

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

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

Nathalia Franco

PORTO ALEGRE

2020

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

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

Autor: Nathalia Franco

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

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Coorientadora: Dra. Fernanda dos Santos de Oliveira

PORTO ALEGRE

2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

Franco, Nathalia

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

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Fernanda dos Santos de Oliveira.

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

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

Nathalia Franco

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

Aprovada em 31 de março de 2020.

APROVADO POR

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Anatomia da pele e cicatrização	15
3.2 Enxertos cutâneos no reparo de feridas	20
3.3 Terapia celular e cicatrização cutânea	23
4 CONCLUSOES	26
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO 1	34

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos

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

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia da pele e cicatrização

3.1.1 Anatomia e fisiologia cutâneas

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

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

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

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

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

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

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

3.1.2 Anexos cutâneos

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

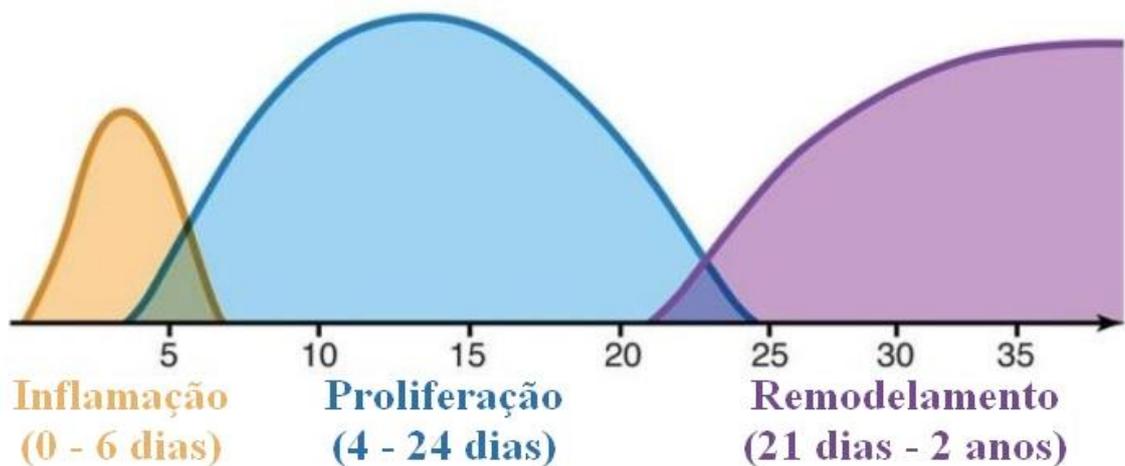
Os tipos de anexo dividem-se em folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas (SUNDBERG, 2018). Os folículos pilosos se localizam na porção mais profunda da derme, assim como no panículo carnoso, em roedores, e no tecido subcutâneo (PAVLETIC, 2018). As glândulas sebáceas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

3.1.3 Fisiologia do processo de cicatrização

A cicatrização cutânea é um processo complexo e contínuo, resultando em formação cicatricial, e se dá a partir de três fases com períodos de sobreposição entre si,

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

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



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

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

permanente ou incontrolado, decorrente da liberação de espécies reativas a oxigênio (ROS) pode ser observada a formação de feridas crônicas, com permanência do estado inflamatório (YOUNG; McNAUGHT, 2011; KANJI; DAS, 2017; PAVLETIC, 2018; BILGEN *et al.*, 2019).

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

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

3.2 Enxertos cutâneos no reparo de feridas

3.2.1 Tipos e indicações de enxertos

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

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

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

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

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

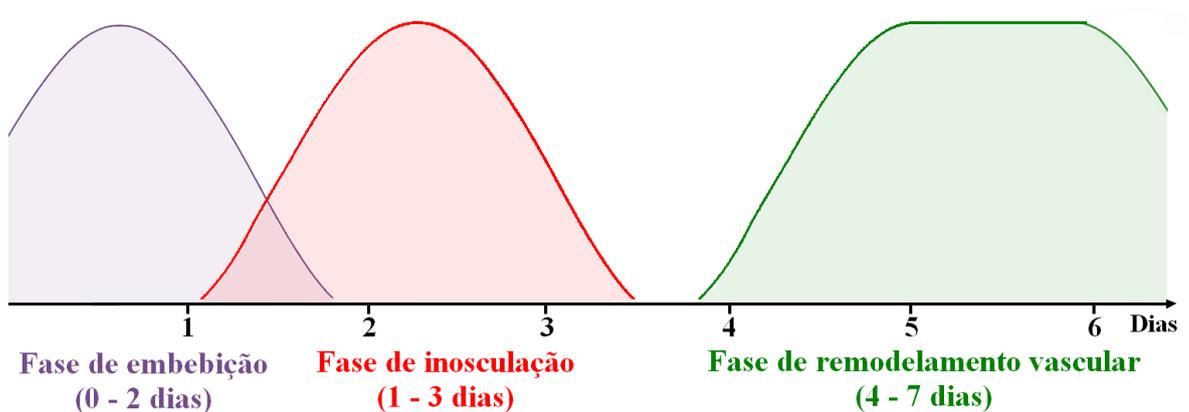
3.2.2 Fases de cicatrização de enxertos cutâneos

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

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

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

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



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

3.2.3 Complicações

Faz-se necessária a imobilização da ferida por até cinco dias, visando a redução da taxa de contração, principalmente em enxertos de espessura parcial (SERRA *et al.*, 2016). Além disso, a imobilização do tecido enxertado também permite melhor aderência entre o tecido e o leito receptor, assim como a manutenção e viabilidade de

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

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

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

3.3 Terapia celular e cicatrização cutânea

3.3.1 Origem de células tronco e suas capacidades

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

Mesenchymal stem cells), provenientes do próprio indivíduo após o nascimento (ZUK *et al.*, 2001).

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

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

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

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

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), os critérios para sua caracterização envolvem capacidade de aderência ao plástico, diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Além disso, devem manifestar expressão positiva aos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e expressão negativa para

CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD 19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006).

3.3.3 Indicações de terapia celular em cirurgia reconstrutiva

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

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

3.3.4 Uso de terapia celular na cicatrização cutânea

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

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

fatores de crescimento pró-angiogênicos, citocinas e quimiocinas responsáveis pelo processo cicatricial e redução na inflamação e estresse tecidual (UYSAL *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2014; TSUJI, 2014; DENU; HEMATTI, 2016; McCARTHY *et al.*, 2018).

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

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

4 CONCLUSÕES

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

1. A localização de ADSCs marcadas nos dois dias de avaliação demonstra que, após a liberação e regulação de fatores de crescimento, imunomodulação e mobilização até o tecido lesado, as células demonstram uma maior preferência por tecidos em constante regeneração como folículos pilosos e epiderme
2. A utilização de ADSCs na fase inicial de cicatrização de enxertos cutâneos de espessura completa promove a neovascularização precoce, com dados obtidos a partir da análise molecular quanto ao aumento de expressão de VEGF, bFGF, FGFR, EGF, CD34, α -SMA e redução do fator de hipóxia HIF-1 α
3. Animais tratados com ADSC demonstraram menor taxa de contração dos enxertos cutâneos, fator capaz de reduzir a morbidade e necessidade de reintervenção cirúrgica de pacientes após a enxertia

4. A utilização de ADSCs não diminuiu significativamente as taxas de necrose, sangramento ou exsudato no grupo tratado quando comparado aos demais
5. Apesar de não demonstrar diferença significativa na avaliação histopatológica, através da análise molecular foi possível perceber redução da infiltração inflamatória no grupo tratado com ADSCs
6. Animais tratados com ADSCs demonstraram menor expressão de óxido nítrico, com dados obtidos a partir da atividade de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e seus metabólitos finais, nitrito e nitrato (NOx)
7. O grupo ADSC apresentou maior expressão dos componentes do sistema plasmina-plasminogênio, envolvido na liberação e regulação de fatores de crescimento pró-angiogênicos e redução na expressão de seu principal inibidor, PAI-1
8. Animais tratados com ADSCs demonstraram menor presença de marcadores relacionados ao stress e conseqüente dano oxidativo que os demais grupos.

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

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

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREASSI, A.; BILENCI, R.; BIAGIOLI, M.; D'ANIELLO, C. Classification and pathophysiology of skin grafts. *Clinics in Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 332-337, 2005.
- BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; McINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMANN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft *in vivo*. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.
- BILGEN, F.; URAL, A.; KURUTAS, E. B.; BEKERECIOGLU, M. The effect of oxidative stress and Raftlin levels on wound healing. **International Wound Journal**, v. 16, n. 5, p. 1178-1184, 2019.

- BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. **Science**, v. 344, n. 6189, p. 1242281, 2014.
- BULLER, M.; LEE, T. J.; DAVIS, J.; WILHELMI, B. J. Bolstering skin grafts with a surgical scrub brush: a cost-effective solution. **Eplasty**, v. 17, e21, 2017.
- CAPLA, J. M.; CERADINI, D. J.; TEPPER, O. M.; CALLAGHAN, M. J.; BHATT, K. A.; GALIANO, R. D.; LEVINE, J. P.; GURTNER, G. C. Skin graft vascularization involves precisely regulated regression and replacement of endothelial cells through both angiogenesis and vasculogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 3, p. 836-844, 2006.
- CLAY, L.; STARK, B.; GUNNARSSON, U.; STRIGÅRD, K. Full-thickness skin graft vs. synthetic mesh in the repair of giant incisional hernia: a randomized controlled multicenter study. **Hernia**, v. 22, n. 2, p. 325-332, 2018.
- DARRACH, H.; KOKOSIS, G.; BRIDGHAM, K.; STONE, J. P.; LANGE, J. R.; SACKS, J. M. Comparison of keystone flaps and skin grafts for oncologic reconstruction: A retrospective review. **Journal of Surgical Oncology**, v. 119, n. 7, p. 843-849, 2019.
- DE BEM, D. M.; MACIEL, C. D.; ZUANON, J. A.; NETO, C. B.; PARIZOTTO, N. A. Histological analysis of healthy epithelium of Wistar rats in vivo irradiated with different intensities of therapeutic ultrasound. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 14, n. 2, p. 114-120, 2010.
- DE UGARTE, D. A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P. A.; ZHU, M.; DRAGOO, J. L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M. H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, v. 174, n. 3, p. 101-109, 2003.
- DENU, R. A.; HEMATTI, P. Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, ID 2989076, 2016.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- ERWIN; ETRIWATI; GUNANTI; HANDHARYANI, E.; NOVIANA, D. Changes in histopathology and cytokeratin AE1/AE3 expression in skin graft with different time on Indonesian local cats. **Veterinary World**, v. 10, n. 6, p. 662-666, 2017.

- FENG, N.; JIA, Y.; HUANG, X. Exosomes from adipose-derived stem cells alleviate neural injury caused by microglia activation via suppressing NF- κ B and MAPK pathway. **Journal of Neuroimmunology**, v. 334, ID 576996, 2019.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2012.
- GAO, Y.; GAO, B.; ZHU, H.; YU, Q.; XIE, F.; CHEN, C.; LI, Q. Adipose-derived stem cells embedded in platelet-rich plasma scaffolds improve the texture of skin grafts in a rat full-thickness wound model. **Burns**, in press, 2019.
- GREAVES, N. S.; IQBAL, S. A.; BAGUNEID, M.; BAYAT, A. The role of skin substitutes in the management of chronic cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 2, p. 194-210, 2013.
- GUOGIENÉ, I.; KIEVISAS, M.; GRIGAITÉ, A.; BRAZIULIS, K.; RIMDEIKA, R. Split-thickness skin grafting: early outcomes of a clinical trial using different graft thickness. **Journal of Wound Care**, v. 27, n. 1, p. 5-13, 2018.
- HARPER, D.; YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 32, n. 9, p. 445-450, 2014.
- HARRISON, C. A.; MacNEIL, S. The mechanism of skin graft contraction: An update on current research and potential future therapies. **Burns**, v. 34, n. 2, p. 153-163, 2008.
- ISENBERG, J. S.; RIDNOUR, L. A.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A.; ROBERTS, D. A. Nitric oxide in wound healing. **Microsurgery**, v. 25, n. 5, p. 442-451, 2005.
- JALLER, J. A.; HERSKOVITZ, I.; BORDA, L. J.; MERVIS, J.; DARWIN, E.; HIRT, P. A.; LEV-TOV, H.; KIRSNER, R. S. Evaluation of donor site pain after fractional autologous full-thickness skin grafting. **Advances in Wound Care**, v. 7, n. 9, p. 309-314, 2018.
- JIANG, D.; QI, Y.; WALKER, N. G.; SINDRILARU, A.; HAINZL, A.; WLASCHEK, M.; MacNEIL, S.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 10, p. 2501-2515, 2013.
- KABASHIMA, K.; HONDA, T.; GINHOUX, F.; EGAWA, G. The immunological anatomy of the skin. **Nature Reviews: Immunology**, v. 19, n. 1, p. 19-30, 2018.
- KAMRAN, A.; JAVAD, F. M.; SAHRAM, F.; JABER, M. S. A comparison of survival and secondary contraction in expanded versus conventional full-thickness skin grafts: an experimental study in rats. **Eplasty**, v. 12, e20, p. 188-193, 2012.

- KANJI, S.; DAS, H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, ID 5217967, 2017.
- KERN, B.; SUCHER, R. Ischemia and reperfusion injury in reconstructive transplantation. **Anaplastology**, v. 2, n. 2, ID 1000108, 2013.
- KIM, C. H.; LEE, J. H.; WON, J. H.; CHO, M. K. Mesenchymal stem cells improve wound healing *in vivo* via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. **Journal of Korean Medical Science**, v. 26, n. 6, p. 726-733, 2011.
- KIM, P. J.; APPLEWHITE, A.; DARDANO, A. N.; FERNANDEZ, L.; HALL, K.; McELROY, E.; MENDEZ-EASTMAN, S.; OBST, M. A.; THOMAS, C.; WADDELL, L.; WIRTH, G.; TÉOT, L. Use of a novel foam dressing with negative pressure wound therapy and instillation: recommendations and clinical experience. **Wounds**, v. 30, n. 3, p. S1-S17, 2018.
- KING, A.; BALAJI, S.; KESWANI, S. G.; CROMBLEHOLME, T. M. The role of stem cells in wound angiogenesis. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 10, p. 614-625, 2014.
- KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. In: MUEHLBAUER, P.; McGOWAN, C. **Site-Specific Cancer Series: Skin Cancer**. 3 ed. Pittsburgh: Oncology Nursing Society, 2009. cap. 1.
- KONDO, T.; ISHIDA, Y. Molecular pathology of wound healing. **Forensic Science International**, v. 203, n. 1-3, p. 93-98, 2010.
- KRAUSZ, A.; FRIEDMAN, A. J. Nitric oxide as a surgical adjuvant. **Future Science OA**, v. 1, n. 1, FSO56, 2015.
- MACFARLANE, D. F. Current techniques in skin grafting. **Advances in Dermatology**, v. 22, p. 125-138, 2006.
- McCARTHY, M. E.; BROWN, T. A.; BUKOWSKA, J.; BUNNELL, B. A.; FRAZIER, T.; WU, X.; GIMBLE, J. M. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. **Current Stem Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 127-137, 2018.
- MIKESH, L. M.; ARAMADHAKA, L. R.; MOSKALUK, C.; ZIGRINO, P.; MAUCH, C.; FOX, J. W. Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, v. 84, p. 190-200, 2013.
- MINUTTI, C. M.; KNIPPER, J. A.; ALLEN, J. E.; ZAISS, D. M. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 61, p. 3-11, 2017.

- NALDAIZ-GATESI, N.; BAHRI, O. A.; MUNAIN, A. L.; McCULLAGH, K. J. A.; IZETA, A. The *panniculus carnosus* muscle: an evolutionary enigma at the intersection of distinct research fields. **Journal of Anatomy**, v. 233, n. 3, p. 275-288, 2018.
- PAVLETIC, M. M. The skin. In: _____. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. 4 ed. Hoboken: John Wiley and Sons Inc., 2018. cap. 1.
- PAZZINI, J. M.; SERAFIM, E. L.; GÄRTNER, F.; AMORIM, I.; FARIA, F.; RÊMA, A.; MORAES, P. C.; de NARDI, A. B. Histochemical and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) submitted to skin grafts associated with platelet-rich plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 12, p. 1519-1525, 2017.
- PLOCK, J. A.; SCHNIDER, J. T.; ZHANG, W.; SCHWEIZER, R.; TSUJI, W.; KOSTEREVA, N.; FANZIO, P. M.; RAVURI, S.; SOLARI, M. G.; CHENG, H. Y.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G.; GORANTLA, V. S. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells prolong graft survival in vascularized composite allotransplantation. **Transplantation**, v. 99, n. 9, p. 1765-1773, 2015.
- PLOCK, J. A.; SCHNIDER, J. T.; SCHWEIZER, R.; ZHANG, W.; TSUJI, W.; WALDNER, M.; SOLARI, M. G.; MARRA, K. G.; RUBIN, J. P.; GORANTLA, V. S. The influence of timing and frequency of adipose-derived mesenchymal stem cell therapy on immunomodulation outcomes after vascularized composite allotransplantation. **Transplantation**, v. 101, n. 1, p. e1-11, 2017.
- PORTOU, M. J.; BAKER, D.; ABRAHAM, D.; TSUI, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 31-36, 2015.
- RICCIO, M.; MARCHESINI, A.; ZINGARETTI, N.; CARELLA, S.; SENESI, L.; ONESTI, M. G.; PARODI, P. C.; RIBUFFO, D.; VAIENTI, L.; de FRANCESCO, F. A multicentre study: the use of micrografts in the reconstruction of full-thickness posttraumatic skin defects of the limbs - a whole innovative concept in regenerative surgery. **Stem Cells International**, v. 2019, article ID 5043518, 10 pages, 2019.
- RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103-120, 2016.
- ROTH, D.; PIEKAREK, M.; PAULSSON, M.; CHRIST, H.; BLOCH, W.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M.; EMING, S. A. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 2, p. 670-684, 2006.

- SERRA, R.; RIZZUTO, A.; ROSSI, A.; PERRI, P.; BARBETTA, A.; ABDALLA, K.; CAROLEO, S.; LONGO, C.; AMANTEA, B.; SAMMARCO, G.; de FRANCISCIS, S. Skin grafting for the treatment of chronic leg ulcers – a systematic review in evidence-based medicine. **International Wound Journal**, v. 14, n. 1, p. 149-157, 2017.
- SOM, P. M.; LAITMAN, J. T.; MAK, K. Embryology and anatomy of the skin, its appendages, and physiologic changes in the head and neck. **Neurographics**, v. 7, n. 5, p. 390-415, 2017.
- STANLEY, B. J.; PITT, K. A.; WEDER, C. D.; FRITZ, M. C.; HAUPTMAN, J. G.; STEFICEK, B. A. Effects of negative pressure wound therapy on healing of free full-thickness skin grafts in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 42, n. 5, p. 511-522, 2013.
- SUN, B. K.; SIPRASHVILI, Z.; KHAVARI, P. A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 941-945, 2014.
- SUNDBERG, J. P.; BOOTH, C. J.; NANNEY, L. B.; FLECKMAN, P.; KING JR, L. E. Skin and adnexa. In: TREUTING, P. M.; DINTZIS, S. M.; MONTINE, K. S. **Comparative Anatomy and Histology**. 2 ed. Elsevier: Academic Press, 2018. cap. 24.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.
- TOMBA, P.; VIGANÒ, A.; RUGGIERI, P.; GASBARRINI, A. Gaspare Tagliacozzi, pioneer of plastic surgery and the spread of his technique throughout Europe in “*De Curtorum Chirurgia per Insitionem*”. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 4, p. 445-450, 2014.
- TSUJI, W. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 312-321, 2014.
- TUNCALI, D.; YAVUZ, N.; CIGSAR, B.; GOKREM, S.; ASLAN, G. Effect of full-thickness skin graft initial dimension on secondary wound contraction: experimental study in rats. **Dermatologic Surgery**, v. 31, n. 5, p. 542-545, 2005.
- UYSAL, C. A.; OGAWA, R.; LU, F.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication. **Annals of Plastic Surgery**, v. 65, n. 2, p. 237-244, 2010.
- VIDOR, S. B.; TERRACIANO, P. B.; VALENTE, F. S.; ROLIM, V. M.; KUHL, C. P.; AYRES, L. S.; GARCEZ, T. N. A.; LEMOS, N. E.; KIPPER, C. E.; PIZZATO, S. B.; DRIEMEIER, D.; CIRNE-LIMA, E. O.; CONTESINI, E. A. Adipose-derived stem

cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 118, p. 336-344, 2018.

YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 475-479, 2011.

WANG, J.; HAO, H.; HUANG, H.; CHEN, D.; HAN, Y.; HAN, W. The effect of adipose-derived stem cells on full-thickness skin grafts. **BioMed Research International**, v. 2016, ID 1464725, 2016.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J. C.; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92-98, 2016.

ZHU, Y.; WANG, Y.; JIA, Y.; XU, J.; CHAI, Y. Roxadustat promotes angiogenesis through HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 signaling and accelerates cutaneous wound healing in diabetic rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, n. 4, p. 324-334, 2019.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ANEXO 1



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

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

Projeto: 2018/0590

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

Pesquisador Responsável: FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Equipe de Pesquisa:

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

Data de Aprovação:

Data de Término: 13/03/2020

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade
RATO ISOGÊNICO	M/8 Semana(s)	30

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



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ADYTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação:
15/02/2019 08:27:34