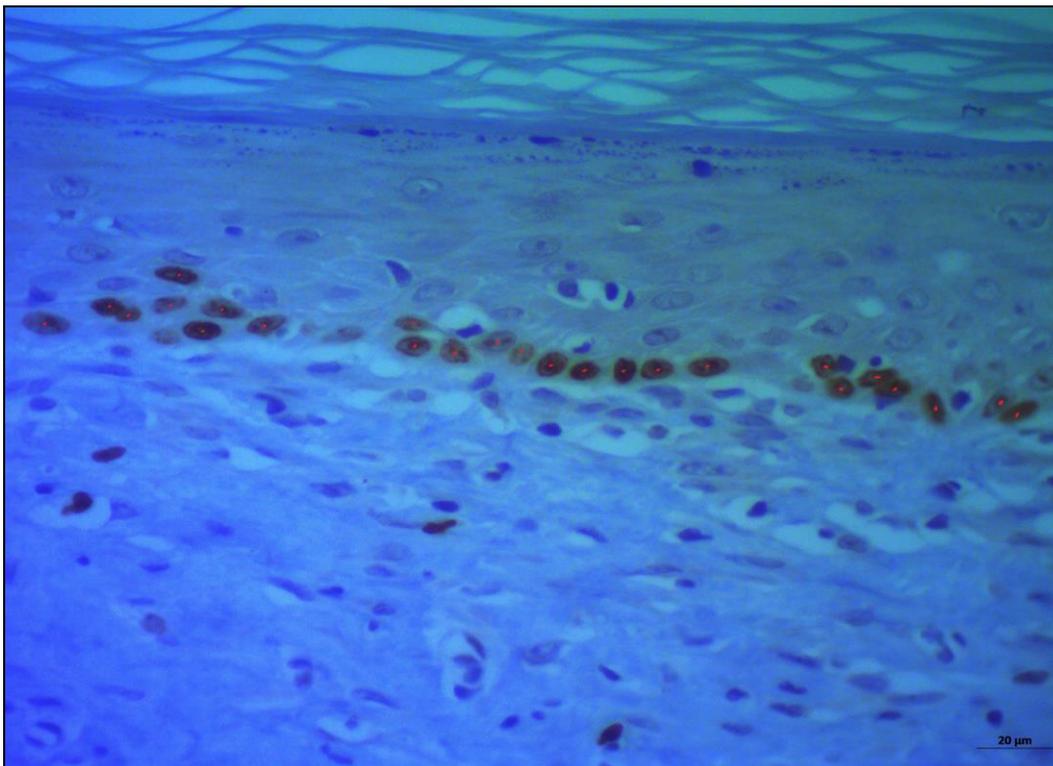


Figura 17 – Contagem das células da camada basal da epiderme marcadas pelo anticorpo Ki-67. As células aparecem coradas em marrom com pontos vermelhos no centro para facilitar a contagem após a captura dos campos (25 células neste campo). IHQ, Obj. 40.

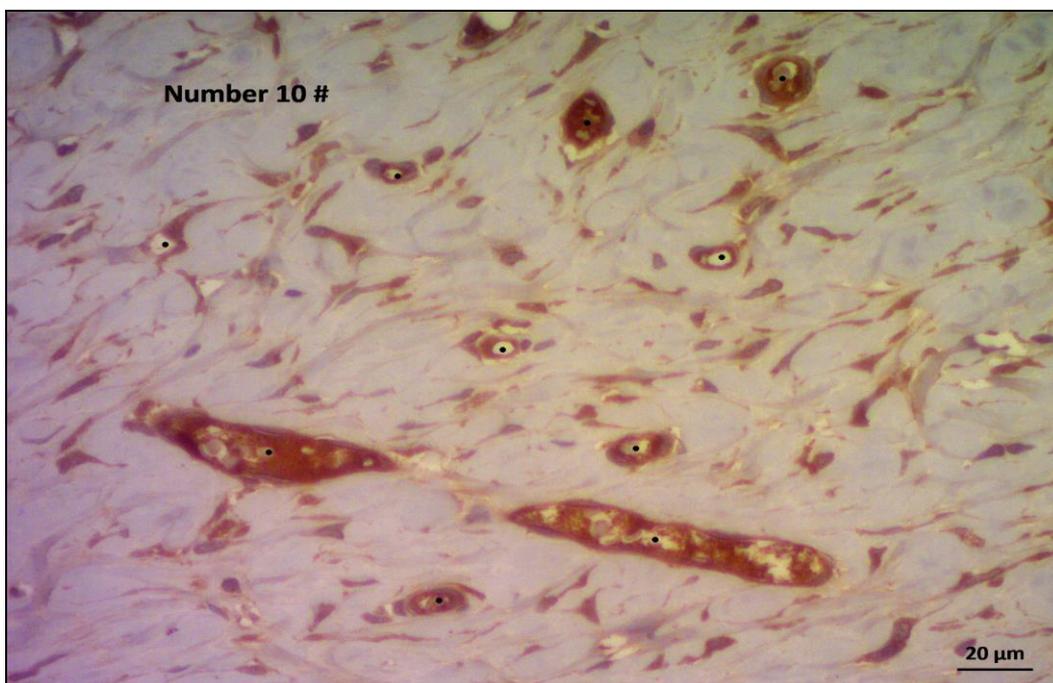


Figura 18 – Contagem dos vasos sanguíneos na derme marcados pelo VEGF. Os vasos aparecem com pontos pretos no centro para facilitar a contagem após a captura dos campos (10 vasos neste campo). IHQ, Obj. 40.

4.14 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS versão 23 (SPSS Inc. IBM Company, USA). Os dados foram tabulados no software Excel versão 2010 (Microsoft Corporation, Washington, USA).

Para as avaliações macroscópicas, a análise estatística utilizou as Equações de Estimativa Generalizadas (GEE), com Matriz de correlação de trabalho não estruturada, um estimador robusto para a Matriz de covariância, uma resposta com distribuição normal e função de ligação identidade. As comparações foram obtidas com a utilização do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os resultados foram expressos em média e erro padrão, considerando o nível de significância de $p < 0,05$.

Nas avaliações do VEGF, Ki-67 e escore histológico, a análise de normalidade da variável foi realizada com o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise do comportamento das variáveis VEGF, Ki-67 e escore histológico entre os grupos de tratamento foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para variáveis independentes não paramétricas com teste *Post Hoc* de Dunn, utilizando o teste de comparação múltipla de Bonferroni. Os resultados foram expressos em mediana (percentil 50) e percentis 25 e 75. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 O animal experimental

O animal experimental adotado para esse estudo (ratos Wistar, *Rattus norvegicus*) mostrou-se adequado para o cumprimento de todos os objetivos aos quais foi desafiado. As etapas anestésicas e cirúrgicas transcorreram com mínimas intercorrências. Os procedimentos pós-operatórios e as avaliações macroscópicas puderam ser executados sem dificuldades ou transtornos. Esse animal permitiu, ainda, a padronização de feridas de considerável diâmetro devido ao seu tamanho e extensão do dorso, o que possibilitou uma avaliação do processo de cicatrização por um período mais longo.

Do total de 89 ratos utilizados nesse estudo, 86 foram para o protocolo de indução das lesões e três serviram de doadores para o cultivo das ADSCs. Dos 86 ratos destinados à indução das lesões, dois morreram durante a indução anestésica e quatro precisaram ser eutanasiados antes do final do período experimental, os quais foram substituídos posteriormente para que o n de 80 animais (n = 10 por grupo experimental) fosse mantido.

5.2 Coleta e cultivo das células-tronco mesenquimais

Os cinco gramas de tecido adiposo coletados dos três ratos doadores foram suficientes para o isolamento e expansão das 40×10^6 ADSCs utilizadas durante o estudo *in vivo*, 1×10^6 ADSCs para o ensaio de imunofenotipagem e 4×10^4 ADSCs para o ensaio de diferenciação *in vitro*. As células apresentaram confluência de 80 a 90%, aderência ao plástico de cultivo (garrafas de cultura) e morfologia semelhante à de fibroblastos. Nas datas previstas, as células foram aplicadas entre P3 e P4, necessitando de aproximadamente um período de 30 dias do isolamento até essas subculturas (passagens).

5.3 Diferenciação e caracterização das células-tronco mesenquimais

O ensaio de diferenciação foi realizado com as ADSCs na P3 e as mesmas foram capazes de diferenciar-se nas linhagens adipogênica e osteogênica (Figura 19).

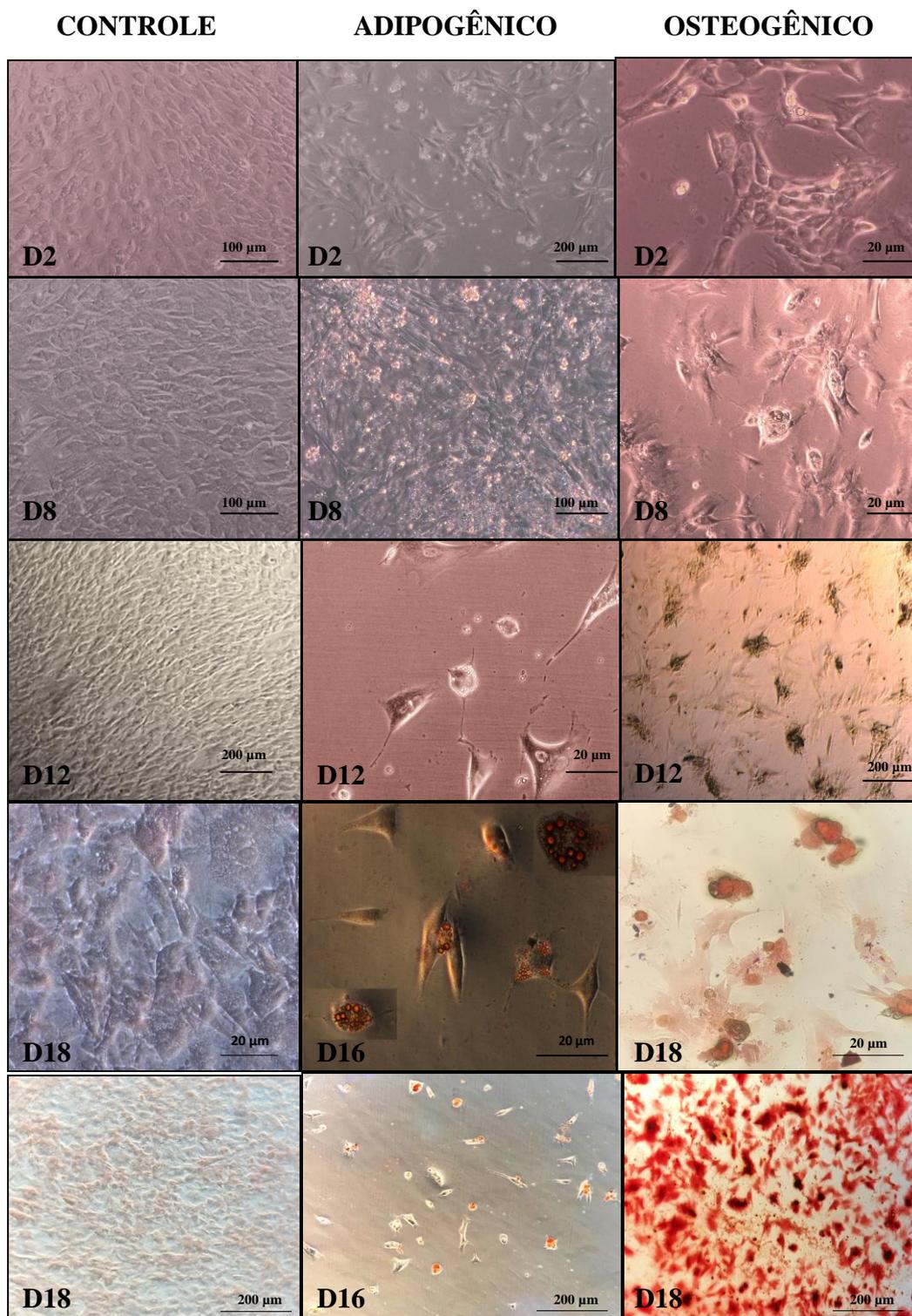


Figura 19 – Ensaio de diferenciação *in vitro* das ADSCs de ratos Wistar. Fotomicroscopia das ADSCs no estágio de indiferenciação (Controle) e submetidas à diferenciação adipogênica e osteogênica no 2º (D2), 8º (D8) e 12º (D12) dia após o início da indução das diferenciações. No 16º dia (D16), coloração com *Oil Red O* evidenciando os vacúolos de gordura corados de vermelho na diferenciação adipogênica. No 18º dia (D18) coloração com *Alizarin Red O* demonstrando o depósito de cálcio corado de vermelho na matriz extracelular da diferenciação osteogênica e sem marcação nas ADSCs não diferenciadas do controle.

O ensaio de imunofenotipagem foi realizado com as ADSCs na P4. No ensaio por citometria de fluxo, ocorreu a expressão apenas do marcador de superfície celular CD44 e não houve expressão para os demais marcadores testados: CD45, CD106, CD31 e MHC classe II (Figura 20).

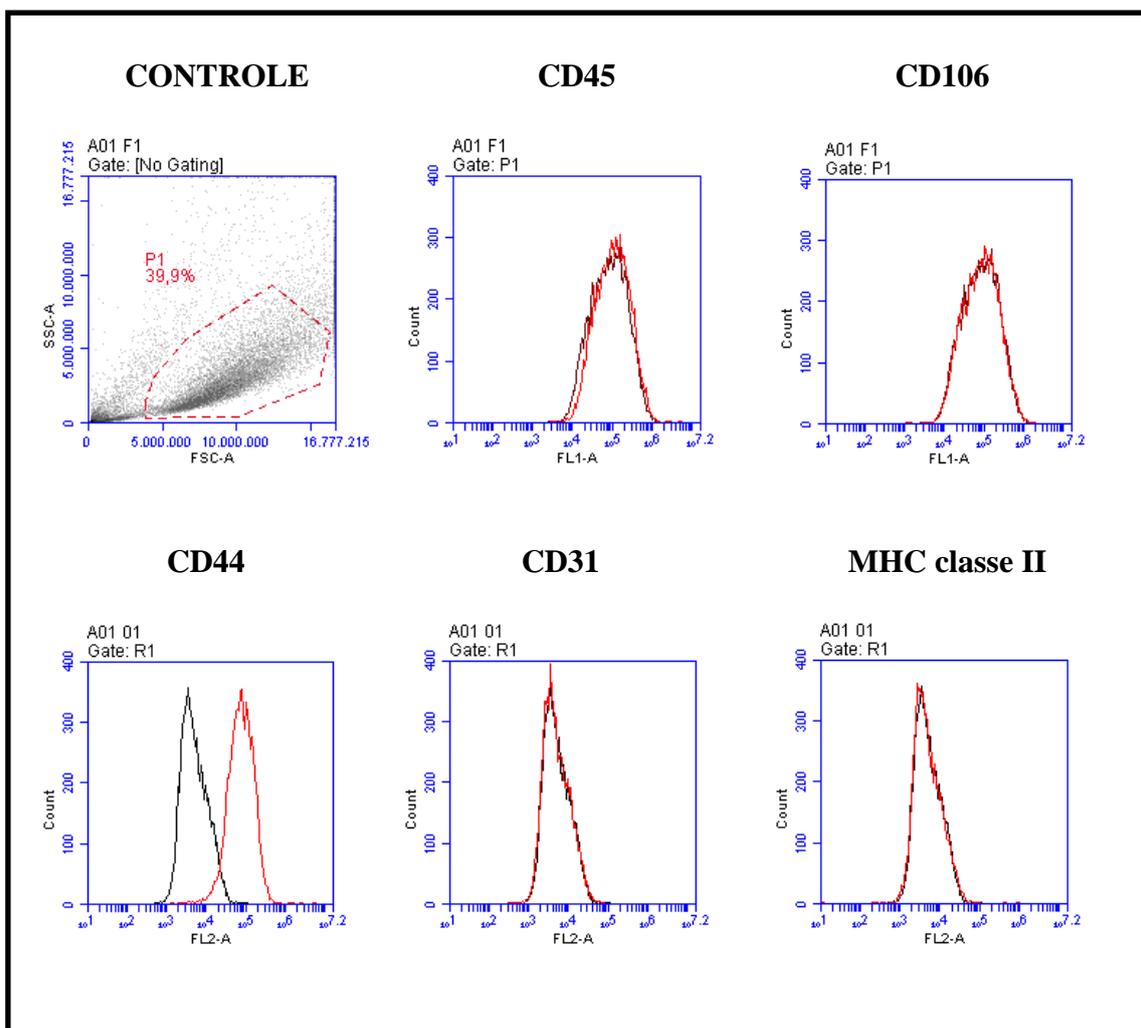


Figura 20 – Demonstração gráfica dos marcadores de superfície celular durante ensaio de citometria de fluxo. O gráfico 1 (controle) tem complexidade das células no eixo Y e tamanho no eixo X, mostrando a população de células total e o *gate* estabelecido a partir do qual foram coletados 10.000 eventos. Os demais gráficos, um para cada anticorpo, mostra o controle negativo em preto (células não marcadas) e a marcação com cada anticorpo em vermelho. Nota-se que apenas a população marcada com o CD44 teve resultado positivo e para as demais populações não houve marcação.

5.4 Procedimento anestésico

O protocolo anestésico empregado foi adequado para as necessidades inerentes à intervenção cirúrgica proposta, ou seja, rápida, não cruenta e de nível alérgico moderado. A recuperação pós-operatória dos animais após a suspensão do anestésico inalatório foi satisfatória, assim como a analgesia, podendo-se constatar o retorno às suas atividades normais (alimentação, deambulação, exploração do ambiente, entre outras) logo que eram recolocados nas caixas-moradias. O procedimento anestésico totalizou entre quatro e oito minutos nos 84 animais anestesiados. Ocorreu o óbito de dois ratos no momento da indução anestésica.

5.5 Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi considerado de fácil execução e rápido. O tempo de indução de cada lesão através do *spray* de nitrogênio líquido foi de exatamente um minuto, dividido em 15 segundos de jato contínuo e 45 segundos de jatos intermitentes (a cada cinco segundos). O tempo mínimo de descongelamento das feridas foi de 2 minutos e 30 segundos e, o máximo foi de 4 minutos e 40 segundos. O procedimento foi bem tolerado pelos animais, os quais permaneceram com aspecto saudável durante todo o período experimental. Não ocorreram intercorrências durante a execução do procedimento criocirúrgico.

Os primeiros 30 animais operados foram mantidos isolados nas caixas-moradias após o procedimento criocirúrgico. Porém desses, quatro animais precisaram ser eutanasiados antes do período previsto devido à automutilação no local das lesões. Sendo assim, optou-se por manter os demais em pares nas caixas-moradias. Com essa alteração no protocolo de manutenção dos ratos, mais nenhum animal precisou ser descartado do experimento.

5.6 Procedimento pós-operatório

A analgesia pós-operatória com cloridrato de tramadol nos dois dias subsequentes ao procedimento criocirúrgico mostrou ser eficiente para o controle da dor na espécie e intervenção propostas e foi realizada sem transtornos ou dificuldades a cada 12 horas. Os animais apresentavam-se bem ativos e com comportamento exploratório inerente a espécie tanto previamente quanto após a aplicação do analgésico, sem demonstrar reações exacerbadas durante a injeção por via intraperitoneal. Foi necessário fazer o resgate analgésico em quatro ratos antes do 10º dia após a indução da lesão, devido à automutilação. Decorridos dois a três dias de aplicação do cloridrato de tramadol, na mesma dose e frequência utilizadas no pós-operatório imediato, sem apresentar qualquer melhora clínica das lesões, optou-se pela antecipação da morte desses animais.

5.7 Tratamentos

A aplicação das ADSCs ou do veículo (NaCl 0,9%) por via subcutânea ocorreu de forma rápida, aproximadamente 1 minuto para aplicação nos quatro pontos equidistantes nas bordas da ferida, e sem intercorrências. Os animais foram anestesiados para garantir uma eficiente imobilização durante a aplicação. Tão logo eles retornaram da anestesia, todo o conteúdo injetado já havia sido absorvido e não apresentavam qualquer sinal de desconforto ou dor no local das aplicações. O volume aplicado em cada ponto foi adequado considerando o tamanho da espécie e o local injetado, uma vez que não apresentou extravasamento do conteúdo nem demora na absorção nem distensão significativa da pele nas proximidades da lesão.

5.8 Avaliação macroscópica

Quatro ratos precisaram ser eutanasiados antes do término do protocolo experimental, devido à automutilação no local das feridas. Esses animais estavam sendo mantidos isolados nas caixas-moradias e suas feridas tornaram-se exsudativas com sangramento e contaminação bacteriana, além da extensão no tamanho da lesão (Figura 21). Esse n foi substituído, a fim de que todos os grupos continuassem com o número de ratos inicialmente proposto.

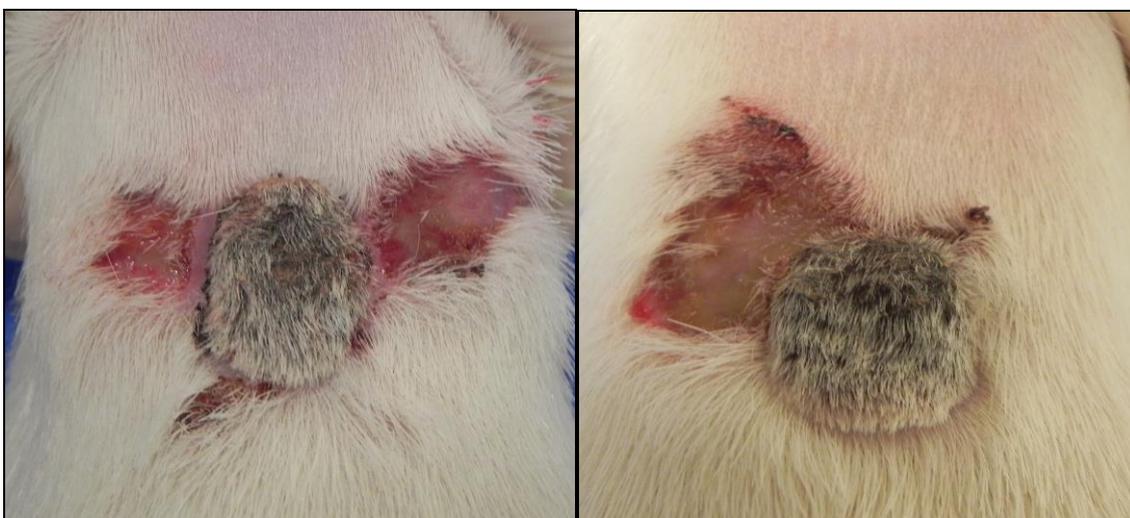


Figura 21 – Lesões provocadas por automutilação próxima à crioneecrose no 10º dia após o procedimento criocirúrgico.

Ao término do período experimental (45 ou 60 dias), as lesões de todos os grupos estavam cicatrizadas, porém com diferenças visivelmente significativas nas dimensões e formato das cicatrizes entre os grupos tratados com as ADSCs e os que não receberam a terapia celular.

As figuras a seguir (Figuras 22 e 23) mostram o aspecto clínico macroscópico das feridas e a evolução do processo de cicatrização nos dias zero, cinco, 15, 30, 35, 45 e 60 pós-cirúrgicos.



Figura 22 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução (d0), aos cinco, 15, 30, 35 e 45 dias de pós-operatório. C1 = Controle 1, S1 = Sham 1 e T1 = Tratamento 1.

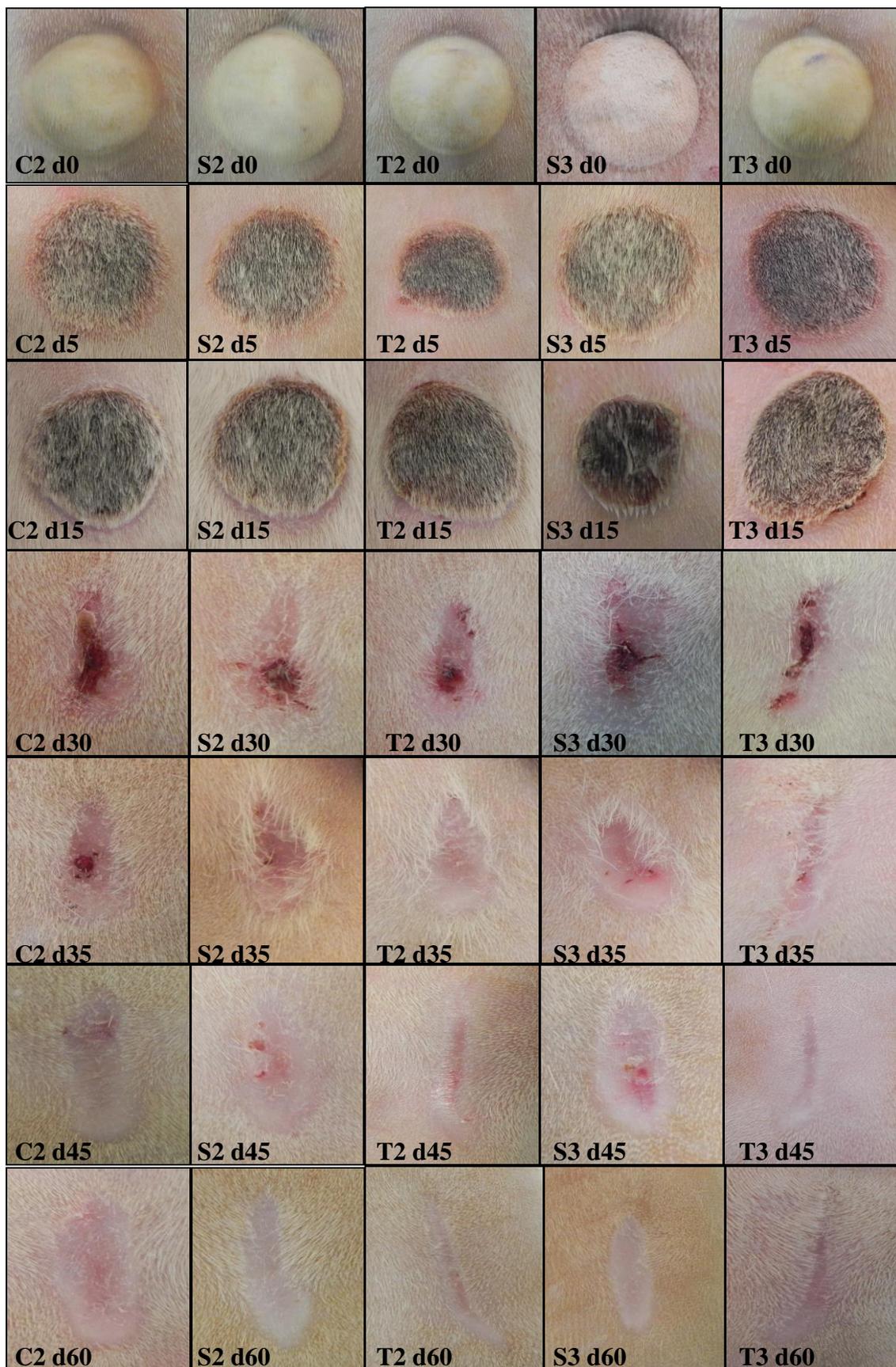


Figura 23 – Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução (d0), aos cinco, 15, 30, 35, 45 e 60 dias de pós-operatório. C2 = Controle 2, S2 = Sham 2, T2 = Tratamento 2, S3 = Sham 3 e T3 = Tratamento 3.

As crostas (crionecrose) começaram a se desprender (soltar as bordas) entre o 12º e 15º dia após a indução das lesões (Figura 24). No 15º dia essas crostas começaram a cair completamente e esse processo se estendeu até o 35º dia pós-cirúrgico, conforme mostra a tabela a seguir (Tabela 1).

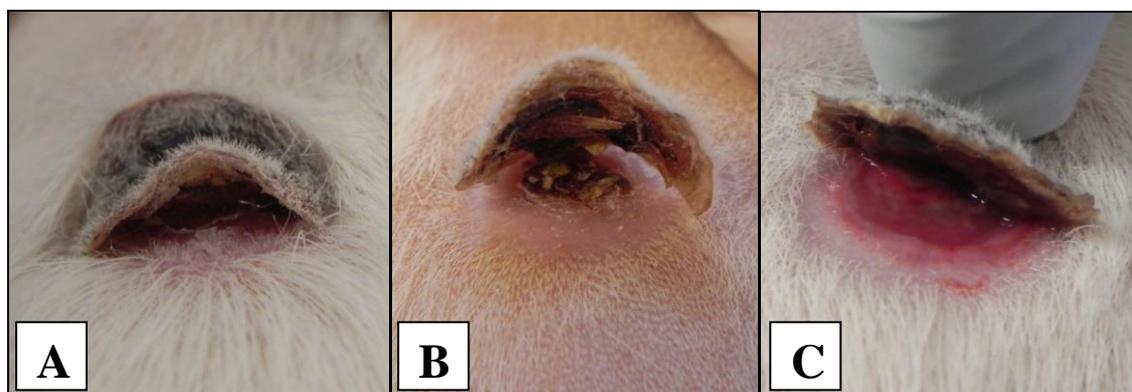


Figura 24 – Crionecroses se despreendendo após 12-15 dias da indução da lesão. **A)** Crosta começando a se desprender na porção caudal da ferida. **B)** Crosta solta em todas as bordas, presa apenas no centro da ferida. **C)** Visualização do tecido de granulação exuberante logo abaixo da crosta.

Tabela 1 – Dia da queda da primeira e da última crionecrose com o número de animais que perderam a crosta naquele dia após a indução da lesão, de cada grupo avaliado. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

GRUPO	Queda da primeira crionecrose	Número de animais	Queda da última crionecrose	Número de animais
C1	20º	5	30º	1
C2	20º	3	30º	2
S1	20º	1	30º	3
S2	20º	4	25º	6
S3	15º	1	30º	2
T1	25º	5	35º	1
T2	15º	1	30º	1
T3	25º	9	35º	1

O aparecimento das cicatrizes se iniciou entre o 30° e 35° dia após a indução das lesões e se estendeu até o 55° dia pós-cirúrgico, conforme mostra a tabela a seguir (Tabela 2).

Tabela 2 – Dia do aparecimento da primeira e da última cicatriz após o procedimento criocirúrgico e o número de animais em cada grupo avaliado. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

GRUPO	Primeira cicatriz	Número de animais	Última cicatriz	Número de animais
C1	30°	6	45°	1
C2	30°	2	55°	1
S1	35°	3	45°	2
S2	30°	3	55°	1
S3	35°	4	40°	6
T1	35°	2	45°	3
T2	30°	2	40°	1
T3	35°	4	45°	3

5.9 Avaliação morfométrica

Houve interação entre grupo e tempo com $p < 0,001$. Os dados foram expressos como média e erro padrão e o nível de significância foi $p < 0,05$. As comparações foram obtidas usando o teste de comparação múltipla de Bonferroni.

Os resultados estão demonstrados na Tabela 3 e nas Figuras 25 e 26 a seguir. Ressalta-se que os valores médios se apresentam quanto mais altos tanto maior a taxa de cicatrização das feridas.

Os grupos T1, T2 e T3 apresentaram diferença estatisticamente significativa com os grupos S1 ($p = 0,010$; $p = 0,002$ e $p = 0,023$, respectivamente), C1 ($p = 0,000$; $p = 0,000$ e $p = 0,000$, respectivamente) e C2 ($p = 0,000$, $p = 0,000$ e $p = 0,000$, respectivamente). O grupo S2 apresentou diferença estatisticamente significativa com os grupos C1 ($p = 0,022$) e C2 ($p = 0,000$). E, o grupo S3 apresentou diferença estatisticamente significativa apenas com o grupo C2 ($p = 0,016$).

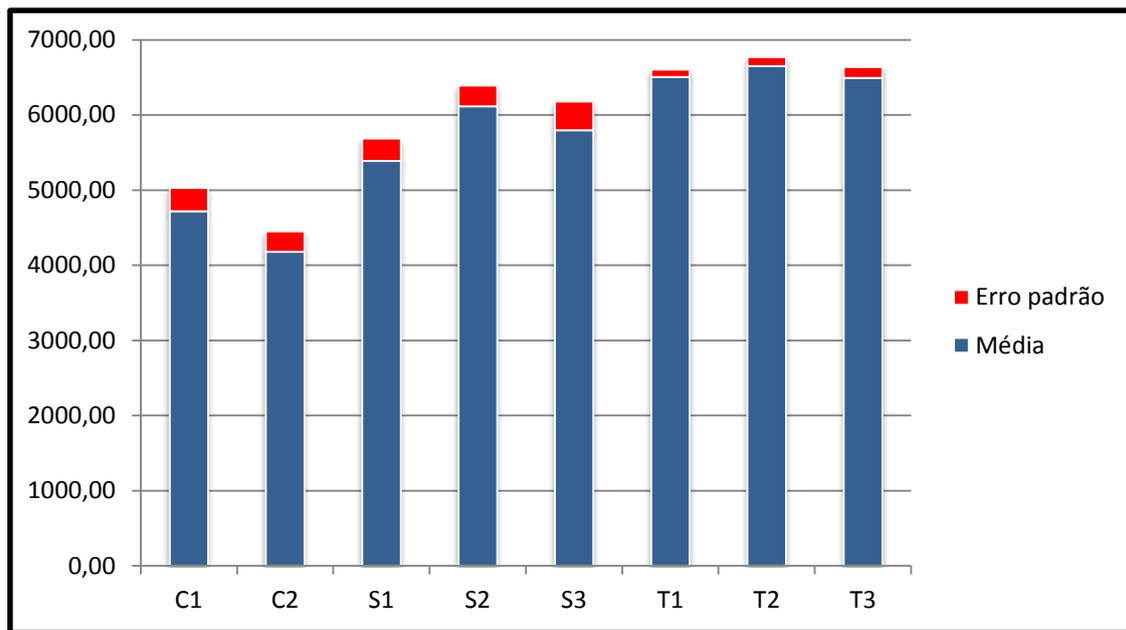


Figura 25 – Demonstração gráfica das médias das taxas de cicatrização com o erro padrão em cada grupo avaliado. O eixo X representa os grupos e o eixo Y representa as médias das taxas de cicatrização das feridas. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

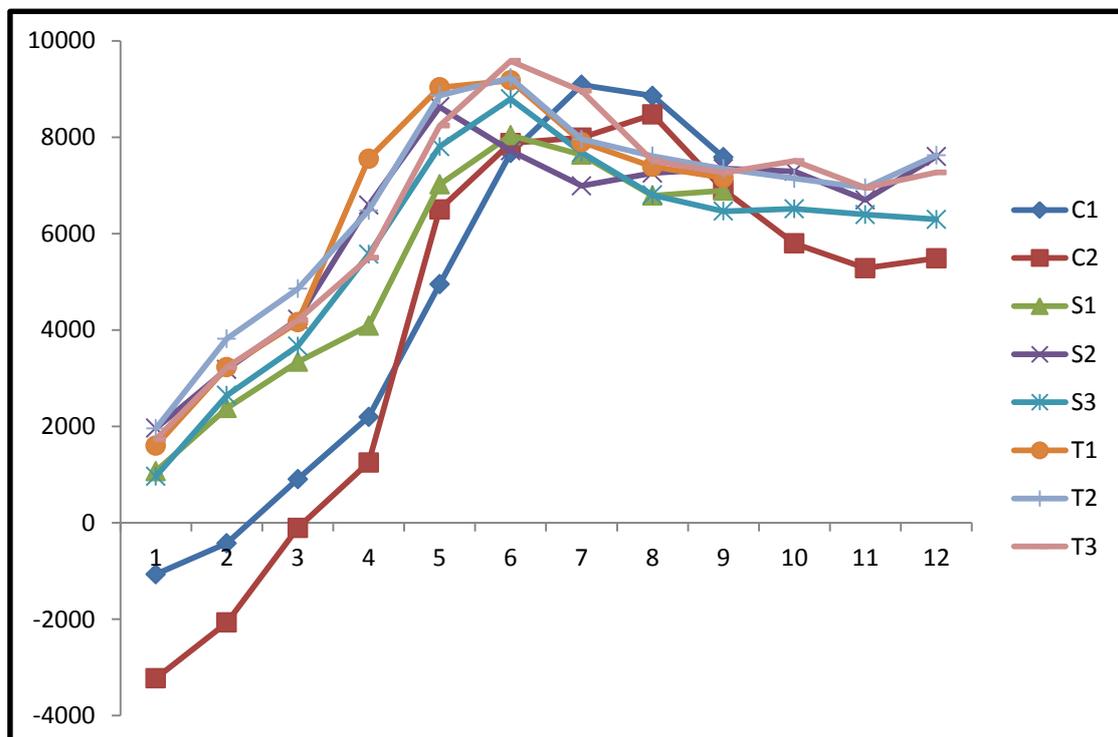


Figura 26 – Demonstração gráfica da evolução da taxa de cicatrização média de cada grupo em relação aos dias de avaliações. O eixo X representa as avaliações pós-cirúrgicas, a cada cinco dias, e o eixo Y representa os valores médios das taxas de cicatrização das feridas. Nota-se que nos grupos C1, S1 e T1 a última avaliação foi a nove, pois a eutanásia nesses grupos ocorreu no 45º dia, enquanto nos demais foi no 60º dia. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = *Sham* 1, S2 = *Sham* 2, S3 = *Sham* 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

Na Figura 25 é possível notar que as maiores médias das taxas de cicatrização das feridas foram obtidas nos grupos T2, T1 e T3, respectivamente, bem como os menores erros padrões também ocorreram nesses grupos, em T1, T2 e T3, respectivamente.

A Figura 26 mostra a taxa de cicatrização média de cada grupo em relação aos dias avaliados. É possível observar que o grupo T1 apresentou as taxas mais altas na 4ª e na 5ª avaliação, ou seja, nos dias 20 e 25 pós-operatórios, sendo que havia recebido a aplicação das ADSCs no 15º dia após a criocirurgia. Nota-se também que o grupo T3 apresentou a taxa mais elevada na 6ª avaliação, ou seja, 30 dias após a indução da lesão, sendo que também havia recebido a aplicação das ADSCs no 15º dia pós-operatório. O grupo T2 apresentou uma evolução muito semelhante ao grupo T1, finalizando com a média mais alta entre todos os grupos, depois de receber a aplicação das ADSCs no 30º dia após o procedimento criocirúrgico. Os valores encontram-se detalhados na Tabela 3.

Tabela 3 – Taxa de cicatrização média obtida a cada cinco dias no período pós-cirúrgico durante as avaliações morfométricas e a média final com o erro padrão dos grupos analisados. Nota-se que nos grupos C1, S1 e T1 a última avaliação foi a nove, pois a eutanásia nesses grupos ocorreu no 45º dia, enquanto nos demais foi no 60º dia. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

AVALIAÇÃO	C1	C2	S1	S2	S3	T1	T2	T3
1,0	-1064,6	-3224,4	1071,9	1963,7	965,5	1601,9	1959,8	1734,2
2,0	-423,7	-2069,3	2381,0	3185,2	2643,1	3225,7	3819,5	3224,5
3,0	906,5	-107,8	3339,7	4223,2	3667,9	4161,4	4855,6	4204,0
4,0	2197,1	1251,3	4090,0	6589,0	5571,1	7551,5	6478,6	5498,3
5,0	4947,0	6501,6	7021,2	8626,8	7802,7	9032,5	8865,9	8239,2
6,0	7669,4	7877,9	8039,6	7718,6	8795,0	9176,8	9230,4	9580,8
7,0	9084,9	7988,0	7635,2	6991,0	7678,9	7895,4	7956,7	8959,2
8,0	8855,8	8469,0	6787,0	7254,6	6800,1	7387,2	7609,6	7509,6
9,0	7581,9	6907,3	6889,4	7346,3	6465,2	7155,6	7344,8	7263,1
10,0	-	5793,9	-	7291,7	6511,8	-	7140,9	7505,4
11,0	-	5281,3	-	6699,9	6394,4	-	6950,1	6949,1
12,0	-	5487,4	-	7599,7	6295,4	-	7626,9	7267,5
Média Final	4720,4	4179,7	5390,8	6119,0	5799,3	6506,0	6653,2	6494,6
Erro padrão	311,5	272,8	296,4	275,5	382,1	99,3	116,3	144,8

5.10 Avaliação microscópica

Na análise do escore histológico, os grupos mostraram diferença estatística com $p=0,001$. No teste *Post Hoc*, o escore do grupo S1 (3 [2,5 - 4,5]) foi menor que T2 (6 [4,75 - 6]), $p=0,029$ e menor que C1 (6 [4,75 - 6]), $p=0,013$). Esses resultados estão demonstrados com maior detalhamento na Figura 27 e na Tabela 4 a seguir.

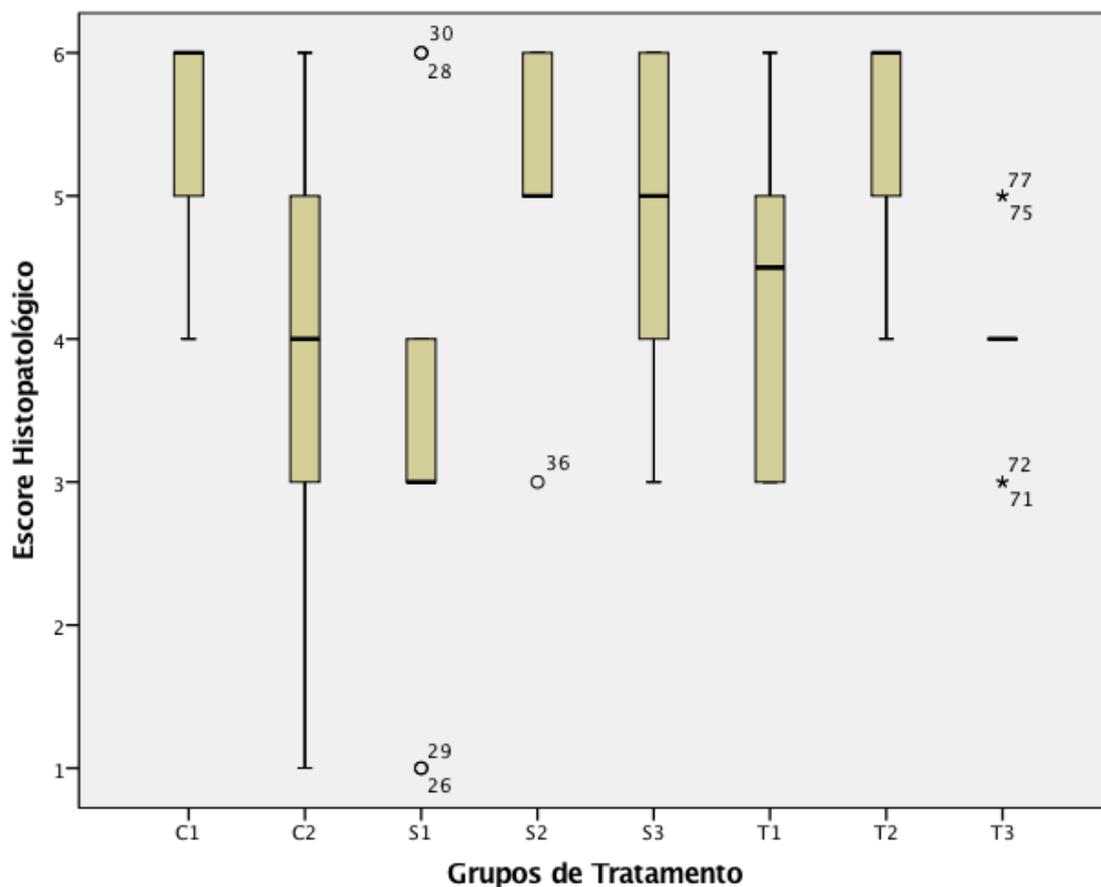


Figura 27 – Demonstração gráfica dos valores do escore histológico. O eixo X representa os oito grupos estudados e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos S1, S2 e T3 apresentaram valores *outliers*. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

Tabela 4 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do escore histológico nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

GRUPO	Percentil 25	Percentil 50 (mediana)	Percentil 75
C1	5,00	6,00	6,00
C2	3,00	4,00	5,00
S1	3,00	3,00	4,00
S2	5,00	5,00	6,00
S3	4,00	5,00	6,00
T1	3,00	4,50	5,00
T2	5,00	6,00	6,00
T3	4,00	4,00	4,00

Todos os grupos apresentaram amostras com hiperplasia da epiderme, sendo assim dispostas em relação à quantidade de animais por grupo (n=10): C1 (9/10); C2 (2/10); S1 (2/10); S2 (7/10); S3 (7/10); T1 (3/10); T2 (8/10) e T3 (2/10).

Em todos os grupos foi observada a presença de papilas dérmicas e cristas interpapilares (Figura 28), na seguinte quantidade de animais por grupo (n=10): C1 (2/10); C2 (5/10); S1 (2/10); S2 (7/10); S3 (4/10); T1 (9/10); T2 (9/10); T3 (6/10).

Foi observada a presença de anexos na junção da área neoformada com a pele sadia em todos os grupos, sem exceção, dispostas numa relação de amostras por grupo da seguinte forma: C1 (6/10); C2 (6/10); S1 (3/10); S2 (4/10); S3 (7/10); T1 (8/10); T2 (7/10); T3 (8/10). Dois animais do grupo T2 e três do grupo T3 apresentaram folículos pilosos na área central da pele reparada (Figura 29).

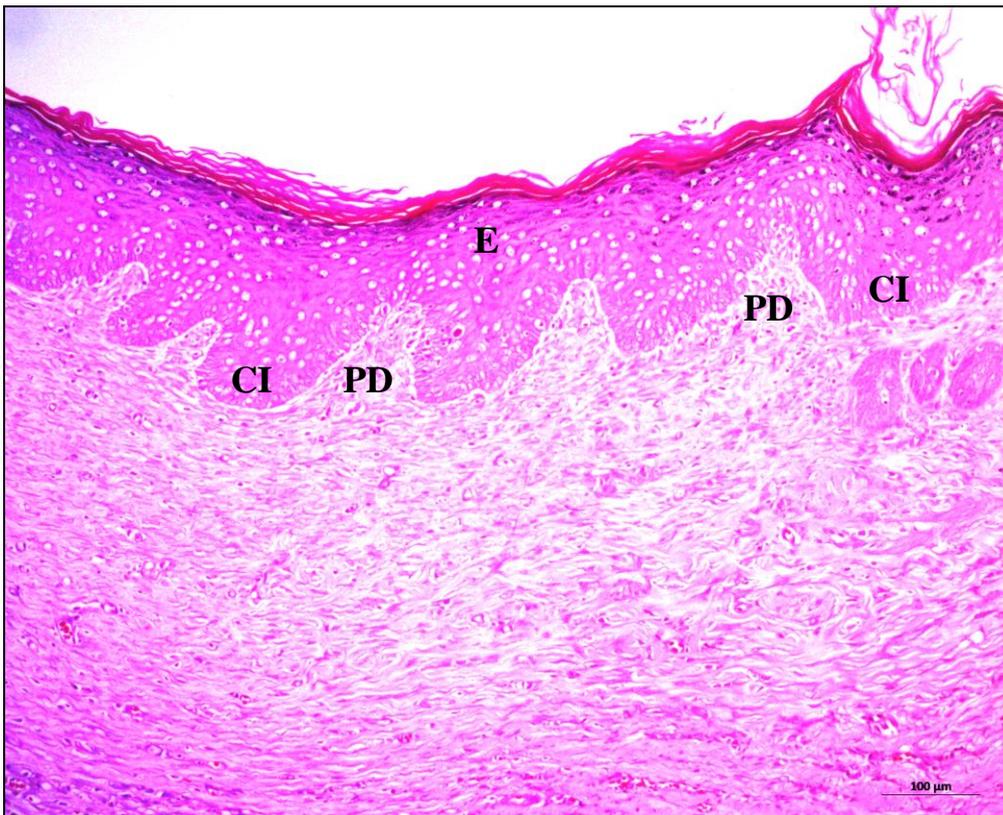


Figura 28 - Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 1. Epiderme hiperplásica (E), apresentando papilas dérmicas (PD) e cristas interpapilares (CI). HE, Obj. 10.

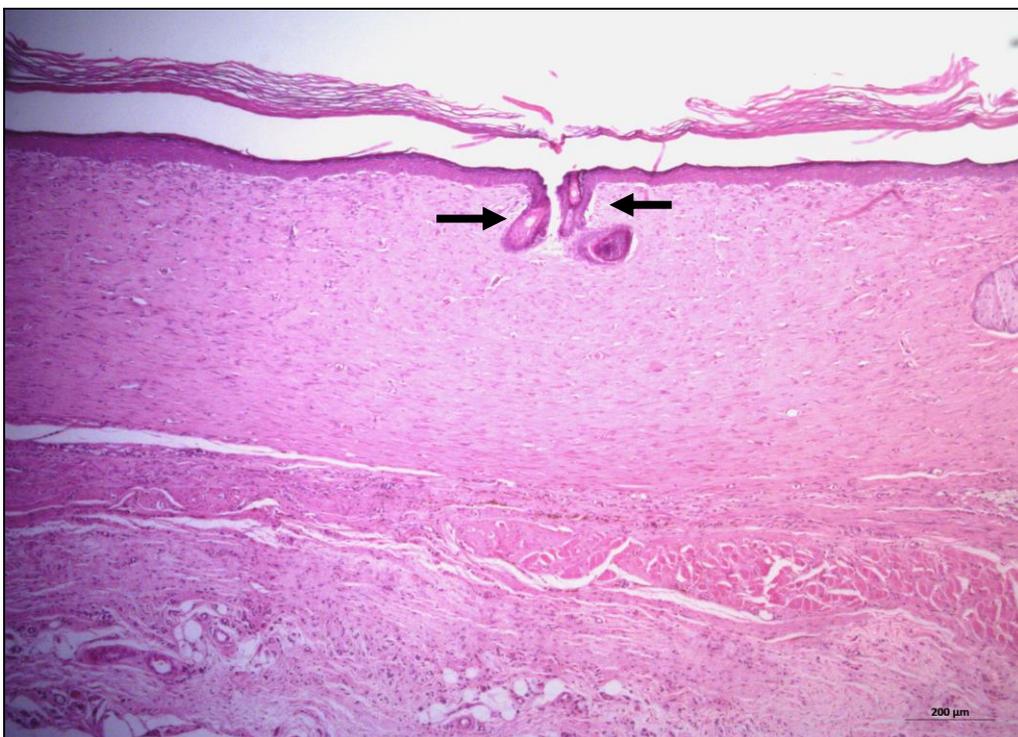


Figura 29 - Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 3. Presença de abertura de folículos pilosos (→) no centro da região cicatrizada. HE, Obj. 5.

Os grupos T1, T2, T3, S2, S3 e C1 apresentaram 100% das amostras com reepitelização completa e ceratinização ortoceratótica (Figura 30). Dois animais do grupo S1 e um do grupo C2 não apresentaram reepitelização completa da ferida e epiderme completamente ceratinizada.

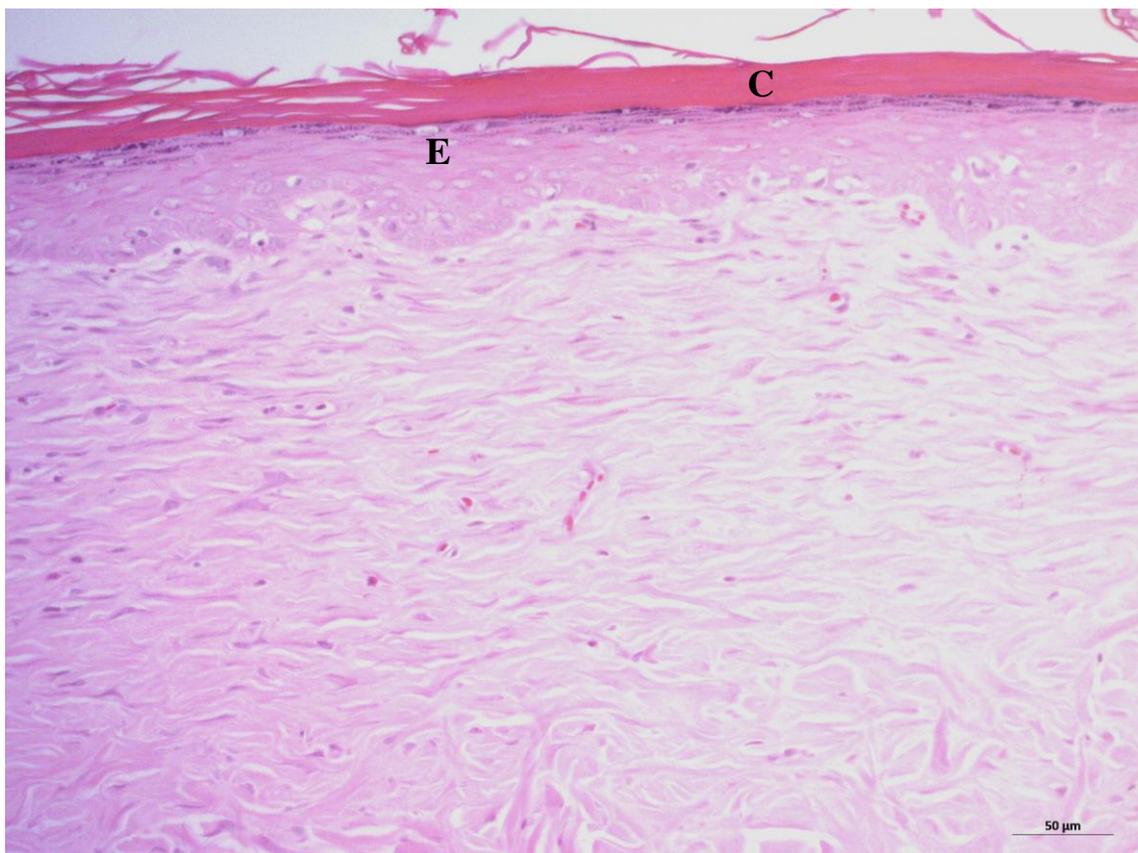


Figura 30 – Pele reparada, rato Wistar, grupo tratamento 2. Epiderme com várias camadas, completamente reepitelizada (E) e ceratinizada (C). HE, Obj. 20.

Pela técnica histoquímica do TM foi possível observar na derme a presença de fibras colágenas, na sua maioria, organizadas, compactadas e dispostas paralelas à superfície nas amostras representativas de todos os grupos (Figuras 31 e 32). As fibras colágenas apresentaram coloração variando do azul pálido ao intenso, sendo que essa variação ocorreu mesmo dentro de cada grupo. Apenas as três amostras que não obtiveram completa reepitelização e ceratinização, mencionadas anteriormente, apresentaram fibras desorganizadas na derme.

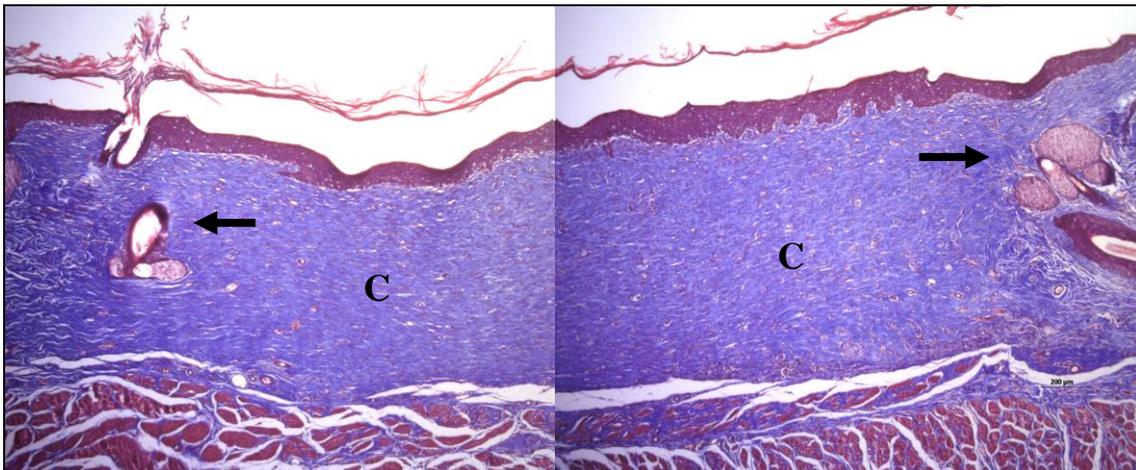


Figura 31 – Pele reparada, rato Wistar, grupo *sham* 3. Extensa área cicatrizada com anexos na interface com a pele sadia em ambos os lados (→) e derme rica em fibras colágenas (C). Masson, Obj. 5.

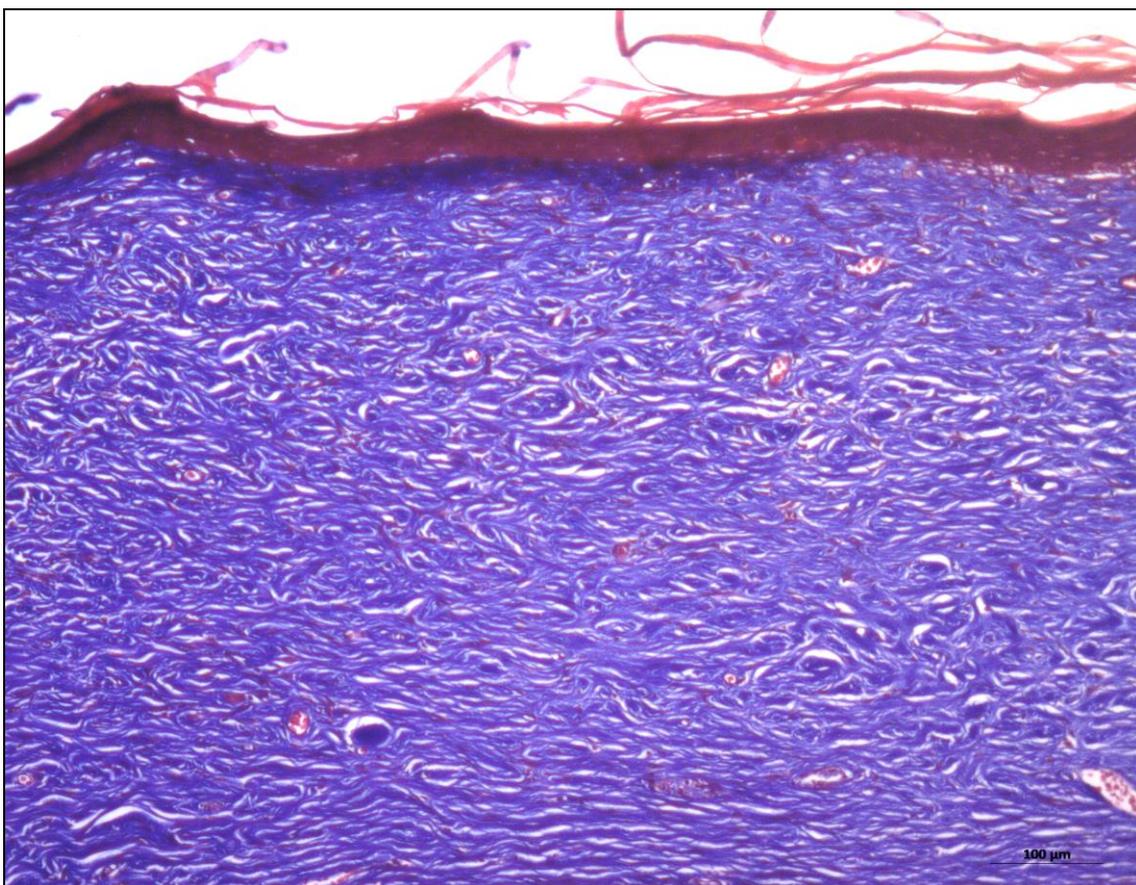


Figura 32 – Pele, rato Wistar, grupo tratamento 1. Pele reparada com derme rica em fibras colágenas organizadas, compactadas e, na sua maioria, dispostas paralelas a superfície. Masson, Obj. 10.

Na avaliação do Ki-67 houve diferença estatística significativa com $p=0,001$. O grupo S1 (21,10 [14,40-32,60]) apresentou maior mediana que os grupos T2 (8,40 [5,00-12,20], $p=0,001$), T3 (10,50 [8,80-11,40], $p=0,01$) e S2 (10,60 [3,60-13,00], $p=0,015$). Os resultados estão demonstrados nas Figuras 33 e 34 e os valores detalhados na Tabela 5 a seguir.

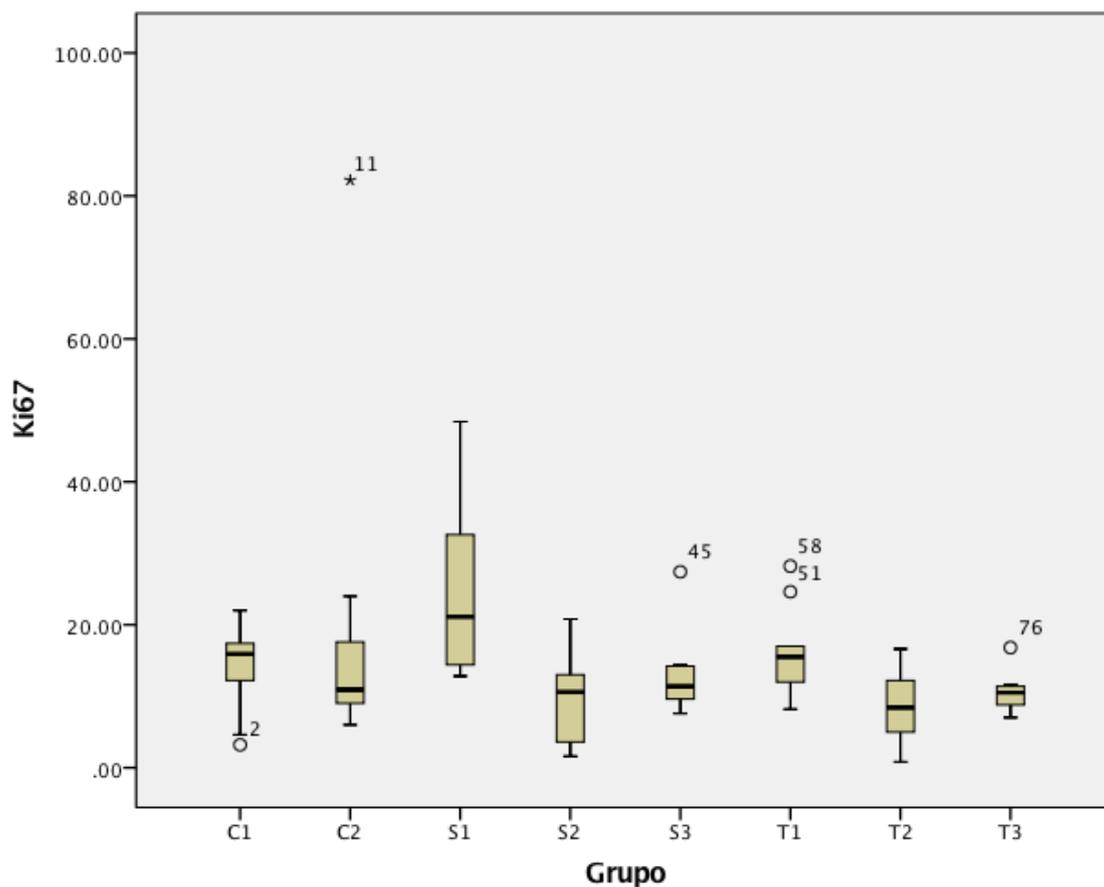


Figura 33 – Demonstração gráfica dos valores do Ki-67. O eixo X representa os oito grupos estudados, e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos C1, C2, S3, T1 e T3 apresentaram valores *outliers*. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

Tabela 5 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do Ki-67 nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

GRUPO	Percentil 25	Percentil 50 (mediana)	Percentil 75
C1	12,20	15,90	17,40
C2	9,00	10,90	17,60
S1	14,40	21,10	32,60
S2	3,60	10,60	13,00
S3	9,60	11,40	14,20
T1	12,00	15,50	17,00
T2	5,00	8,40	12,20
T3	8,80	10,50	11,40

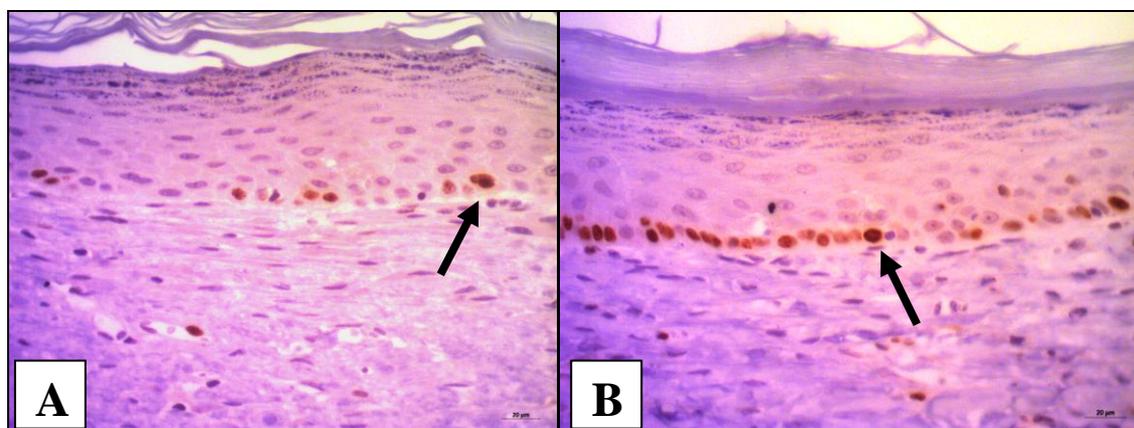


Figura 34- Marcação das células da camada basal da epiderme pelo anticorpo Ki-67 (→). **A)** Pele reparada de um animal do grupo T2 apresentando pouca marcação pelo Ki-67. **B)** Pele reparada de um animal do grupo S1 apresentando bastante marcação pelo Ki-67. IHQ, Contra coloração: Hematoxilina de Harris, Obj. 40.

Na avaliação do VEGF houve diferença estatística significativa com $p=0,027$. O grupo T1 (4,40 [3,00-7,20]) apresentou maior mediana que o grupo S3 (2,40 [1,20-3,20], $p=0,003$). Os resultados estão demonstrados nas Figuras 35 e 36 e os valores detalhados na Tabela 6 a seguir.

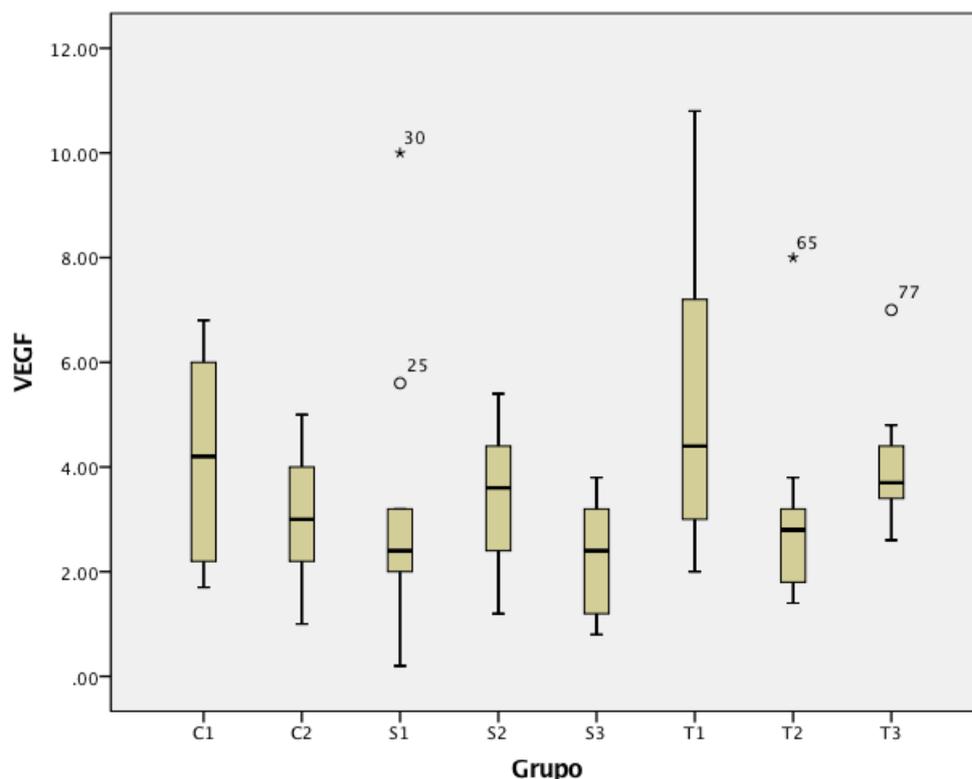


Figura 35 – Demonstração gráfica dos valores do VEGF. O eixo X representa os oito grupos estudados, e o eixo Y representa os valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75. Nota-se que os grupos S1, T2 e T3 apresentaram valores *outliers* muito maiores que os outros do mesmo grupo. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

Tabela 6 – Valores dos percentis 25, 50 (mediana) e 75 obtidos pelo teste estatístico para avaliação do VEGF nos grupos analisados. C1 = Controle 1, C2 = Controle 2, S1 = Sham 1, S2 = Sham 2, S3 = Sham 3, T1 = Tratamento 1, T2 = Tratamento 2 e T3 = Tratamento 3.

GRUPO	Percentil 25	Percentil 50 (mediana)	Percentil 75
C1	2,20	4,20	6,00
C2	2,20	3,00	4,00
S1	2,00	2,40	3,20
S2	2,40	3,60	4,40
S3	1,20	2,40	3,20
T1	3,00	4,40	7,20
T2	1,80	2,80	3,20
T3	3,40	3,70	4,40

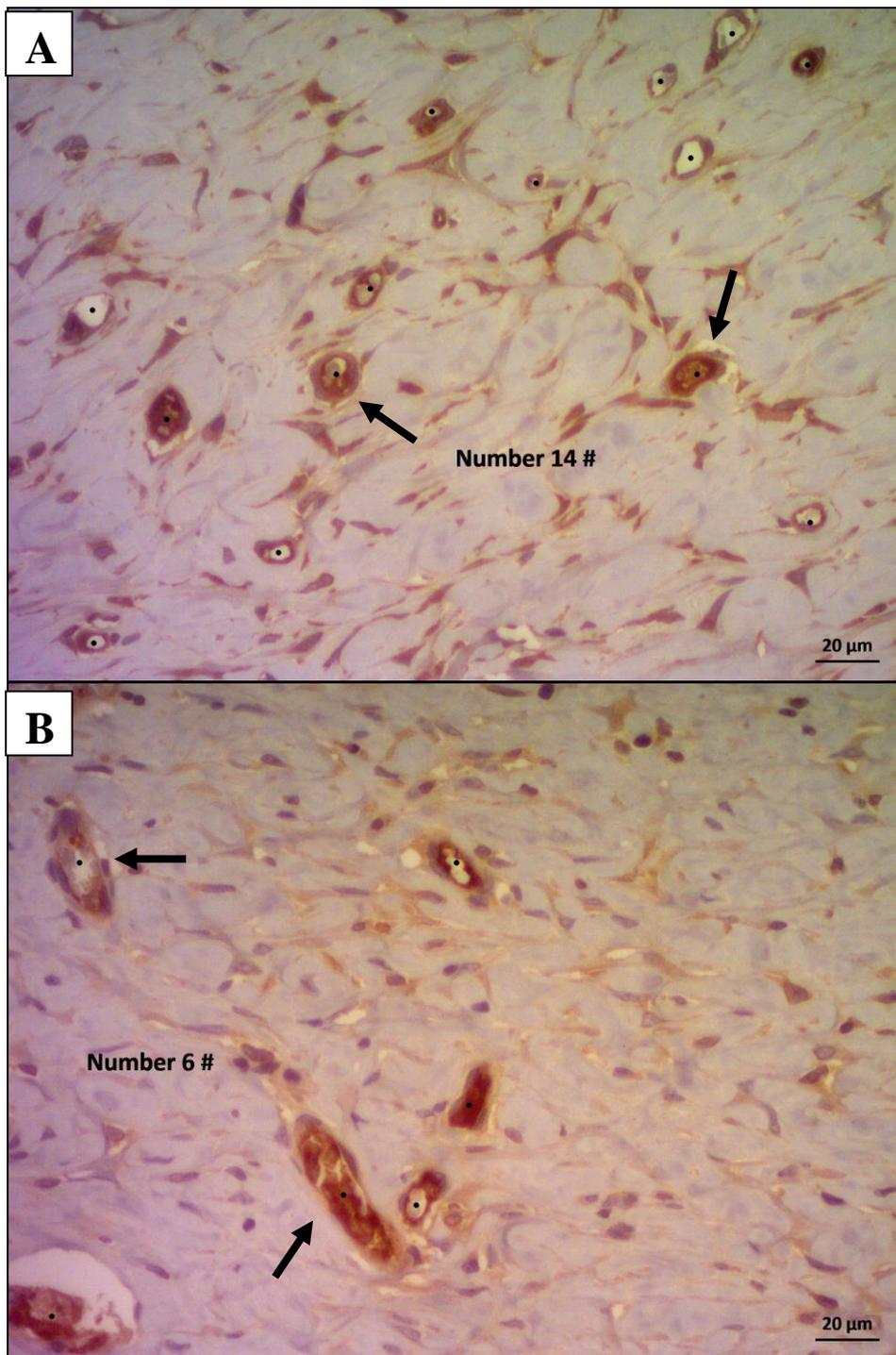


Figura 36 – Marcação dos vasos neoformados na derme pelo anticorpo anti-VEGF (→). **A)** Derme de um animal do grupo T1 apresentando 14 vasos neoformados. **B)** Derme de um animal do grupo S3 apresentando seis vasos neoformados. IHQ, Contra coloração: Hematoxilina de Harris, Obj. 40.

6 DISCUSSÃO

O animal experimental adotado para esse estudo (rato *Rattus norvegicus*) atendeu às expectativas e necessidades propostas. A característica de fácil adaptação à manipulação e docilidade durante o manuseio adequado foi bastante relevante nessa pesquisa, pois em estudos sobre cicatrização é primordial que os animais sejam tranquilos o suficiente para que, somado à terapia analgésica, não causem interferência no processo cicatricial por automutilação e estresse. De acordo com Lapchik *et al.* (2009), o rato tem muitas vantagens como um animal de pesquisa, pois está facilmente disponível, é de fácil criação, adaptação, manuseio, é inteligente e tende a ser dócil. Ademais, o tamanho maior dos ratos, em comparação aos camundongos, faz deles um modelo cirúrgico mais adequado. Tufik *et al.* (2004) e Ferreira *et al.* (2005) afirmaram que o *Rattus norvegicus* é uma opção de uso como modelo cirúrgico induzido, sendo amplamente utilizado para estudos com pele. É possível encontrar na literatura diversos trabalhos realizados na área de cicatrização de feridas e regeneração tecidual, os quais utilizaram esse animal em estudos experimentais (MCFARLIN *et al.*, 2006; BUSNARDO & BIONDO-SIMÕES, 2010; PIMENTEL, 2011; PESSOA *et al.*, 2012; LOSS, 2013; WAN *et al.*, 2013; VALENTE, 2014; VIDOR, 2015).

Levando em consideração que a apreensão e o estresse produzidos pela manipulação e pelo procedimento de indução das feridas poderiam iniciar uma variedade de reações neuro-humorais, potencialmente deletérias e passíveis de sensibilizar tanto o sistema nervoso central quanto o periférico elevando a sensibilidade à dor, optou-se pelo uso do opióide cloridrato de tramadol, na dose de 10 mg.kg⁻¹, administrado por via intraperitoneal, previamente ao procedimento criocirúrgico, conforme proposto por Andrade (2002). Para a indução e manutenção da anestesia, fez-se uso do agente inalatório isoflurano, o qual demonstrou ser eficiente e seguro para a espécie em questão, pois os animais permaneceram em plano cirúrgico durante o procedimento e apresentaram um retorno anestésico rápido e tranquilo (SCHANAIDER & SILVA, 2004). O tempo médio do procedimento anestésico variou entre quatro e oito minutos e foi considerado satisfatório, uma vez que incorporou o tempo necessário à tricotomia, pesagem, aplicação do analgésico, antisepsia, demarcação no dorso do local onde se provocaria a ferida e do número do animal, indução, medição com paquímetro, imagem fotográfica, marcação permanente na orelha e descongelamento da lesão, sendo

considerado concluído apenas quando se visualizava o retorno anestésico completo do animal.

Durante o procedimento na câmara de indução anestésica ocorreram dois óbitos. Esse fato, provavelmente, foi decorrente de uma sobredosagem do agente inalatório isoflurano com depressão respiratória central, levando a hipóxia e a morte rápida do animal por parada cardiorrespiratória (LEE *et al.*, 1994). O método de indução por bucha de anestésico apresenta pouco controle na precisão em relação à concentração inalada e, considerando a variabilidade individual nessa espécie e linhagem, pode-se inferir que, possivelmente, aqueles animais apresentavam uma maior sensibilidade ao agente anestésico utilizado. Mesmo assim, considerou-se o protocolo anestésico seguro para a espécie e foi mantido até o final, visto que alguns animais precisaram ser anestesiados três vezes durante todo o experimento (indução da lesão mais duas aplicações de ADSCs ou veículo – grupos T3 e S3), sem a ocorrência de nenhum óbito no segundo ou terceiro procedimento anestésico.

O tempo da indução de cada lesão foi de exatamente um minuto, dividido em 15 segundos para atingir o halo desejado e os 45 segundos restantes para manter o halo de congelamento, tal como descrito por Maia & Ribeiro (1997), Dawber (2002), Lucas (2004), Pimentel (2011) e Valente (2014). O tempo de descongelamento das feridas variou entre 2 minutos e 30 segundos e 4 minutos e 40 segundos, estando de acordo com Maia & Ribeiro (1997), Dawber (2002) e Kuflik (2004), os quais sugerem que o tempo ideal de descongelamento total deve ser igual ou maior a duas vezes o tempo de congelamento total. O procedimento cirúrgico foi considerado rápido, não cruento e de nível algico moderado.

O método escolhido para a indução das feridas foi o congelamento por meio do *spray*. A grande maioria dos autores considera esse o método mais rápido, mais destrutivo e letal para o tecido alvo, além de ser considerado aquele que atinge a maior profundidade durante o procedimento criocirúrgico (PODKONJAK, 1982; WITHROW, 1989; KORPAN, 2001; DAWBER, 2002). A utilização da técnica do *spray* (sistema aberto) associado ao cone de neoprene (sistema confinado) para direcionar o jato e controlar o diâmetro de congelamento desejado foi satisfatória, pois possibilitou a padronização quanto ao tamanho e aspecto das lesões. Mesmo assim, houve alguma variabilidade na determinação da área das lesões no momento imediato à sua realização, fato inerente à elasticidade da pele de cada indivíduo em estudo. A mesma dificuldade

foi encontrada nos experimentos de Hossein *et al.* (2008), Garcez (2012), Loss (2013) e Gianotti (2015). No entanto, nesse trabalho e nos citados anteriormente não houve diferença que interferisse significativamente nas análises posteriores.

O tamanho do Cryocone® utilizado foi considerado adequado para a espécie uma vez que permitiu a confecção de uma ferida com 15 mm de diâmetro no dorso do rato. De acordo com Pimentel (2011), as lesões cutâneas nesses animais tendem ao rápido fechamento e feridas menores que 10 mm de diâmetro favorecem uma rápida resolução. No estudo realizado por Valente (2014), utilizando a mesma técnica para indução da lesão cutânea e o mesmo diâmetro do Cryocone®, observou-se que após 28 dias ainda haviam feridas não cicatrizadas completamente. Por isso, optou-se por provocar, nesse experimento, lesões com o mesmo diâmetro, visto que o processo cicatricial seria analisado por um período mais longo (45 ou 60 dias), ou seja, até a formação das cicatrizes.

O enriquecimento ambiental por meio de amendoim torrado com casca, toalha de papel e semente de girassol auxiliou favoravelmente no entretenimento, distração dos animais e na interação positiva homem-animal tão necessária durante as manipulações para as avaliações semanais e demais procedimentos. Segundo Lapchik *et al.* (2009), o enriquecimento ambiental objetiva proporcionar aos animais em cativeiro um ambiente rico em estimulação sensorial, que pode ser criado de diversas maneiras. Ainda, o enriquecimento alimentar, no caso de roedores, pode ser feito administrando sementes e alimentos com grau de dureza mais elevado, possibilitando o desgaste dos dentes incisivos. Durante todo o experimento foi mantida a preocupação com o bem-estar dos animais em estudo, conforme descrito por Lapchik *et al.* (2009): “O bem-estar dos animais em cativeiro não é apenas dependente da ausência de dor e de angústia ou de comportamentos anormais, mas também impor o mínimo de restrição às necessidades fisiológicas e etológicas dos animais”.

A utilização do cloridrato de tramadol (derivado opióide) como analgésico, aplicado por via intraperitoneal, na dosagem de 10 mg.kg⁻¹, duas vezes ao dia, por dois dias após a indução das feridas, se mostrou um método eficiente no controle da dor pós-cirúrgica, sem, contudo apresentar interferência no processo cicatricial, que poderia ter ocorrido com o emprego de drogas antiinflamatórias (BALBINO *et al.*, 2005). Os animais retomaram precocemente às atividades, não apresentando sinais de dor quando manipulados, mantendo-se dóceis durante as avaliações macroscópicas e demais

procedimentos e com disposição alimentar normal, o que pode ser comprovado ao final do experimento quando obtiveram um incremento médio de 150 g nos seus pesos corporais comparado ao início do estudo.

A automutilação próxima ao local da ferida experimentalmente induzida foi observada em quatro animais antes do 10º dia pós-cirúrgico. De acordo com Hallam *et al.* (2010), as lesões de pele causadas pelo congelamento causam degranulação de mastócitos com liberação de histamina, o que justifica o prurido intenso que ocorreu nesses animais. Em todos os grupos, sem exceção, ocorreram alguns casos de arranhaduras e escoriações causados por prurido, porém esses sinais eram mais evidentes até o 15º dia após a indução da lesão, não tendo relação com e nem interferindo nos tratamentos subsequentes. Essa condição pruriginosa já foi relatada em trabalho com o mesmo tipo de lesão, no qual as amostras foram coradas pela técnica histológica do azul de toluidina e demonstraram intensidade moderada de mastócitos em todos os grupos estudados, mesmo após 28 dias da indução da lesão por nitrogênio líquido (VALENTE, 2014).

Além disso, esses quatro animais estavam sendo mantidos isoladamente, o que aumenta o grau de estresse e pode ter sido um agravante para a condição de automutilação. Os ratos são considerados animais gregários, necessitando viver em grupos onde formam hierarquias e assim desenvolvem os comportamentos naturais da espécie. O isolamento social é uma das condições mais estressantes para eles (LAPCHIK *et al.*, 2009), fazendo parte inclusive de protocolos experimentais para indução de estresse crônico. Nesses animais cujas lesões por automutilação se agravaram rapidamente, aumentando consideravelmente a extensão da ferida provocada inicialmente, foi optada pela antecipação da morte. A adoção de medidas de antecipação de morte (ou eutanásia como forma de evitar o sofrimento) é um procedimento de refinamento e proteção/preservação do bem-estar animal. Deve ser adotada sempre que os animais apresentarem comportamento alterado ou sinais de sofrimento que não puderem ser controlados com manejo ou analgésicos segundo as principais normativas e recomendações para a utilização de animais na pesquisa científica (CONCEA, 2016; CONCEA, 2018).

O isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais seguiu protocolo já bem definido e publicado em diversos trabalhos (MEIRELLES & NARDI, 2003; PINTO FILHO *et al.*, 2013; TERRACIANO *et al.*, 2014; GIANOTTI, 2015; SPRADA *et al.*,

2015; VIDOR, 2015). As células foram transplantadas nos animais experimentais na terceira ou quarta passagem e numa concentração de 1×10^6 ADSCs, conforme já descrito em outros estudos com cicatrização (LEONARDI *et al.*, 2012; PINTO FILHO *et al.*, 2013; GIANOTTI, 2015; VIDOR, 2015; JAUREGUI *et al.*, 2018; KANAZAWA *et al.*, 2018). Os autores mencionados utilizaram células da terceira até a sétima passagem em seus trabalhos, obtendo resultados satisfatórios e comprovando que as células são viáveis e não apresentam diferenças significativas entre as culturas P3 até P7. Segundo Meirelles & Nardi (2003) ao estudarem culturas de células-tronco até 50 passagens (oito meses em cultivo), observaram que todas as culturas apresentavam morfologia muito parecida, com células achatadas (planas), aderentes ao plástico e semelhante a fibroblastos. Porém, uma maior heterogeneidade na morfologia celular das culturas era notada até a oitava ou nona passagens. Por esse motivo, há uma tendência geral nos trabalhos publicados com ADSCs, em não utilizá-las para a aplicação *in vivo* antes da terceira passagem. Nesse estudo, pode-se comprovar que logo após o isolamento, a cultura apresentava, além das células-tronco presentes no tecido adiposo, muitas células hematopoiéticas, mortas, não viáveis e outros debris celulares, não sendo indicada a utilização dessa cultura inicial para a aplicação em ensaios clínicos ou experimentais. Com o crescimento e expansão das células dessa cultura inicial, foram realizadas as passagens (subculturas) sendo possível observar uma “purificação” com aumento da homogeneidade na morfologia das células de interesse, conforme já descrito por Meirelles & Nardi (2003).

O protocolo de aplicação local das ADSCs foi baseado em trabalhos semelhantes que avaliaram o potencial das MSCs no reparo de lesões cutâneas (WU *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2009; BROWER *et al.*, 2011; GIANOTTI, 2015; VIDOR, 2015) e testaram a aplicação de células-tronco mesenquimais tanto no local da ferida como por via hematológica, obtendo resultados semelhantes entre as duas vias de aplicação (MCFARLIN *et al.*, 2006). Por isso, preferiu-se utilizar a via subcutânea para a aplicação das ADSCs nas bordas da lesão, por ser uma via de acesso fácil e rápido, além de não provocar nenhuma reação adversa no local da aplicação. Esse fato já era esperado, uma vez que as MSCs apresentam baixa imunogenicidade e bom potencial imunomodulatório. Estudos que compararam transplantes homólogos e autólogos das células-tronco não encontraram diferenças terapêuticas significativas e qualquer sinal de rejeição às mesmas (CHEN *et al.*, 2009; WAN *et al.*, 2013; HASSAN *et al.*, 2014).

A metodologia proposta nesse estudo permitiu a indução de apenas uma lesão em cada animal experimental, diferentemente de outros trabalhos com cicatrização cutânea (GARCEZ, 2012; LOSS, 2013; VALENTE, 2014). Já é bem conhecido o fato de que as MSCs aplicadas por via sistêmica são capazes de migrar e se enxertar na região do tecido lesionado. Essa migração ocorre em resposta aos sinais quimiotáticos modulando a inflamação, reparação de danos teciduais e facilitando a regeneração (MAXSON *et al.*, 2012). Por esse motivo, optou-se pela indução de apenas uma lesão, uma vez que as ADSCs utilizadas para o tratamento dela poderiam migrar para outra ferida se houvesse uma segunda em processo de cicatrização no mesmo animal, interferindo potencialmente nos resultados encontrados.

A quantidade de animais utilizados como doadores de tecido adiposo para a produção das ADSCs necessárias para todas as aplicações nos animais, além dos testes de caracterização e diferenciação foi inferior a outros trabalhos encontrados na literatura. Nesse estudo, a partir de três ratos foi possível produzir: 40×10^6 ADSCs para o experimento *in vivo*, 1×10^6 ADSCs para o ensaio de caracterização (imunofenotipagem) e 4×10^4 ADSCs para a diferenciação *in vitro*. Vidor (2015) utilizou quatro ratos no cultivo de 15×10^6 ADSCs para o experimento *in vivo* e 1×10^6 ADSCs para o ensaio de caracterização. Gianotti (2015) utilizou 34 camundongos como doadores no cultivo de 35×10^6 ADSCs para o experimento *in vivo*. A eficácia e refinamento da técnica no cultivo celular, desde o momento do isolamento do tecido adiposo até a aplicação nos animais experimentais, contribuiu para a redução do número de animais utilizados como doadores respeitando o Princípio dos 3Rs (*Reduction, Replacement e Refinement*), que deve nortear a pesquisa científica com o uso consciente e humanitário dos animais pelos pesquisadores (CONCEA, 2016).

A diferenciação osteogênica das ADSCs ocorreu após 18 dias do início da indução de diferenciação *in vitro*. Por volta do 11º dia já era possível observar deposição de matriz extracelular mineralizada, a qual foi se tornando cada vez mais evidente e em maior quantidade com o passar dos dias. A coloração com o corante *Alizarin Red S* foi realizada no 18º dia da diferenciação, sendo evidenciada a matriz extracelular rica em cálcio secretada pelos osteoblastos (BEYER & MEIRELLES, 2006). Nesse estudo, conseguiu-se detectar a diferenciação osteogênica em um período inferior ao citado na maioria dos trabalhos encontrados na literatura, que geralmente mencionam de 21 a 30 dias (DEUS *et al.*, 2012; TERRACIANO *et al.*, 2014; CARELLI

et al., 2015; GIANOTTI, 2015; VIDOR, 2015; CARELLI *et al.*, 2018; JAUREGUI *et al.*, 2018; KANAZAWA *et al.*, 2018; TESHIMA *et al.*, 2018). Provavelmente, com o protocolo utilizado (DEUS *et al.*, 2012), se essas culturas de células tivessem sido coradas no 11º dia, já seria possível concluir a diferenciação osteogênica.

A diferenciação adipogênica das ADSCs ocorreu após 16 dias do início da indução de diferenciação *in vitro*, sendo possível evidenciar as gotículas lipídicas no interior das células com o corante *Oil Red O* (BEYER & MEIRELLES, 2006). Assim como ocorreu com a diferenciação osteogênica, nesse estudo, conseguiu-se detectar, a diferenciação em adipócitos em um período inferior ao mencionado na literatura, que geralmente é de 21 dias (DEUS *et al.*, 2012; TERRACIANO *et al.*, 2014; CARELLI *et al.*, 2015; GIANOTTI, 2015; VIDOR, 2015; CARELLI *et al.*, 2018; JAUREGUI *et al.*, 2018; KANAZAWA *et al.*, 2018; TESHIMA *et al.*, 2018). Além disso, a diferenciação adipogênica espontânea foi observada durante o cultivo das ADSCs, principalmente quando as culturas estavam com confluência máxima, próxima da realização de passagem, conforme já descrito por Meirelles & Nardi (2003).

Apesar do Consenso publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006) recomendar a diferenciação *in vitro* das MSCs em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas, os artigos publicados mais recentemente estão fazendo apenas as diferenciações osteogênica e adipogênica, em associação a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a caracterização das células-tronco mesenquimais (LEONARDI *et al.*, 2012; BARBOZA *et al.*, 2014; CARELLI *et al.*, 2015; CARELLI *et al.*, 2018; JAUREGUI *et al.*, 2018; KANAZAWA *et al.*, 2018; TESHIMA *et al.*, 2018). Horwitz *et al.* (2005) afirmam que a *International Society for Cellular Therapy* aceita a diferenciação das MSCs em apenas duas linhagens celulares distintas, desde que acompanhada da caracterização por imunofenotipagem e demonstração da aderência celular por longos períodos em cultura. Pelos motivos mencionados, não foi realizada a diferenciação condrogênica nesse trabalho.

A imunofenotipagem mostrou que, na quarta passagem, as células eram positivas para o marcador de superfície celular CD44 e negativas para os marcadores CD45, CD31, CD106 e MHC classe II. Esses resultados corroboram com o descrito por Dominici *et al.* (2006) e Yang *et al.* (2013) que afirmam que as MSCs não devem expressar o CD45 e o MHC classe II. Ainda, de acordo com Gebler *et al.* (2012) as MSCs devem expressar o CD44 e ser negativas para o CD31 pelo ensaio da citometria

de fluxo. No estudo de Deus *et al.* (2012), as MSCs foram negativas para os marcadores endoteliais CD31 e CD106 e para o marcador de leucócitos CD45 e positivas para o marcador CD44 na quarta passagem, semelhantemente ao encontrado nesse estudo.

As lesões causadas pelo procedimento criocirúrgico promoveram a necrose de toda a pele em sua profundidade, incluindo o tecido subcutâneo. Isso também ocorre nas queimaduras pelo calor, porém, historicamente, essas vêm sendo muito mais estudadas e diversos trabalhos já relataram o uso das células-tronco como adjuvantes na cicatrização (SHUMAKOV *et al.*, 2003; RASULOV *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2008; XUE *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2014). As taxas de cicatrização média das feridas dos grupos tratados com ADSCs foram superiores aos grupos *sham* e controle, corroborando com os trabalhos já encontrados na literatura. Liu *et al.* (2008) ao aplicarem *scaffolds* com MSCs em queimaduras provocadas em suínos observaram uma melhor taxa de cicatrização das feridas, com melhor vascularização e ceratinização. Xue *et al.* (2013) aplicaram MSCs humanas em queimaduras provocadas em camundongos e notaram uma cicatrização significativamente mais rápida com aumento na neoangiogênese e vasos mais calibrosos. Também, Yang e colaboradores (2014) observaram uma taxa de cicatrização mais rápida e o aparecimento de folículos pilosos e glândulas sebáceas nas queimaduras provocadas em ratos e tratadas com células-tronco mesenquimais e cola de fibrina em relação ao grupo controle. Ainda, Shumakov *et al.* (2003) e Rasulov *et al.* (2006) ao aplicarem células-tronco mesenquimais em queimaduras provocadas em ratos, observaram diminuição das células inflamatórias e aceleração na formação de novos vasos sanguíneos e no tecido de granulação, com aumento das taxas de cicatrização em relação ao grupo controle.

Nesse estudo, os grupos que receberam a aplicação das ADSCs obtiveram as maiores taxas de cicatrização média ao final do experimento, independentemente se a aplicação ocorreu apenas na fase proliferativa ou na de remodelamento ou em ambas. Isso porque, o uso das células-tronco em feridas agudas ou crônicas resulta em uma aceleração no processo cicatricial, decorrente do impacto benéfico que elas trazem para todas as fases da cicatrização (HOCKING, 2012; MAXSON *et al.*, 2012). De acordo com Brower *et al.* (2011) quando as ADSCs são aplicadas diretamente na lesão ou na sua periferia, elas se enxertam ali e se diferenciam em vários tipos de células cutâneas (ceratinócitos, células endoteliais e pericitos) incrementando o processo de cicatrização. Dessa forma, observa-se um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de

cicatrização, além da conformação de uma cicatriz menos evidente (JACKSON *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2014).

A escolha pela aplicação das ADSCs nas fases de proliferação e remodelação levou em consideração os efeitos benéficos das células-tronco nessas duas fases da cicatrização (CHEN *et al.*, 2012; MAXSON *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013) embora, fazendo-se uma pesquisa na literatura existente, é possível perceber que sua aplicação é bem mais estudada na fase inflamatória. Acredita-se que o tipo de lesão provocada nesse experimento impediria as MSCs de atuarem com todo o seu potencial, uma vez que o procedimento criocirúrgico provoca a destruição total do tecido, criando uma necrose muito aderida no local, que leva vários dias para se desprender do tecido sadio. Segundo Jones & Wagers (2008) os fatores circunjacentes às células-tronco são extremamente importantes para a sua manutenção, isto é, autorrenovação e diferenciação celular. Esse microambiente complexo e dinâmico, que transmite e recebe os sinais por meio de mediadores celulares e não celulares, é denominado nicho. Dessa forma, se ocorresse a aplicação das ADSCs nas bordas da lesão, as mesmas encontrariam apenas a crionecrose formada por células mortas e debris no leito da ferida, não conseguindo interagir com o nicho que deve estar propício para que as MSCs consigam expressar sua máxima eficiência. Por isso, considerou-se que nesse modelo de cicatrização por segunda intenção com necrose intensa formada pelo congelamento excessivo, o melhor período para a aplicação da terapia celular seja durante o processo de queda ou após o desprendimento total da crionecrose, quando existe um tecido de granulação exuberante e crescimento de células com expressão de fatores de crescimento.

O grupo que recebeu as ADSCs no 15º dia após a indução das lesões (T1), apresentou a média mais elevada na taxa de cicatrização aos 20 e 25 dias pós-operatórios. E, o grupo, que recebeu as ADSCs no 15º e no 30º dia após o procedimento criocirúrgico (T3), também apresentou a maior média na taxa de cicatrização aos 30 dias de pós-operatório. As lesões causadas pela criocirurgia cicatrizam por segunda intenção e apresentam uma cicatrização mais lenta quando comparada a outras feridas limpas, enquadrando-se ainda na fase de proliferação mesmo após 15 dias da injúria tecidual, o que pode ser observado clinicamente pelo exuberante tecido de granulação existente próximo a esse dia. As ADSCs estimulam o processo de cicatrização de feridas por meio de diversos fatores de crescimento (efeito parácrino) dentre esses:

VEGF, KGF, FGF2, PDGF, HGF, TGF- β , fibronectina e colágeno I95 (HASSAN *et al.*, 2014). Os eventos de neovascularização e reepitelização iniciam na fase proliferativa e, concordando com Jackson *et al.* (2012), essas são as principais razões para o uso das células-tronco nessa fase com o intuito de melhorar a cicatrização de feridas.

As crionecroses provocadas pelo procedimento criocirúrgico começaram a desprender suas bordas entre o 12º e 15º dia pós-cirúrgico. A partir do 15º dia após a indução das feridas, as crionecroses começaram a cair completamente e esse processo de queda se estendeu até o 35º dia pós-cirúrgico, discordando do descrito por Castro *et al.* (2013). De acordo com esses autores, a maior parte das lesões se apresenta no pós-cirúrgico como escaras secas que se destacarão do tecido sadio em quatro ou cinco dias, caindo entre o 10º e 14º dia. Quando a parte necrosada se destaca e cai, o tecido de granulação começa a se fechar por contração e epitelização e o processo cicatricial se completa entre 14 e 21 dias (WITHROW, 1980). Nesse experimento, o aparecimento das cicatrizes se iniciou entre o 30º e 35º dia após a indução das lesões e se estendeu até o 55º dia pós-cirúrgico em alguns animais, provavelmente devido ao grande tamanho da ferida conforme citado por Withrow (1980) e Lucas & Larsson (2007). Também, conforme estudo de Valente (2014), muitas feridas provocadas por nitrogênio líquido não estavam completamente cicatrizadas no 28º dia pós-cirúrgico. As lesões induzidas pelo procedimento criocirúrgico tendem a cicatrizar por segunda intenção mais lentamente que outras feridas limpas, nas quais não ocorre a formação de uma necrose exacerbada, sendo que quanto mais precoce for a queda dessa mais rapidamente se completará o processo de cicatrização e o aparecimento de uma cicatriz.

Após a queda das crionecroses, o que se observou nas lesões induzidas experimentalmente foi a presença de um tecido de granulação exuberante decorrente da fibroplasia e da angiogênese. A angiogênese é um processo que ocorre na fase proliferativa da cicatrização de feridas e é ela quem suprirá a nutrição necessária para os fibroblastos que irão produzir o tecido de granulação (KING *et al.*, 2014). As células-tronco mesenquimais facilitam a revascularização pela ação parácrina secretando FGF e VEGF, os quais promovem a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais dos vasos. Além disso, as ADSCs facilitam a revascularização através da diferenciação em pericitos (células do endotélio vascular) (MAXSON *et al.*, 2012). Em um trabalho com cicatrização cutânea e ADSCs, Hassan *et al.* (2014) observaram, por meio de avaliações histológicas, taxas de epitelização mais elevadas, aumento da

formação de tecido de granulação e de capilares quando compararam as feridas tratadas com as controles. Nesse estudo, não foi possível a análise desses parâmetros uma vez que as biopsias foram realizadas na fase de remodelação quando as feridas já estavam cicatrizadas.

Mesmo o grupo que recebeu a aplicação das ADSCs apenas no 30º dia pós-operatório (T2) apresentou a média mais elevada entre todos os grupos na taxa de cicatrização ao final do experimento, seguido pelo grupo T3. Experimentos *in vitro* demonstraram que as MSCs podem se transdiferenciar em células epidérmicas (ceratinócitos e células endoteliais microvasculares) e interagir com as células epidérmicas da própria pele lesada. Esses estudos sugerem que as MSCs poderiam participar diretamente na regeneração estrutural dos tecidos dérmicos e epidérmicos, representando assim um mecanismo adicional pelo qual elas podem promover a cicatrização de feridas cutâneas (HASSAN *et al.*, 2014).

Pode-se definir cicatriz como sendo o resultado da reparação tecidual que ocorre após um ferimento. Esse processo fisiológico começa após a lesão e tem como finalidade a formação de um novo tecido. O processo cicatricial pode resultar em cicatrizes inestéticas ou funcionalmente limitantes, repercutindo emocionalmente nos pacientes (PEREIRA, 2003). Em se tratando de animais, embora esses não sofram diretamente o impacto emocional de uma cicatriz esteticamente inaceitável, os seus tutores, com frequência, atribuem importância considerável ao tamanho e à forma das cicatrizes, bem como ao tempo necessário para se completar a cicatrização de ferimentos cutâneos por segunda intenção.

A análise macroscópica e o acompanhamento da evolução das lesões evidenciaram um resultado clinicamente relevante quanto ao tamanho e o formato das cicatrizes. Os grupos que receberam as ADSCs apresentaram ao final do estudo, cicatrizes mais estreitas e compridas com as medidas da área final inferiores as cicatrizes do grupo controle e *sham*, que se mostraram mais largas e evidentes, corroborando com outros estudos que demonstraram que a aplicação de MSCs proporciona a formação de cicatrizes cosmeticamente mais aceitáveis (KLINGER *et al.*, 2008; GHIEH *et al.*, 2015). Não foi observada outras diferenças relevantes nas cicatrizes entre os grupos que receberam apenas uma ou duas aplicações de ADSCs ao final do experimento. Com esses resultados, foi possível inferir que a utilização das ADSCs nas lesões causadas por criocirurgia minimizam a disfunção estética relevante

mencionada por Marciani & Trodahl (1975). Isso porque as células-tronco mesenquimais tem a capacidade de agir no remodelamento e melhorar a qualidade da cicatriz (UYSAL *et al.*, 2014).

O período de avaliação das feridas foi de 45 e 60 dias, sendo possível acompanhar todas as fases da cicatrização, porém a fase de remodelação de uma lesão cutânea pode se estender por um ano ou até mais (HOSGOOD, 2006). De acordo com Guyuron & Vaughan (1992) a avaliação estética da cicatriz deve ser feita após um ano, baseando-se no fato de que o colágeno está totalmente maturado e a ferida completamente cicatrizada. Já para Trimbos *et al.* (2002) a avaliação da cicatriz com seis meses pós-operatórios é tão confiável quanto com um ano. Há ainda autores que consideram suficiente a avaliação após três meses. No período de três meses, a ferida tem 80% da resistência original da pele, sendo improvável que alterações significativas em sua remodelação ou seu alargamento ocorram após esse tempo, modificando a evolução estética da cicatriz (VIDIGAL & PETROIANU, 2010). Os dados mencionados foram resultados de estudos em humanos, porém mesmo considerando as diferenças anatômicas e fisiológicas, inclusive no metabolismo e tempo de cicatrização de feridas entre ratos e humanos, pode-se considerar que para uma melhor avaliação das cicatrizes quanto a sua estética seria necessário um tempo superior ao utilizado nesse estudo. Assim, seria possível acompanhar não somente a formação da cicatriz, mas também o seu remodelamento por um período maior.

Nesse trabalho foram induzidas queimaduras graves pelo congelamento, as quais produziram destruição completa dos elementos regenerativos da pele. O principal mecanismo de cura dessas lesões profundas na pele é a contração, com epitelização apenas das bordas sadias, culminando com a formação de cicatrizes extensas e defeitos cosméticos consideráveis (PAPINI, 2004). Levando em consideração a gravidade das feridas provocadas, a presença significativa de hiperplasia da epiderme, papilas dérmicas/cristas interpilares e anexos cutâneos no grupo tratamento 2 indica que as ADSCs aplicadas auxiliaram relevantemente na regeneração da pele lesada, uma vez que esses achados histológicos são indicativos de maturidade da epiderme. De acordo com Ito *et al.* (2005) as células-tronco que residem na protuberância do folículo piloso contribuem para a regeneração do folículo e, também, para a reparação de feridas, podendo diferenciar-se em células da epiderme, das glândulas sebáceas e do folículo piloso. As células da papila dérmica podem induzir a formação de pelos em roedores,

uma vez que estão localizadas perto do epitélio e, até, gerar um novo folículo piloso quando combinadas com as células-tronco do próprio folículo piloso (XING & KOBAYASHI, 2001). Em relação à hiperplasia da epiderme, Leirós *et al.* (2014) afirmaram que muitos fatores de crescimento são produzidos pelas células das papilas dérmicas e que alguns desses fatores contribuem para o maior número de camadas da epiderme e manutenção da sua população de células-tronco. Como em todos os grupos tratados com as ADSCs foi observada a presença de anexos cutâneos e papilas dérmicas em grande parte das amostras pode-se inferir que as células aplicadas agiram sinergicamente com as células residentes (do nicho) das bordas da ferida de forma a estimular a formação de novos folículos e também de reparar a epiderme lesada.

Outro dado interessante foi a relação da presença de papilas dérmicas em grande parte das amostras dos grupos tratados com as ADSCs, que também apresentaram marcação considerável do VEGF. Corroborando com isso, o estudo realizado por Leirós e colaboradores (2014) demonstrou que a presença das células das papilas dérmicas contribuiu para a manutenção de uma população de células-tronco na nova epiderme e observou um aumento na neoangiogênese que não foi associado a um processo inflamatório intenso, mas sim a um processo precoce de remodelação tecidual. Os autores desse trabalho sugerem que as células das papilas dérmicas não só favorecem a neovascularização precoce, mas também contribuem para a maturação da rede vascular na nova derme, além de evitar uma resposta inflamatória excessiva, favorecendo um ambiente regenerativo, em vez de um cicatricial.

Os grupos que receberam ADSCs apresentaram, em praticamente todas as suas amostras (7-8 de 10), a presença de anexos cutâneos (glândulas sebáceas e folículos pilosos) na interface da pele reparada com a sadia. Um achado muito relevante encontrado em cinco animais de dois grupos tratados (T2 e T3) foi a presença de folículos pilosos na região da pele cicatrizada. Uma das complicações dermatológicas permanentes (sequelas) da criocirurgia é a alopecia (LUCAS & LARSSON, 2007). Tanto nas feridas causadas pelo procedimento criocirúrgico quanto nas lesões provocadas pelo frio intenso (*frostbites*), ocorre a destruição completa da derme com todos os anexos cutâneos. A grande maioria das células-tronco da pele estão localizadas no bulbo do folículo piloso. Essas células-tronco dos folículos pilosos dão origem a células-tronco epidérmicas apenas quando a epiderme está lesada, a fim de reparar e reepitelizar uma ferida. Assim, as queimaduras superficiais que deixam intactos os

folículos pilosos, cicatrizam mais rapidamente com a regeneração dos apêndices epidérmicos (ARNO *et al.*, 2011). Nesse estudo, pode-se inferir que as ADSCs aplicadas nas bordas da ferida contribuíram beneficemente para o surgimento dos folículos pilosos na pele reparada, corroborando com outros trabalhos que também encontraram um incremento no número de folículos pilosos após a aplicação das MSCs (LOUGH *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; GHIEH *et al.*, 2015; GIANOTTI, 2015). Gianotti (2015) obteve um aumento na densidade de folículos pilosos após o uso das ADSCs e ao analisar a enxertia dessas células encontrou um número significativo nos folículos pilosos, concluindo que as ADSCs aplicadas agiram positivamente nas MSCs do próprio folículo piloso, provocando o incremento.

Nesse estudo, pode-se observar que a queda das crionecroses e o aparecimento das cicatrizes não foram mais precoces nos grupos que receberam a aplicação das ADSCs, ou seja, as células-tronco não provocaram uma aceleração no processo de cicatrização das feridas. De acordo com Balbino *et al.* (2005) quando o reparo de tecidos ocorre pela regeneração, há a recomposição da atividade funcional do tecido. Por outro lado, quando há cicatrização, ocorre a rápida homeostasia, porém com perda de funcionalidade pela formação de cicatriz fibrótica. Na maioria das lesões, o tecido torna-se uma cicatriz, ou seja, um “remendo”, essencialmente de fibroblastos, e uma matriz extracelular desorganizada, basicamente de colágeno (GURTNER *et al.*, 2008; JACKSON *et al.*, 2012). Essa rápida interposição de tecido cicatricial confere uma vantagem importante para a sobrevivência, ao impedir a colonização por microorganismos patogênicos e a deformação do tecido, contudo leva a uma alteração funcional do tecido lesado (GURTNER *et al.*, 2008), pois essa cicatriz não conterá elementos como glândulas sebáceas, folículos pilosos, receptores sensoriais e atingirá, no máximo, 80% da resistência da pele normal (JACKSON *et al.*, 2012). Dessa forma, as ADSCs não aceleraram o processo de cicatrização das feridas, mas proporcionaram a formação de cicatrizes menores (pela maior taxa de cicatrização) e esteticamente mais aceitáveis, além de apresentarem glândulas sebáceas e folículos pilosos na interface da pele reparada com a sadia e, até mesmo, a formação de folículos pilosos na região central da pele reparada. De acordo com Blanes (2004), a regeneração ocorre com reposição tissular “original”, na qual as células epidérmicas, das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar para o leito da ferida. Segundo Gurtner e colaboradores

(2008), manipular o processo de cicatrização de feridas em mamíferos talvez exija a habilidade de diminuir a velocidade da resposta fibrótica para que as células pluripotentes estaminais ou progenitoras possam regenerar o tecido. Corroborando com os autores mencionados e baseando-se nos resultados descritos anteriormente, pode-se inferir que algumas das amostras que receberam a aplicação das ADSCs conseguiram a reparação tissular através da regeneração e não da cicatrização, sendo esse mecanismo muito desejável por apresentar vantagens na restauração da pele.

A angiogênese é um processo fisiológico que envolve o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. É um processo normal e vital no crescimento e desenvolvimento, bem como na cicatrização de feridas e nas inflamações crônicas (ROBBINS & COTRAN, 2010; SEPHEL & WOODWARD, 2006). O VEGF é um peptídeo angiogênico produzido pelas células endoteliais, macrófagos e muitas outras células, sendo um excelente marcador para as células endoteliais (PESSOA *et al.*, 2012). O grupo que recebeu as ADSCs no 15º dia após a lesão e teve as suas amostras coletadas no 45º dia (T1) apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,003$) em relação ao grupo *sham* (S3) quanto à quantidade de vasos neoformados marcados pela técnica imuno-histoquímica do VEGF. As células-tronco mesenquimais atuam na fase de proliferação da cicatrização de feridas, produzindo fatores angiogênicos como o VEGF, HGF, PDGF e angiopoietinas (LAU *et al.*, 2009). As ADSCs, embora não conhecidas por formar novos vasos sanguíneos na cicatrização normal de feridas, são células-tronco multipotentes capazes de se diferenciar em células endoteliais e promover a angiogênese, facilitando esse processo em feridas mais profundas (ALTMAN *et al.*, 2008). Dessa forma, foi possível detectar uma maior proliferação vascular nas lesões que receberam as células-tronco durante a fase proliferativa e cujas amostras foram coletadas mais precocemente do que nos outros dois grupos que também receberam a aplicação das ADSCs, porém as amostras foram coletadas no 60º dia após a indução da lesão. A maior quantidade de neovasos no grupo T1 pode ter ocorrido pela diferenciação das ADSCs em células endoteliais e/ou pelo aumento da secreção de fatores angiogênicos via mecanismo parácrino (MEYER *et al.*, 2012).

O grupo *sham* (S1) obteve valores mais elevados e estatisticamente significativos do que os grupos tratados com ADSCs (T2 e T3) em relação à avaliação de formação da epiderme, por meio da imuno-histoquímica. O anticorpo Ki-67 reage com antígenos presentes no núcleo das células da camada basal do epitélio, a qual tem

capacidade proliferativa, e origina os ceratinócitos que migram constituindo as outras camadas epidérmicas. A capacidade de transição mesenquimal-epitelial das células-tronco, fazendo com que a célula mude de um fenótipo mesenquimatoso para um fenótipo epitelial é um processo extremamente importante na regeneração tecidual e cicatrização de feridas (MANI *et al.*, 2008). Outra teoria proposta que favorece a epitelização é a fusão das células-tronco mesenquimais com as células epiteliais. No entanto, embora esse processo ocorra com frequência *ex vivo*, a transdiferenciação é considerada o evento predominante *in vivo*. Ainda, além da transição mesenquimal-epitelial e da fusão celular, as ADSCs promovem a epitelização por sinalização parácrina, a qual aumenta a migração e a proliferação de ceratinócitos e células epiteliais (LAU *et al.*, 2009).

As amostras dos animais que haviam recebido a aplicação das ADSCs apresentaram menos marcação pelo anticorpo Ki-67 possivelmente porque as células-tronco auxiliaram positivamente e precocemente no processo de epitelização daquelas feridas e, ao final de 60 dias, as lesões já se encontravam na fase de remodelação há mais tempo que as feridas do grupo *sham*. Esse dado pode ser explicado pelo fato das lesões se encontrarem em momentos diferentes durante as fases do processo de cicatrização. As amostras cujas feridas já se encontravam na fase de remodelação há mais tempo, foram menos marcadas pelo anticorpo Ki-67. Isso porque, na fase de maturação, não ocorre mais proliferação celular intensa de fibroblastos e ceratinócitos para o reparo do tecido conjuntivo e epitélio, processos inerentes à fase de proliferação (SEPHÉL & WOODWARD, 2006). Também, a expressão do marcador Ki-67, típico de epitélio em hiperproliferação, pode ter sido mais evidente no grupo *sham* (S1) devido ao momento da coleta das amostras (45 dias após a lesão), tempo inferior em relação aos outros grupos que apresentaram menor marcação pelo anticorpo. Ainda é preciso levar em consideração a variação da expressão do Ki-67 ao longo das diferentes fases do ciclo celular. As células expressam o antígeno durante as fases G1, S, G2 e M, mas não durante a fase de repouso G0. Os níveis de Ki-67 são baixos nas fases G1 e S e aumentam para o seu nível máximo na mitose. Depois da fase mitótica (anáfase e telófase), ocorre uma diminuição acentuada nos níveis do Ki-67 (JONAT & ARNOLD, 2011).

A cicatrização é o processo de reestabelecer a continuidade do tecido após uma lesão e começa imediatamente após este evento. A cicatrização da pele é o processo

biológico mais complexo da vida adulta, pois muitos tipos celulares incluindo neutrófilos, monócitos, linfócitos e células dendríticas, células endoteliais, ceratinócitos e fibroblastos, sofrem alterações de fenótipo e de expressão genética para gerar proliferação, diferenciação e migração celular (GURTNER *et al.*, 2008). A pele é o maior órgão do corpo e está em constante modificação devido às células lábeis que se renovam permanentemente. A cicatrização cutânea além de ser um processo complexo que envolve uma gama de mecanismos fisiológicos iniciados após a injúria, sofre, também, a influência direta de fatores individuais relacionados à anatomia (como o padrão de feixes vasculares, elasticidade da pele, distribuição das linhas de tensão cutânea) ao estado nutricional, às condições de *stress* entre outros (PAVLETIC, 2010). Sendo assim, trabalhar com cicatrização cutânea em uma população não homogênea, como a linhagem heterogênea de ratos Wistar, é sempre um desafio, pois os animais apresentam resultados variáveis dentro do mesmo grupo de tratamento. Dessa forma, conseguir detectar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados em parâmetros como a taxa de cicatrização cutânea, escore histológico, proliferação vascular (VEGF) e proliferação epitelial (Ki-67) evidenciados nesse estudo, são considerados resultados relevantes que demonstram a inegável influência das ADSCs no processo de reparo da pele.

Uma alternativa para conseguir detectar diferenças estatisticamente significativas entre mais grupos experimentais ou mais parâmetros macroscópicos e microscópicos nesse trabalho com cicatrização de feridas, seria aumentar o número de indivíduos estudados, a fim de tentar diminuir as diferenças individuais e os resultados discrepantes (*outliers*) dentro do mesmo grupo. Porém, a necessidade de aumentar o *n* em um trabalho experimental, encontra, cada vez mais, dificuldades na tramitação e execução dos projetos, em virtude dos princípios éticos ditados pela legislação brasileira vigente e, também, pela constante mudança da própria consciência humana no meio acadêmico quanto ao uso de animais de laboratório para pesquisas científicas.

É importante ressaltar a dificuldade de comparação entre os dados obtidos na literatura e os resultados desse experimento, uma vez que nenhum dos artigos encontrados obteve exatamente as mesmas condições experimentais. Existe um grande número de trabalhos utilizando as células-tronco mesenquimais com ação terapêutica na cicatrização da pele, porém não foi encontrado nenhum estudo utilizando elas como tratamento de feridas provocadas por congelamento. As cicatrizes cutâneas após

queimaduras ou cirurgias severas representa um grande problema para o sistema de saúde, podendo causar transtornos funcionais e psicológicos por longos períodos nos pacientes afetados por grandes ou múltiplas cicatrizes (MARSHALL *et al.*, 2016). Por isso, existe uma necessidade de continuação dos estudos nessa linha de pesquisa, pois apesar de existirem alternativas cirúrgicas e farmacêuticas para tratar e/ou prevenir cicatrizes, nenhuma das opções disponíveis até o momento é completamente efetiva na prevenção de cicatrizes, particularmente nos pacientes acometidos por lesões mais graves as quais atingem toda a profundidade da pele.

7 CONCLUSÕES

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

- 1) A terapia com as ADSCs no 15º dia após a indução da lesão (grupo T1), apresenta as maiores taxas de contração cicatricial média das feridas no 20º e 25º dia pós-cirúrgico e demonstra diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *sham* (S3) quanto à neovascularização;
- 2) O grupo que recebeu a aplicação das ADSCs apenas no 30º dia após a indução da lesão (T2), apresenta as maiores taxas de contração cicatricial média das feridas no 55º e 60º dia pós-cirúrgico e obteve maior escore histológico estatisticamente significativo em relação ao grupo *sham* (S1);
- 3) A terapia com duas aplicações das ADSCs, uma no 15º e outra no 30º dia após a indução da lesão (grupo T3), obteve a maior taxa de contração cicatricial média das feridas no 30º dia pós-operatório;
- 4) O grupo *sham* (S1) obteve diferença estatística significativa em relação aos grupos tratados com as ADSCs (T2 e T3) quanto à proliferação epitelial;
- 5) A terapia com as ADSCs proporciona uma relevante evolução clínica das feridas, podendo ser constatada ao final do período de avaliação por cicatrizes mais estreitas e compridas com as medidas da área final inferiores as cicatrizes dos grupos controle (C1 e C2) e *sham* (S1, S2 e S3);
- 6) A terapia com as ADSCs não acelera as fases de proliferação e remodelação das feridas nem o processo cicatricial como um todo.

Ainda, pode-se afirmar que os três grupos que receberam as ADSCs expressam médias estatisticamente superiores quanto às taxas de cicatrização das feridas em relação aos demais grupos, comprovando a eficácia do tratamento.

Propõem-se a necessidade de novos estudos com as ADSCs na cicatrização de lesões cutâneas provocadas pela criocirurgia ou por outra modalidade de congelamento. Sugere-se a realização de biópsias com análises histopatológicas e imuno-histoquímicas em períodos de tempo anteriores aos realizados nesse estudo, a fim de detectar diferenças no processo de cicatrização imediatamente após a aplicação das ADSCs. Também, o acompanhamento das cicatrizes por mais de 60 dias, pode auxiliar na verificação da atuação das ADSCs por um período mais longo durante a fase de remodelação (que pode levar um ano ou mais), evidenciando de forma ainda mais clara a eficácia dessa terapia celular no remodelamento de uma cicatriz esteticamente mais aceitável.

REFERÊNCIAS

- AL-NBAHEEN, M. *et al.* Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 9, p. 32-43, 2013.
- ALTMAN, A. *et al.* Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 29, p. 1431-1442, 2008.
- ANDERSON, D. Wound management in small animal practice. **In Practice**, v. 18, n. 3, p. 115-129, 1996.
- ANDRADE, S. F. Analgésicos. In: _____. **Manual de terapêutica veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002.
- ARNO, A. *et al.* Stem Cell Therapy: A New Treatment for Burns? **Pharmaceuticals**, v. 4, p. 1355-1380, 2011.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BANKS, W. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1992. 629 p.
- BARBOZA, C. A. G. *et al.* Laser de baixa intensidade induz à proliferação *in vitro* de células-tronco mesenquimais. **Einstein**, v. 12, n. 1, p. 75-81, 2014.
- BAUM, C.; ARPEY, C. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.
- BAXTER, J. S. The machinery of veterinary cryosurgery. **Journal of Small Animal Practice**, v. 19, p. 27-34, 1977.
- BEYER, N. N.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 174, p. 249-282, 2006.
- BLANES, L. Tratamento de feridas. In: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. (Ed.). **Cirurgia vascular: guia ilustrado**. São Paulo: 2004. Disponível em: <<http://www.baptista.com>>. Acesso em: 20 jun. 2017.
- BOJRAB, M. J. Veterinary cryosurgery: an overview. **Norden News**, v. 53, p. 16-20, 1978.
- BOND, J. E. *et al.* Wound Contraction is Attenuated by Fasudil Inhibition of Rho-Kinase. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 128, n. 5, p. 438-450, 2011.
- BROWER, J. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Therapy and Delivery Systems in Nonhealing Wounds CM. **Advances in Wound Care**, v. 24, n. 11, p. 524-532, 2011.

BUSNARDO, V. L.; BIONDO-SIMOES, M. L. P. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 1, p. 45-51, 2010.

BUTTS, K. *et al.* Diffusion-weighted MRI after cryosurgery of the canine prostate. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 1, p. 131-135, 2003.

CARELLI, S. *et al.* Characteristics and Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived From Microfragmented Adipose Tissue. **Cell Transplantation**, v. 24, p. 1233–1252, 2015.

CARELLI, S. *et al.* Mechanical Activation of Adipose Tissue and Derived Mesenchymal Stem Cells: Novel Anti-Inflammatory Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 267, p. 1-16, 2018.

CASTRO, J. L. C. *et al.* Criocirurgia – revisão de literatura. **Medvep Dermato – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 3, n. 6, p. 11-25, 2013.

CHEN, C. H. *et al.* Porous tissue grafts sandwiched with multilayered mesenchymal stromal cell sheets induce tissue regenerations for cardiac repair. **Cardiovascular Research**, v. 80, p. 88-95, 2008.

CHEN, J. S. *et al.* Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cutaneous Wound Healing. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 192-198, 2012.

CHEN, M.; PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Stem Cells for Skin Tissue Engineering. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 37, n. 4, p. 399–421, 2009.

CHENG, K. *et al.* Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v. 3, n. 2, p. 53-62, 2011.

CIRNE-LIMA, E. O. Stem Cells. **Revista HCPA**, v. 27, n. 3, p. 66-73, 2007.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa nº 30, de 02 de fevereiro de 2016. Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA). Disponível em: <<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>>. Acesso em: 03 fev. 2018.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA). Resolução Normativa nº 37, de janeiro de 2018. Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA. Disponível em: <<http://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/institucional/concea/paginas/legislacao.html>>. Acesso em: 03 fev. 2018.

COOPER, I. S. Criogenic surgery: a new method of destruction or extirpation of benign and malignant tissue. **The New England Journal of Medicine**, v. 268, p. 743, 1963.

COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, Cap. 3, p. 35-48.

DAWBBER, R. **Criocirurgia cutânea princípios e prática clínica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999, 135 p.

DAWBBER, R. Cryosurgery: unapproved uses, dosages, or indications. **Clinics in Dermatology**, v. 20, p. 563-570, 2002.

DEUS, G. C. *et al.* Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. **Einstein**, v. 10, n. 3, p. 296-301, 2012.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DYCE, J. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. I. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 233-238, 1990.

DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 227-233, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

ESCUADERO, A. B.; RODRIGUEZ, R. R. P.; FUNEZ, F. A. Princípios técnicos de la cirugía prostática (1º Parte). **Archivos Espanoles de Urologia**, v. 59, n. 10, p. 1089-1109, 2003.

FERREIRA, L.; HOCHMAN, B.; BARVOSA, M. V. J. Experimental models in research. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 28-34, 2005.

FRASER, J. K. *et al.* Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 150-154, 2006.

GAGE, A. A.; BAUST, J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. **Cryobiology**, v. 37, n. 8, p. 171-186, 1998.

GAO, W. *et al.* Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2575-2585, 2014.

GARCEZ, T. N. A. **Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia**. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

- GEBLER, A. *et al.* The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 2, p. 128-134, 2012.
- GHIEH, F. *et al.* The use of stem cells in burn wound healing: a review. **BioMed Research International**, v. 2015, p.1-9, 2015.
- GIANOTTI, W. B. **Efeito das células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases iniciais da cicatrização de feridas cutâneas induzidas em camundongos.** 2015. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- GILBERT, J. C. *et al.* Temperature determination in the frozen region during cryosurgery of rabbit liver using MR image analysis. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 15, n. 6, p. 657-667, 1997.
- GINANI, F. *et al.* Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento *in vitro* de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 3, p. 359-363, 2012.
- GOLDSTEIN, R. S.; HESS, P. W. Cryosurgical treatment of cancer. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, n. 1, p. 51-64, 1977.
- GOMILLION, C. T.; BURG, K. J. L. Stem cells and adipose tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 36, p. 6052-6063, 2006.
- GREINER, T. P. *et al.* Cryosurgery. **Veterinary Clinics of North America**, v. 5, n. 3, p. 565-581, 1975.
- GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314-321, 2008.
- GUYURON, B.; VAUGHAN, C. A comparison of absorbable and nonabsorbable suture materials for skin repair. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 89, n. 2, p. 234-236, 1992.
- HAIK, J. *et al.* Deep Frostbite: the Question of Adjuvant Treatment. **Israel Medical Association Journal**, v. 18, p. 56-57, 2016.
- HALLAM, M. J. *et al.* Managing frostbite. **British Medical Journal**, v. 341, p. 58-64, 2010.
- HARIRCHI, I. *et al.* Frostbite: incidence and predisposing factors in mountaineers. **British Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 898-901, 2005.
- HARTLAPP, I. *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis *in vivo*. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 12, p. 2215-2224, 2001.

- 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.
- HASSI, J.; MÄKINEN, T. M. Frostbite: occurrence, risk factors and consequences. **International Journal of Circumpolar Health**, v. 59, p. 92-98, 2000.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 88, n. 2, p. 53-58, 2007.
- HEDLUND, C. S. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 135-230.
- HOCKING, A. M. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 1, n. 4, p. 166–171, 2012.
- HOFFMANN, N. E.; BISCHOF, J. C. The cryobiology of cryosurgical injury. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 40-49, 2002.
- HONG, J. S.; RUBINSKY, B. Patterns of ice formation in normal and malignant breast tissue. **Cryobiology**, v. 31, p. 109-120, 1994.
- HORWITZ, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.
- HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 25 ago. 2016.
- HOSGOOD, G. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2007. v. 1.
- HOSSEIN, K. M. *et al.* Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) Activated By Thromboplastin-D on the Repair and Regeneration of Wounds in Dogs. **Iranian Journal of Veterinary Surgery**, v. 3, n. 4, p. 19-30, 2008.
- IKÄHEIMO, T. M.; HASSI, J. Frostbites in circumpolar areas. **Global Health Action**, v. 4, p. 1-7, 2011.
- ITO, M. *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. **Nature Medicine**, n. 11, p. 1351-1354, 2005.
- 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. 20, n. 3, p. 1–9, 2012.
- JAUREGUI, C.; YOGANARASIMHA, S.; MADURANTAKAM, P. Mesenchymal stem cells derived from healthy and diseased human gingiva support osteogenesis on electrospun polycaprolactone scaffolds. **Bioengineering**, v. 5, n. 8, p. 1-16, 2018.

JONAT, W.; ARNOLD, N. Is the Ki-67 labelling index ready for clinical use? **Annals of Oncology**, v. 22, n. 3, p. 500-502, 2011.

JONES, D. L.; WAGERS, A. J. No place like home: anatomy and function of stem cell niche. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 11-21, 2008.

KANAZAWA, M. *et al.* The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. **International Journal of Implant Dentistry**, v. 4, n. 2, p. 1-11, 2018.

KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KHOSROTEHRANI, K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? Kiarash. **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 307-310, 2013.

KIM, C. H. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Improve Wound Healing In Vivo via Early Activation of Matrix Metalloproteinase-9 and Vascular Endothelial Growth Factor. **Cell therapy & Organ transplantation**, v. 26, p. 726-733, 2011.

KIM, J. *et al.* The Effects of Topical Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Canine Experimental Cutaneous Wounds. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 242-253, 2013.

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

KLINGER, M. *et al.* Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 32, n. 3, p. 465-469, 2008.

KORPAN, N. N. Cryosurgery in the 21st Century. In: _____. **Basics of Cryosurgery**. Slovenia: Springer Wien New York, p. 3-8, 2001.

KUFLIK, E. G. *et al.* History of dermatologic cryosurgery. **Dermatologic Surgery**, v. 26, p. 715-722, 2000.

KUFLIK, E. G. Cryosurgery for skin cancer: 30-year experience and cure rates. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. 2, p. 297-300, 2004.

LANE, J. G. Practical cryosurgery: an introduction for small animal Clinicians. **Journal of Small Animal Practice**, v. 15, p. 715-725, 1974.

LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M.; KO, G. M. **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. São Paulo: Atheneu, 2009. 708 p.

LAU, K. *et al.* Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. **Experimental Dermatology**, v. 18, p. 921-933, 2009.

LEE, D. K. *et al.* Técnicas de indução inalatória em ratos: estudo comparativo. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 34-37, 1994.

LEE, S. H. *et al.* Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. **Annals of Dermatology**, v. 23, n. 2, p. 150-155, 2011.

LEIRÓS, G. J. *et al.* Dermal Papilla Cells Improve the Wound Healing Process and Generate Hair Bud-Like Structures in Grafted Skin Substitutes Using Hair Follicle Stem Cells. **Stem Cells Translational Medicine**, n. 3, p. 1209-1219, 2014.

LEONARDI, D. *et al.* Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds. **Burns**, v. 38, p. 1143-1150, 2012.

LIPTAK, J. M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 408-413, 1997.

LIU, P. *et al.* Tissue-engineered skin containing mesenchymal stem cells improves burn wounds. **Artificial Organs**, v. 32, n. 12, p. 925-931, 2008.

LOSS, F. R. **Protocolo para estabelecimento de ferida cutânea crônica experimental em ratos Wistar**. 2013. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

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.

LU, F. *et al.* Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 15, p. 121-130, 2008.

LUCAS, R. **Monitorização e mensuração tomográfica de diferentes técnicas de crioterapia em pele de cães da raça Beagle, e sua relação com as medidas da necrose estimada pela histopatologia**. 2004. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LUCAS, R.; LARSSON, C. E. O uso da criocirurgia na dermatologia veterinária. **Clínica Veterinária**, n. 69, p. 74-84, 2007.

MAIA, M.; RIBEIRO, A. E. **Curso de criocirurgia**. São Paulo: centro de estudos dermatológicos Adolpho Carlos Linderberg - clínica de dermatologia da Santa Casa de São Paulo, 1997. 19 p. (Apostila)

MÄKINEN, T. M. *et al.* Factors affecting outdoor exposure in winter: population-based study. **International Journal Biometeorology**, v. 51, p. 27-36, 2006.

MÄKINEN, T. M. Human cold exposure, adaptation, and performance in high latitude environments. **American Journal of Human Biology**, v. 19, p. 155-164, 2007.

MÄKINEN, T. M.; HASSI, J. Health problems in cold work. **Industrial Health**, v. 47, p. 207-220, 2009.

MANI, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, p. 704–715, 2008.

MARCIANI, R. D.; TRODAHL, M. J. Postoperative sequelae of cryosurgery. **Journal Oral Surgery**, v. 33, n. 6, p. 458-461, 1975.

MARQUES, L. A. C. **Criocirurgia: nossa experiência**. 1989. 83 f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1989.

MARSHALL, C. D. *et al.* Cutaneous Scarring: Basic Science, Current Treatments, and Future Directions. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 2, p. 29-45, 2016.

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.

MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH. **Stages of frostbite**. Disponível em: <<https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/frostbite/multimedia/img-20114490>>. Acesso em: 31 jan. 2018.

MCFARLIN, K. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, n. 4, p. 471–478, 2006.

MCINTOSH, S. E. *et al.* Wilderness medical society practice guidelines for the prevention and treatment of frostbite. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 22, p. 156-166, 2011.

MEIRELLES, L. S.; NARDI, N. B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, n. 123, p. 702–711, 2003.

MEIRELLES, L. S. *et al.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MENDONÇA, R.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MEYER, L. A. *et al.* Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. **Burns**, v. 38, n. 2012, p. 820-829, 2012.

MIZUNO, H. *et al.* Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. **Stem Cell Regenerative Medicine**, v. 30, p. 804-810, 2012.

- NAKAGAMI, H. *et al.* Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as a Novel Option for Regenerative Cell Therapy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 13, n. 2, p. 77-81, 2006.
- NEEL, H. B. *et al.* Requisites for successful cryogenic surgery of cancer. **Archives of Surgery**, v. 102, p. 45-52, 1971.
- NISHIDA, H. *et al.* Cryoimmunology for malignant bone and soft-tissue tumors. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 16, p. 109-117, 2011.
- NORHEIM, A. J. *et al.* A new treatment for frostbite sequelae: Botulinum toxin. **International Journal of Circumpolar Health**, v. 76, p. 1-5, 2017.
- NWOMEH, B. C. *et al.* Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 1998.
- OTTO, W. R.; WRIGHT, N. A. Mesenchymal Stem Cells: From Experiment to Clinic. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 4, n. 1, p. 20, 2011.
- PAPINI, R. Management of burn injuries of various depths. **BMJ**, n. 329, p. 158-160, 2004.
- PARK, J. E. *et al.* Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v. 187, n. 5, p. 11-16, 2004.
- PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal reconstructive surgery**. 3 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 679 p.
- PEREIRA, J. R. C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cefalín, heparina e alantoína. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 8, p. 603-608, 2003.
- PESSOA, W.S. *et al.* Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 665-670, 2012.
- PIMENTEL, C. B. **Estudo dos efeitos celulares e vasculares da criocirurgia com nitrogênio líquido, na pele de ratos, por método histopatológico**. 2011. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
- PINTO FILHO, S. T. L. *et al.* Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20 (Edição Comemorativa), p. 49-59, 2013.
- PODKONJAK, K. R. Veterinary cryotherapy. A comprehensive look at uses, principles, and successes. **Veterinary Medicine & Small Animal Clinician**, v. 77, p. 51-64, 1982.

PROVIC, P. Health aspects of Antarctic tourism. **Journal of Travel Medicine**, v. 5, p. 210-212, 1998.

QUEIROZ, G. F. *et al.* Clinical study of cryosurgery efficacy in the treatment of skin and subcutaneous tumors in dogs and cats. **Veterinary Surgery**, v. 37, p. 438-443, 2008.

RAISER, A. G. Feridas. In: **Patologia Cirúrgica Veterinária**. 1 ed. Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, 1995. v. 2, cap. 6, p. 137-156.

RASMUSSEN, I. *et al.* Mesenchymal Stem Cells Inhibit Lymphocyte Proliferation by Mitogens and Alloantigens by Different Mechanisms. **Experimental Cell Research**, v. 305, p. 33-41, 2005.

RASULOV, M. F. *et al.* Cell transplantation inhibits inflammatory reaction and stimulates repair processes in burn wound. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 142, n. 1, p. 112-115, 2006.

RICHTER, G. T. *et al.* Impact of Vascular Endothelial Growth Factor on Skin Graft Survival in Irradiated Rats. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v. 11, n. 2, p. 110-113, 2009.

RIGOTTI, G. *et al.* Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 119, n. 5, p. 1409-1422, 2007.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Renovação, regeneração e reparo dos tecidos. In: **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROH, C.; LYLE, S. Cutaneous Stem Cells and Wound Healing. **Pediatric Research**, v. 59, n. 4, p. 100-103, 2006.

RUBINSKY, B. Cryosurgery. **Annual Reviews of Biomedical Engineering**, v. 2, p. 157-187, 2000.

SACHS, C. *et al.* The triaging and treatment of cold-induced injuries. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 112, n. 44, p. 741-747, 2015.

SANDISON, G. A. Future directions for cryosurgery computer treatment planning. **Urology**, v. 60, n. 2, p. 50-55, 2002.

SASAKI, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **The Journal of Immunology**, v. 180, p. 2581-2587, 2008.

SCHANAIDER, A.; SILVA, P. C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 4, 2004.

SEIFERT, A. W. *et al.* Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. **PlosOne**, v. 7, n. 4, p.e32875, 2012.

SEIM, H. B. Mechanisms of cold-induced cellular death. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 755-762, 1980.

SEPHEL, G. C.; WOODWARD, S. C. Reparação, regeneração e fibrose. In: RUBIN, E. **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 89-120.

SHUMAKOV, V. I. *et al.* Mesenchymal bone marrow stem cells more effectively stimulate regeneration of deep burn wounds than embryonic fibroblasts. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 136, n. 2, p. 192-195, 2003.

SILVERMAN, S. G. *et al.* MR imaging-guided percutaneous cryotherapy of liver tumors: initial experience. **Radiology**, v. 217, p. 657-664, 2000.

SKARDAL, A. *et al.* Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of large skin wound. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 11, p. 792-802, 2012.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Brunner & Suddarth: Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 30, 2010.

SPRADA, A. G. *et al.* Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35 (Supl.1), p. 15-20, 2015.

STERODIMAS, A. *et al.* Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS**, v. 63, n. 11, p. 1886-1892, 2010.

STOCUM, L. Repair of skin wounds by fibrosis. **Regenerative biology and medicine**. New York: Elsevier, 2006. p. 21-39.

SWAIN, S. F.; HENDERSON, R. A. **Small Animal Wound Management**. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 444 p.

TANAKA, S.; OHKUMA, T.; ISHII, Z. Experimental Cryoimmunology. In: KORPAN, N. N. **Basics of cryosurgery**. Slovenia: Springer Wien New York, 2001. p. 31-39.

TERRACIANO, P. *et al.* Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

TESHIMA, T.; MATSUMOTO, H.; KOYAMA, H. Soluble factors from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote canine hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, e0191539, 2018.

THEORET, L. The pathophysiology of wound repair. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 21, p. 1-13, 2005.

TRAVIS, S. ROBERTS, D. Arctic willy. **British Medical Journal**, v. 299, p. 1573-1574, 1989.

TRIMBOS, J. B. *et al.* The Donati stitch revisited: favorable cosmetic results in a randomized clinical trial. **Journal of Surgical Research**, v. 107, n. 1, p. 131-134, 2002.

TSUJI, W. *et al.* Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 312-321, 2014.

TUFIK, S. *et al.* **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. São Paulo: Unifesp – Universidade Federal de São Paulo, 2004.

UYSAL, C. A. *et al.* Effect o mesenchymal stem cells on skin graft to flap fabrication, an experimental study. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 2, p. 237-244, 2010.

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.

VALENTE, F. S. **Terapia tópica na cicatrização de lesões cutâneas provocadas por congelamento com nitrogênio líquido em ratos Wistar**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

VAN, L. R.; RONCARI, D. A. K. Isolation of fat cell precursors from adult rat adipose tissue. **Cell and Tissue Research**, v. 181, p. 197-203, 1977.

VIDIGAL, F. M.; PETROIANU, A. Avaliação de cicatrizes cutâneas: apresentação de um método quantitativo. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 2, p. 121-127, 2010.

VIDOR, S. B. **Células-tronco mesenquimais de origem adiposa associadas a enxertos livres de pele de espessura total em modelo murino**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

WAN, L. *et al.* Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

WANG, Y. *et al.* Future application of hair follicle stem cells: Capable in differentiation into sweat gland cells. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 18, p. 3545–3552, 2013.

- WARD, M. Frostbite. **British Medical Journal**, v.1, p. 67-70, 1974.
- WITHROW, S. J.; GREINER, T. R.; LISKA, W. D. Cryosurgery: veterinary considerations. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 11, p. 271-282, 1975.
- WITHROW, S. J. General principles of cryosurgical technique. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 10, n. 4, p. 779-786, 1980.
- WITHROW, S. J. **Clinical veterinary oncology**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1989. p. 107-111.
- WU, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.
- XING, L.; KOBAYASHI, K. Ability of transplanted cultured epithelium to respond to dermal papillae. **Tissue Engineering**, n. 7, p. 535-544, 2001.
- 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. 1327–1336, 2013.
- YANG, M. *et al.* Stem Cell Therapy for Lower Extremity Diabetic Ulcers: WhereDoWeStand? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- YANG, Y. *et al.* Scalded skin of rat treated by using fibrin glue combined with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells. **Annals of Dermatology**, v. 26, n. 3, p. 289–295, 2014.
- YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adipose humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.
- YOUNG, T. K.; MÄKINEN, T. M. The health of Arctic populations: does cold matter? **American Journal of Human Biology**, v. 22, p. 129-133, 2010.
- ZACARIAN, S. A. Cryogenics: the cryolesion and the pathogenesis of cryonecrosis. In: _____. **Cryosurgery for skin cancer and cutaneous disorders**. St. Louis: C.V. Mosby Company, 1985. p. 1-30.
- ZONTA, S. *et al.* Which is the most suitable and effective route of administration for mesenchymal stem cell-based immunomodulation therapy in experimental kidney transplantation: endovenous or arterial? **Transplantation Proceedings**, v. 42, n. 4, p. 1336–1340, 2010.
- ZUK, P. A. *et al.* Human Adipose Tissue is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

APÊNDICE A – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

FICHA CONTROLE CIRÚRGICO

Animal: _____ Peso: _____ g

Data da indução da ferida (CRIOCIRURGIA): ____/____/____

Grupo:

CONTROLE 1 (C1)

CONTROLE 2 (C2)

SHAM 1 (S1)

SHAM 2 (S2)

TRATAMENTO 1 (T1)

TRATAMENTO 2 (T2)

TRATAMENTO 3 (T3)

SHAM 3 (S3)

Protocolo anestésico: Isoflurano Outro Qual? _____

Tempo anestésico: Início: _____ Fim: _____ Total: _____

Tempo de congelamento – JATO CONTÍNUO: _____

Tempo de congelamento – JATOS INTERMITENTES: _____

Tempo de descongelamento: _____

Tempo cirúrgico: Início: _____ Fim: _____ Total: _____

Intercorrência(s)? Qual(is)? _____

Extensão da Ferida: Crânio-caudal _____ mm

Látero-lateral _____ mm

Número do Registro Fotográfico: _____

Observações:

APÊNDICE B – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

FICHA AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

Animal: _____

Grupo:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> CONTROLE 1 (C1) | <input type="checkbox"/> CONTROLE 2 (C2) |
| <input type="checkbox"/> SHAM 1 (S1) | <input type="checkbox"/> SHAM 2 (S2) |
| <input type="checkbox"/> TRATAMENTO 1 (T1) | <input type="checkbox"/> TRATAMENTO 2 (T2) |
| <input type="checkbox"/> TRATAMENTO 3 (T3) | <input type="checkbox"/> SHAM 3 (S3) |

FERIDA:

1. Extensão: Crânio-caudal _____ mm Látero-lateral _____ mm
2. Crosta (crionecrose): Não Sim Pouco aderida Muito aderida
3. Tecido de Granulação: Não Sim + Sim ++ Sim +++
4. Eritema Edema Prurido Secreção/Exudato Sangramento
 - A) Localização na lesão: Margens Central Generalizado
 - B) Localizado ao redor da lesão
 - C) Grau: Ausente Pouco Moderado Acentuado
5. Dor local/Escore: Ausente Pouco Moderado Acentuado
6. Observações:

Data: _____

Examinadora: _____

Legenda: (0) Ausente (+) Pouco (++) Moderado (+++) Acentuado

APÊNDICE C – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

FICHA CONTROLE BIÓPSIA

Animal: _____ Peso: _____ g

Data da indução da ferida (CRIOCIRURGIA): ____/____/____

Data da biópsia: ____/____/____

Grupo:

CONTROLE 1 (C1)

CONTROLE 2 (C2)

SHAM 1 (S1)

SHAM 2 (S2)

TRATAMENTO 1 (T1)

TRATAMENTO 2 (T2)

TRATAMENTO 3 (T3)

SHAM 3 (S3)

Extensão da Ferida:

Crânio-caudal _____ mm

Látero-lateral _____ mm

Número do Registro Fotográfico: _____

Destino do material: _____

Observações:

ANEXO A – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM MODELO DE LESÃO CUTÂNEA INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE POR NITROGÊNIO LÍQUIDO EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 3468300117, sob a responsabilidade de **Daniel Curvello de Mendonça Müller e equipe; Fernanda Soldatelli Valente; Amanda Oliveira de Andrades; Cibele Lima Lhamas; Matheus Pippi da Rosa; Nathalia Franco** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 08/03/2017.

We certify that the proposal "STEM CELLS MESENCHYMAL IN A MODEL OF SKIN INJURY EXPERIMENTALLY INDUCED BY LIQUID NITROGEN IN WISTAR RATS", utilizing 95 Heterogenics rats (95 males), protocol number CEUA 3468300117, under the responsibility of **Daniel Curvello de Mendonça Müller and team; Fernanda Soldatelli Valente; Amanda Oliveira de Andrades; Cibele Lima Lhamas; Matheus Pippi da Rosa; Nathalia Franco** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 03/08/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **06/2018**

Área: **Clínica de Pequenos Animais**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **45 a 65 dias**

N: **95**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Resumo: A criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas e órgãos, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, sendo sua maior indicação o tratamento de dermatopatias. Contudo, efeitos adversos como a cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional, são relatados após a aplicação da substância criogênica. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência das células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) na cicatrização de feridas cutâneas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos Wistar, em duas fases da cicatrização cutânea: fase de proliferação e/ou fase de remodelação. Serão utilizados 95 ratos Wistar, machos, hípidos, entre sete e oito semanas de idade, sendo 15 animais para coleta de gordura para posterior obtenção das ADSCs e, 80 animais divididos aleatoriamente em oito grupos de dez animais cada. Através da aplicação do nitrogênio líquido pela técnica do spray aberto, será realizada a indução de uma ferida, de aproximadamente 15 mm de diâmetro, na região dorsal de cada rato. A ferida receberá o tratamento de acordo com o grupo ao qual pertence: (1) aplicação das ADSCs, por via intradérmica, no 15º dia (T1), no 30º dia (T2) ou nos dois tempos mencionados anteriormente (T3) após a indução da lesão; (2) aplicação de solução cloreto de sódio 0,9% (veículo das ADSCs), por via intradérmica, no 15º dia (S1), no 30º dia (S2) ou nos dois tempos mencionados anteriormente (S3) após a indução da lesão; (3) sem intervenção alguma até o momento da eutanásia dos animais no 45º dia (C1) ou no 60º dia (C2) após a indução da lesão. Macroscopicamente, a cada cinco dias, serão analisadas as medidas das lesões e calculada a área e a taxa de contração cicatricial das mesmas. No 45º ou no 60º dia de pós-operatório (dependendo de cada grupo), será realizada a coleta das biópsias para avaliação histopatológica e imuno-histoquímica, quanto à presença de células inflamatórias, intensidade de deposição de colágeno, proliferação epitelial e angiogênese. Espera-se que a utilização das ADSCs, aplicadas em uma ou em duas fases da cicatrização (fase de proliferação e/ou fase de remodelação), acelere o processo de cicatrização e regeneração cutânea, bem como minimize os efeitos estéticos indesejados da criocirurgia, quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento com as ADSCs).

Local do experimento: Laboratório de Terapia Celular e Regenerativa (Bloco 6) e Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) (Bloco 5) do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da UFSM.

Santa Maria, 17 de janeiro de 2018

ANEXO B – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO
HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

Solução A: HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina	0,5 g
Álcool absoluto	5 ml
Alúmen de potássio ou amônio	10 g
Óxido vermelho de mercúrio	0,25 g
Água destilada	100 ml

Preparo: Dissolver a hematoxilina no álcool, e o alúmen a quente na água. Misturar as duas soluções. Levar a mistura à ebulição o mais breve possível; depois de remover do fogo, juntar o óxido vermelho de mercúrio. Aquecer novamente a solução até ficar vermelha escura durante 1 minuto; em seguida, remover do fogo o recipiente e deixá-lo esfriar rapidamente em água fria ou na geladeira. A solução depois de esfriada está pronta para uso.

Solução B: EOSINA

Eosina Y (amarela hidrossolúvel)	0,5 g
Água destilada	10 ml
Álcool a 95%	90 ml
Ácido acético (optativo)	1 gota

Preparo: Dissolver a eosina Y em água destilada e depois juntar o álcool a 95%. A adição do ácido acético aumenta a intensidade da coloração, mas diminui a durabilidade do corante.

Solução C: DIFERENCIADOR

Álcool a 95%	100 ml
Ácido clorídrico	5 gotas

TÉCNICA:

1. Desparafinizar, alcoolizar e hidratar;
2. Hematoxilina durante 10 minutos;
3. Lavar em água corrente até azulecer os cortes;
4. Diferenciar rapidamente em álcool-ácido;
5. Lavar em água corrente, por 5 a 10 minutos;
6. Lavar rapidamente em álcool a 95%;
7. Eosina durante 1 a 2 minutos;
8. Diferenciar em álcool a 95%;
9. Desidratar, diafanizar e montar.

Fixação: Formól, Bouin, Duboscq-Brasil, Helly

Cortes: parafina ou congelação

ANEXO C – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

PROTOCOLO DE COLORAÇÃO
TRICÔMICO DE MASSON (TM)

HEMATOXILINA DE WEIGERT

Solução A

Hematoxilina 1 g
Álcool 95% 100 ml

Solução B

Cloreto Férrico 30% 4 ml
Ácido Clorídrico 1 ml
Água destilada 100 ml

Solução de trabalho: Juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B.

CLORETO FÉRRICO 30%

Cloreto Férrico 30 g
Água destilada 100 ml

ÁCIDO ACÉTICO 1%

Ácido acético glacial 1 ml
Água destilada 100 ml

PONCEAU XILIDINE 1%

Ponceau Xilidine 1 g
Ácido acético 1 ml
Água destilada 100 ml

FUCSINA ÁCIDA 1%

Fucsina ácida 1 g
Ácido acético 1 ml
Água destilada 99 ml

Solução de trabalho: PONCEAU XILIDINE 1% 1 ml
FUCSINA ÁCIDA 1% 2 ml

(Não reaproveitar essa solução.)

ÁCIDO FOSFOMOLIBDICO 1%

Ácido fosfomolibdico 1 g
Água destilada 100 ml

LIGHT GREEN 2% (estoque)

Light Green 2 g
Ácido acético 1 ml
Água destilada 99 ml

LIGHT GREEN 20% (uso)

Light Green 2% (estoque) 20 ml
Água destilada 100 ml

TÉCNICA:

1. Desparafinizar e hidratar;
2. Hematoxilina de Weigert (férrico), durante 5 minutos;
3. Lavar em água corrente, durante 5 minutos;
4. Ponceau Xilidine 1% + Fucsina ácida, durante 5 minutos;
5. Lavar em água destilada;
6. Ácido Fosfomolibdico 1%, durante 5 minutos;
7. Lavar em água destilada;
8. Light Green (solução uso – 20%), durante 15 minutos;
9. Lavar em água destilada;
10. Ácido acético 1%, durante 1 minuto;
11. Desidratar, clarificar e montar a lâmina.

ANEXO D – Células-tronco mesenquimais em modelo de lesão cutânea induzida experimentalmente por nitrogênio líquido em ratos Wistar. Valente, F. S. (2018)

PROCOLO TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Fixação

Fixadores: substâncias químicas que mantêm a integridade do tecido após a morte, sem alteração da estrutura celular, na unidade de Patologia Experimental (UPE) é utilizado o formol 10 % tamponado preparado da seguinte forma:

900 ml de água destilada;
100 ml de formalina 37%;
1 frasco de tampão PBS;

Em um frasco de vidro ou de plástico que comporte 20x do volume da amostra que não pode ser de espessura maior que 5mm.

O tempo de fixação é em média de 24h à 72h.

Descalcificação

Para que possa examinar o tecido ósseo ou tecido com área calcificada, este deve ser descalcificado, neste caso é utilizado na unidade de Patologia Experimental (UPE) o ácido nítrico 10% preparado da seguinte forma:

900 ml de água destilada;
100 ml de ácido nítrico;

Trocamos diariamente até obter o resultado desejado.

Processamento

Desidratação: processo de retirada da água do interior do tecido utilizando uma série gradativa de 8 alcoóis etílicos.

Uma rápida lavada em água 1° e 2° (50%), 3° e 4° (70%), 5° e 6° (80%), 7° (90%) e 8° absoluto.

Sendo uma hora em cada.

Diafanização

Entre a desidratação e a impregnação é necessário diafanizar a parafina, pois álcool e parafina não são miscíveis, o qual usamos o xilol em uma sequência de 2.

Impregnação em parafina

É utilizada duas parafinas a 65°C por uma hora cada, para que a peça possa passar para a inclusão em parafina.

O fragmento (peça) será retirado da cápsula e colocado em forma com parafina 65°C, seguindo a devida orientação de posição, considerando a área que será analisada na lâmina, identificando o bloco de parafina com a numeração previamente realizada e colocada dentro da cápsula respectiva.

Desenformar após o resfriamento.

Microtomia

Os cortes são realizados no micrótomo com a espessura e o ângulo convenientes ao tecido a ser trabalhado.

Lavagem de lâminas para sinalização

1. Colocar em cestos;
2. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;
3. Colocar em cestos com lâminas em cuba com organo-silano 10% por 1 min;
4. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;
5. Colocar em cesto com lâminas em cuba com acetona;

Imuno Histoquímica

1. Médico Patologista solicita imuno em um formulário específico (IHQ-MOD);
2. Técnica recolhe o material na sala de microscopia, leva até a área técnica onde se providencia blocos em parafina;

Corte de bloco de parafina

1. Realizar cortes de 3 micras em um bloco pré-preparado em organo-silano;
2. Centralizar o selo com o fragmento na lâmina;
3. Após identificação, colocar em um cesto para que seja desparafinado;

Desparafinização e Hidratação

1. Colocar em estufa por 12 horas à 60°C ou por 40 minutos à 80°C;
2. Passar os cestos com as respectivas lâminas em cubas com:
3. Xilol por 5 minutos;
4. Xilol por 5 minutos;
5. Álcool;
6. Álcool;
7. Álcool;
8. Álcool;
9. Água destilada;
10. PBS, por 5 minutos;

Recuperação Antigênica

1. Lâminas em cuba frisada horizontal;
2. Incubação em tampão citrato pH 6 (0,02g de ácido cítrico em 1 L de água destilada, usando hidróxido de sódio para ajustar o pH);
3. 2 gotas de Tween;
4. Banho-Maria de 95°C, por 20 minutos;
5. Descansa por 10 minutos, com o Banho-Maria desligado;
6. Água destilada por duas vezes;
7. Em PBS, por 5 minutos;

Bloqueio da Peroxidase Endógena

1. Lâmina em imersão em cuba frisada, em sentido horizontal;
2. Fazer duas vezes o mesmo processo: deixar com peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 10 minutos;
3. 2x água destilada;
4. PBS, por 5 minutos;

Bloqueio das reações inespecíficas

1. Circular o corte das lâminas com caneta Dakopen;
2. Protein Block REF DPB-125 por 10 minutos;
3. PBS por 5 minutos;

Anticorpo Primário

1. Anticorpo específico diluído em PBS;
2. Pingar o anticorpo primário no centro do círculo;
3. Câmara por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente ou overnight em geladeira à 4°C;

Flash

1. Remoção do anticorpo primário;
2. Lavar lâmina por lâmina em água corrente 1x;
3. PBS, por 5 minutos 3x;

Anticorpo Secundário

1. Pingar na lâmina o anticorpo secundário;
2. Incubar por 30 minutos em câmara escura;
3. PBS, 3x por 5 minutos;

Streptavidina (Ligar Ac 1° e Ac 2°)

1. Pingar na lâmina a streptavidina em câmara escura;
2. Incubar por 30 minutos;
3. PBS, 3x por 5 minutos;

Revelação**Kit Dab:**

1. 1,5 mL do diluente com 1 gota de cromógeno, pingar na lâmina, se positivo esperar, em média, por 1 minuto até obter um resultado em cor caramelo;
2. Água destilada;
3. Lâmina em cestos na cuba;

Contra coloração:

1. Hematoxilina de Harris por 20 segundos (contra coloração);
2. Água corrente;
3. Água amoniacal (amônia 2% em água destilada) para azular;
4. Água corrente;
5. Álcool por 3 vezes;
6. Xilol por 3 vezes;
7. Montagem de lâminas;