

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

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE ORIGEM ADIPOSITIVA ASSOCIADAS A  
ENXERTOS LIVRES DE PELE DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO MURINO

Silvana Bellini Vidor

PORTO ALEGRE

2015

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

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE ORIGEM ADIPOSITIVA ASSOCIADAS A  
ENXERTOS LIVRES DE PELE DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO MURINO

Autora: Silvana Bellini Vidor

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

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Emerson Antonio Contesini

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Obino Cirne-Lima

PORTO ALEGRE

2015

Silvana Bellini Vidor

CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE ORIGEM ADIPOSITA ASSOCIADAS A  
ENXERTOS LIVRES DE PELE DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO MURINO

APROVADO POR

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Comissão (UFRGS)

---

Dr<sup>a</sup> FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Membro da Comissão (HCPA/UFRGS)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> MELISSA MEDEIROS MARKOSKI

Membro da Comissão (INSTITUTO DE CARDIOLOGIA)

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> MARCELO MELLER ALIEVI

Membro da Comissão (UFRGS)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> ANA CRISTINA PACHECO DE ARAÚJO

Membro da Comissão (UFRGS)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha filha Júlia e meu marido Daniel. É maravilhoso e renovador termos esse relacionamento tão amoroso, carinhoso e incentivador.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Emerson Antonio Contesini, que me acompanha desde cedo na graduação, por sua confiança e seus ensinamentos como cientista e pai de família.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elizabeth Obino Cirne Lima, por ter me acolhido com tanta generosidade e confiança em seu grupo de trabalho, sempre com um sorriso meigo, um abraço e um beijo carinhoso.

À Dr<sup>a</sup> Paula Barros Terraciano, pela paciência e vontade de ensinar, pela parceria na hora do estudo e do trabalho no cultivo celular e do companheirismo nas horas do café.

Às doutorandas Tuane Nerissa Alves Garcez e Fernanda Soldatelli Valente pelo apoio, dedicação e boas risadas durante o projeto e o experimento.

À toda equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular que mostrou-se unida e forte no ano que passou. Todos sempre com muitas ideias de projetos, comemorando as vitórias e incentivando a novos desafios: Cristiana Palma Kuhl, Cristina Botelho Messias, Laura Silveira Ayres, Isabel Cirne Lima Durli, Sabrina Beal Pizzato, Débora Gotardi, Kamila Pazza, Cristiano Kiepper.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal pela alta disponibilidade e profissionalismo, em especial à enfermeira Marta Justina Giotti Cioatto, sempre pronta a ajudar e resolver os problemas das mais variadas naturezas.

À patologista e querida amiga Verônica Machado Rolim, sempre pronta a estudar e trabalhar junto, sempre com seu lindo sorriso.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Davi Driemeier pela confiança e gentileza em ceder o tempo de uma de suas patologistas.

À doutoranda Wanessa Behegaray Gianotti pelos diretórios cheios de artigos, as conversas para pensar no projeto e na discussão dos resultados.

À Unidade de Análises Moleculares e Proteicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e ao Programa de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas pelo apoio logístico e

pela qualidade na oferta de espaço para pesquisa e para formação dos profissionais da área da saúde.

Às colegas de pós-graduação pela convivência agradável e pelos ensinamentos de suas experiências profissionais: Simone Passos Bianchi, Fabiane Reginato, Fabíola, Luciana Queiroga, Daniela Fagundes, Tatiane Mottin, Juliana, Naila e Natália.

Às Prof<sup>as</sup> Dr<sup>as</sup> Fernanda Amorim pelos ensinamentos e incentivo nos atendimentos da rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias-UFRGS.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV-UFRGS), representado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Amorim, pelo Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Afonso de Castro Beck e Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Marcelo Meller Alievi, por permitirem minha atuação na instituição, contribuindo para minha formação como Médica Veterinária.

Aos queridos residentes, ex-colegas de graduação, pelo carinho e apoio: Letícia Gutierrez, Luciana Torelli Pinto, Amanda Siviero, Rachel Michaelsen, Sabrina Souza, Mariana Boss, Rafaela Barcelos, Amanda Siviero.

Aos membros da banca examinadora por terem aceito o convite e pela oportunidade de contar com seus ensinamentos e sugestões.

Ao meu marido, Daniel, e minha mãe, Maria, que souberam entender as minhas ausências e acreditaram, às vezes mais do que eu mesma, que era possível terminar uma segunda graduação e uma pós-graduação após tanto tempo.

À minha filha Júlia, apenas por estar aqui e me ensinar todo dia uma coisa nova a respeito da vida.

Aos animais que doaram suas vidas para a obtenção dos resultados deste experimento. Dedico os méritos gerados por eles neste estudo ao objetivo último da iluminação de todos os seres sencientes.

Muito obrigada!

## RESUMO

Enxertos livres de pele de espessura total são indicados para cobrir grandes defeitos de pele em superfícies flexoras ou em extremidades distais e sofrem lesão por isquemia e reperfusão pela própria natureza do procedimento cirúrgico. O objetivo deste trabalho foi testar a associação de células tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) heterólogas a enxertos cutâneos autólogos de espessura total em ratos Wistar. Enxertos de 12 mm de diâmetro foram executados no dorso de 30 ratos, em dois locais: cranial e caudal. Os ratos foram distribuídos em seis grupos (n=5): grupo ADSC\_G recebeu, no enxerto,  $1 \times 10^6$  ADSCs em 200  $\mu$ L de Solução Salina 0,9% (SS); grupo ADSC\_B recebeu  $1 \times 10^6$  ADSCs em 200  $\mu$ L de SS na borda do leito receptor; grupo ADSC\_GB, metade da mesma suspensão na borda e outra metade no enxerto. Os grupos controle, SS\_G e SS\_B, receberam apenas SS no enxerto ou nas bordas respectivamente. No grupo S, o enxerto não recebeu nenhum tratamento durante as cirurgias. Curativos do tipo *tie-over* permaneceram até o 5º dia. Na cirurgia (d<sub>0</sub>), aos 5 (d<sub>5</sub>) e 14 (d<sub>14</sub>) dias de pós-operatório, os desenhos dos enxertos foram digitalizados e suas áreas mensuradas (*software* ImageJ). As avaliações clínicas consideraram peso, presença de secreções e ocorrência de epidermólise. A planimetria demonstrou a taxa de pele normal, de pele avermelhada e de ulceração, assim como a contração dos enxertos entre os intervalos d<sub>0</sub>-d<sub>5</sub>, d<sub>5</sub>-d<sub>14</sub> e d<sub>0</sub>-d<sub>14</sub>. As amostras dos enxertos foram obtidas em d<sub>14</sub> para coloração com Hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson. A epiderme foi avaliada para espessamento, ceratose, acantose, degeneração hidrópica, infiltrado inflamatório. A derme foi avaliada quanto a rarefação pilosa, tecido de granulação, infiltrado inflamatório, deposição de colágeno. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e a análise estatística utilizou as Equações de Estimativas Generalizadas (GEE), com nível de significância de 5%. O grupo ADSC\_G apresentou melhores aspectos macroscópicos, menos ocorrência de epidermólise e de rarefação pilosa e uma das menores médias de área de ulceração, juntamente com os outros grupos tratados com ADSCs. O grupo ADSC\_G demonstrou as menores médias de alterações histopatológicas como: espessamento da epiderme, degeneração hidrópica, tecido de granulação. O mesmo grupo ficou entre as menores médias de acantose e infiltrado inflamatório na derme, ao mesmo tempo que apresentou as maiores médias de VEGF no subcutâneo e no tecido de granulação. Dessa forma, pode-se concluir que as ADSCs protegeram os enxertos dos efeitos deletérios da isquemia, assim como e

sugerem-se novos estudos em fases iniciais da cicatrização para compreensão dos mecanismos envolvidos.

**Palavras-chave:** terapia celular, terapia regenerativa, fatores de crescimento, cirurgia reconstrutiva, autoenxertos de pele, ADSC.

### ABSTRACT

*Evaluation of adipose derived stem cells (ADSC) effect on full-thickness skin graft (FTSG) as a wound healing model in ischemic conditions. Two 12 mm diameter FTSGs were harvested and placed onto dorsal recipient beds of twenty-four Wistar rats, in two anatomic regions: cranial and caudal. Rats were randomized into five groups. Before grafting, group E FTSGs received subfascial injection of 1X106 ADSCs diluted in 200  $\mu$ L of physiologic saline. Group EC FTSGs received only physiologic saline. Group B received ADSCs in the recipient bed edges; group C received physiologic saline in the edges. Group ADSC\_GB received the same ADSCs number and volume, half in the graft and half in the edges. Using planimetry, grafts were analyzed for graft's contraction rate (d0, d5, d14), normal skin rate and occurrence of epidermolysis and failure rate (d14). FTSGs samples were obtained on the d14 to hematoxylin-eosin and Masson's Trichrome staining for epidermal analysis (epidermal thickening, keratosis, acanthosis, hydropic degeneration, inflammatory infiltrate) and dermal analysis (hairless, granulation tissue, inflammatory infiltrate, collagen deposition). The obtained results were expressed by mean (n=5). Statistical significance ( $p < 0,05$ ) was calculated using Generalized Estimating Equations. The ADSC\_G group had better macroscopic aspects, less occurrence of epidermolysis and hairless and one of the lowest averages of ulceration area, along with the other groups treated with ADSCs. The ADSC\_G group showed the lowest mean on the histopathological changes measured such as thickening of the epidermis, hydropic degeneration, less granulation tissue. The same group was among the lowest acanthosis and inflammatory infiltrate averages in the dermis, while presented with the greatest of VEGF average in the subcutaneous and in the granulation tissue. Thus it can be concluded that the ADSCs may have protected the grafts from the deleterious effects of ischemia and suggest new studies in the early stages of healing to understand the mechanisms involved.*

**Key-words:** regenerative therapy, cell therapy, growing factors, reconstructive surgery, autograft, ADSC.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 -</b>	Esquema da histologia da pele das espécies de animais domésticos (FONTE: BANKS, 1992).....	22
<b>FIGURA 2 -</b>	Esquema da irrigação e drenagem da pele de caninos e felinos (FONTE: PAVLETIC, 2010).....	24
<b>FIGURA 3 -</b>	Diagrama esquemático da cicatrização em mamíferos. FONTE: SEIFERT et al., 2012 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	25
<b>FIGURA 4 -</b>	Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de inflamação em mamíferos. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	27
<b>FIGURA 5 -</b>	Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de proliferação. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	31
<b>FIGURA 6 -</b>	Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de maturação. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	36
<b>FIGURA 7 -</b>	Diagrama de corte das camadas da pele, demonstrando os enxertos de pele de espessura total e de espessura parcial. FONTE: ROBERTS & HEDGES, 1991 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	39
<b>FIGURA 8 -</b>	Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células tronco. FONTE: ZAGO & COVAS, 2006..	51
<b>FIGURA 9 -</b>	Diagrama com as fases da cicatrização e as funções exercidas pelas células tronco mesenquimais em cada uma delas. Fonte: MAXSON et al., 2012 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	59
<b>FIGURA 10 -</b>	Esquema com as possibilidades de tratamentos na busca pela regeneração da pele. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).....	61

<b>FIGURA 1 -</b>	Caracterização das ADSCs obtidas a partir de tecido adiposo gonadal de rato Wistar. (A) Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 100X; (B) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 400X; (C) Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 400X.....	70
<b>FIGURA 2 -</b>	Aspectos macroscópicos de todos os enxertos (dois enxertos por animal), aos 14 dias de pós-cirúrgico. Cada coluna contém as fotos dos enxertos de um grupo. Todas as fotografias foram realizadas com a mesma resolução (300 DPI) e na mesma distância dos enxertos (15 cm). Todas foram editadas com mesmo tamanho de corte, com mesma resolução, no mesmo software de imagem (Photoshop versão CS6), pelo mesmo operador. Em d <sub>14</sub> , pode-se perceber que ADSC_G apresenta melhor aspecto quando comparado a seu controle SS_G e quando comparado com o SHAM, que corresponde ao tratamento padrão.....	71
<b>FIGURA 3 -</b>	Ocorrência de epidermólise nos grupos de tratamento. A. A ocorrência no grupo SHAM-operado foi de 100%, por este motivo este grupo não entrou na análise estatística (*p=0,000 e **p=0,012); B. Enxertos de um animal do grupo ADSC_G, fotos realizadas em d <sub>5</sub> e d <sub>14</sub> ; Enxertos de um animal do grupo SS_B, fotos realizadas em d <sub>5</sub> , d <sub>14-a</sub> (antes da retirada da crosta de epiderme), e d <sub>14-b</sub> (após a retirada da crosta de epiderme).....	72
<b>FIGURA 4 -</b>	Médias e desvios padrão das análises histopatológica da epiderme, realizadas com HE em d <sub>14</sub> : A. Espessamento da epiderme (*p=0,001, **p=0,000, ***p=0,002 e ****p=0,001); B. Degeneração hidrópica (*p=0,032); C. Acantose (*p=0,008, **p=0,000 e ***p=0,000); D. Espessamento da epiderme - lâmina do grupo SS_B (Aumento 20X); E. Epiderme com espessura normal - grupo ADSC_B (Aumento 20X); F. Infiltrado inflamatório na epiderme - grupo SS_G (Aumento 20X); G. Acantose - grupo SS_B (Aumento 20X) H. Degeneração hidrópica na epiderme - grupo SS_B (Aumento 20X); I. Espessamento da epiderme e hiperqueratose (Aumento 20X).....	73

**FIGURA 5 -** A. Histopatologia com Tricrômico de Masson para quantificação da deposição de colágeno na derme em d<sub>14</sub> - grupo ADSC\_G (Aumento 20X); B. Deposição de colágeno na derme em d<sub>14</sub> - grupo SHAM (Aumento 20X); C. Histopatologia com Hematoxilina e Eosina para quantificação do infiltrado inflamatório na derme em d<sub>14</sub> - grupo ADSC\_G (Aumento 20X); D. Infiltrado inflamatório na derme em d<sub>14</sub> - grupo SS\_G (Aumento 20X); E. Folículos pilosos na derme - grupo ADSC\_B (Aumento 20X); F. Rarefação de folículos pilosos na derme - SS\_G (Aumento 20X); G. Médias e desvios padrão das análises histopatológica da derme, realizadas com HE em d<sub>14</sub>: tecido de granulação (\*p=0,026); H. Infiltrado inflamatório (\*p=0,000, \*\*p=0,008 e \*\*\*p=0,008); I. Rarefação pilosa.....75

**FIGURA 6 -** Média e desvio padrão da quantidade de células marcadas com anticorpo anti-VEGF em d<sub>14</sub>: A. No tecido subcutâneo (\*p=0,008, \*\*p=0,000, \*\*\*p=0,000 e \*\*\*\*p=0,001); B. No tecido de granulação (\*p=0,007 e \*\*p=0,006). C. Média e desvio padrão da quantidade de células marcadas com anticorpo anti-KI67 na camada basal da epiderme (\*p=0,000, \*\*p=0,000, \*\*\*p=0,000, \*\*\*\*p=0,021) (Aumento 20X).....76

**FIGURA 7 -** Esquema representando os grupos experimentais: ADSC\_G recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 µL de Solução Salina a 0,9% no espaço subcutâneo do enxerto; ADSC\_B recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 µL de Solução Salina a 0,9% injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; ADSC\_GB recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 µL de Solução Salina a 0,9%, metade no espaço subcutâneo do enxerto e outra metade injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; SS\_G recebeu 200 µL de Solução Salina a 0,9% no espaço subcutâneo do enxerto; SS\_B recebeu 200 µL de Solução Salina a 0,9% injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; SHAM foi submetido à cirurgia, sem a aplicação de nenhum tratamento.....89

- FIGURA 8 -** Esquema representando as etapas do estudo. D0: dia zero, em que foi realizada a cirurgia, com a injeção de ADSCs ou SS nos enxertos; D5: dia cinco, em que ocorreu a remoção dos curativos e algumas avaliações clínicas; D14: dia 14, quando os animais foram eutanasiados e as biópsias de pele dos enxertos foram coletadas.....89
- FIGURA 9 -** Fotografias realizadas nas cirurgias-piloto do estudo. A. Incisão da pele realizada com trépano corneal de 12 mm para retirada do enxerto de pele; B. Finalização da incisão da pele com tesoura; C. Aplicação da suspensão de ADSCs em SS na borda do leito receptor; D. Sutura do enxerto ao leito receptor com fio mononylon 6-0 em padrão simples separado; E. Rato com curativo primário, do tipo *tie-over*; F. Rato com curativo secundário.....90
- FIGURA 10 -** Caixa adaptada para evitar que o rato roçasse o dorso na tampa. A. a ração, o amendoim e as sementes de girassol foram colocadas no chão da caixa, junto com a maravalha; B. a garrafa d'água foi fixada com presilha metálica, assim como a tampa.....91
- FIGURA 11 -** Médias e desvios padrão obtidos com as planimetrias no dia da eutanásia (d<sub>14</sub>): A. Área de ulceração dos grupos; B. Área de pele avermelhada; C. Área de pele normal; D. Taxa de contração entre d<sub>0</sub> e d<sub>5</sub>; E. Taxa de contração entre d<sub>5</sub> e d<sub>14</sub>; F. Taxa de contração entre d<sub>0</sub> e d<sub>14</sub>.....93
- FIGURA 12 -** Médias e desvios padrão das análises histopatológica da epiderme, realizadas com HE em d<sub>14</sub>: A. Infiltrado inflamatório; B. Ceratose; C. Paraceratose.....94
- FIGURA 13 -** Médias de distribuição do infiltrado inflamatório na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE aos 14 dias de pós-cirúrgico.....96
- FIGURA 14 -** Médias de localização do infiltrado inflamatório na derme dos enxertos, na histopatologia com coloração de HE, aos 14 dias de pós-cirúrgico.....96

<b>FIGURA 15 -</b>	Médias de localização do tecido de granulação na derme dos enxertos, na histopatologia com coloração de HE, aos 14 dias de pós-cirúrgico.....	97
<b>FIGURA 16 -</b>	Médias e desvio padrão da deposição de colágeno na derme, na análise histológica com Tricrômico de Masson aos 14 dias de pós-cirúrgico: A. deposição de colágeno no enxerto; B. deposição de colágeno na interface entre os enxertos e as bordas dos leitos receptores.....	97
<b>FIGURA 17 -</b>	Médias de distribuição da deposição de colágeno na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de TM aos 14 dias de pós-cirúrgico.....	98
<b>FIGURA 18 -</b>	Médias da localização da deposição de colágeno na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de TM aos 14 dias de pós-cirúrgico.....	98

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** - Tempo de realização da cirurgia para retirada dos dois fragmentos de pele, dissecação do músculo panículo carnososo, aplicação do tratamento (exceto no grupo SHAM) e sutura do enxerto no leito receptor; tempo transcorrido para colocação do curativo e tempo total.....91
- TABELA 2** - Médias e desvios padrão da área de ulceração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.....92
- TABELA 3** - Médias e desvios padrão da área de ulceração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.....92
- TABELA 4** - Médias e desvios padrão da contração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.92
- TABELA 5** - Médias e desvios padrão dos parâmetros de avaliação da epiderme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE aos 14 dias de pós-cirúrgico.....94
- TABELA 6** - Médias e desvios padrão dos parâmetros de avaliação da derme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE (tecido de granulação e infiltrado inflamatório) e Tricrômico de Masson (depósito de colágeno) aos 14 dias de pós-cirúrgico.....95
- TABELA 7** - Médias e desvios padrão da avaliação de quantidade de células marcadas com anticorpo anti-VEGF no subcutâneo e no tecido de granulação aos 14 dias de pós-cirúrgico.....99
- TABELA 8** - Médias e desvios padrão da avaliação de quantidade de células marcadas com anticorpo ki67 na camada basal da epiderme aos 14 dias de pós-cirúrgico.....99

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ L	Microlitros
a.C	Antes de Cristo
ADSC	Células tronco mesenquimais de origem adiposa, do inglês, <i>adipose derived stem cells</i>
ADSC_B	Grupo com aplicação das ADSCs nas bordas ( <i>border</i> )
ADSC_G	Grupo com aplicação das ADSCs no enxerto ( <i>graft</i> )
ADSC_GB	Grupo com aplicação das ADSCs no enxerto e nas bordas ( <i>graft and border</i> )
ANGPT	Angiopietina
ATP	Trifosfato de adenosina
BM-MSC	Células tronco mesenquimais de medula óssea, do inglês, <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>
CEUA	Comitê de Ética para Uso de Animais
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo
d.C	Depois de Cristo
d <sub>0</sub>	Dia zero
d <sub>14</sub>	Dia 14
d <sub>5</sub>	Dia cinco
DPI	Pontos por polegada, do inglês <i>dots per inch</i>
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto II
FIP	coronavírus felino
FIV/FELV	Vírus da Imunodeficiência Felina/ Vírus da Leucemia Felina
GEE	Equações de Estimações Generalizadas
GFP	Green Fluorescent Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio

HB-EGF	fator de crescimento epidermal ligado à heparina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e Eosina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF-1	do inglês <i>hypoxia-inducible factor 1</i>
HIF-1	Fator induzível por hipóxia (do inglês, <i>hypoxia-inducible factor 1</i> )
IGF-1	fator 1 de crescimento semelhante à insulina, do inglês, <i>insulin-like growth factor-1</i>
IL	interleucina
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Óxido nítrico induzível sintetase
IP	Intraperitoneal
IRI	Lesão por isquemia e reperfusão, do inglês, <i>ischemia reperfusion injury</i>
kg	Quilogramas
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
L/min	Litros por minuto
LB	Linfócitos B
LT	Linfócitos T
LT <sub>H2</sub>	Célula T auxiliar
MCP-1	proteína quimiotática 1 para macrófago
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramas
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MIP-1 $\alpha$	proteína inflamatória de macrófago 1 alfa
MMP	Metaloproteinases de matriz
MSC	Células tronco mesenquimais, do inglês, <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i>
MT-MMP	Metaloproteinases tipo matriz
NF- $\kappa$ B	do inglês, <i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NGF	fator de crescimento de nervo
NK	<i>Natural Killers</i>

NO	do inglês, <i>Nitric Oxide</i>
NOS	Oxido nítrico sintetase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
°C	Graus Celsius
OH	Radical hidroxila
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGF	Fator de Crescimento de Placenta, do inglês, <i>placental growth fator</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SALT	do inglês, <i>skin associated lymphoid tissue</i>
SC	Subcutâneo
SMA	$\alpha$ -actina do músculo liso
SOD	Enzima superóxido dismutase
SS	Solução Salina 0,9%
SS_B	Grupo com aplicação de SS nas bordas
SS_G	Grupo com aplicação de SS no enxerto
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador beta
T <sub>H</sub> 1	Célula T inflamatória
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TLR	receptores <i>Toll-Like</i>
TM	Tricrômico de Masson
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral, do inglês, <i>tumor necrosis fator</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
UCB-MSCs	Células tronco mesenquimais derivadas de cordão umbilical, do inglês, <i>umbilical cord blood mesenchymal stem cells</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Objetivos.....</b>	<b>20</b>
1.1.1 Objetivo Geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 A pele .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Fisiologia da cicatrização da pele .....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Hemostasia da pele no processo de cicatrização .....	25
2.2.2 Fase inflamatória.....	26
2.2.3 Fase de proliferação .....	31
2.2.3.1 Fibroplasia da pele no processo de cicatrização .....	32
2.2.3.2 Angiogênese da pele no processo de cicatrização .....	33
2.2.3.3 Epitelização da pele no processo de cicatrização.....	34
2.2.3.4 Contração da pele no processo de cicatrização.....	35
2.2.4 Fase de maturação.....	35
<b>2.3 Cirurgia plástica reconstrutiva.....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Enxertos cutâneos livres de espessura total.....	38
2.3.2 A fisiologia do enxerto de pele de espessura total.....	40
2.3.3 Contração do enxerto .....	42
2.3.4 Lesão por isquemia e reperfusão - IRI .....	43
2.3.5 A técnica de enxertia.....	46
2.3.6 A interpretação da aparência do enxerto .....	50
<b>2.4 Células tronco mesenquimais .....</b>	<b>51</b>
2.4.1 Células tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs).....	54
2.4.2 Uso das MSCs na cicatrização da pele.....	58
2.4.3 As ADSCs na cicatrização da pele.....	60
<b>3 EFEITOS DA INFUSÃO DE ADSCS EM DIFERENTES LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO EM ENXERTOS DE PELE DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO MURINO.....</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Resumo .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2 Abstract.....</b>	<b>64</b>
<b>3.3 Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>3.4 Materiais e métodos .....</b>	<b>66</b>
3.4.1 Animais experimentais.....	66
3.4.2 Obtenção e manutenção das ADSCs.....	66
3.4.3 Modelo de enxerto de pele de espessura total .....	67
3.4.4 Grupos experimentais.....	67
3.4.5 Avaliações clínicas.....	68
3.4.6 Planimetria.....	68
3.4.7 Histopatologia.....	68

3.4.8 Imuno-histoquímica .....	69
3.4.9 Análise estatística.....	69
<b>3.5 Resultados .....</b>	<b>70</b>
3.5.1 Coleta, processamento e caracterização das ADSCs .....	70
3.5.2 Modelo de enxerto de pele de espessura total .....	70
3.5.3 Avaliações clínicas.....	71
3.5.4 Planimetria.....	73
3.5.5 Histopatologia.....	74
3.5.6 Imuno-histoquímica .....	76
<b>3.6 Discussão .....</b>	<b>78</b>
<b>3.7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>86</b>
<b>3.8 Dados complementares .....</b>	<b>90</b>
3.8.1 Desenho experimental .....	90
3.8.2 Linha do tempo do estudo .....	90
3.8.3 Modelo cirúrgico.....	91
3.8.4 Tempo de cirurgia .....	92
3.8.6 Planimetrias .....	93
3.8.7 Histopatologia.....	95
3.8.8 Imuno-histoquímica .....	100
<b>4 CONCLUSÕES.....</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Enxertos livres são transplantes teciduais nos quais a pele perde totalmente o contato com a área doadora e passa a ser nutrida pelo leito. Incluem a epiderme e toda a espessura da derme, sendo indicados para a cobertura de grandes defeitos em superfícies flexoras e/ou em extremidades distais (ANGELI, BRANDÃO & FREITAS, 2006; FOSSUM, 2013; PAVLETIV, 2003). Apesar de sua semelhança aparente com a pele normal, na prática são ambientes de feridas grandes em que os queratinócitos, fibroblastos e outras células tornam-se ativadas e nos quais ocorre a angiogênese (HARRISON & MACNEIL, 2008). Pela própria natureza do procedimento cirúrgico, os enxertos sofrem lesão por isquemia e, posteriormente, por reperfusão (do inglês, *ischemia reperfusion injury* – IRI) (ZHANG et al., 2008; BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). A lesão causada pela própria técnica cirúrgica do enxerto de pele é um limitante multifatorial para o sucesso do tratamento (BIGOLIN et al., 2010), assim como em qualquer transplante de órgão (ELTZSCHING & COLLARD, 2004).

As complicações mais frequentes são a contração excessiva ou a necrose parcial (até 10% da área) ou total da pele enxertada, que demandam nova enxertia ou procedimentos para cicatrização por segunda intenção (LÔFEGO FILHO, 2006; MICHELSKI, 2010; ZOGRAFOU, 2011). Em pacientes humanos, pode ocorrer necrose da epiderme em 20% dos enxertos de pele realizados (AMÂNCIO et al., 2006).

As células tronco mesenquimais de origem adiposa são células de fácil isolamento, que apresentam multipotencialidade e potencial terapêutico regenerativo e imunomodulador (ZAGO & COVAS, 2006; KOLF et al, 2007; BYDŁOWSKI et al, 2009). Influenciam positivamente na cicatrização por segunda intenção, acelerando a epitelização, aumentando o tecido de granulação e a angiogênese e diminuindo o infiltrado inflamatório, além de modular a resposta imune, regulando células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B e células *Natural Killers* (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; JACKSON, NESTI E TUAN, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al, 2013).

Estudos indicam a possibilidade de uso das células tronco mesenquimais de medula óssea (do inglês, *bone marrow mesenchymal stem cells* - BM-MSCs) e das células tronco mesenquimais de origem adiposa (do inglês, *adipose derived stem cells* – ADSCs) para proteger os tecidos das lesões causadas pela IRI e para diminuir a

disfunção de órgãos submetidos à isquemia. As ADSCs podem proteger flapes axiais da IRI pela melhora na resposta angiogênica e aumento da perfusão sanguínea (REICHENBERGER et al., 2012). Vários estudos utilizaram as ADSCs para prevenir lesões isquêmicas em flapes de pele (ICHIOKA et al., 2004; LU et al., 2008; REICHENBERGER et al., 2012; SIMMAN & MACKINNEY, 2005; SUARTZ et al., 2014; UYSAL et al., 2009; UYSAL et al., 2010), assim como Zografou e colaboradores (2011) as utilizaram para melhorar a qualidade de enxertos livres de pele. Dessa forma, este trabalho tem o objetivo de revisar a literatura a respeito de enxertos de pele, IRI, cicatrização de pele, células tronco e ADSCs, assim como apresentar o artigo resultante da aplicação experimental de ADCs a enxertos de pele de espessura total.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo Geral**

Avaliar a associação de terapia celular, com ADSCs heterólogas, em enxertos cutâneos autólogos de espessura total em ratos Wistar.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Comparar a área de viabilidade do enxerto combinado com as ADSCs, com a área de viabilidade do implante sem essa associação;
- Comparar a mensuração de produção do Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) entre os grupos;
- Comparar a proliferação celular da camada basal da epiderme com e sem a associação com ADSCs;
- Comparar a reação inflamatória causada pelo enxerto com e sem a associação com ADSCs;
- Comparar a quantidade de deposição de colágeno com e sem a associação com ADSCs;
- Comparar a taxa de contração cicatricial entre os grupos com e sem a associação com as ADSCs;

- Comparar os efeitos das vias de aplicação das ADSCs: a via intradérmica na borda do leito receptor do enxerto, ou a via subcutânea no próprio enxerto.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A pele**

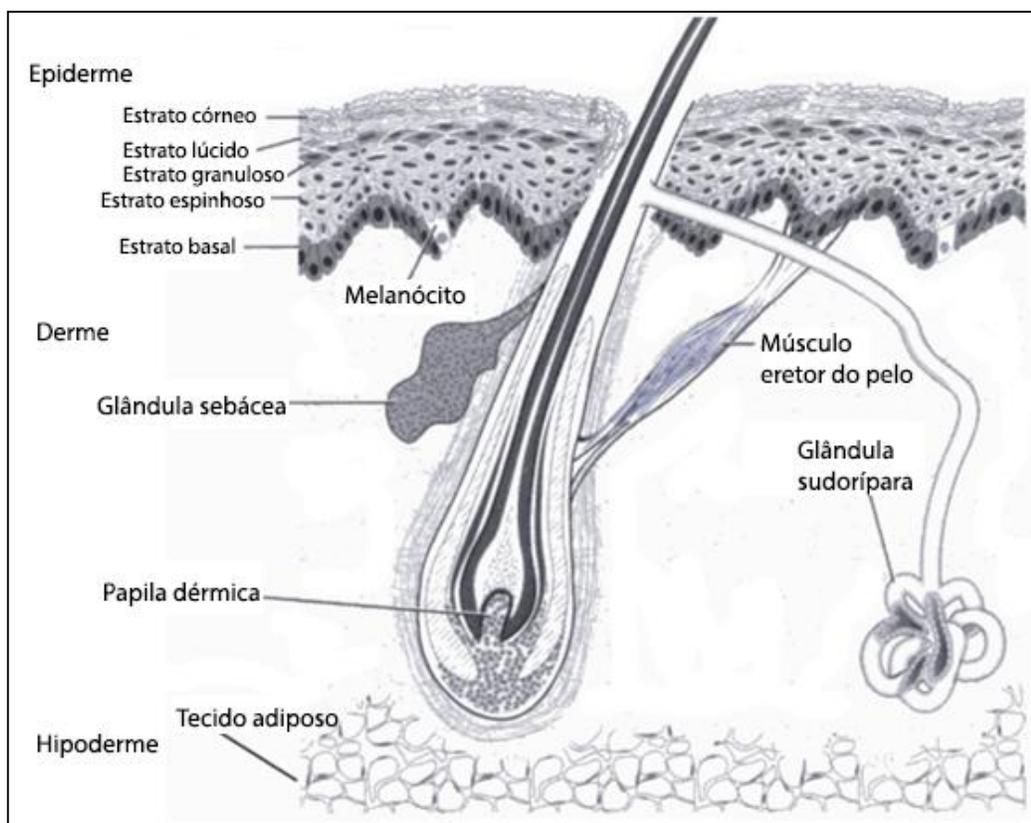
A pele é uma barreira mecânica de proteção contra invasão de microrganismos e compostos tóxicos, variações de temperatura e umidade. A proteção mecânica é realizada pela epiderme por ser queratinizada, impermeável e resistente, enquanto a proteção química ocorre pelas secreções sebáceas e sudoríparas, e a microbiológica, pela microbiota residente da pele, que concorre com patógenos e impede sua colonização (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). A pele também impede a perda excessiva de líquidos, mantém a temperatura corpórea, sintetiza vitamina D com a exposição aos raios solares, age como órgão sensorial e participa da termorregulação (BRUNNER & SUDDARTH, 2005).

É formada pela epiderme e pela derme, firmemente unidas entre si, e seus anexos: as glândulas sudoríparas, sebáceas e os folículos pilosos. A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, variável em quantidade de queratinização. É continuamente renovada e, nos animais domésticos, formada por cinco estratos (FIGURA 1): córneo, lúcido, granuloso, espinhoso e basal, do mais externo ao mais interno (DYCE et al., 1990; BANKS, 1992; EURELL, 2004; PAVLETIC, 2010). A epiderme é avascular e recebe nutrição dos fluídos que penetram de suas camadas mais profundas e dos capilares da derme (FOSSUM, 2013). Apresenta três diferentes linhagens celulares: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langerhans (DYCE et al., 1990; BANKS, 1992). Suas principais células, os queratinócitos, podem ser pigmentados em suas camadas mais profundas (EURELL, 2004).

Apoiado sobre a membrana basal, o estrato basal contém células cúbicas a cilíndricas com junções aparentes chamadas desmossomos e está preso à derme por hemidesmossomos. Os queratinócitos desta camada estão em mitose contínua, conforme migram para a superfície, sofrem diferenciação, perdem o núcleo e acumulam queratina. Os estratos espinhoso e granuloso são ligados por desmossomos e seus queratinócitos ainda realizam mitose. No estrato córneo, as células formam várias linhas. São

achatadas, não apresentam núcleo, nem organelas, e seu citoplasma é rico em queratina. As suas células mais profundas são ligadas por desmossomos, e as mais superficiais descamam (BANKS, 1992).

A pele ainda conta com componentes do sistema imune. As células dendríticas da derme e do epitélio são também chamadas de células de Langerhans e estão presentes entre as células do estrato espinhoso e a derme. Há ainda uma quantidade variável de linfócitos T na derme, conhecidos como tecido linfoide associado à pele (do inglês, *skin associated lymphoid tissue - SALT*) (BANKS, 1992; BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). Finalmente, as células de Merkel são mecanorreceptores, apoiados na membrana basal, que fazem sinapse com células nervosas aferentes (BANKS, 1992).



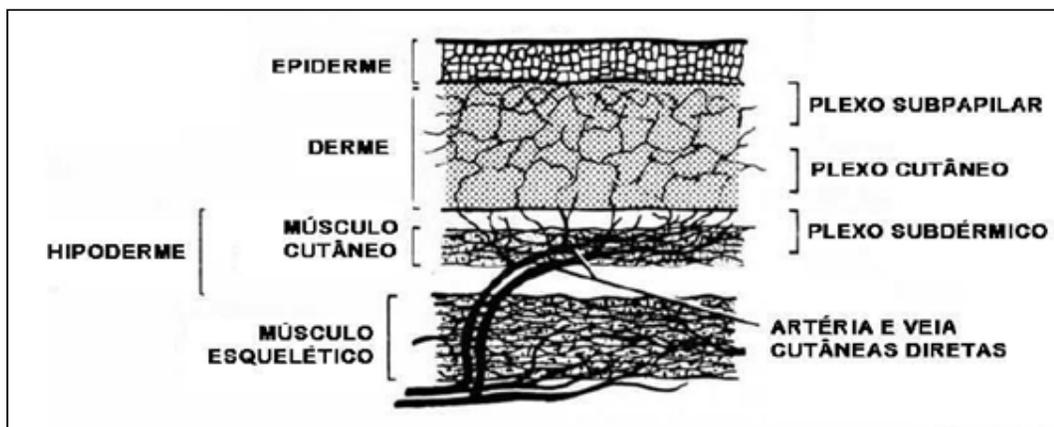
**Figura 1.** Esquema da histologia da pele das espécies de animais domésticos. FONTE: BANKS, 1992.

A derme é uma camada mais espessa que a epiderme, e que se estende desta até o tecido subcutâneo. É composta de tecido conjuntivo frouxo a denso não modelado, de colágeno tipo I, de fibras elásticas e reticulares, rodeadas por uma substância mucopolissacarídea (BANKS, 1992; FOSSUM, 2013). Bastante vascularizada e innervada, a derme pode conter glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos

(DYCE et al., 1990; FOSSUM, 2013). É dividida em camada papilar (mais externa) e reticular (mais interna) (BANKS, 1992; DYCE et al., 1990). Contém tipos celulares diferentes, incluindo fibroblastos, macrófagos, mastócitos e leucócitos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos (DYCE et al., 1990).

Nos coxins plantares, a pele é espessa, contém todos os estratos bem definidos, com estrato lúcido e córneo espessos e apresenta apenas glândulas sudoríparas. A pele fina, encontrada no resto do corpo, possui estrato córneo delgado, estrato espinhoso e granuloso fundidos e não apresenta o estrato lúcido (BANKS, 1992).

Vasos musculocutâneos, perpendiculares à superfície da pele, realizam o suprimento sanguíneo primário em humanos, suínos e macacos, enquanto a pele de caninos e felinos apresenta vasos cutâneos diretos, localizados paralelos à pele. Arteriolas e veias ramificam-se de vasos diretos cutâneos e formam um plexo subdérmico (profundo), um plexo cutâneo (intermediário) e um plexo subpapilar (superficial) (FIGURA 2). O plexo subdérmico (profundo) nutre os folículos e bulbos pilosos, glândulas tubulares, a porção profunda de ductos glandulares e os músculos pilo-erectores. O plexo cutâneo (intermediário) provê suprimento às glândulas sebáceas e reforça a rede de capilares ao redor das estruturas nutridas pelo plexo subdérmico. O plexo subpapilar (superficial), na porção mais externa da derme, é formado por emaranhados de capilares que se projetam em direção à epiderme para supri-la. Esse sistema é pouco desenvolvido em cães e gatos, razão pela qual essas espécies não formam bolhas com queimaduras superficiais. O plexo subdérmico é essencial para a viabilidade da pele e, em áreas onde há um panículo carnoso, supre também a musculatura. O panículo carnoso está ausente nas extremidades (FOSSUM; 2013).



**Figura 2.** Esquema da irrigação e drenagem da pele de caninos e felinos. FONTE: PAVLETIC, 2010.

Assim como a pele de animais domésticos, a pele do rato (*rattus norvegicus sp.*) não apresenta glândulas sudoríparas, ou *rete ridges*, como a de seres humanos. O ciclo de crescimento dos pelos desses animais apresenta a duração de três semanas, e a espessura da derme depende desse ciclo. Com espessura delgada e não aderida a estruturas subjacentes, a pele do rato apresenta uma camada muscular subcutânea, chamada panículo carnoso, razão pela qual o mecanismo mais importante da cicatrização de feridas, nesses animais, é a contração. Dito isso, para simular o processo cicatricial em humanos ou em membros distais de animais domésticos, é necessário realizar a excisão dessa camada muscular (WONG et al., 2010).

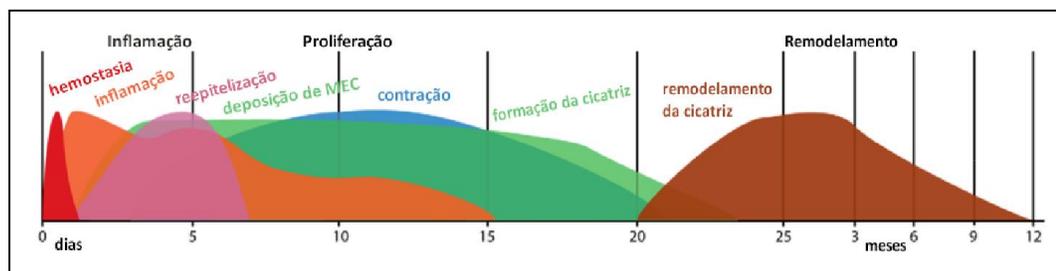
## 2.2 Fisiologia da cicatrização da pele

A cicatrização é o processo de reestabelecer a continuidade do tecido após uma lesão e começa imediatamente após este evento (FOSSUM, 2013). 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, queratinócitos e fibroblastos, sofrem alterações de fenótipo e de expressão genética para gerar proliferação, diferenciação e migração celular (GURTNER et al., 2008).

Em organismos superiores, 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 (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). 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, NESTI & TUAN, 2012). Essa rápida interposição de tecido cicatricial confere uma vantagem importante para a sobrevivência, ao impedir a colonização por microrganismos 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, NESTI & TUAN, 2012). 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 (GURTNER et al., 2008).

O mecanismo de cicatrização de feridas (FIGURA 3) é composto por uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases para facilitar sua compreensão. Para Cesaretti (1998), Gurtner et al. (2008), Blanes (2004), Balbino (2005), Vidinsky (2006), Clark (2007) e Maxson (2012), esses eventos podem ser divididos em três etapas: inicialmente, um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizado por um estágio de remodelação. Já Hosgood (2013) e Tsirogianni, Moutsopoulos & Moutsopoulos (2006) descrevem as fases de hemostasia, inflamação, reparo e maturação. Outros autores costumam utilizar as fases de inflamação, debridamento, reparo e maturação, considerando a hemostasia como parte da fase inflamatória (FOSSUM, 2013).



**Figura 3.** Diagrama esquemático da cicatrização em mamíferos. FONTE: SEIFERT et al., 2012 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

### 2.2.1 Hemostasia da pele no processo de cicatrização

No momento da lesão, os vasos sofrem constrição reflexa pela liberação local de bradicinina, serotonina, catecolaminas, endotelinas e pela produção de tromboxano A2 (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013). Ao mesmo tempo, as plaquetas ativadas pela liberação de tromboplastina e fator

VIII, durante a lesão endotelial, combinam-se às hemácias, fluídos e fibras insolúveis de fibrina para formarem o *plug* plaquetário (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). Esse *plug* plaquetário, ou trombo provisório, transforma a ferida em um ambiente de hipóxia pela condição isquêmica do tecido (GURTNER, 2008) e coleta passivamente uma grande quantidade de neutrófilos da circulação sanguínea (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

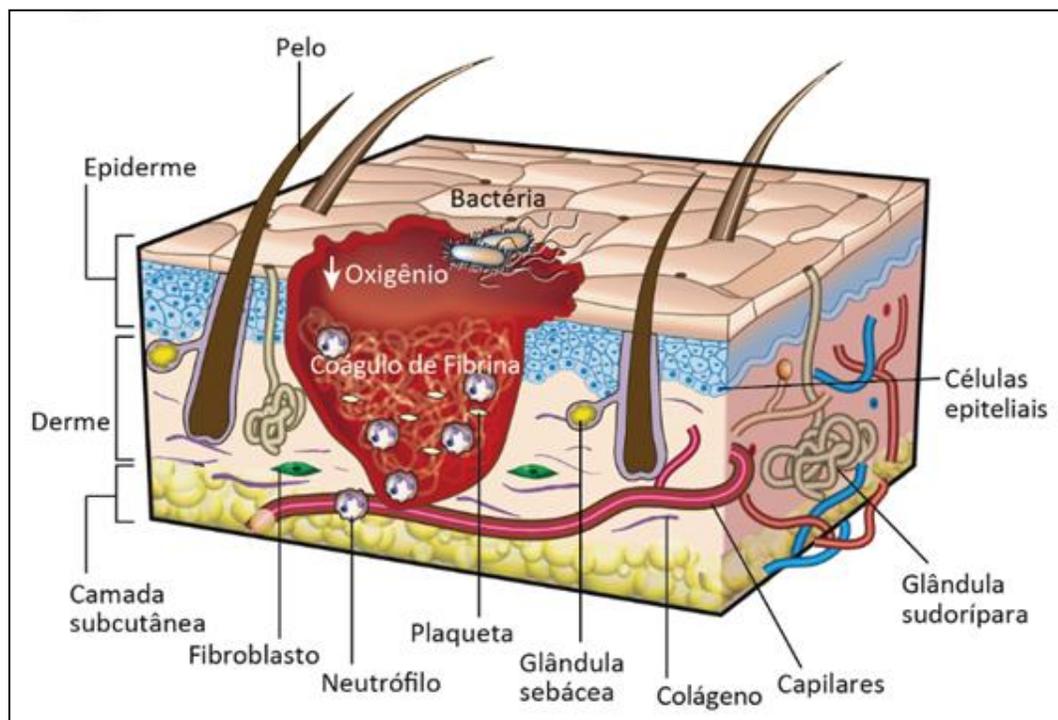
Na hemostasia, ocorre ainda a dilatação dos vasos para a passagem de células e de fluido intracelular através da parede dos vasos para o espaço extravascular. Essa vasodilatação é causada pela liberação dos grânulos de histamina dos mastócitos com a contribuição de prostaglandinas da via araquidônica, cininas da cascata de coagulação e fatores complementares (BALBINO, PEREIRA E CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013). Como consequência do trauma ou da própria ativação celular, o microambiente da ferida tem suas características físico-químicas alteradas, com diminuição da tensão de oxigênio, diminuição do pH e presença de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

Os monômeros de fibrina do coágulo, na presença do fator VIII ativado, tornam-se reticulados e ligam-se diretamente às plaquetas para formar a matriz extracelular (MEC) provisória (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013). A função da MEC provisória será de facilitar a entrada de células na ferida pelos seus sítios de ligação com as moléculas de adesão (integrinas e selectinas) dos neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (HOSGOOD, 2013).

### 2.2.2 Fase inflamatória

A fase inflamatória (FIGURA 4) inicia com a ativação do sistema complemento e caracteriza-se pela migração de leucócitos, dentro de seis horas após a lesão. Os produtos da degradação dos complementos atraem neutrófilos para a ferida e servem como opsoninas, ligando-se a bactérias e materiais estranhos, para otimizar a fagocitose (TSIROGIANNI et al., 2006; GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). Os neutrófilos são as células predominantes nos três primeiros dias, e seu pico ocorre entre 24 e 48 horas. Respondem à quimiotaxia de fibrinopeptídeos, liberados quando o fibrinogênio é convertido em fibrina (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013), enquanto os leucócitos são atraídos pelos leucotrienos, e os

macrófagos e os fibroblastos são atraídos pelo Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ) e pelo Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), liberados pela degranulação de plaquetas ativadas (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013).



**Figura 4.** Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de inflamação em mamíferos. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

Os mediadores da MEC provisória promovem a diapedese dos neutrófilos para o interior da ferida (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013), e as proteinases liberadas pelos próprios neutrófilos degradam tecido necrótico e atraem mais neutrófilos (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013). Os neutrófilos eliminam bactérias pela fagocitose e pela liberação de óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide* - NO), produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) e o Fator de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor* - TNF- $\alpha$ ). Indiretamente, pela ação do NO liberado, causam a vasodilatação local, a morte das bactérias e a degradação de macromoléculas bacterianas, da MEC desnaturada e de células danificadas (HOSGOOD, 2013). Os neutrófilos degradados, em conjunto com os fluidos da feridas e com o tecido desnaturado, constituem o exsudato, também conhecido como pus, que não significa infecção, pois, normalmente, os neutrófilos estão presentes em feridas estéreis (HOSGOOD, 2013).

Enquanto os neutrófilos predominam no início da fase inflamatória e sua vida é curta, os monócitos prevalecem em feridas mais antigas, sendo essenciais para sua cicatrização. A concentração de monócitos atinge o seu máximo entre 48 e 72 horas (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013), podendo essas células permanecerem por semanas. Os monócitos são atraídos pelas citocinas de neutrófilos ativados, combinadas com produtos de degradação e proteínas inflamatórias da MEC provisória (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013). São ainda atraídos por outros monócitos, fatores de crescimento e citocinas como: PDGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento de nervo (NGF), proteína quimiotática 1 para macrófago (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ) (WERNER & GROSER, 2003; HOSGOOD, 2013). Nas regiões da ferida onde o aporte de oxigênio está comprometido pelo rompimento dos vasos e pelo *plug* de fibrina, os neutrófilos e macrófagos presentes aumentam a demanda por oxigênio e acabam elevando a concentração de lactato e diminuindo o pH. A combinação de hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico ativa os macrófagos para a produção de fatores de crescimento (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

Os monócitos permanecem na MEC provisória e transformam-se em macrófagos ativados, essenciais para perpetuar o processo inflamatório (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013) pela liberação de citocinas pró-inflamatórias interleucinas-1  $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 e Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (HOSGOOD, 2013). Os macrófagos também estimulam e modulam os processos de reparação - fibroplasia, angiogênese e epitelização (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013) - pela liberação de Fator de Crescimento de Fibroblasto II (FGF-2), TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , Fator de Crescimento Epidermal (EGF), IGF, PDGF, VEGF, Metaloproteinases de Matriz (MMP) e seus Inibidores Teciduais (TIMP) (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013). No início da fase inflamatória, os macrófagos, são importantes para o debridamento da ferida por sua ação fagocítica (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013). Já no final desta fase, em conjunto com os neutrófilos, são importantes para a modificação da MEC provisória em MEC da ferida, conhecida também como tecido de granulação. Além da diferenciação em macrófagos, os

monócitos podem ainda evoluir para células epidermais e histiócitos ou degradarem-se e formar células gigantes multinucleadas com função fagocítica (HOSGOOD, 2013).

#### 2.2.2.1 Resposta imune da pele no processo de cicatrização

A inflamação, a fagocitose e a cicatrização da ferida estão ligadas pela resposta imune inata e a adaptativa. O sistema inato fornece defesa pela reação inflamatória e pela ação de leucócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos (TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA, 2011). Quando o sistema inato falha na eliminação do patógeno, o adaptativo é ativado, com a ação dos linfócitos dirigidos especificamente contra a ameaça (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013).

Os macrófagos, os neutrófilos, as células epidermais e endoteliais expressam os receptores *Toll-Like* (TLR), que ao se ligarem a moléculas estranhas são ativados e iniciam a produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1), moléculas de adesão (integrinas e selectinas) e fatores de crescimento (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA, 2011; HOSGOOD, 2013). Esse processo ocorre pela ativação da transcrição de Fator nuclear kB (do inglês, *nuclear factor kB* - NF-kB), molécula-chave para a resposta imunológica da pele, que migra até o núcleo da célula e faz a mediação da transcrição de genes e de produção de mediadores inflamatórios (TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA, 2011). Adicionalmente, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 também podem ativar essa mesma cascata, amplificando a resposta imune celular (TSIROGIANNI et al., 2006). A ação dos TLRs é essencial para o início da fase inflamatória (TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA, 2011; HOSGOOD, 2013).

Os mediadores TNF- $\alpha$  e IL-1 iniciam as alterações vasculares e a exsudação celular necessárias à reabsorção dos restos celulares. As primeiras células que exsudam são os fagócitos (neutrófilos e monócitos), mas linfócitos T (LT), células *Natural Killers* (NK) e células dendríticas também migram para iniciar a resposta imune adaptativa. Os monócitos auxiliam os neutrófilos na fagocitose de microrganismos e, após fagocitá-los, realizam o seu processamento nos fagossomas e apresentam seus peptídeos pelo complexo maior de histocompatibilidade (MHC) aos linfócitos T auxiliares. Assim, estabelece-se o elo entre o sistema imune inato e o adaptativo (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). Células NK também são ativadas por macrófagos para desativar o material fagocitado e secretar interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), que vai

ativar mais macrófagos. Complementarmente, os queratinócitos contêm um grande estoque de IL-1, que pode ser secretado diretamente no local da lesão (TSIROGIANNI et al., 2006).

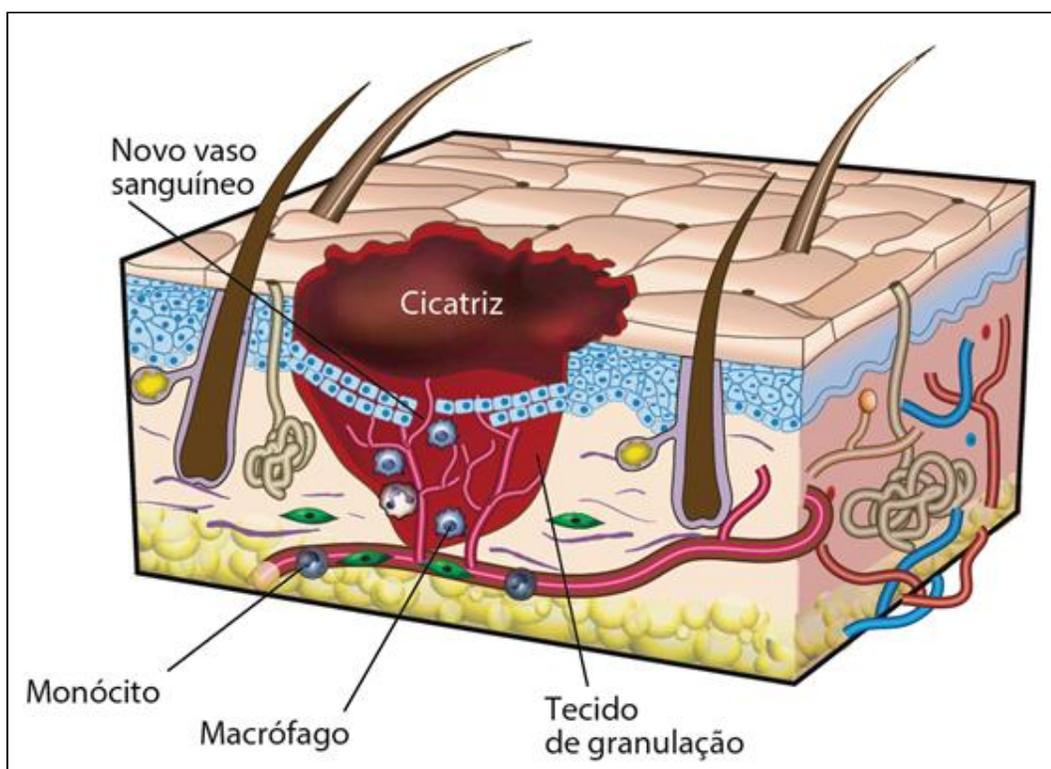
Os LTs são muito importantes para a cicatrização da ferida, e a depleção de todos os seus subtipos prejudica o processo. Os antígenos são capturados pelas células dendríticas, as quais irão aos órgãos linfáticos para ativar LT CD4+, com a geração de autoanticorpos e LT sensibilizados (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2011). Um LT pode diferenciar-se em Linfócito T *helper*, LT<sub>H0</sub> (células CD4+ imatura), em T<sub>H1</sub> (célula T inflamatória), ou em LT<sub>H2</sub> (célula T auxiliar). Essas três células secretam um perfil de citocinas comum (IL-3, GM-CSF) e um perfil específico. LT<sub>H1</sub> secreta TNF- $\beta$ , IL-2 e INF- $\gamma$ , que induzem a expressão de óxido nítrico induzível (iNOS) nos macrófagos – imunidade celular. As citocinas produzidas por LT<sub>H2</sub> (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13) ativam os linfócitos B (LB) – imunidade humoral (HOSGOOD, 2013).

#### 2.2.2.2 O Óxido Nítrico na cicatrização da pele

O NO é produzido por três isoformas da enzima Oxido nítrico sintetase (NOS), duas encontradas em células normais (eNOS) e uma, a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), produzida pelas células ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  em tecidos bem vascularizados (HOSGOOD, 2013). O NO, durante a fase inflamatória, promove vasodilatação; tem atividade antimicrobiana; diminui a agregação plaquetária; induz a permeabilidade vascular (SIEMIONOW & ARSLAN, 2004; HOSGOOD, 2013); atenua a aderência dos leucócitos ao endotélio; elimina radicais livres de oxigênio; inibe a proliferação de  $\alpha$ -actina do músculo liso (SMA); estimula a regeneração de células endoteliais (SIEMIONOW & ARSLAN, 2004). De acordo com sua concentração, pode também regular a proliferação celular na fase de reparação. Baixas doses de NO estimulam a proliferação de fibroblastos, células endoteliais e epidermais, enquanto doses mais altas são inibitórias. O NO pode ainda proteger as células endoteliais de apoptose. Durante a fase de reparação, os níveis de NO podem regular positivamente a expressão de VEGF pelas células e de deposição de colágeno na MEC (HOSGOOD, 2013).

### 2.2.3 Fase de proliferação

Na fase de reparação ou proliferativa (FIGURA 5), entre dois e dez dias, ocorrem os processos multiplicativos de angiogênese, fibroplastia, epitelização e contração da ferida (TSIROGIANNI et al., 2006; GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). No início, ocorre a invasão de fibroblastos e o acúmulo de colágeno na ferida (TSIROGIANNI et al., 2006; HOSGOOD, 2013), além da formação de novas estruturas endoteliais. Entre o terceiro e quinto dia, ocorre a transição entre a MEC provisória e a MEC madura, também conhecida como tecido de granulação (HOSGOOD, 2013).



**Figura 5.** Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de proliferação. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

O tecido de granulação, que preenche a ferida, é a combinação de vasos neoformados, fibroblastos e tecido conjuntivo fibroso (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013), suportados por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II. É um tecido edematoso com espaços vazios pela imaturidade dos vasos sanguíneos, muito exsudativos, que sangram facilmente. Esse tecido macroscopicamente parece conter muitos grânulos, que são apenas as extremidades dos vasos neoformados com organização perpendicular à superfície da

ferida, com coloração vermelha escura (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). O objetivo do tecido de granulação é preencher o defeito do tecido; proteger a ferida; conter os miofibroblastos importantes na retração da ferida; fornecer uma barreira contra infecção e uma superfície para a epitelização. Para a entrada de células na ferida, nesta fase, é importante que ocorra: (1) sinal bioquímico para estimular a proliferação e a migração celular; (2) expressão, por parte das células, de integrinas e selectinas, para interagir com a MEC e serem guiadas para dentro da ferida; (3) a degradação da MEC pelas enzimas proteolíticas metaloproteínases de matriz (MMP), a fim de permitir a entrada das células (HOSGOOD, 2013).

A perda de tecido da ferida é preenchida por dois mecanismos. No primeiro, os fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos, ao perderem a interação com as células adjacentes, são estimulados a proliferar e migrar em direção ao centro da lesão. No segundo, mesmo quando há tecido de granulação, as margens se aproximam pela ação dos fibroblastos que diferenciaram-se em miofibroblastos e passam a ter propriedades contráteis (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

#### 2.2.3.1 Fibroplasia da pele no processo de cicatrização

De três a quatro dias após a lesão, a população de fibroblastos começa a aumentar e permanece muito ativa até os sete dias, para sintetizar a MEC madura com colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas (HOSGOOD, 2013; TSIROGIANNI et al., 2006). A conexão entre a fase inflamatória e a de reparação ocorre pela atividade de fatores de crescimento e citocinas produzidos principalmente por macrófagos derivados de monócitos (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013), que estimulam a migração de fibroblastos, células mesenquimais e células endoteliais pela MEC provisória (HOSGOOD, 2013).

Os fibroblastos residentes no tecido adjacente são estimulados a proliferar, expressar receptores apropriados de integrinas e migrar para dentro da ferida pelo fator de crescimento de tecido conectivo (CTGF), PDGF, TGF- $\beta$  e FGF em conjunto com moléculas da MEC. O movimento dos fibroblastos para o interior da MEC provisória ocorre pelo caminho anteriormente clivado por enzimas proteolíticas como MMP, produzidas por neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos. Os fragmentos da MEC clivados pelas MMPs denominam-se matricinas e são responsáveis pela regulação positiva da atividade celular (HOSGOOD, 2013).

As MMPs apresentam a expressão gênica regulada por citocinas e fatores de crescimento como interleucinas, interferon, fatores de crescimento de queratinócitos (KGF), EGF, bFGF, VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e indutores extracelulares de MMP. Suas famílias incluem as colagenases, as estromolisinas, metaloelastinas, matrilisinas, metaloproteinases tipo matriz (MT-MMP) e gelatinases, e são ativadas por outras MMPs ou por proteases (HOSGOOD, 2013).

A migração e a proliferação de fibroblastos dentro da MEC provisória é estimulada pelo PDGF, TGF- $\alpha$ , EGF, IGF-1, CTGF e fator de crescimento epidermal ligado à heparina (HB-EGF) (HOSGOOD, 2013). Com o aumento dessas células ativadas para a produção de colágeno, a MEC é substituída por um tecido mais forte e elástico, ocorrendo assim a fibroplastia (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005). A produção do pró-colágeno depende de co-fatores como o oxigênio, a vitamina C e  $\alpha$ -cetogluturato (HOSGOOD, 2013), dessa forma a neovascularização da região é um fator decisivo para a eficiência da fibroplastia por proporcionar a chegada desses elementos no local (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005).

Na ferida recente, o colágeno predominante é o de tipo III, que vai sendo substituído pelo colágeno tipo I durante o amadurecimento da ferida (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). A produção é muito intensa entre o sétimo e o 14º, atingindo seu máximo no 21º dia, quando começa a diminuir pelo feedback negativo do colágeno aos fibroblastos. Os capilares do tecido de granulação vão diminuindo, e os fibroblastos entrando em apoptose, e a ferida tornar-se uma cicatriz acelular. (HOSGOOD, 2013). A fibronectina, elemento de sustentação da MEC provisória, desaparece quando as fibras colágenas já estão organizadas (LOFÊGO FILHO et al., 2006).

#### 2.2.3.2 Angiogênese da pele no processo de cicatrização

A angiogênese depende da interação da MEC com as citocinas secretadas pelos linfócitos. Na primeira fase, dois dias após a lesão, ocorre a migração de células endoteliais pelos capilares íntegros ou recém lesionados, estimulada pelo VEGF, FGF e TGF- $\beta$  e angiopoietina (ANGPT). Para que haja angiogênese, é importante a existência da MEC provisória, da expressão de integrinas (estimulada pelo VEGF, FGF e TGF- $\beta$ ) e de MMP pelas células endoteliais (estimulada pelo VEGF, FGF-2 e TGF- $\beta$ ) (HOSGOOD, 2013), sendo VEGF e FGF-2 os dois reguladores mais importantes da angiogênese na pele (GURTNER, 2008; REHMAN et al., 2004).

As MMPs degradam a MEC e a membrana basal para que as células endoteliais migrem e formem tubos (BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013). A própria migração das células endoteliais aumenta a sua proliferação, estimulada também por fatores armazenados na MEC e secretados pelas células migrantes e pelos macrófagos, como VEGF, FGF, TGF- $\beta$ , angiogenina, angiotropina, angiopectina 1, trombospondina e endotelinas (HOSGOOD, 2013). Alterações do ambiente da ferida também ativam a produção de mediadores que deflagram a angiogênese, como baixa tensão de oxigênio (ELTZSCHING & COLLARG, 2004; BALBINO, PEREIRA & CURI, 2005; HOSGOOD, 2013), altos níveis de lactato e baixo pH (HOSGOOD, 2013). Os capilares imaturos do tecido de granulação são porosos e, pela ação da angiopoietina, vão amadurecendo e diminuindo sua porosidade. À medida que a MEC amadurece, os novos vasos entram em apoptose, e o tecido torna-se menos vermelho (HOSGOOD, 2013).

#### 2.2.3.3 Epitelização da pele no processo de cicatrização

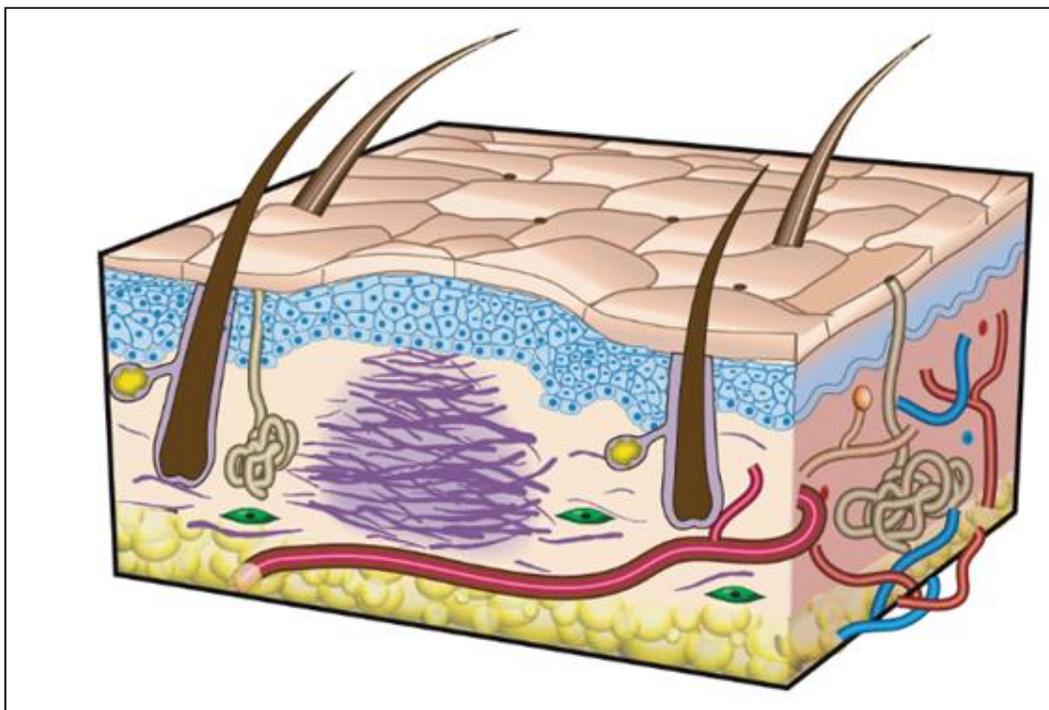
Logo após a lesão, as células da epiderme sofrem alterações fenotípicas para permitir a sua movimentação. Essas alterações incluem: retração dos monofilamentos intracelulares; dissolução dos desmossomos; formação de filamentos de actina no citoplasma periférico; e expressão de integrinas para interagir com a MEC. As próprias células epidermais, os fibroblastos e os macrófagos da ferida secretam EGF, TGF- $\beta$  e KGF para regular a migração e a proliferação das células epidermais (HOSGOOD, 2013) Enquanto o HGF, o EGF e o FGF regulam positivamente a reepitelização, o TGF- $\beta$  o faz negativamente (GURTNER, 2008). A laminina vai sendo acumulada para gerar uma nova lâmina basal abaixo das células migrantes, na direção das bordas para o interior da ferida. As células epidermais voltam ao seu fenótipo normal, ligam-se firmemente com a membrana basal e à derme e começam a se estratificar. Os melanócitos da pele adjacente sofrem mitose e migram para a epiderme regenerada, pigmentando a nova epiderme também das bordas para o centro (HOSGOOD, 2013). A acetilcolina e seus receptores são produzidos pelos queratinócitos para criar um feedback positivo para a migração dessas células pelos receptores M4 e negativo pelos receptores M3. Catecolaminas como a adrenalina também são produzidos pelos queratinócitos para reduzir a reepitelização (GURTNER, 2008).

#### 2.2.3.4 Contração da pele no processo de cicatrização

Entre cinco e nove dias, a contração da ferida é visível (HOSGOOD, 2013). Os fibroblastos e os fibrócitos diferenciam-se em miofibroblastos (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013), que passam a apresentar junções intracelulares, envelope nuclear distorcido e filamentos contráteis de actina, desmina e vimentina. Os fibrócitos são células progenitoras com origem na medula óssea, que migram para a ferida durante a fase inflamatória e sua diferenciação é induzida pelo TGF- $\beta_1$ , que estimula a sua expressão de SMA. Na segunda semana, os miofibroblastos, estimulados pelo TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  e PDGF, vão causar a contração e o remodelamento da MEC. A contração termina quando as bordas da ferida se encontram, ou se a tensão da pele adjacente iguala-se ou excede a força de contração. Se esse processo cessar e ainda houver tecido de granulação exposto, a cobertura da ferida ocorre por reepitelização (HOSGOOD, 2013).

#### 2.2.4 Fase de maturação

Na fase de maturação (FIGURA 6), os fibroblastos e as células endoteliais sofrem apoptose (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). Os feixes de colágeno tornam-se mais espessos e assumem a orientação ao longo das linhas de tensão da pele (HOSGOOD, 2013). Tudo isso para aumentar a resistência mecânica da cicatriz, em um processo que leva meses ou anos (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). O colágeno depositado na MEC gera um feedback negativo para os miofibroblastos, assim como o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  sinalizam para os fibroblastos produzirem menos colágeno (HOSGOOD, 2013). Ao mesmo tempo, as MMPs secretadas pelos macrófagos, células epidermais, células endoteliais e fibroblastos da MEC degradam o colágeno (GURTNER, 2008; HOSGOOD, 2013). O equilíbrio entre a expressão de MMPs e TIMPs é importante nessa fase, juntamente com os fatores de crescimento TGF- $\beta$ , PDF e IL-1. Os TIMPs ligam-se irreversivelmente às MMPs, impedindo sua ação de degradação do colágeno, inibem a angiogênese e induzem apoptose celular. São expressados por fibroblastos, células epidermais e endoteliais, osteoclastos, condrócitos, células do músculo liso e células tumorais, e são afetados por FGF, PDGF, EGF, IL-6, IL-1 e IL-1 $\beta$  (HOSGOOD, 2013).



**Figura 6.** Diagrama esquemático da cicatrização, na fase de maturação. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

### 2.3 Cirurgia plástica reconstrutiva

As lesões na pele são um transtorno para o homem e para os animais desde tempos remotos. Na medicina, representam um problema de saúde pública com repercussões socioeconômicas significativas. Embora os dados brasileiros sejam pouco precisos, estima-se que quatro milhões de pessoas apresentem algum tipo de complicação no processo de cicatrização (GEORGE, 1996; MANDELBAUM et al., 2003).

Dos pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade de São Paulo com lesão de deslucamento, ferida já considerada complicada por sua extensão e contaminação, 95,2% apresentaram alterações sistêmicas ou poli trauma, trazendo maiores dificuldades para a enxertia da pele avulsionada. A maioria dos casos é consequência de acidentes automobilísticos, e desses, 28,6% evoluem para amputação de membro e 14,3% para órbito (MILCHESKI, 2010). No Reino Unido, 13 mil pessoas por ano são admitidas em hospitais por queimaduras. Mundialmente, seis milhões de pessoas por ano necessitam de enxertia por este tipo de lesão. Ao menos 30% desses pacientes sofrem de hipertrofia e contração do enxerto, com redução de mobilidade (HARRISON & MACNEIL, 2008). Em estudo com 985 pacientes adultos queimados de 1993 a 2002 em Boston, EUA,

38,7% desenvolveu no mínimo uma contratura, com média de três contraturas/paciente. O ombro foi a região mais afetada (38%), seguida de cotovelo (34%) e joelho (22%) (LEBLEBICI et al., 2006).

As grandes perdas cutâneas, como nas queimaduras e nos traumas cinéticos de alta energia, podem gerar lesões extensas e profundas, as quais acarretam, agudamente, diminuição da barreira de proteção da pele, com prejuízo da função imunológica, aumento do risco de infecções (que podem generalizar-se e levar o paciente a óbito), aumento da perda de água e eletrólitos e desencadeamento da cascata de dor e suas consequências. Cronicamente, há formação de cicatrizes extensas, causando perda da capacidade de troca e regulação com o ambiente, alteração de sensibilidade para mais ou para menos, retrações em articulações que determinam restrições motoras, estenoses de regiões cavitárias (pálpebras, nariz, boca, conduto auditivo, genitália e ânus) e prejuízo estético (CONDUTA, 2012).

A síntese e a reconstrução da pele podem ser realizadas por várias técnicas. A escolha dependerá da profundidade e da extensão das lesões: curativos; sutura para fechamento primário (com pontos, grampos, cola, etc.); enxertos do próprio indivíduo traumatizado (autógeno ou autólogo), de outros da mesma espécie (alógeno ou homólogo), ou ainda de outra espécie (xenoenxerto ou heterólogo); retalhos pediculados (flapes ou *flaps*); enxertos (ou retalhos) livres; ou transplantes microvascularizados (LOFÊGO FILHO et al. 2006; PAVLETIC, 2010; COUTINHO, 2012; FOSSUM, 2013). A reconstrução e o fechamento precoce da ferida devem ser priorizados quando: (1) tecidos vitais estiverem expostos; (2) quando a reconstrução do tecido é necessária para suporte estrutural, como os coxins, por exemplo; (3) em feridas localizadas em superfícies flexoras, e o manejo prolongado da ferida possa levar a uma contratura; (4) feridas abertas sobre os tendões; (5) feridas orofaciais, em que é importante o retorno rápido às funções do tecido, como as pálpebras (WILLIAMS, 2013).

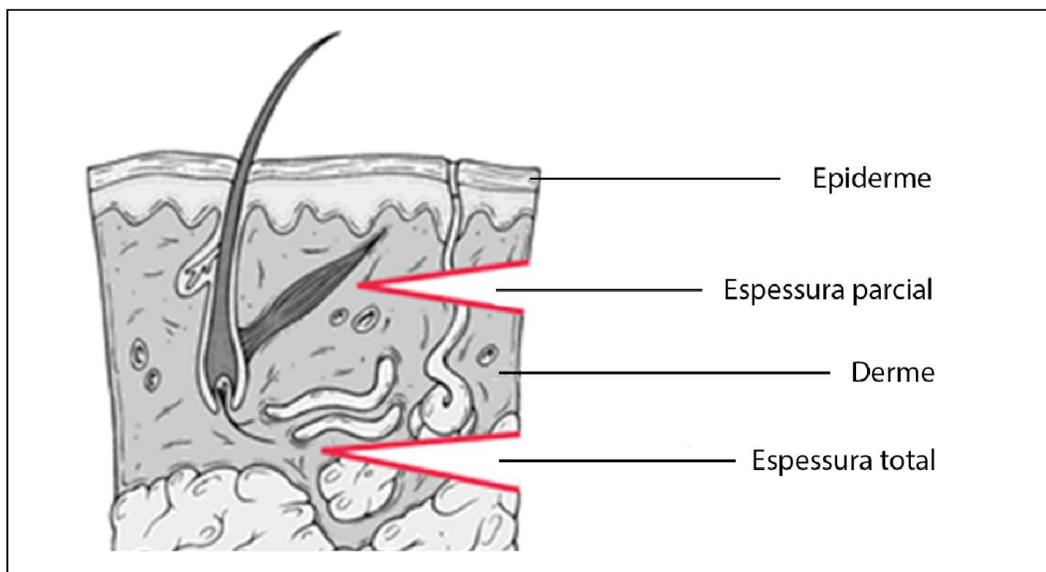
Quando técnicas simples de relaxamento de tensão não forem suficientes para o fechamento da ferida ou ainda persistir excesso de tensão, deve-se optar por técnicas reconstrutivas mais avançadas com objetivo de: fechamento rápido com a técnica mais simples possível; sem comprometimento da função e morbidade do paciente; e custos mínimos. A cirurgia plástica em humanos utiliza o conceito de “escada reconstrutora”, que postula: “quanto mais extensa ou complicada for a ferida, mais alto precisa o

cirurgião escalar para encontrar a técnica mais apropriada”. Pela ordem crescente, os degraus correspondem a: (1) cicatrização por segunda intenção; (2) fechamento primário; (3) fechamento primário tardio; (4) técnica simples de alívio de tensão; (5) flapes de plexo subdérmico; (6) enxerto livre de pele; (7) flape de padrão axial; (8) flape musculocutâneo; (9) transferência de tecido livre microvascular (WILLIAMS, 2013).

### 2.3.1 Enxertos cutâneos livres de espessura total

O enxerto de pele é um procedimento cirúrgico simples, fruto de uma longa evolução teórica e técnica. Há registros de enxertos de pele de 2.500 anos a.C.. Os textos de um cirurgião da Índia antiga, chamado Susruta, descrevem enxertos de pele para reconstrução de orelha, nariz e lábios no século VI d.C.. Gaspare, em seu tratado de medicina de 1597, menciona, pela primeira vez no Ocidente, um transplante cutâneo. Mas apenas no século XIX a técnica é descoberta, melhorada e generalizada com os trabalhos de Reverdin e Ollier. A popularização da técnica foi contemporânea aos estudos sobre fisiologia da cicatrização, quando em 1863 Paul Bert publica seu trabalho de doutorado com uma série de experimentos em que conclui que a sobrevivência do enxerto de pele depende da vascularização do leito receptor até o enxerto. Em 1914, John Staige Davis modifica a técnica de Reverdin e, durante o século XX, essa técnica é refinada. Mesmo assim, nos dias atuais ainda existe a necessidade de maior compreensão sobre os mecanismos celulares e moleculares da integração e revascularização dos enxertos de pele (BOUDANA et al., 2010).

Enxertos livres podem ser de espessura total ou parcial (FIGURA 7). Sendo estes últimos classificados de acordo com sua espessura em finos, médios e grossos (LOFÊGO FILHO et al. 2006; PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013). Os enxertos cutâneos livres são segmentos completamente separados de uma área do corpo, utilizados para cobrir outra área carente da superfície da pele (ANGELI, BRANDÃO & FREITAS, 2006; LOFÊGO FILHO et al. 2006; BOUDANA et al., 2010; PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013). Podem ser classificados de acordo com o processamento para sua expansão (LOFÊGO FILHO et al. 2006; PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013): em malha, ilhas e tiras (LOFÊGO FILHO, 2006; PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013).



**Figura 7.** Diagrama de corte das camadas da pele, demonstrando os enxertos de pele de espessura total e de espessura parcial. FONTE: ROBERTS & HEDGES, 1991 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

Os enxertos promovem epitelização e fechamento mais rápido de feridas do que a cicatrização por segunda intenção (UYSAL et al., 2014). Enxertos de pele em cães e gatos são geralmente de espessura total. Podem ser aplicados imediatamente em feridas com leitos limpos com suprimento sanguíneo adequado ou sobre tecido de granulação maduro (WHITE, 2003; PAVLETIC, 2010; WILLIAMS, 2013), ou ainda sobre músculo sadio, periósteo e peritônio (PAVLETIC, 2010), desde que sejam leitos vascularizados. Geralmente, estes enxertos são autógenos (WHITE, 2013) já que os aloenxertos e xenoenxertos são temporários e funcionam como curativos biológicos (LOFÊGO FILHO, 2006).

São indicados para a cobertura de grandes defeitos em superfícies flexoras e/ou em extremidades distais (ANGELI, BRANDÃO & FREITAS, 2006; PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013) para reparar defeitos causados por excisão de tumor, trauma, defeito congênito, queimadura e feridas crônicas por irradiação ou diabetes (ZOGRAFOU et al., 2011). Há recomendação para o uso dessa técnica reconstrutiva quando não existe pele móvel adjacente, o que ocorre principalmente na parte distal dos membros, ou quando há possibilidade de desenvolvimento de tecido cicatricial excessivo na proximidade de articulações, diminuindo sua função (WHITE, 2013). Na medicina, os autoenxertos também são os mais empregados por sua comodidade,

segurança, baixo custo e capacidade de atuar como cobertura definitiva (LOFÊGO FILHO, 2006).

Nessas técnicas cirúrgicas, a área a ser recuperada chama-se área receptora e utilizam outra área do corpo como doadora de pele. Da mesma forma, a área doadora sofre também um processo de cicatrização, mas o trauma pode ser planejado cirurgicamente e melhor controlado. Mesmo assim, haverá um processo de cicatrização nos dois locais, que poderá determinar manchas e cicatrizes definitivas, ou poderá apresentar complicações que levem a uma má cicatrização (PAVLETIC, 2010; COUTINHO, 2012; FOSSUM, 2013).

### 2.3.2 A fisiologia do enxerto de pele de espessura total

Os enxertos de pele apresentam uma semelhança aparente com a pele normal, mas, na prática, são ambientes de feridas grandes em que os queratinócitos, fibroblastos e outras células tornam-se ativadas, onde ocorre angiogênese (HARRISON & MACNEIL, 2008). A cicatrização da pele após enxertia apresenta dois eventos: a integração, ou “pega”, seguida da contração (LOFÊGO FILHO et al., 2006). A “pega do enxerto” é o processo pelo qual as células dérmicas e, com menor importância, as células epidérmicas da região doadora sobrevivem no leito receptor até tornarem-se completamente revascularizadas pelo crescimento de capilares do leito receptor para o enxerto. Segundo White (2013), a “pega” se dá em dois processos separados, porém relacionados: adesão e nutrição.

A adesão consiste no desenvolvimento de um selante de fibrina que exsuda da superfície receptora (LOFÊGO FILHO et al., 2006; WHITE, 2013), com força máxima de adesão oito horas após a enxertia. Para isso, é importante manter uma estreita proximidade entre o enxerto e o leito receptor. Além da função de cola, a fibrina ainda atua como um andaime, por onde crescerão os novos capilares da região doadora em direção ao enxerto. Leucócitos e fibroblastos marginam a fibrina, que será substituída por tecido conjuntivo fibroso, aumentando ainda mais a estabilidade da pele transplantada após uma semana de pós-cirúrgico.

Dessa forma, o sucesso da adesão precoce da fibrina é essencial para a nutrição do enxerto (WHITE, 2013), que ocorre por embebição plasmática, ou circulação plasmática, entre o segundo e o terceiro dia, (LOFÊGO FILHO et al., 2006;

PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). Nesse momento, o enxerto absorve as proteínas séricas livres de fibrinogênio e os eritrócitos exsudados da superfície receptora. Possui uma aparência edematosa e enegrecida pela absorção dos produtos da hemoglobina, sendo que a sua aparência pouco saudável nessa fase não deve ser confundida com a sua rejeição precoce (WHITE, 2013).

No segundo ou terceiro dia, inicia o processo de inosculação, que se refere ao desenvolvimento de novos brotos capilares oriundos do leito receptor, os quais cruzam os andaimes de fibrina e se ligam diretamente aos antigos vasos do enxerto (LOFÊGO FILHO et al., 2006; PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). Esse processo vai fornecer uma movimentação lenta e desorganizada de sangue (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013), com uma aparência ainda cianótica (LOFÊGO FILHO et al., 2006; PAVLETIC, 2010). Mesmo não se compreendendo bem a importância desse processo na sobrevivência do enxerto, sabe-se que pode ser o responsável pela aparência mais saudável dos enxertos bem-sucedidos após uma semana (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). A movimentação do enxerto nas primeiras horas pode interferir com as ligações de fibrina e o seu deslocamento durante a primeira semana pode romper essas ligações e diminuir o contato do enxerto, retardando ou evitando a “pega” (WHITE, 2013). Em seres humanos e em cães essa anastomose ocorre em três a cinco dias (AMÂNCIO et al., 2006; PAVLETIC, 2010).

A revascularização, ou penetração vascular, é o processo final. Ele leva de uma a duas semanas (WHITE, 2013), quando ocorre o surgimento de novos vasos e sua proliferação, assegurando a sobrevivência da pele transplantada (LOFÊGO FILHO et al., 2006; WHITE, 2013). Nessa fase, a aparência saudável do enxerto confirma o reestabelecimento da circulação cutânea (WHITE, 2013). A ocorrência de qualquer material acumulado, como pus, soro, sangue, hematoma ou corpo estranho entre o enxerto e o leito, assim como a movimentação do enxerto sobre o leito e a infecção bacteriana, atrasam ou impedem a revascularização, causando necrose do tecido implantado (PAVLETIC, 2010).

O contato inadequado entre enxerto e pele impede a inosculação e gera revascularização pobre. Isso ocorre quando há excesso de tensão do enxerto, porque este é muito pequeno em relação ao leito; ou quando o enxerto é muito maior que o leito e ocorre o seu preeamento. Os enxertos sem viabilidade, após o tempo de

revascularização, apresentam coloração branca ou negra. Mas é preciso saber que os primeiros sinais de necrose superficial do enxerto nem sempre são catastróficos, pois os folículos pilosos e os anexos cutâneos da região profunda do enxerto podem sobreviver e funcionar como uma fonte de epitelização para a ferida (PAVLETIC, 2010).

### 2.3.3 Contração do enxerto

A contração é o fenômeno fisiológico que reduz a área de uma ferida de espessura total para acelerar seu fechamento. Animais possuem a pele solta com uma camada muscular subcutânea chamada panículo carnoso que permite que a pele deslize suavemente sobre os tecidos subjacentes. Onde essa camada muscular está ausente e a pele é mais firmemente ligada aos tecidos mais profundos, a contração leva à distorção dos tecidos circundantes com deformidade estética associada e limitação da mobilidade articular. A aplicação de enxertos de espessura parcial em feridas reduz a contração e a hipertrofia da cicatriz, quando comparada à cicatrização de segunda intenção, mas ainda assim essa complicação permanece presente (HARRISON & MACNEIL, 2008).

Após a integração do enxerto, a partir do décimo dia, assim como nas feridas abertas, os miofibroblastos e as proteínas contráteis iniciam o processo de contração do enxerto, que pode perdurar até seis meses e pode trazer prejuízos cosméticos. Os fibroblastos do tecido de granulação, além de sintetizar componentes da matriz extracelular, diferenciam-se e passam a apresentar miofilamentos com a expressão de feixes de  $\alpha$ -actina, tornam-se bipolares, orientados ao longo das linhas de tensão. Enxertos de espessura total apresentam menor contração pela menor proporção de fibroblastos contráteis (LOFÊGO FILHO et al., 2006; HARRISON & MACNEIL, 2008) e pela intensidade e distribuição menos acentuadas da fibronectina, que também desaparece mais precocemente. A fibronectina é o elemento de sustentação da MEC provisória, a qual desaparece quando as fibras colágenas já estão organizadas (LOFÊGO FILHO et al., 2006).

Esse processo ocorre em dois momentos: a contração primária ocorre quando o enxerto é retirado do sítio doador e varia entre 9% a 22%, de acordo com a sua espessura, pelo encolhimento das fibras de elastina na derme. Neste momento, enxertos de espessura total contraem mais do que os de espessura parcial por apresentar maior conteúdo de elastina. Ao ser colocado em seu leito, ele sofre a contração secundária. As bordas recolhem-se em direção ao centro e reduzem a sua área e as bordas em contato

com o leito. Contrariamente à primária, a contração secundária é menor em enxertos de espessura total (HARRISON & MACNEIL, 2008).

A menor contração de um enxerto está relacionada à redução do infiltrado inflamatório e à diferenciação dos miofibroblastos. A aplicação de enxerto também reduz a contração do tecido de granulação, transformando as granulações em tecido fibroso avascular denso. Enxertos de espessura total tem menor diferenciação dos miofibroblastos que os de espessura parcial e, conseqüentemente, menor contração. A aplicação de enxerto também inibe a atividade da *prolyl hydroxylase*, diminuindo a síntese de colágeno no leito do enxerto (HARRISON & MACNEIL, 2008).

Quanto mais móvel for a área do leito, maior será a contração, assim como em leito de tecido de granulação. As formas de prevenção da contração são o uso de talas e roupas de pressão durante meses. Em humanos, a pressão constante, maior que 25 mmHg, durante 6 a 12 meses, regride a hipertrofia da cicatriz em 60-85% dos pacientes. As roupas são desagradáveis e podem prolongar o período de tratamento médico após a lesão e atrasar o retorno às atividades diárias, mas quando a contratura ocorre, deve-se realizar nova enxertia, com alta probabilidade de reincidência. A contração também ocorre com maior gravidade em pacientes pediátricos, que possuem maior proporção de TGF- $\beta$ 1 que TGF- $\beta$ 3, o que vai se alterando com a idade. Enxertos colocados em lugares diferentes no mesmo paciente ou no mesmo local em pacientes diferentes terão comportamentos diferentes (HARRISON & MACNEIL, 2008).

#### 2.3.4 Lesão por isquemia e reperfusão - IRI

Enxertos livres são transplantes teciduais nos quais a pele perde completamente o contato com a área doadora (ANGELI, BRANDÃO & FREITAS, 2006), e a lesão causada pela própria técnica cirúrgica do enxerto de pele é um limitante multifatorial para o sucesso do tratamento (BIGOLIN et al., 2010), assim como em qualquer transplante de órgão (ELTZSCHING & COLLARD, 2004). Isquemia é definida como a condição de suprimento sanguíneo inadequado a uma área de determinado tecido (PEREIRA et al., 2012), que ocorre em condições de hipóxia ou anóxia (ELTZSCHING & COLLARD, 2004). O tempo crítico de isquemia depende do tipo de tecido, de acordo com seu nível de atividade metabólica (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; PEREIRA et al., 2012). Dessa forma, o tempo afeta diretamente o sucesso do procedimento

cirúrgico e determina a severidade da lesão ao tecido. A pele pode suportar entre 10 a 12 horas de isquemia (PEREIRA et al., 2012).

A isquemia primária é causada pela interrupção do fluxo sanguíneo (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004; PEREIRA et al., 2012) que, com a chegada insuficiente de oxigênio ao tecido, dá início ao metabolismo anaeróbico intracelular em 60 a 90 minutos após a lesão (PEREIRA et al., 2012). Os seus efeitos não são percebidos macroscopicamente pelo cirurgião, mas trarão consequências tardias ao enxerto (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

Na isquemia primária, ocorre o acúmulo de lactato; a diminuição do pH; a distribuição alterada de íons celulares com o influxo do cálcio, sódio e água; aumento dos mediadores pró-inflamatórios (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; PEREIRA et al., 2012); a alteração do potencial de membrana; o edema intracelular; a desorganização do citoesqueleto; o aumento da hipoxiantina; a diminuição de ATP, de fosfocreatina e de glutadion; a estabilização e translocação nuclear do fator induzível por hipóxia (do inglês *hypoxia-inducible factor 1* - HIF-1); o aumento da expressão da molécula de adesão de leucócitos; o aumento da expressão de VEGF (ELTZSCHING & COLLARD, 2004); a diminuição do diâmetro dos capilares, o sequestro de leucócitos; e o aumento da secreção de mediadores pró-inflamatórios. Os fatores mais importantes durante essa fase são a formação de radicais livres de oxigênio, a alteração do NO, a ativação do sistema complemento e dos leucócitos, e a secreção dos fatores de crescimento pelo endotélio e pelas mitocôndrias (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

A isquemia secundária é ainda mais lesiva que a primária. Nessa fase, ocorre trombose intravascular massiva, edema intersticial, e a ausência de drenagem linfática agrava ainda mais o edema (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004; PEREIRA et al., 2012). Há falta de inervação e de tônus das artérias, sendo o fluxo sanguíneo equivalente à metade do fluxo original (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; PEREIRA et al., 2012). Essa fase pode manifestar-se clinicamente como falha do enxerto (ELTZSCHING & COLLARD, 2004).

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado, por outro lado, inicia-se uma cascata de eventos que causam lesões adicionais àquelas causadas pela isquemia. As mudanças bioquímicas e moleculares ocorridas durante a isquemia predispõem o tecido a danos mediados pelos radicais livres. Entre as espécies de radicais livres tóxicas para a pele

temos: superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila (OH) (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

Os radicais de oxigênio causam alterações microvasculares como edema das células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular durante a isquemia e, quando o fluxo de sangue é restaurado, o influxo de células inflamatórias lesiona o tecido. Em condições normais, a enzima superóxido dismutase (SOD) converte o superóxido em peróxido. No entanto, durante a reperfusão, essa defesa não é suficiente (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). Assim, o peróxido de hidrogênio é convertido em hidroxila, que danifica aminoácidos, proteínas de transporte da membrana celular, citocromos e DNA (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). As espécies reativas de oxigênio (ROS) estimulam a ativação de leucócitos, sua quimiotaxia, adesão e transcrição de fatores como NF- $\kappa$ B (ELTZSCHING & COLLARD, 2004), molécula-chave para a resposta imunológica da pele, que induz a produção de mediadores inflamatórios (TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA, 2011).

Os neutrófilos, primeiros leucócitos a chegar no local pela quimiotaxia das plaquetas, das células endoteliais e por outros neutrófilos, secretam enzimas proteolíticas como elastase, produzem radicais livres adicionais e obstruem os capilares, aumentando a extensão da isquemia (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). Em consequência, ocorre trombose e edema pela oclusão de vasos linfáticos. As alterações das células endoteliais causam estreitamento dos vasos da microcirculação, vazamento dos capilares e falha da microcirculação. A disfunção do endotélio inibe a produção de NO, diminuindo seu efeito protetivo e aumentando o acúmulo de oxigênio nas fases iniciais da reperfusão (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

O complexo de transporte de elétrons das mitocôndrias reduz sua atividade e apresenta alterações estruturais após 60 minutos de isquemia. Com a reintrodução de oxigênio da reperfusão, as alterações estruturais desse complexo causam um vazamento de elétrons, que reagem com oxigênio para produzir  $O_2^-$ , resultando em uma explosão oxidativa. A lesão causada pela isquemia também ativa o sistema complemento para iniciar a resposta imune contra as células do enxerto. Durante a reperfusão, ocorre também a apoptose celular induzida pela interação entre as células sanguíneas e as do endotélio vascular. O sistema complemento amplifica a reação inflamatória, induzindo a produção e secreção de TNF- $\alpha$ , proteína quimiotática 1 (MCP-1) para macrófago e

citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6; aumenta a atração e a ativação de leucócitos, ao induzir a produção endotelial de IL-8 e MCP-1 (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

### 2.3.5 A técnica de enxertia

Os enxertos livres de pele em cães e gatos podem ser exitosos, se observados os detalhes da técnica cirúrgica correta e asséptica (PAVLETIC, 2010). A área doadora mais utilizada é o flanco, enquanto o pescoço e a região ventral são opções inferiores, consideradas se o primeiro não estiver disponível. A área doadora deve oferecer pele grande o suficiente para a reconstrução; deve ser passível de reconstrução simples; ser durável e resistente o suficiente para o desgaste da região receptora (WHITE, 2013) e livre de lesões neoplásicas (LOFÊGO FILHO, 2006). Enquanto a pele do flanco possui uma boa densidade de pelo e um tecido dérmico de boa qualidade, a pele da região ventral possui uma derme mais robusta, contudo com poucos folículos pilosos. Apesar da menor importância, pode-se considerar também a compatibilidade da aparência da região doadora com a receptora (WHITE, 2013).

A pele geralmente é coletada com a dissecação entre o tecido adiposo frouxo abaixo da hipoderme e o músculo do panículo. Pode-se realizar a incisão ao redor de um molde no formato da ferida a ser reconstruída, ou pode-se simplesmente remover uma grande área de pele em um formato que simplifique o seu fechamento primário, como uma elipse. Deve ser coletada com alguns milímetros adicionais de sobreposição para garantir a área adequada (WHITE, 2013). As bordas de pele devem ser manipuladas o menos possível e com instrumentos delicados, como ganchos de pele, pinças de Debakey, pinças de Adson com dente ou pinças Adson-Brown. Suturas de reparo com mononilon ou polipropileno (4-0 ou 3-0) podem ser utilizadas (WHITE, 2013; WILLIAMS, 2013), colocadas ao redor do enxerto à medida em que ele é elevado (WHITE, 2013). As incisões devem ser realizadas preferencialmente com lâmina de bisturi e não com tesoura, pois esta esmaga e rasga dos tecidos. A incisão deve ser feita perpendicularmente à pele, sem angulação, para melhor aposição no momento da sutura (WILLIAMS, 2013).

O tecido hipodérmico deve ser retirado com uma tesoura, pois a sua inclusão entre a derme do enxerto e a área receptora impede a revascularização, podendo causar

necrose precoce (entre um e quatro dias de pós-operatório). Essa raspagem não deve ser realizada com uma lâmina de bisturi para não causar danos à derme (WHITE, 2013). A coleta deve ser realizada em condição asséptica, e o enxerto deve ser enrolado em esponja ou gaze estéreis embebidas em solução salina 0,9% (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013) ou antibiótica (WHITE, 2013) ou de Ringer Lactato (PAVLETIC, 2010) para evitar o seu ressecamento, enquanto não é aplicado na ferida. A pele coletada pode ser preservada por alguns dias a 4°C (WHITE, 2003).

O leito receptor deve apresentar vascularização suficiente (LOFÊGO FILHO et al., 2006), pois o leito pouco vascularizado pode levar à necrose precoce (WHITE, 2013). Por isso, deve-se evitar a enxertia sobre ossos desprovidos de periósteo, cartilagem desprovida de pericôndrio, ou diretamente sobre tecido adiposo cauterizado (LOFÊGO FILHO et al., 2006). Às vezes, é interessante aguardar para realizara enxertia (WHITE, 2003; LOFÊGO FILHO et al., 2006; PAVLETIC, 2010; WILLIAMS, 2013), pois leitos com tecido de granulação maduro ajudam a preencher a profundidade do defeito e apresentam menos formação de seroma e hematoma (LOFÊGO FILHO et al., 2006).

A hemostasia rigorosa reduz o risco de infecção pós-cirúrgica e a formação de hematomas e seromas (LOFÊGO FILHO et al., 2006; WILLIAMS, 2013) e assegura um bom contato entre o enxerto e o leito receptor. A superfície receptora também deve estar livre de debris e de irregularidades (LOFÊGO FILHO et al., 2006; WHITE, 2013) e com menor número possível de áreas cauterizadas (LOFÊGO FILHO et al., 2006).

O enxerto deve ser suturado com pontos simples interrompidos, aplicados frouxamente (WHITE, 2013). Os fios devem ser finos, monofilamentares, 3-0 (WHITE, 2013; WILLIAMS, 2013) ou 4-0, agulhados, e com agulhas de corte reverso ou ponta romba (atraumática). O porta-agulha deve ter ponta fina para não danificar a agulha, como o de Debakey ou de Mayo. A manipulação dos tecidos deve ser delicada para evitar lesões vasculares ou resposta inflamatória aumentada. A aposição correta dos tecidos reduz a ocorrência de deiscência e melhora a qualidade estética da reconstrução (WILLIAMS, 2013). Suturar o enxerto no local sob pequena tensão periférica ajuda a aumentar o seu contato e evita que o enxerto se enrole ou se mova (WHITE, 2013). Para evitar o acúmulo excessivo de seroma no pós-cirúrgico, a formação de espaço morto, normal em cirurgias reconstrutivas, deve ser manejada por suturas de aposição das

camadas mais internas, ou será necessário deixar drenos passivos (WILLIAMS, 2013) ou ativos (WHITE, 2013; WILLIAMS, 2013), principalmente quando a enxertia é realizada sobre uma ferida recente (WHITE, 2013).

A área receptora pode sofrer infecções, ou os retalhos apresentarem necrose, de forma que a reconstrução seja perdida parcial ou totalmente (PAVLETIC, 2010; ZOGRAFOU et al., 2011; COUTINHO, 2012; MACPHAIL, 2013). A infecção também pode causar a contração exagerada do enxerto (LOFÊGO FILHO et al., 2006). Na sequência do tratamento, haverá a probabilidade de eleger-se outra área doadora para um novo enxerto ou retalho. Nos casos de grandes perdas ou muitas complicações, essa sequência torna-se de difícil manejo, praticamente esgotando a possibilidade do uso de tecido autógeno (PAVLETIC, 2010; COUTINHO, 2012; MACPHAIL, 2013).

A debilitação sistêmica do paciente pode levar à necrose tardia do enxerto após quatro dias (WHITE, 2013). Assim, a sua condição geral de saúde também deve ser avaliada, pois esta pode trazer graves complicações à cicatrização. Deve-se proceder o diagnóstico de doenças concomitantes preexistentes como: diabetes melito, hiperparatireoidismo, hipotireoidismo, infecções por FIV/FeLV, coronavírus felino (FIP), anemia, uremia, hipoproteinemia, neoplasias, coagulopatias, estado nutricional ruim. Medicamentos como corticosteroides e quimioterápicos podem apresentar efeitos adversos na cicatrização (FRIEND, 2013).

#### 2.3.5.1 Curativo e cuidados pós-cirúrgicos

Após o enxerto ser fixado na área receptora, é necessário aplicar um curativo compressivo, particularmente se o implante for de grande dimensão e espessura (PAVLETIC, 2010). Caso a localização da ferida não permita a colocação de bandagens, o curativo pode ser preso ao corpo, utilizando o curativo do tipo *tie-over*, que envolve a colocação de grandes suturas soltas na pele, ao redor da ferida para ancorar o curativo, comprimindo-o sobre a ferida (ANDERSON, 2013). O objetivo é criar uma pressão uniforme para baixo em toda superfície do enxerto (WHITE, 2013) para otimizar o contato do enxerto com o leito da área receptora para permitir a correta anastomose entre os vasos dos mesmos e reduzir a ocorrência de hematoma e seroma (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). Contudo, é preciso ter em conta que os curativos muito apertados podem levar à necrose tardia (após quatro dias) (WHITE, 2013).

Um manejo cuidadoso e regular é essencial para garantir que o enxerto pegue (WHITE, 2013). Em cães e gatos, geralmente utiliza-se um curativo em cinco camadas: a primeira camada de antimicrobiano tópico de base oleosa; a segunda, uma camada para evitar a aderência ao curativo aplicada de forma homogênea; a terceira, uma camada absorvente de gazes estéreis; a quarta, uma atadura elástica para evitar o deslizamento do enxerto sobre o leito; a quinta, camada de imobilização (tala) para restringir o movimento da região que recebeu o enxerto (PAVLETIC, 2010).

As trocas de curativo devem ser regulares para evitar acúmulo de exsudato ao redor do enxerto e a entrada de sujidades. Geralmente, a primeira troca de curativos é realizada com 48 horas de pós-operatório, com bastante cuidado para não movimentar o enxerto (WHITE, 2013). No entanto, é mais seguro esperar até 72 horas para a primeira troca (LOFÊGO FILHO et al., 2006; PAVLETIC, 2010) para assegurar-se de não interromper o período crítico de revascularização. O repouso absoluto, com restrição total de movimentos, é muito importante e crucial nas primeiras 48 horas (PAVLETIC, 2010). Os pacientes devem ser sedados e ter seus movimentos restritos durante a troca de curativo para evitar traumas acidentais. Deve-se cuidar para não levantar o enxerto do leito, e, se houver aderências, deve-se desfazê-las com solução salina 0,9% (PAVLETIC, 2010). Os líquidos podem ser retirados, pressionando-se delicadamente o enxerto com um cotonete ou aspirando com agulha hipodérmica fina (WHITE, 2013).

Após o período crítico, a frequência das trocas de curativo depende da quantidade de exsudato produzido, normalmente nas primeiras duas semanas pode ser a cada 24 ou 48 horas (WHITE, 2013). Recomenda-se o uso de colar elisabetano para evitar auto trauma e a permanência dos curativos durante 30 dias com troca a cada três (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). A manutenção da derme depende também da secreção das glândulas sudoríparas e apócrinas, que retornam à atividade normal depois de várias semanas (WHITE, 2013). Provavelmente, a pele sob o curativo estará seca e pruriginosa, assim se recomenda o uso de cremes emolientes (WHITE, 2013).

Deve-se fornecer um apropriado controle da dor a cada troca de curativo e avaliação da ferida. É importante estar pronto para anestésiar o paciente algumas vezes para que seja possível tratar a ferida com segurança e sem estresse para o mesmo. O uso de luvas é importante para diminuir a contaminação, inclusive trocando-as entre a limpeza da ferida e a colocação de novas bandagens. É importante também proteger a

ferida do ambiente hospitalar, de sujidades do ambiente e de fômites (ANDERSON, 2013).

### 2.3.6 A interpretação da aparência do enxerto

Entre o primeiro e o terceiro dia de pós-cirúrgico, o enxerto tem aparência ingurgitada ou edematosa, pois é quando ocorre o máximo de embebição plasmática. Logo a seguir, escurece, e algumas regiões ficam azuladas ou amarronzadas. As áreas azuis são consideradas saudáveis neste momento. Até o final da primeira semana, o enxerto assumirá uma aparência menos edematosa e uma coloração rosada, pela formação de uma pequena circulação. Já entre a segunda e a terceira semanas, poderá haver sinal de crescimento de pelos, mas isso pode levar várias semanas (WHITE, 2013).

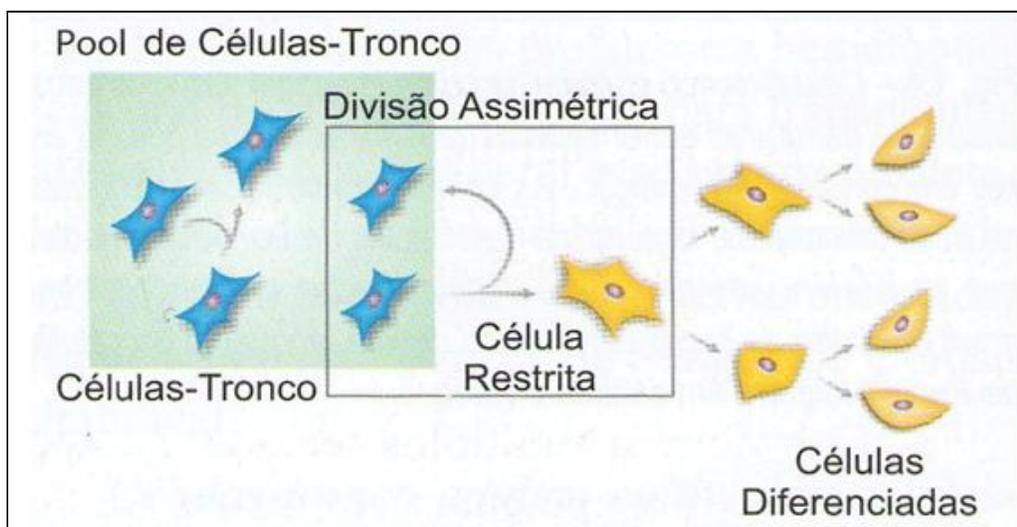
Qualquer indicativo de movimentação do enxerto é preocupante, porém menos grave durante as primeiras 48 horas pela ocorrência do processo de embebição. A movimentação após esse período resulta na quebra do leito de fibrina e na falha da angiogênese. Quando ocorre a falha do enxerto, nota-se a separação do mesmo de seu leito. Já a separação total ou parcial da epiderme pode ocorrer em alguns casos. Mesmo causando uma má aparência, a maioria dos enxertos será bem sucedida, pois a camada dérmica profunda integra-se à ferida e continua viável (WHITE, 2013). Na medicina humana, 20% dos enxertos sofrem descamação da epiderme (RAMALHO et al., 1997; AMÂNCIO et al., 2006). Também chamada de epidermólise por alguns autores, chega a acometer 100% dos ratos em alguns experimentos (VURAL et al., 2010; RICHTER et al., 2009).

A coloração branca geralmente indica isquemia do enxerto, enquanto a coloração negra indica necrose. Estas devem ser resseccionadas precocemente para salvar as áreas não afetadas. Sinais de infecções superficiais menores podem ocorrer, mas exsudato purulento sob o enxerto indica mau prognóstico, e a salvação do enxerto é impossível (WHITE, 2013). As complicações mais comuns dos enxertos de espessura total são a contração, a perda parcial (até 5% a 10% da área) ou total do enxerto, sendo necessária nova enxertia ou o tratamento por segunda intenção (LOFÊGO FILHO, 2006; MICHELSKI, 2010; ZOGRAFOU, 2011). O resultado funcional e estético depende da quantidade de derme e estruturas anexas contidas no enxerto e da proporção

da ferida coberta pela derme enxertada. Essas estruturas anexas podem estar reduzidas quando o enxerto é muito retalhado ou acompanhado de áreas de cicatrização por segunda intenção, pois áreas epitelizadas não conterão essas estruturas e essas áreas serão menos funcionais (WHITE, 2013).

## 2.4 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 especializado (MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006). Com divisão assimétrica (FIGURA 8), 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 (ZAGO & COVAS, 2006; CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010; CHENG et al., 2011).



**Figura 8** - Desenho ilustrativo da propriedade fundamental de divisão assimétrica das células tronco. FONTE: ZAGO & 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, CHAGAS TELLES & NARDI, 2006). De acordo com 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 (CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010). Células multipotentes apresentam capacidade de gerar uma quantidade limitada de tipos celulares (CIRNE-LIMA, 2007; YARAK & OKAMOTO, 2010). São objeto de estudo em trabalhos experimentais por sua plasticidade, que permite a diferenciação em tecidos como fígado, tecido nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração e músculo esquelético (ZAGO & COVAS, 2006).

As células tronco mesenquimais (MSCs) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein e colaboradores em 1966 (YANG et al., 2013; ZAGO & COVAS, 2006). São células multipotentes adultas, ou células tronco somáticas (GOMILLION & BURG, 2006; GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012), capazes de diferenciação na maioria dos tipos celulares com objetivo de manter e reparar o organismo. Residem em múltiplos locais como tecido adiposo (GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012; GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012), medula óssea, cordão umbilical, membrana amniótica (GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012; YANG et al., 2013), rins, fígado, baço, pulmões, pâncreas, tendões, membranas sinoviais, placenta, fluido amniótico e polpa dentária (GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012). Por serem facilmente isoladas e cultivadas em laboratório, são uma opção viável para uso em terapia celular (GOMILLION & BURG, 2006).

As MSCs secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem a migração e a expansão celular, exercem atividades imunomoduladoras (GAO et al., 2014; GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012), modulam a angiogênese e a apoptose celular e suportam a migração e a diferenciação de células tronco hematopoiéticas (GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 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 imunossupressivas 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, ZABEL, & SELIGER,

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, NESTI & TUAN, 2012). Sua capacidade de atração para áreas de inflamação (KHOSROTEHRANI, 2013; JACKSON, NESTI & TUAN, 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 Fator derivado de estroma (SDF1), PDGF, *insulin-like growth factor-1*, IL-8 e TNF $\alpha$ . Em modelos murinos, as MSCs aplicadas pela via sistêmica são capazes de chegar aos tecidos lesionados (JACKSON, NESTI & TUAN, 2012). Adicionalmente, sabe-se que as MSCs cultivadas a partir de camundongos proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP) 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 $\alpha$  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, ZABEL, & SELIGER, 2012) e a apresentação de morfologia celular semelhante a fibroblastos (GOMILLION & BURG, 2006; GEBLER, ZABEL, & SELIGER, 2012).

Na dermatologia, as MSCs vêm sendo utilizadas clinicamente para doenças inflamatórias (RINGDEN et al., 2006; LE et al., 2008; LIANG et al., 2010; ZHOU et al., 2010; PRASAD et al., 2011; HERRMAN et al., 2012; SCUDERI et al., 2013), doença do enxerto contra o hospedeiro (LE et al., 2008; ZHOU et al., 2010), Doença de

Chrown (GARCIA-OLMO et al., 2009), esclerose sistêmica, lúpus ou dermatomiosites (LIANG et al., 2010; CONNICK et al., 2012; SCUDERI et al., 2013).

Tradicionalmente, as MSCs humanas são isoladas a partir de medula óssea. Mas com a limitação da quantidade de células obtidas para os ensaios clínicos, é necessário estudar outras fontes como as células de cordão umbilical ou de tecido adiposo (AL-NBAHEEN et al., 2013). Nos últimos anos, populações celulares similares às MSCs estão sendo obtidas de diferentes tecidos como: tecido adiposo (ZUK et al., 2002), pele (TOMA et al., 2005), sangue (CAMPAGNOLLI et al., 2001), sangue de cordão umbilical, pâncreas (SEEBERGER, ESHPETER & KORBUTT, 2011) e fígado. 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).

#### 2.4.1 Células tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs)

Em 1977, Van e Roncari 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 (VAN & RONCARI, 1977). Em 2001, as células tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) foram identificadas e, desde então, são estudadas para uso na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos (STERODIMAS et al., 2010; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014; ZUK et al., 2002).

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 (*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, RUDIN, & MARRA, 2014).

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; CHENG et al., 2011; GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014). ADSCs são células multipotentes com propriedades similares, porém não idênticas às das MSCs (FRASER et al., 2006; NAKAGAMI et al., 2006; CHENG et al., 2011; LEE, LEE, & CHO, 2011; GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012; AL-NBAHEEN et al., 2013), com a vantagem de estarem presentes em muito maior volume no organismo; apresentam maior expansibilidade relativa; causam menor morbidade na colheita (ZUK et al., 2002; FRASER et al., 2006; GOMILLION & BURG, 2006; KERN et al., 2006; STERODIMAS et al., 2010; YARAK & OKAMOTO, 2010; GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014); e contêm menor potencial oncogênico. 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).

Em condições de cultura *in vitro*, as ADSCs apresentam similaridade com as MSCs na maioria dos marcadores de superfície (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) e na maior parte do perfil de expressão gênica (ZUK et al., 2002; NAKAGAMI et al., 2006; CHENG et al., 2011). 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. Trabalhos recentes 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 são capazes de diferenciar-se em linhagens adipogênica, condrogênica, osteogênica e neuronal (ZUK et al., 2002; FRASER et al., 2006; GOMILLION & BURG, 2006; KERN et al., 2006; YARAK & OKAMOTO, 2010; CHENG et al., 2011; GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014), muscular, hematopoiética (ZUK et al., 2002), células produtoras de insulina e hepatócitos (CHENG et al., 2011) com uma velocidade de expansão dez ou mais vezes maior (NAKAGAMI et al., 2006). Adicionalmente, as ADSCs colhidas podem ser criopreservadas durante pelo menos seis meses, o que é útil na criação de

bancos de células autólogas para aplicações clínicas futuras (STERODIMAS et al., 2010).

Há indícios de que as células precursoras de adipócitos comportam-se de forma diferente de acordo com o local do tecido adiposo e da idade do doador. As ADSCs do lipoaspirado abdominal humano apresentam menor senescência que as ADSCs de origem subcutânea. Células de doadores jovens apresentam aumento da indução de diferenciação em todos os locais doadores (STERODIMAS et al., 2010). As ADSCs apresentaram padrão de crescimento, viabilidade celular e capacidade de diferenciação semelhantes às culturas não-criopreservadas, quando criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , durante 30 dias (GINANI, SOARES, & BARNOZA, 2012), a 12 meses (MARTINELLO et al., 2011).

Em estudo comparativo entre ADSCs, BM-MSCs e MSCs derivadas de cordão umbilical (*umbilical cord blood mesenchymal stem cells* - UCB-MSCs), Kern e colaboradores (2006) não encontraram diferença entre as três origens celulares quanto à morfologia celular ou ao imunofenótipo. Adicionalmente, comprovaram que as linhagens de origem de cordão umbilical e de tecido adiposo são alternativas para a terapia celular por apresentarem maior tempo de cultura e capacidade de proliferação respectivamente (KERN et al., 2006; REICHENBERGER et al., 2012). Sobre o tratamento de feridas, as BM-MSCs já demonstraram acelerar a cicatrização, contudo o rendimento da expansão das células doadoras necessário exige a colheita de um grande volume de tecido doador, o que inviabiliza esse tratamento. Com um grama de tecido de medula óssea de um paciente hígido é possível isolar  $5 \times 10^4$  BM-MSCs, enquanto que com o mesmo volume de tecido adiposo, é possível isolar entre  $3,5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  ADSCs (TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014).

Estudos sugerem que tanto as ADSCs, quanto as BM-MSCs podem contribuir para a restauração do fluxo sanguíneo em modelo de isquemia de membro pélvico em ratos (NAKAGAMI et al., 2006; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014). A vantagem da aplicação das ADSCs sobre as BM-MSCs é que 20 mL de lipoaspirado supre a necessidade da infusão, enquanto é necessário coletar 500 mL de sangue para crescimento da mesma quantidade de células. Além disso, é possível expandir as células muito mais rápido, com a mesma pluripotência e sem a expressão de marcadores

indesejados, normalmente obtidos em passagens mais adiantadas das MSCs (NAKAGAMI et al., 2006).

A expressão dos genes da secreção das citocinas (VEGF, bFGF, e HGF) das ADSCs é um tratamento promissor para órgãos transplantados e/ou com isquemia, pois tecidos e órgãos que passam por hipóxia, pela falta de vasculatura, sofrem de apoptose celular consecutivamente. Ao mesmo tempo, a secreção dessas citocinas pelas ADSCs tende a ser aumentada pelo ambiente de hipóxia (STERODIMAS et al., 2010; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014). Além disso, as ADSCs respondem, aumentando a capacidade regenerativa dos tecidos, ao bFGF (secretado pela MEC lesada) e ao PDGF (secretado pelas plaquetas ativadas durante o sangramento). Ainda, os receptores  $\alpha$  e  $\beta$  ao PDGF das ADSCs, causam a maior expressão dos receptores de VEGF, HGF, EGF e bFGF (TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014).

As ADSCs mostraram-se eficientes no tratamento de pacientes com distúrbios imunológicos e hematológicos como a púrpura trombocitopênica idiopática (FANG et al., 2012; TSUJI, 2014) e a aplasia de células vermelhas (TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014) e ainda aumentaram a sobrevivência de pacientes com doença do enxerto contra hospedeiro refratários a esteroides (FANG et al. 2007; CHENG et al., 2011; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014). ADSCs autólogas aumentaram a taxa de sucesso de tratamento de fístulas abertas para o exterior da cavidade abdominal em pacientes com doença de Crohn e fístula traqueomediastinal causada por ablação de tumor (CHENG et al., 2011; TSUJI, RUDIN, & MARRA, 2014).

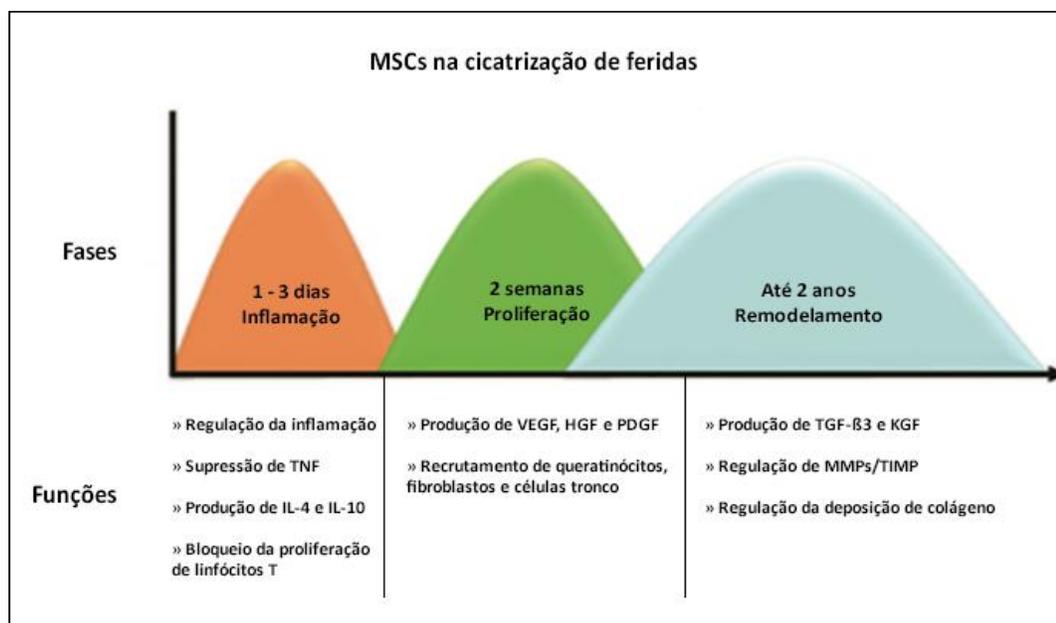
As ADSCs podem reduzir sinais severos de atrofia, retração, fibrose e ulceração da pele causados por radioterapia (RICHTER et al., 2009; STERODIMAS et al., 2010). Possuem um grande potencial para o reparo e a regeneração tecidual na cirurgia plástica reconstrutiva (STERODIMAS et al., 2010), aumentando a neovascularização e a viabilidade de flaps de pele (LU et al., 2008). Combinadas com a lipoinjeção em defeitos da face e do corpo e em tratamentos estéticos de rejuvenescimento, aumentam em 35% o tempo de sobrevivência da gordura injetada e aumenta a microvasculatura da mesma (STERODIMAS et al., 2010).

O uso de ADSCs humanas em arcabouço de *silk fibroin-chitosan* acelerou o fechamento de feridas em camundongos, ao mesmo tempo em que aumentou a

vasculogênese no local da lesão (ALTMAN et al., 2009). As mesmas células aplicadas em gel de colágeno aceleraram o fechamento de feridas por segunda intenção em camundongos *nude*, aumentando a espessura da derme (LEE et al., 2011). 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 de rotina (YANG et al., 2013).

#### 2.4.2 Uso das MSCs na cicatrização da pele

As MSCs agem, em variados níveis, nas três fases da cicatrização (FIGURA 9): inflamatória, de proliferação e de remodelamento. Estudos atuais sugerem que a diferenciação das MSCs, que contribuiriam 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). Alguns autores sugerem que a diferenciação das MSCs em queratinócitos e células endoteliais assumem o mesmo papel da sinalização parácrina para acelerar a neovascularização e a reepitelização de feridas (UYSAL et al., 2014).



**Figura 9.** Diagrama com as fases da cicatrização e as funções exercidas pelas células tronco mesenquimais em cada uma delas. Fonte: MAXSON et al., 2012 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

Na fase inflamatória (1 a 3 dias), a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 é aumentada, enquanto as citocinas pró-inflamatórias IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  são diminuídos, causando a supressão da reação inflamatória local (KIM et al., 2013; MAXSON et al., 2012). Adicionalmente, há o bloqueio da proliferação de linfócitos T (MAXSON et al., 2012). A diminuição do TNF- $\alpha$  também favorece a re-epitelização posteriormente na fase de proliferação (KIM et al., 2013). A ação antimicrobiana das MSCs também é importante para a limitar a ocorrência de infecção (MAXSON et al., 2012).

Na fase proliferativa (14 dias), é aumentada a produção de VEGF, bFGF (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013; UYSAL et al., 2014), EGF, KGF, HGF, PDGF e TGF- $\beta$ . Através de sua ação parácrina, as MSCs aumentam a migração e a proliferação de queratinócitos, células endoteliais e epiteliais. A proliferação de fibroblastos também é aumentada, assim como a formação de vasos sanguíneos. Dessa forma, há um maior crescimento de um tecido de granulação mais exuberante (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013;). A angiogênese é um fator muito importante para a cicatrização de pele, e o VEGF e o FGF são potentes fatores angiogênicos (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 (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013), 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, WONG & GURTNER, 2012; KIM et al., 2013). Contribuem ainda para remodelamento apropriado da cicatriz, o aumento da secreção de VEGF e HGF, o balanço adequado entre TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 (MAXSON, 2012) e o aumento de bFGF e TGF- $\beta$ , que inibem a expressão de  $\alpha$ -SMA (UYSAL et al., 2014). 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, LT, LB e NK (RASMUSSEN, 2005; CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON et al 2012).

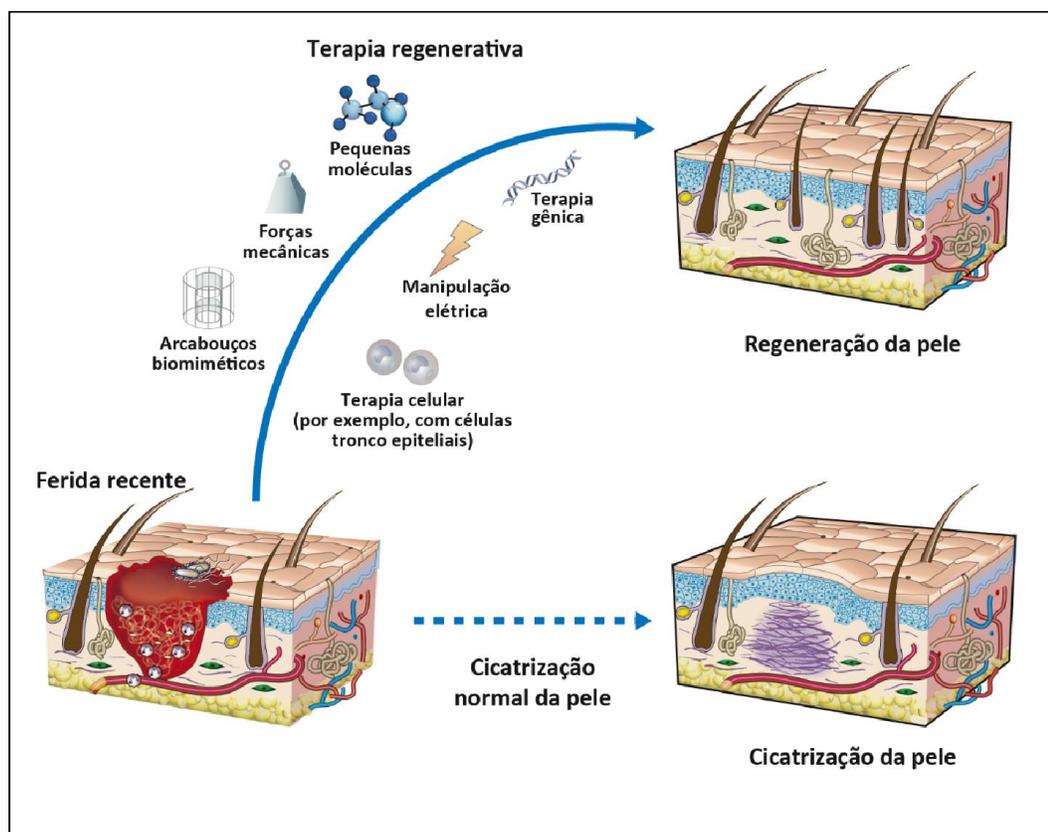
Nambu e colaboradores (2009) já haviam demonstrado a eficiência do efeito estimulatório da combinação de MSCs e uma matriz de colágeno no reparo de lesões cutâneas de camundongos diabéticos. Os efeitos positivos no reparo de lesões cutâneas mediados por MSCs também foram demonstrados por Mishra e colaboradores (2012) em terapia com o uso apenas de fatores secretados por estas células em soluções acelulares. Pereira et al (2013) descrevem os resultados da adoção de diferentes tipos de reparos teciduais, sintéticos ou não, descelularizados ou não, combinados com o uso de terapia celular. Kim e colaboradores (2013) demonstraram que infusões de MSCs experimentais em cães aceleram a cicatrização da pele, aumentam a deposição de colágeno, a proliferação celular e a angiogênese. Ao mesmo tempo, obtiveram menor expressão de citocinas pró-inflamatórias.

#### 2.4.3 As ADSCs na cicatrização da pele

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 do 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; DENG et al., 2011; YANG et al., 2013). Tanto as MSCs quanto as ADSCs podem diminuir o tempo de cicatrização e a expressão de  $\alpha$ -SMA, aumentar os níveis de FGF, melhorar a qualidade da cicatriz, além de diferenciar-se em células endoteliais e queratinócitos em modelos de segunda intenção (UYSAL et al., 2010).

Várias terapias (FIGURA 10) mostraram-se efetivas em estudos *in vitro* para reduzir a formação de cicatriz. A manipulação para a regeneração da pele inclui a utilização, isolada ou combinada, de recursos como: arcabouços biomiméticos, manipulação do ambiente mecânico (terapia com pressão negativa) ou elétrico; administração de pequenas moléculas; uso de terapia gênica; estratégias baseadas em terapia celular, incluindo administração de células tronco epiteliais (GURTNER et al., 2008). Quando comparada ao uso de fatores de crescimento, que como qualquer fármaco apresentam uma meia-vida limitada, a terapia celular com MSCs,

especialmente as BM-MSCs e as ADSCs, pode trazer maiores benefícios por: sua capacidade de expansão; sua expressão fenotípica estável; e a possibilidade de diferenciarem-se em células especializadas, que secretam e suprimem fatores de crescimento e citocinas necessárias no nicho da lesão (GURTNER, 2008; UYSAL et al., 2010; UYSAL et al., 2014).



**Figura 10.** Esquema com as possibilidades de tratamentos na busca pela regeneração da pele. FONTE: GURTNER et al., 2008 (adaptado por VIDOR, SB. 2015).

Recentemente, estudos indicam a possibilidade de uso das BM MSCs e de ADSCs para proteger os tecidos das lesões causadas pela IRI e para melhorar a disfunção de órgãos submetidos à isquemia. As ADSCs podem proteger flaps axiais da IRI com resultados tão satisfatórios quanto os obtidos em procedimentos sem isquemia, pela melhora na resposta angiogênica e aumento da perfusão sanguínea (REICHENBERGER et al., 2012). Vários estudos utilizaram as ADSCs para prevenir lesões isquêmicas em flaps de pele (ICHIOKA et al., 2004; SIMMAN & MACKINNEY, 2005; UYSAL et al., 2009; UYSAL et al., 2010; REICHENBERGER et al., 2012; SUARTZ et al., 2014). O aumento da sobrevivência dos flaps de pele com a

administração de ADSCs pode ser explicado pelo aumento da secreção tecidual de fatores pró-angiogênicos como VEGF e PDGF. Sabe-se que VEGF e PDGF são potentes vasodilatadores, aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a migração celular em tecidos lesados ou isquêmicos (REICHENBERGER et al., 2012).

O tratamento para angiogênese pode ser utilizado para problemas isquêmicos como cardiomiopatia isquêmica, doenças vasculares periféricas, diabetes, ou para aumentar a sobrevivência do tecido pela proliferação de vasos colaterais, como em transferências de tecidos livres ou em flapes. Isso pode ser obtido pela aplicação de fatores de crescimento angiogênicos ou infusão de células tronco que secretarão esses fatores angiogênicos ou se diferenciarão em células endoteliais (MEYER et al., 2012).

Na pele, as ADSCs apresentam o mesmo potencial angiogênico que as BM-MSCs para secretar VEGF, HGF, Fator de crescimento de placenta (do inglês, *placental growth factor* - PGF), ANGPT e TGF- $\beta$ . O mecanismo de angiogênese utiliza a diferenciação das ADSCs em elementos vasculares e o aumento da secreção de citocinas via mecanismo parácrino (MEYER et al., 2012). Zografou e colaboradores (2011) obtiveram, nos grupos de enxertos livres de pele tratados com ADSCs, menor área de necrose, aumento de densidade vascular e de densidade de colágeno e de expressão de VEGF e TGF- $\beta$ 3.

### **3 EFEITOS DA INFUSÃO DE ADSCS EM DIFERENTES LOCAIS DE ADMINISTRAÇÃO EM ENXERTOS DE PELE DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO MURINO**

#### **EFFECTS OF ADSCS INFUSION IN DIFFERENT ROUTES OF ADMINISTRATION IN FULL-THICKNESS SKIN GRAFT IN MURINE MODEL**

VIDOR, S.B.<sup>1</sup>; TERRACIANO, P.B.<sup>2</sup>; VALENTE, F.S.<sup>1</sup>; ROLIM, V.M.<sup>1</sup>; GARCEZ, T.N.<sup>1</sup>; LEMOS, N.E.<sup>3</sup>; KIPPER, C.E.<sup>4</sup>; PIZZATO, S.B.<sup>5</sup>; AYRES, L.S.<sup>3</sup>; KUHL, C.P.<sup>3</sup>; DRIEMEIER, D.<sup>6</sup>; CONTESINI, E.A.<sup>6</sup>; CIRNE-LIMA, E.O.<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS; <sup>2</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre; <sup>3</sup>Pós-Graduação em Ciências da Saúde, UFRGS; <sup>4</sup>Faculdade de Medicina, UFRGS; <sup>5</sup>Faculdade de Farmácia, UFRGS <sup>6</sup>Docente Pós-Graduação em Ciências

Veterinárias, UFRGS. sil.bellini@gmail.com

### 3.1 Resumo

Enxertos livres de pele de espessura total são indicados para cobrir grandes defeitos de pele em superfícies flexoras ou em extremidades distais e sofrem lesão por isquemia e reperfusão pela própria natureza do procedimento cirúrgico. O objetivo deste trabalho foi testar a associação de células tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) heterólogas a enxertos cutâneos autólogos de espessura total em ratos Wistar. Enxertos de 12 mm de diâmetro foram executados no dorso de 30 ratos, em dois locais: cranial e caudal. Os ratos foram distribuídos em seis grupos (n=5): grupo ADSC\_G recebeu, no enxerto,  $1 \times 10^6$  ADSCs em 200  $\mu$ L de Solução Salina 0,9% (SS); grupo ADSC\_B recebeu  $1 \times 10^6$  ADSCs em 200  $\mu$ L de SS na borda do leito receptor; grupo ADSC\_GB, metade da mesma suspensão na borda e outra metade no enxerto. Os grupos controle, SS\_G e SS\_B, receberam apenas SS no enxerto ou nas bordas respectivamente. No grupo S, o enxerto não recebeu nenhum tratamento durante as cirurgias. Curativos do tipo *tie-over* permaneceram até o 5º dia. Na cirurgia (d<sub>0</sub>), aos 5 (d<sub>5</sub>) e 14 (d<sub>14</sub>) dias de pós-operatório, os desenhos dos enxertos foram digitalizados e suas áreas mensuradas (*software* ImageJ). As avaliações clínicas consideraram peso, presença de secreções e ocorrência de epidermólise. A planimetria demonstrou a taxa de pele normal, de pele avermelhada e de ulceração, assim como a contração dos enxertos entre os intervalos d<sub>0</sub>-d<sub>5</sub>, d<sub>5</sub>-d<sub>14</sub> e d<sub>0</sub>-d<sub>14</sub>. As amostras dos enxertos foram obtidas em d<sub>14</sub> para coloração com Hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson. A epiderme foi avaliada para espessamento, ceratose, acantose, degeneração hidrópica, infiltrado inflamatório. A derme foi avaliada quanto a rarefação pilosa, tecido de granulação, infiltrado inflamatório, deposição de colágeno. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, e a análise estatística utilizou as Equações de Estimativas Generalizadas (GEE), com nível de significância de 5%. O grupo ADSC\_G apresentou melhores aspectos macroscópicos, menos ocorrência de epidermólise e de rarefação pilosa e uma das menores médias de área de ulceração, juntamente com os outros grupos tratados com ADSCs. O grupo ADSC\_G demonstrou as menores médias de alterações histopatológicas como: espessamento da epiderme, degeneração hidrópica, tecido de granulação. O mesmo grupo ficou entre as menores médias de acantose e infiltrado inflamatório na derme, ao mesmo tempo que apresentou as maiores médias de VEGF no subcutâneo e no tecido de granulação. Dessa forma, pode-se concluir que as ADSCs protegeram os enxertos dos efeitos deletérios da isquemia, assim como e

sugerem-se novos estudos em fases iniciais da cicatrização para compreensão dos mecanismos envolvidos.

**Palavras-chave:** terapia celular, terapia regenerativa, fatores de crescimento, cirurgia reconstrutiva.

### 3.2 Abstract

*Evaluation of adipose derived stem cells (ADSC) effect on full-thickness skin graft (FTSG) as a wound healing model in ischemic conditions. Two 12 mm diameter FTSGs were harvested and placed onto dorsal recipient beds of twenty-four Wistar rats, in two anatomic regions: cranial and caudal. Rats were randomized into five groups. Before grafting, group E FTSGs received subfascial injection of 1X106 ADSCs diluted in 200  $\mu$ L of physiologic saline. Group EC FTSGs received only physiologic saline. Group B received ADSCs in the recipient bed edges; group C received physiologic saline in the edges. Group ADSC\_GB received the same ADSCs number and volume, half in the graft and half in the edges. Using planimetry, grafts were analyzed for graft's contraction rate (d0, d5, d14), normal skin rate and occurrence of epidermolysis and failure rate (d14). FTSGs samples were obtained on the d14 to hematoxylin-eosin and Masson's Trichrome staining for epidermal analysis (epidermal thickening, keratosis, acanthosis, hydropic degeneration, inflammatory infiltrate) and dermal analysis (hairless, granulation tissue, inflammatory infiltrate, collagen deposition). The obtained results were expressed by mean (n=5). Statistical significance ( $p < 0,05$ ) was calculated using Generalized Estimating Equations. The ADSC\_G group had better macroscopic aspects, less occurrence of epidermolysis and hairless and one of the lowest averages of ulceration area, along with the other groups treated with ADSCs. The ADSC\_G group showed the lowest mean on the histopathological changes measured such as thickening of the epidermis, hydropic degeneration, less granulation tissue. The same group was among the lowest acanthosis and inflammatory infiltrate averages in the dermis, while presented with the greatest of VEGF average in the subcutaneous and in the granulation tissue. Thus it can be concluded that the ADSCs may have protected the grafts from the deleterious effects of ischemia and suggest new studies in the early stages of healing to understand the mechanisms involved.*

**Key-words:** regenerative therapy, cell therapy, growing factors, reconstructive surgery

### 3.3 Introdução

Enxertos livres de pele de espessura total incluem a derme e a epiderme. Sofrem lesão isquêmica pela própria natureza do procedimento cirúrgico e, após sua inosculação, lesão por reperfusão. São indicados para cobrir grandes defeitos de pele em superfícies flexoras ou em extremidades distais, causados por excisão de tumor, trauma, defeitos congênitos ou feridas crônicas (ANGELI, BRANDÃO & FREITAS, 2006; FOSSUM, 2013; PAVLETIC, 2010). A necrose da epiderme é a complicação mais comum, que traz dano estético ao enxerto (AMÂNCIO et al., 2006). Já a necrose da derme é uma complicação mais grave, pois implica na perda de área parcial ou total do enxerto, necessitando de manejo como ferida por segunda intenção ou nova enxertia (LOFÊGO FILHO, 2006; MILCHESKI et al., 2010; ZOGRAFOU, 2011).

As células tronco mesenquimais de origem adiposa são células de fácil isolamento, com multipotencialidade e capacidade terapêutica regenerativa e imunomoduladora. Já são utilizadas em ensaios clínicos em humanos por influenciar positivamente na cicatrização, ao acelerar a epitelização, aumentar o tecido de granulação e a angiogênese e diminuir o infiltrado inflamatório, além de modular a resposta imune (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; JACKSON, NESTI e TUAN, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013).

Estudos indicam para a possibilidade de uso das células tronco mesenquimais de medula óssea (BM-MSC) ou de tecido adiposo (ADSC) para proteger os tecidos das lesões causadas pela lesão por isquemia e reperfusão (do inglês, *ischemia and reperfusion injury* – IRI) e para melhorar a disfunção de órgãos submetidos à isquemia. As ADSCs podem proteger flapes axiais da IRI com resultados tão satisfatórios quanto os obtidos em procedimentos sem isquemia, pela melhora na resposta angiogênica e aumento da perfusão sanguínea (REICHENBERGER et al., 2012). Vários estudos já utilizaram as ADSCs para prevenir lesões isquêmicas em flapes de pele (ICHIOKA et al., 2004; GAO et al., 2011; REICHENBERGER et al., 2012; SIMMAN, CRAFT & MACKINNEY, 2005; SUARTZ et al., 2014; UYSAL et al., 2009; UYSAL et al., 2010). Pelos mesmos mecanismos, pode-se pensar em utilizar as ADSCs para aumentar a sobrevivência de enxertos livres de pele (ZOGRAFOU, 2011). Dessa forma, este estudo objetiva testar o efeito da administração de ADSCs heterólogas no espaço subcutâneo

de enxertos livres de pele de espessura total autólogos para tratamento de feridas em primeira intenção.

### **3.4 Materiais e métodos**

#### **3.4.1 Animais experimentais**

Trinta ratos Wistar (*Rattus norvegicus sp.*), jovens adultos, pesando entre 250 e 350 gramas, foram utilizados neste estudo após aprovação no Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), sob o número 13-0414. Os procedimentos *in vivo* foram realizados conforme a legislação brasileira, Lei 11.794/2008, que estabelece Procedimentos para o Uso Científico de Animais. Todos os procedimentos foram embasados na Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (2013). Os procedimentos de finalização seguiram as normas indicadas pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA - 2013).

Todas as cirurgias e procedimentos foram realizados sob anestesia geral inalatória com Isoflurano (Instituto Bioquímico Indústria Farmacêutica LTDA, Itatiaia, RJ), vaporizado em oxigênio a 100%, na dose de 5% para indução e 2% para manutenção, em 0,5 L/min. Para analgesia, foi administrado cloridrato de tramadol (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, SP) ( $5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), por via intraperitoneal (IP), continuado, após a indução das lesões, a cada 12 horas, durante 2 dias, e para antibioticoterapia pré-cirúrgica foi aplicada ampicilina sódica ( $20\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) por via subcutânea (SC) (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, SP). Todos os procedimentos cirúrgicos ocorreram em ambiente e com técnica estéril e com mínima variação possível das técnicas empregadas.

#### **3.4.2 Obtenção e manutenção das ADSCs**

As células tronco mesenquimais utilizadas foram isoladas a partir de gordura inguinal de ratos Wistar e processadas de acordo com Terraciano et al. (2014). Resumidamente, o tecido adiposo obtido foi submetido à digestão enzimática por colagenase e a suspensão de células obtida foi plaqueada (DMEM- Low Glucose, 20% SFB, 1% Penicilina/Streptomicina). Essas foram mantidas em incubadora umidificada a

37°C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando em aproximadamente 80% de confluência, as células foram expandidas. A cultura de células tronco mesenquimais foi caracterizada por imunofenotipagem (CD90 e CD29, CD34, CD11b) (DOMINICI et al., 2006) e diferenciada *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos (TERRACIANO et al., 2014). Cerca de 5 dias antes das cirurgias, as células (P4-P5) foram expandidas para a realização da terapia celular.

#### 3.4.3 Modelo de enxerto de pele de espessura total

Após indução anestésica, dois fragmentos de 12 mm de diâmetro foram removidos da região dorsal dos ratos na linha média, caudalmente à linha das escápulas em duas posições, cranial e caudal, distantes 10 mm um do outro. Os fragmentos, retirados com um trépano corneal, incluíam o panículo carnoso. Os enxertos de pele de espessura total foram preparados, removendo o músculo panículo carnoso com auxílio de microscópio cirúrgico, e suturados novamente em suas posições originais com fio mononailon 6-0 (Brasuture Indústria, Comércio Importação e Exportação LTDA, São Paulo, SP), em padrão simples separado, nas posições relativas às 3, 6, 9 e 12 horas do enxerto, e posteriormente nas quatro posições intermediárias a esses pontos. Durante a manipulação dos enxertos, estes eram irrigados com Solução Salina 0,9% na temperatura ambiente. Os dois enxertos receberam curativos do tipo *tie-over*, compostos de bucha de gaze estéril suturada à pele com mononailon 4-0 (Brasuture Indústria, Comércio Importação e Exportação LTDA, São Paulo, SP) em quatro pontos (3, 6, 9 e 12 horas), separada do enxerto por uma camada de Vaselina Sólida 100% (Rioquímica Indústria Farmacêutica LTDA, São José do Rio Preto, SP).

#### 3.4.4 Grupos experimentais

Os 30 ratos foram distribuídos em cinco grupos de tratamento e um grupo SHAM-operado (n=5). O grupo ADSC\_G (*graft*) recebeu, na camada subcutânea do enxerto, 1x10<sup>6</sup> ADSCs ressuspendidas em 200 µL de Solução Salina 0,9% (SS). O grupo ADSC\_B (*border*) recebeu 1x10<sup>6</sup> ADSCs em 200 µL de SS divididos em quatro pontos equidistantes na borda do leito receptor, pela via intradérmica. O grupo ADSC\_GB (*graft and border*), metade da mesma suspensão em quatro pontos equidistantes na borda e outra metade na camada subcutânea do enxerto. Os grupos controle, SS\_G e SS\_B, receberam apenas SS na camada subcutânea do enxerto ou em

quatro pontos equidistantes das bordas respectivamente. O grupo SHAM-operado não recebeu nenhum tratamento entre a retirada do retalho e a sua sutura no leito. Os curativos permaneceram até o 5º dia de pós-cirúrgico em todos os animais.

#### 3.4.5 Avaliações clínicas

Os ratos foram pesados no dia da cirurgia ( $d_0$ ), aos cinco dias de pós-operatório ( $d_5$ ), e aos 14 dias de pós-cirúrgico ( $d_{14}$ ). Em  $d_{14}$ , os enxertos foram avaliados quanto à presença de secreções nas bordas dos leitos receptores, por dois avaliadores, um deles desconhecendo o tratamento aplicado. Foi registrada a ocorrência ou não de epidermólise em cada enxerto.

#### 3.4.6 Planimetria

Para realização da planimetria, os enxertos foram desenhados com filme transparente diretamente sobre os mesmos em  $d_0$  e  $d_5$ , e em  $d_{14}$ , quando já era possível retirar a crosta causada pela epidermólise (RICHTER et al., 2006; RICHTER et al., 2009; VURAL et al., 2010). Pele branca-rosada, com toque macio e espessura semelhante à da pele adjacente foi considerada normal; pele cinza escura com toque áspero, necrose; pele avermelhada com espessura afinada e com crosta, ulceração; e pele avermelhada sem crosta ou afinamento, pele avermelhada (RICHTER et al., 2006; ZHANG et al., 2008; RICHTER et al., 2009; VURAL et al., 2010; ZOGRAFOU et al., 2011; ZHANG et al., 2013). As transparências foram digitalizadas e redesenhadas, sempre pelo mesmo observador, utilizando o *software* ImageJ e uma mesa digitalizadora (Wacom, modelo ET-0405-U - Wacom Company LTDA, Saitama, Japão). As áreas de ulceração, pele avermelhada e pele normal foram utilizadas para o cálculo percentual:  $(\text{Área de ulceração}/\text{Área total}) \times 100$ . Utilizando as medidas de área total, a taxa de contração dos enxertos foi calculada entre os intervalos  $d_0$ - $d_5$ ,  $d_5$ - $d_{14}$  e  $d_0$ - $d_{14}$ , conforme a fórmula:  $(A_0 - A_5)/A_0 \times 100$ .

#### 3.4.7 Histopatologia

Os enxertos foram coletados em  $d_{14}$ , juntamente com uma amostra de pele sadia do flanco direito de cada animal. Dois fragmentos do enxerto e um de pele sadia foram processados com a técnica padrão e posteriormente corados por Hematoxilina e Eosina (HE) ou Tricrômico de Masson (TM). Os cortes histológicos foram analisados duas

vezes, sempre pela mesma patologista, cegada a respeito dos tratamentos. As variáveis foram quantificadas, de zero a seis graus, onde zero correspondeu à inexistência; um, à ocorrência discreta; dois, à moderadamente discreta; três, à moderada; quatro, à moderadamente acentuada; e cinco, à ocorrência acentuada, aceitando-se graus intermediários.

As amostras foram avaliadas para adelgaçamento e espessamento da epiderme, ceratose e classificação por paraceratose ou ortoceratose. Foi quantificada ainda a ocorrência de acantose, infiltrado inflamatório intraepitelial e degeneração epitelial. Quanto às avaliações da derme, o tecido de granulação e o infiltrado inflamatório também foram analisados quanto à quantidade e distribuição e foram descritas suas localizações: toda a derme, derme superficial ou derme profunda. A inflamação foi ainda analisada quanto aos tipos celulares predominantes. Com o Tricrômico de Masson, foi possível analisar o depósito de colágeno na derme quanto a: quantidade, distribuição e localização. Também foi quantificado o depósito de colágeno entre a borda do enxerto e a pele.

#### 3.4.8 Imuno-histoquímica

Para detecção de células epiteliais proliferativas, foi utilizado o anticorpo Ki67 (Abcam, Brasil). As células marcadas na camada basal da epiderme foram contadas em dez campos aleatórios, com aumento 20 vezes, para o cálculo da média por enxerto. Para análise da neovascularização, utilizou-se o anticorpo contra Fator de Crescimento Vascular - anti-VEGF (Abcam, Brasil) – quantificado da mesma forma que na histologia.

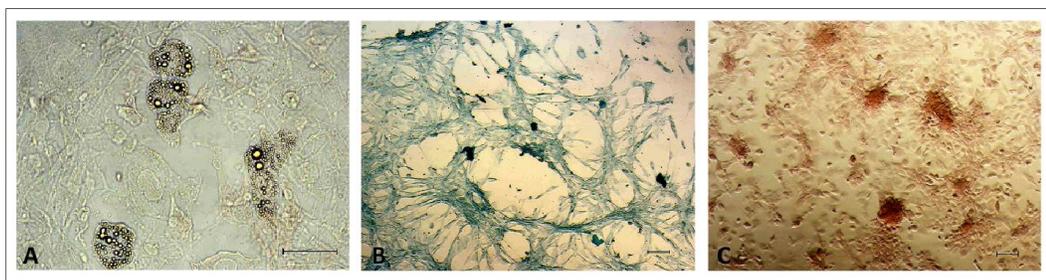
#### 3.4.9 Análise estatística

Para análise estatística, foi utilizado software IBM SPSS versão 22 (SPSS *Inc. IBM Company*). Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, considerando o nível de significância de  $p=0,05$ . A análise estatística utilizou as Equações de Estimativas Generalizadas (GEE), com Matriz de correlação trabalho não estruturada, um estimador robusto para a Matriz de covariância, uma resposta com distribuição normal e função de ligação identidade. As variáveis que não apresentaram variância foram analisadas descritivamente, e a análise da distribuição dos pesos dos ratos foi realizada com teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes.

### 3.5 Resultados

#### 3.5.1 Coleta, processamento e caracterização das ADSCs

Os cinco gramas de tecido adiposo de quatro ratos doadores foram suficientes para o isolamento e a expansão das  $15 \times 10^6$  ADSCs utilizadas durante o estudo *in vivo* e as  $1 \times 10^6$  para o ensaio de caracterização, que apresentavam confluência de 80 a 90% e morfologia adequada e, após descongelamento, apresentavam-se viáveis. Nas datas previstas, as células foram transplantadas entre P4 e P5. Apresentaram aderência ao plástico de cultivo, com morfologia semelhante a de fibroblastos e imunofenótipo de acordo com critérios mínimos de caracterização de células tronco mesenquimais. Após os ensaios específicos, foram capazes de diferenciar-se em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.



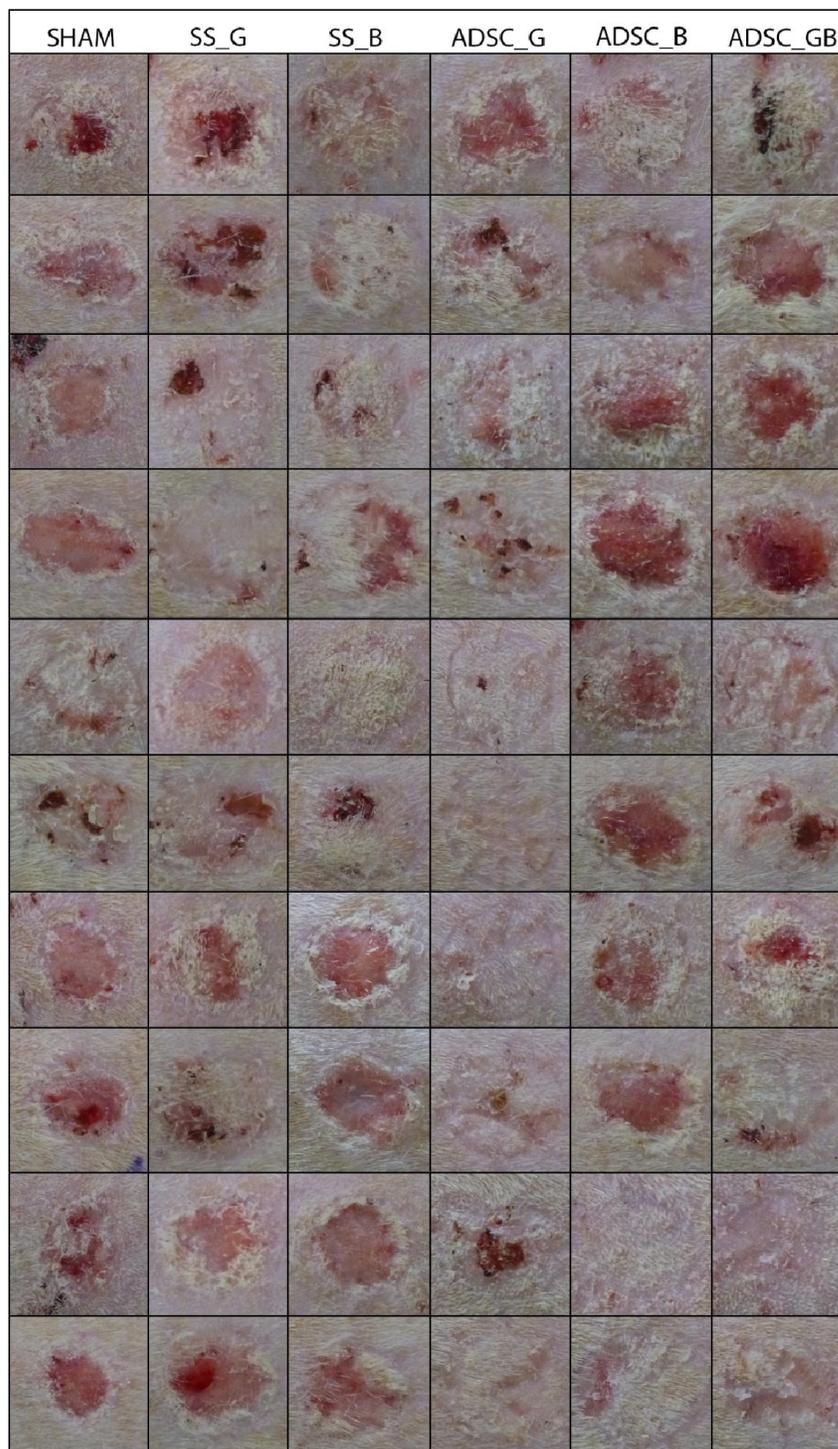
**Figura 1.** Caracterização das ADSCs obtidas a partir de tecido adiposo gonadal de rato Wistar. (A) Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 100X; (B) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 400X; (C) Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 400X.

#### 3.5.2 Modelo de enxerto de pele de espessura total

O protocolo anestésico foi adequado às intervenções cirúrgicas, rápidas, pouco cruentas e de baixo nível de algesia. Os animais regressaram a suas atividades normais rapidamente, e nenhum animal foi a óbito durante a anestesia dos 30 procedimentos cirúrgicos ou das 30 retiradas de curativo. A execução das cirurgias levou em média 24,56 minutos, sendo o tempo de dois a três minutos para a excisão de cada panículo carnoso, e para a colocação dos curativos, 15,7 minutos. O curativo *tie-over* permaneceu durante cinco dias de pós-cirúrgico e foi efetivo para manter a viabilidade dos enxertos. Contudo a imobilização dos mesmos pode ser considerada pouco eficaz, o que era esperado pela localização anatômica dos enxertos.

### 3.5.3 Avaliações clínicas

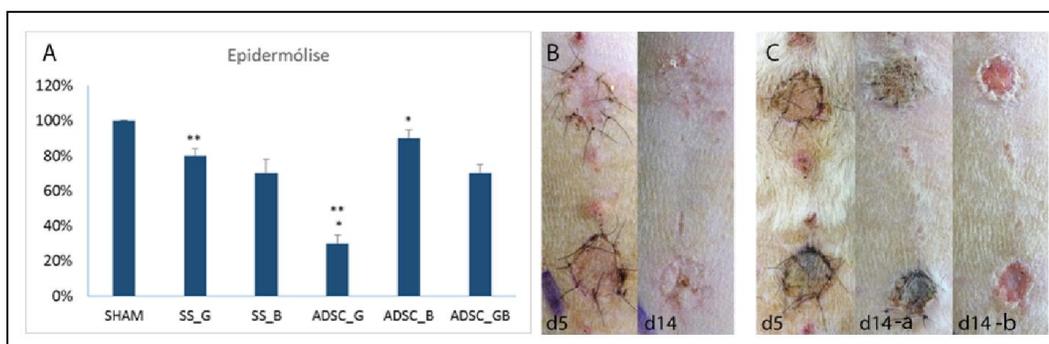
Observando-se a evolução da cicatrização, foi possível constatar que a pele de sete enxertos do grupo ADSC\_G manteve sua aparência muito próxima à aparência da pele adjacente ao enxerto durante os 14 dias de pós-operatório. Em d14, pode-se perceber que ADSC\_G apresenta melhor aspecto quando comparado a seu controle SS\_G e quando comparado com o SHAM, que corresponde ao tratamento padrão, conforme a figura 2.



**Figura 2.** Aspectos macroscópicos de todos os enxertos (dois enxertos por animal), aos 14 dias de pós-cirúrgico. Cada coluna contém as fotos dos enxertos de um grupo. Todas as fotografias foram realizadas com a mesma resolução (300 DPI) e na mesma distância dos enxertos (15 cm). Todas foram editadas com mesmo tamanho de corte, com mesma resolução, no mesmo software de imagem (Photoshop versão CS6), pelo mesmo operador. Em d<sub>14</sub>,

pode-se perceber que ADSC\_G apresenta melhor aspecto quando comparado a seu controle SS\_G e quando comparado com o SHAM.

A epidermólise (Figura 13), ou necrose da epiderme, ocorreu em menos enxertos do grupo ADSC\_G ( $30\pm 4,92\%$ ) do que em SS\_G ( $70\pm 3,98\%$ ) e em ADSC\_B ( $90\pm 4,92\%$ ), com níveis de significância de  $p=0,012$  e  $p=0,000$  respectivamente. Todos os enxertos do grupo SHAM-operado (100%) apresentaram epidermólise. A distribuição das variáveis de diferença de peso entre  $d_0-d_5$ ,  $d_0-d_{14}$  e  $d_5-d_{14}$  foram homogêneas entre os grupos com diferentes tratamentos e o grupo SHAM-operado. Nenhum enxerto apresentou sangramento ou secreção de qualquer tipo em suas bordas aos cinco ou 14 dias de pós-cirúrgico.



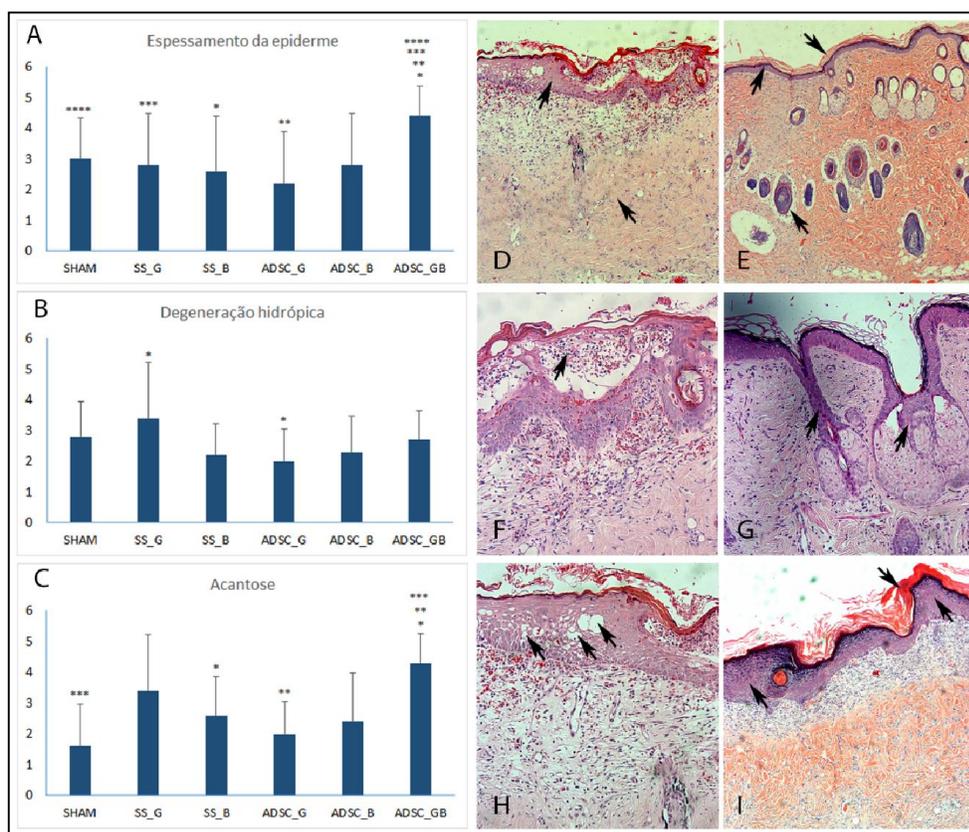
**Figura 3.** Ocorrência de epidermólise nos grupos de tratamento. A. A ocorrência no grupo SHAM-operado foi de 100%, pela homogeneidade dos resultados, este grupo não entrou na análise estatística ( $*p=0,000$  e  $**p=0,012$ ); B. Enxertos de um animal do grupo ADSC\_G, fotos realizadas em  $d_5$  e  $d_{14}$ ; Enxertos de um animal do grupo SS\_B, fotos realizadas em  $d_5$ ,  $d_{14-a}$  (antes da retirada da crosta de epiderme), e  $d_{14-b}$  (após a retirada da crosta de epiderme).

### 3.5.4 Planimetria

Quanto às taxas de ulceração, os grupos tratados com ADSCs (ADSC\_B= $0,00\pm 0\%$ , ADSC\_G= $3,95\pm 6,58\%$  e ADSC\_GB= $2,81\pm 4,58\%$ ) apresentaram menores médias que os tratados com SS (SS\_B = $5,02\pm 8,46\%$ , SS\_G = $8,86\pm 11,82\%$ ) e que o SHAM ( $5,62\pm 9,75\%$ ), contudo sem diferenças estatisticamente significativas. As avaliações obtidas através da planimetria, área de ulceração, área de pele avermelhada e área de pele normal em  $d_{14}$  e taxa de contração dos enxertos entre  $d_0-d_5$ ,  $d_0-d_{14}$  e  $d_5-d_{14}$  apresentaram médias homogêneas entre os grupos.

### 3.5.5 Histopatologia

O espessamento do epitélio (Figura 14) ocorreu em todos os grupos, com maior severidade no grupo ADSC\_GB ( $4,4 \pm 0,97$ ), do que em SS\_B ( $2,7 \pm 1,78$ ) com  $p=0,001$ , em ADSC\_G ( $2,2 \pm 1,69$ ) com  $p=0,000$ , em SS\_G ( $2,8 \pm 1,69$ ) com  $p=0,002$  e em SHAM-operado ( $3 \pm 1,3$ ) com  $p=0,001$ . A grande maioria dos enxertos apresentou, de forma homogênea, ceratose do tipo ortoceratótica. A paraceratose ocorreu apenas em um enxerto dos grupos SS\_B, ADSC\_GB, SS\_G e ADSC\_G. Todos os grupos apresentaram degeneração hidrópica de discreta a moderada, sendo a média do grupo ADSC\_G ( $2 \pm 1,05$ ) menor que a do grupo SS\_G ( $3,4 \pm 1,84$ ), com  $p=0,032$ . As médias do infiltrado inflamatório da epiderme apresentaram-se homogêneas, com a presença de linfócitos, macrófagos e plasmócitos em ordem da maior para a menor ocorrência. Quatro enxertos do grupo SHAM apresentaram edema celular na epiderme. O grupo ADSC\_G apresentou menor infiltrado inflamatório, ceratose e acantose que os outros grupos tratados, contudo sem diferença estatisticamente significativa (ver dados complementares).

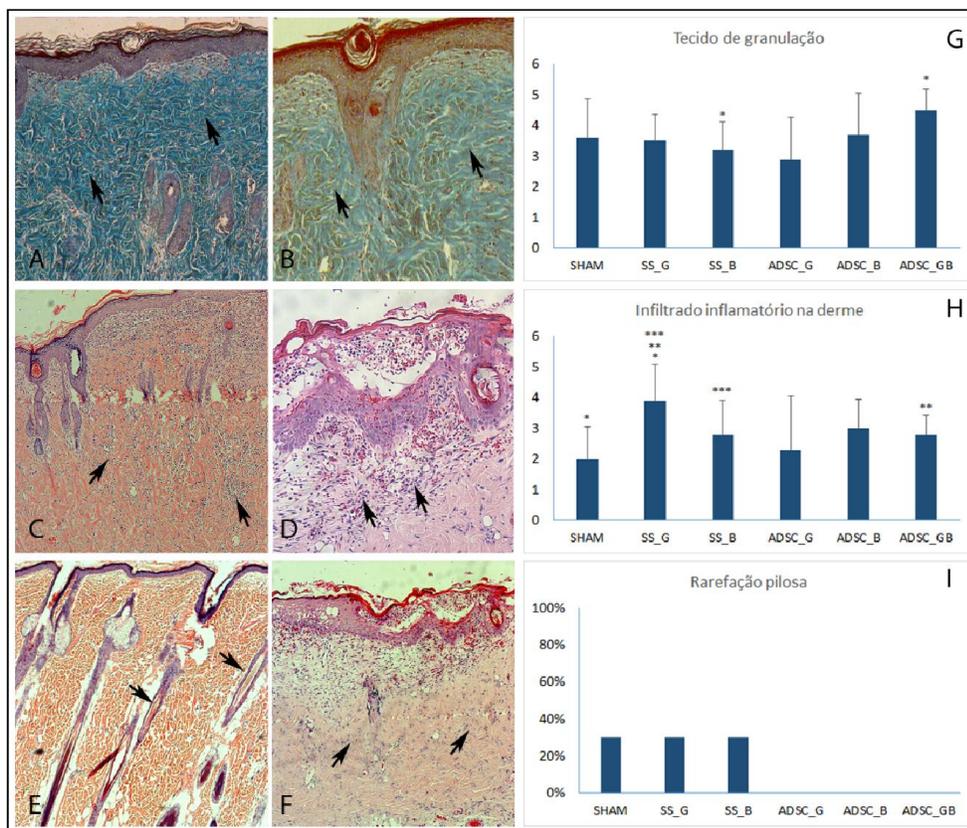


**Figura 4.** Médias e desvios padrão das análises histopatológica da epiderme, realizadas com HE em d<sub>14</sub>: A. Espessamento da epiderme (\* $p=0,001$ ,

\*\*p=0,000, \*\*\*p=0,002 e \*\*\*\*p=0,001); B. Degeneração hidrópica (\*p=0,032); C. Acantose (\*p=0,008, \*\*p=0,000 e \*\*\*p=0,000); D. Espessamento da epiderme - lâmina do grupo SS\_B (Aumento 20X); E. Epiderme com espessura normal - grupo ADSC\_B (Aumento 20X); F. Infiltrado inflamatório na epiderme - grupo SS\_G (Aumento 20X); G. Acantose - grupo SS\_B (Aumento 20X) H. Degeneração hidrópica na epiderme - grupo SS\_B (Aumento 20X); I. Espessamento da epiderme e hiperkeratose (Aumento 20X).

O grupo SS\_G ( $3,9 \pm 1,19$ ) apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório na derme que os grupos SHAM-operado ( $2 \pm 1,05$ ), SS\_B ( $2,8 \pm 1,13$ ) e ADSC\_GB ( $2,8 \pm 0,63$ ), com níveis de significância de  $p=0,000$ ,  $p=0,008$  e  $p=0,008$  respectivamente. O infiltrado inflamatório apresentou a maior parte da sua distribuição difusa em toda derme, e em menor quantidade na derme superficial, com a população celular composta por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, em ordem da maior para a menor ocorrência. O grupo SHAM-operado apresentou 100% do infiltrado inflamatório na derme profunda e 40% de distribuição multifocal, porém sem apresentar diferença estatisticamente significativa. O grupo ADSC\_GB ( $4,5 \pm 0,7$ ) apresentou maior quantidade de tecido de granulação que SS\_B ( $3,2 \pm 0,92$ ), com  $p=0,026$ . Dos grupos, ADSC\_G ( $2,9 \pm 1,37$ ) apresentou menor quantidade de tecido de granulação, assim como o infiltrado inflamatório, mas sem diferença estatisticamente significativa. A apresentação da distribuição e localização do tecido de granulação foi homogênea entre os grupos, sendo em todos os grupos difusa (exceto em um enxerto do grupo ADSC\_B). Houve uma tendência dos grupos SS\_B, SS\_G e SHAM de localização na derme superficial, enquanto os grupos tratados, em toda derme.

Todos os enxertos dos grupos tratados com ADSCs apresentaram a mesma quantidade de folículos pilosos que a pele normal, enquanto os enxertos tratados com SS e o grupo SHAM apresentaram apenas 70% dos enxertos sem a alteração de rarefação pilosa. A deposição de colágeno apresentou um comportamento homogêneo entre os grupos, tanto na avaliação da derme, quanto na interface entre o enxerto e o leito receptor. Todos os enxertos apresentaram distribuição difusa, localizada na derme profunda.

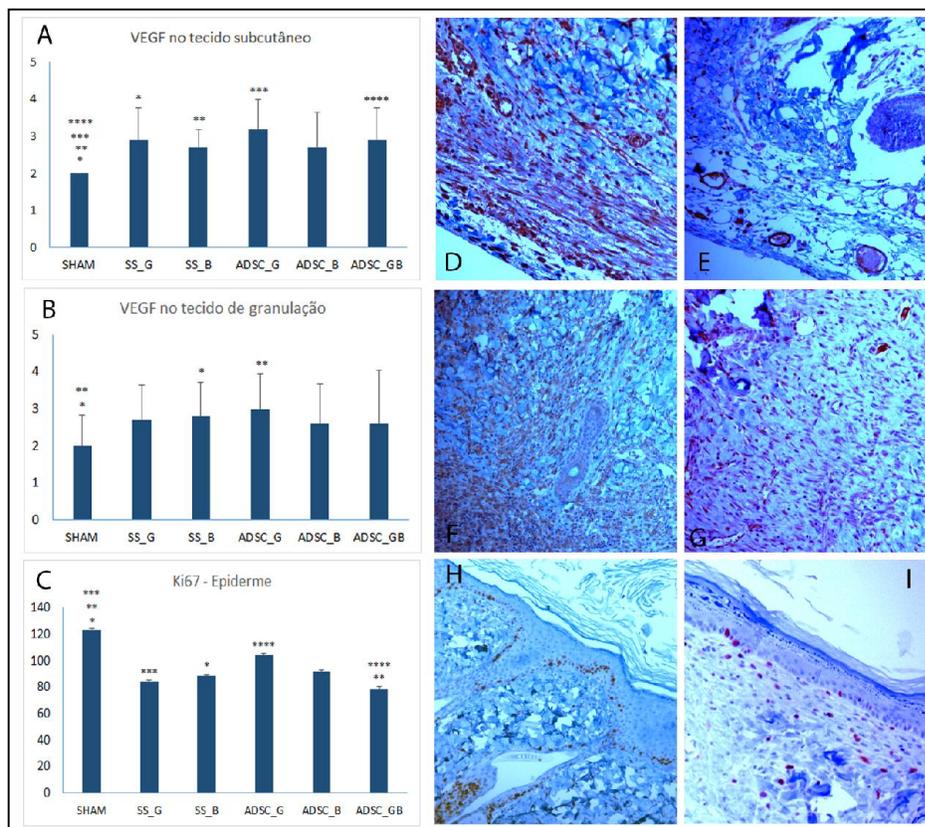


**Figura 5.** A. Histopatologia com Tricrômico de Masson para quantificação da deposição de colágeno na derme em d<sub>14</sub> - grupo ADSC\_G (Aumento 20X); B. Deposição de colágeno na derme em d<sub>14</sub> - grupo SHAM (Aumento 20X); C. Histopatologia com Hematoxilina e Eosina para quantificação do infiltrado inflamatório na derme em d<sub>14</sub> - grupo ADSC\_G (Aumento 20X); D. Infiltrado inflamatório na derme em d<sub>14</sub> - grupo SS\_G (Aumento 20X); E. Folículos pilosos na derme - grupo ADSC\_B (Aumento 20X); F. Rarefação de folículos pilosos na derme - SS\_G (Aumento 20X); G. Médias e desvios padrão das análises histopatológica da derme, realizadas com HE em d<sub>14</sub>: tecido de granulação (\*p=0,026); H. Infiltrado inflamatório (\*p=0,000, \*\*p=0,008 e \*\*\*p=0,008); I. Rarefação pilosa.

### 3.5.6 Imuno-histoquímica

O grupo ADSC\_G ( $3,2 \pm 0,79$  e  $3 \pm 0,94$ ) apresentou maior marcação com anti-VEGF que o grupo SHAM-operado ( $2 \pm 0$  e  $2 \pm 0,82$ ), tanto no tecido subcutâneo quanto no tecido de granulação. No subcutâneo, o SHAM-operado apresentou menor marcação que os grupos SS\_G ( $2 \pm 0$ ), SS\_B ( $2,9 \pm 0,88$ ), ADSC\_G ( $3,2 \pm 0,79$ ), ADSC\_GB ( $2,9 \pm 0,88$ ), com  $p=0,008$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$  e  $p=0,001$  respectivamente. Os gráficos demonstram uma tendência de haver maior marcação com anti-VEGF no grupo ADSC\_G. Na marcação com anticorpo Ki67, o grupo SHAM ( $123 \pm 0,82$ ) apresentou

maiores médias que SS\_B ( $88,22 \pm 0,92$ ), ADSC\_GB ( $78,52 \pm 1,43$ ) e SS\_G ( $83,96 \pm 0,95$ ), com  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$  respectivamente. O grupo ADSC\_G ( $104,18 \pm 0,94$ ) apresentou maior média que ADSC\_GB ( $78,52 \pm 1,43$ ) com  $p=0,021$ .



**Figura 6.** Média e desvio padrão da quantidade de células marcadas com anticorpo anti-VEGF em d<sub>14</sub>: A. No tecido subcutâneo (\* $p=0,008$ , \*\* $p=0,000$ , \*\*\* $p=0,000$  e \*\*\*\* $p=0,001$ ); B. No tecido de granulação (\* $p=0,007$  e \*\* $p=0,006$ ). C. Média e desvio padrão da quantidade de células marcadas com anticorpo anti-Ki67 na camada basal da epiderme (\* $p=0,000$ , \*\* $p=0,000$ , \*\*\* $p=0,000$ , \*\*\*\* $p=0,021$ ); D. Marcação com anti-VEGF no tecido subcutâneo – grupo SHAM (aumento 20X); E. Marcação com anti-VEGF no tecido subcutâneo – grupo ADSC\_G (Aumento 20X); F. Marcação com anti-VEGF no tecido de granulação – grupo ADSC\_B (Aumento 20X); G. Marcação com anti-VEGF no tecido de granulação – grupo SHAM (Aumento 20X); H. Marcação Ki67 na epiderme – grupo SHAM (Aumento 20X); I. Marcação Ki67 na epiderme – grupo ADSC\_G (Aumento 20X).

### 3.6 Discussão

Diferentemente dos flapes, que mantêm seu suprimento sanguíneo pelos vasos de seu pedículo (ZHANG et al., 2008; ZOGRAFOU et al., 2011; PEREIRA et al., 2012), o enxerto passa por um processo de sobrevivência, que ocorre em três fases: a embebição plasmática; a inosculação; e a revascularização. No início, nutre-se exclusivamente do plasma exsudado pela vasodilatação do leito receptor. Após, os vasos do leito receptor vão realizar frágeis anastomoses com os do enxerto. Essas primeiras duas fases são críticas para a sobrevivência do enxerto, dependentes de condições adequadas do leito receptor (PAVLETIC, 2010; ZHANG et al., 2008; ZOGRAFOU et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013) e dos cuidados pós-operatórios, principalmente a imobilização da área afetada (PAVLETIC, 2010; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013).

Assim como em qualquer transplante de órgão, a isquemia primária é causada pela interrupção do fluxo sanguíneo (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004; PEREIRA et al., 2012). Nesse momento, ocorre o acúmulo intracelular de água; aumento do lactato (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; PEREIRA et al., 2012) e dos mediadores pró-inflamatórios (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004; PEREIRA et al., 2012); o edema intracelular; a desorganização do citoesqueleto; a diminuição de trifosfato de adenosina (ATP); a estabilização e translocação nuclear do fator induzível por hipóxia (do inglês, *hypoxia-inducible factor 1* - HIF-1); o aumento da expressão da molécula de adesão de leucócitos; o aumento da expressão de VEGF (ELTZSCHING & COLLARD, 2004); a diminuição do diâmetro dos capilares, o sequestro de leucócitos (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004); a formação de radicais livres de oxigênio (ROS), a alteração do óxido nítrico (NO), a ativação do sistema complemento e dos leucócitos, e a secreção dos fatores de crescimento pelo endotélio e pelas mitocôndrias (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

Quando o fluxo sanguíneo é restaurado, por outro lado, inicia-se uma cascata de eventos que causam lesões adicionais. As mudanças bioquímicas e moleculares ocorridas durante a isquemia predisõem o tecido a danos mediados pelos ROS (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). Por sua vez, os ROS causam edema das células endoteliais e aumento da permeabilidade vascular

durante a isquemia e, quando o fluxo de sangue é restaurado, o influxo de células inflamatórias lesiona mais ainda o tecido (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). Os neutrófilos produzem ROS adicionais e obstruem os capilares, aumentando a extensão da isquemia (ELTZSCHING & COLLARD, 2004; SIEMIONOV & ARSLAN, 2004). Os ROS estimulam a ativação de leucócitos, sua quimiotaxia, adesão e transcrição de fatores como NF- $\kappa$ B (ELTZSCHING & COLLARD, 2004), molécula-chave para a resposta imunológica da pele, que induz a produção de mediadores pró-inflamatórios (TSIROGIANNI et al., 2006; PEREIRA et al., 2012). A disfunção do endotélio inibe a produção de NO, diminuindo seu efeito protetivo e aumentando o acúmulo de oxigênio nas fases iniciais da reperfusão. Durante a reperfusão, ocorre também a apoptose celular induzida pela interação entre as células sanguíneas e as do endotélio vascular. E o sistema complemento amplifica a reação inflamatória, induzindo a produção e secreção de TNF- $\alpha$ , MCP-1 e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e IL-6; aumenta a atração e a ativação de leucócitos, ao induzir a produção endotelial de IL-8 e MCP-1 (SIEMIONOV & ARSLAN, 2004).

Na fase inflamatória da cicatrização (1 a 3 dias após a lesão), as MSCs aumentam a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, enquanto diminuem as citocinas pró-inflamatórias IL-2, Fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), causando a supressão da reação inflamatória local (KIM et al., 2013; MAXSON et al., 2012). Outra característica importante para o processo de regeneração tecidual é a propriedade imunorreguladora dessas células, as quais são capazes de modular várias populações celulares tais como células apresentadoras de antígenos, linfócitos T (LT), linfócitos B (LB) e células *Natural Killers* (NK) (RASMUSSEN et al., 2005; CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON et al., 2012). Adicionalmente, há a supressão da proliferação de LT (JACKSON, NESTI & TUAN, 2012; MAXSON et al., 2012; ZHANG et al., 2013) e do seu recrutamento (JACKSON, NESTI & TUAN, 2012; ZHANG et al., 2013), assim como a regulação da proliferação e da diferenciação dos LB, a modulação da diferenciação e maturação das células dendríticas e alteração da proliferação, citotoxicidade e secreção de citocinas dos NK (ZHANG et al., 2013).

Na fase proliferativa (14 dias após a lesão), as MSCs aumentam a produção de Fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), Fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al.,

2013; UYSAL et al., 2014) Fator de crescimento epidermal (EGF), Fator de crescimento de ceratinócitos (KGF), Fator de crescimento de hepatócitos (HGF), Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013;). Além disso, o aumento de produção de TGF-  $\beta$  pode inibir a proliferação de LT (NICOLA et al., 2002).

A angiogênese é um fator muito importante para a cicatrização de pele, sendo o VEGF e o FGF potentes fatores angiogênicos (UYSAL et al., 2014). Adicionalmente, sabe-se que as ADSCs em condições de hipóxia, apresentam um aumento de cinco vezes na produção de VEGF *in vitro* (YUE et al., 2013; REHMAN et al., 2004; ZHANG & TANG, 2014), assim como o meio condicionado pelas ADSCs em hipóxia aumenta a sobrevivência e a proliferação das células endoteliais, importantes na angiogênese (REHMAN et al., 2004). Em estudo *in vivo*, as ADSCs são capazes de aumentar a perfusão sanguínea em camundongos com isquemia de membro pélvico apenas cinco dias após o tratamento e sustentado até dez dias depois, corroborando com a ideia da capacidade angiogênica das ADSCs também *in vivo* (REHMAN et al., 2004).

Quando comparada à administração de fatores de crescimento (como VEGF ou FGF), que como qualquer fármaco apresentam uma meia-vida limitada, a terapia celular com MSCs, especialmente as BM-MSCs e as ADSCs, pode trazer maiores benefícios por: sua capacidade de expansão; sua expressão fenotípica estável; e a possibilidade de diferenciarem-se em células especializadas, que secretam e suprimem fatores de crescimento e citocinas necessárias no nicho da lesão (CHEN, WONG & GURTNER, 2008; UYSAL et al., 2010; UYSAL et al., 2014).

Os enxertos do presente estudo que receberam as ADSCs no seu espaço subcutâneo apresentaram melhores aspectos macroscópicos, menos ocorrência de epidermólise e de rarefação pilosa e uma das menores médias de área de ulceração, juntamente com os outros grupos tratados com ADSCs. O grupo ADSC\_G ainda demonstrou as menores médias de alterações histopatológicas como: espessamento da epiderme, degeneração hidrópica, menor tecido de granulação. O mesmo grupo ficou entre as menores médias de acantose e infiltrado inflamatório na derme, ao mesmo tempo que apresentou as maiores médias de VEGF no subcutâneo e no tecido de granulação. Nos dados complementares, onde foram colocados os resultados adicionais

obtidos com este estudo, o grupo ADSC\_G mostrou uma tendência a menores médias de ceratose, infiltrado inflamatório na epiderme e deposição de colágeno.

A epidermólise, ou necrose da epiderme, ocorre em 20% dos enxertos de pele de pacientes humanos (RAMAHLO et al., 1997; AMÂNCIO et al., 2006), enquanto em ratos, praticamente 100% dos enxertos são acometidos por essa complicação (RICHTER et al., 2006; RICHTER et al., 2009; VURAL et al., 2010). Tanto nos grupos de tratamento, quanto nos controles, foram obtidas menores médias de epidermólise do que na literatura consultada (RICHTER et al., 2006; RICHTER et al., 2009; VURAL et al., 2010), mesmo se comparados aos grupos não irradiados de Richter e colaboradores (2009) ou aos grupos de camundongos controles normais descritos por Richter et al. (2006). Já outros autores não fazem referência a essa alteração ao testar a aplicação de VEGF exógeno (ZHANG et al., 2008), BM-MSC (ZHANG et al., 2013) ou ADSC (ZOGRAFOU et al., 2011).

Essa necrose superficial não é catastrófica (PAVLETIC, 2010), pois não acomete as camadas basal e de células fusiformes (AMÂNCIO et al., 2006), ou os folículos pilosos e os anexos cutâneos da região profunda, que ao sobreviverem, podem auxiliar como uma fonte de epitelização para a ferida (PAVLETIC, 2010; RICHTER et al., 2006). Por esse motivo, Vural e colaboradores (2010) e Richter e colaboradores (2009) sugerem que as avaliações macroscópicas em ratos e camundongos sejam realizadas após os 14 dias de pós-cirúrgico para que a epiderme necrosada, com aparência de crosta, quase que invariável nas espécies murinas, possa ser removida e não atrapalhe as avaliações. Todos esses resultados sugerem que a deficiência na distribuição dos nutrientes pelos vasos sanguíneos da derme, na situação de isquemia, gera consequências mais graves na epiderme. Deve-se considerar que esta camada é mais sensível à isquemia tecidual do enxerto, porque se nutre dos fluidos que penetram de suas camadas mais profundas e dos capilares da derme (FOSSUM, 2013; RICHTER et al., 2006), ou seja, a camada mais distante do leito, onde se encontram os nutrientes (RICHTER et al., 2006).

A melhor resposta do tratamento com ADSCs do que com VEGF exógeno pode ter ocorrido pela ação de múltiplos fatores de crescimento secretados pelas ADSCs que agiram em conjunto com o VEGF, como por exemplo o HGF, cujo sinergismo já é conhecido. Adicionalmente a habilidade das ADSCs em responder a ambientes de hipóxia pode ter contribuído (REHMAN et al., 2004).

Conforme demonstrado na figura 13, a ocorrência de epidermólise no grupo ADSC\_G menor que SS\_G é semelhante ao descrito por Richter e colaboradores (2006), que obtiveram uma tendência de menor área de epidermólise nos grupos tratados com VEGF que os que receberam SS. As ADSCs aplicadas na região subcutânea dos enxertos do grupo ADSC\_G podem ter funcionado como reservas nutricionais durante a fase de embebição, causando assim um efeito protetor da epiderme. Adicionalmente, Rehman e colaboradores (2004) demonstraram que as ADSCs expressam fatores que suportam a sobrevivência das células no nicho da lesão e evitam sua apoptose.

A ocorrência de epidermólise no grupo ADSC\_G menor que ADSC\_B poderia ser explicada pela diferença da via de aplicação. Na fase de embebição, o enxerto nutre-se de líquidos disponíveis no leito da ferida e não apresenta comunicação com a pele adjacente. Assim as ADSCs injetadas nas bordas da ferida não foram acessadas pelo enxerto. Além disso, as ADSCs injetadas na via intradérmica das bordas podem ter causado lesão por cisalhamento nas mesmas pelo volume ocupado (CHEN, WONG e GURTNER, 2012).

Deve-se considerar ainda que os trabalhos de Richter e colaboradores (2006 e 2009) e Vural (2010) não referem o uso de curativo *tie-over*, que pode ter auxiliado na prevenção da epidermólise, pois confere pressão e contato uniformes do enxerto com o leito receptor (PAVLETIC, 2010; ZOGRAFOU et al., 2011; WHITE, 2013) e reduz a ocorrência de hematoma e seroma (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013) para permitir a correta anastomose entre os vasos (PAVLETIC, 2010; WHITE, 2013). Ramalho e colaboradores (1997) observaram que o grupo com retirada de curativo aos 10 dias não apresentou ocorrência de epidermólise, enquanto que, no grupo que retirou o curativo com 5 dias, observou-se a descamação superficial do pelo, lembrando a epidermólise da pele humana. O tempo de cinco dias foi escolhido por ser referido na maioria da bibliografia consultada (PAVLETIC, 2010; AMÂNCIO et al., 2006; MILCHESKI et al., 2010; FOSSUM, 2013). Ao mesmo tempo, durante a realização dos pilotos, notou-se que o estresse e a perda de peso dos animais era expressiva enquanto permaneciam com os curativos, sendo necessário não estender muito esse tempo.

Nenhum enxerto apresentou necrose da derme, assim como Richter e colaboradores (2006) referiram a ocorrência de necrose na epiderme com muito mais frequência do que na derme. Enquanto neste estudo, a área de ulceração foi menor nos

grupos tratados com ADSCs do que nos grupos tratados com SS ou no grupo SHAM, sem diferença estatisticamente significativa, Zografou e colaboradores (2011) obtiveram o mesmo resultado com diferença estatística, possivelmente pelo tamanho de sua amostra.

Tanto as áreas de ulceração dos grupos tratados com ADSCs, como os tratados com SS e o SHAM deste estudo foram menores que as obtidas por Zografou e colaboradores (2011), contudo deve-se considerar que os defeitos criados por esse autor possuíam área maior, o que pode ter contribuído para a maior área de necrose de seus enxertos, mesmo que o cálculo da área de necrose seja relativo. As áreas de ulceração também foram menores em todos os grupos deste estudo do que autores que testaram a associação de VEGF a enxertos de pele (RICHTER et al., 2006; RICHTER et al., 2009; ZHANG et al., 2008).

A complicação mais comum dos enxertos de pele é a necrose parcial (AMÂNCIO et al., 2006; MICHELSKI et al., 2010; ZHANG et al., 2008; ZOGRAFOU et al., 2011), tanto que normalmente espera-se uma perda de 5% a 10% de sua área (MILCHESKI et al., 2010; ZOGRAFOU et al., 2011). Em ratos, é comum uma maior taxa de perda (ZHANG et al., 2008; ZOGRAFOU et al., 2011). Pelas condições de manejo desses animais e das manobras anestésicas envolvidas nos procedimentos experimentais, torna-se quase impossível observar com precisão a exigência de imobilização da área afetada (ZHANG et al., 2008; PAVLETIC, 2010; ZOGRAFOU et al., 2011; FOSSUM, 2013; WHITE, 2013), a drenagem do leito receptor (ZHANG et al., 2008; PAVLETIC, 2010; FORTIER & CASTIGLIONE, 2012; WHITE, 2013) e a realização de manobras anestésicas no transoperatório (FORTIER & CASTIGLIONE, 2012; PEREIRA et al., 2012).

A alteração de adelgaçamento de epiderme não ocorreu em nenhum grupo deste experimento. Já o espessamento da epiderme ocorreu, assim como em outros trabalhos (SHICHU et al., 2009; RODRIGUES et al., 2014). Contudo, esses autores não obtiveram diferença estatisticamente significativa entre os grupos após 12 dias de pós-cirúrgico. Amâncio e colaboradores (2006) também obtiveram maior espessamento da epiderme nos enxertos do grupo de coelhos tratados com irradiação ultrassônica terapêutica, contudo sem diferença estatisticamente significativa. Salgado e colaboradores (2007) referem a ocorrência de espessamento moderado da epiderme aos

19 e 35 dias de pós-operatório em coelhos, tanto no grupo de enxerto de pele quanto no grupo de cicatrização conduzida.

A hiperplasia da epiderme consiste no aumento das células da epiderme, que se mostra espessada (BOGLIOLO, 2011). Sua ocorrência é menor em enxertos de espessura total do que nos de espessura parcial e pode contribuir para a contração exagerada do enxerto (HARRISON & MACNEIL, 2008). Em estudo acompanhando pacientes humanos durante seis meses, concluiu-se que a complicação mais comum dos enxertos de pele de espessura total era a hipertrofia da epiderme, afetando 4-9% de todos os casos (132 de 2673 pacientes) e 42-43% (132 de 312 pacientes) de todas as complicações. Para a resolução da hipertrofia da epiderme e da deposição exagerada de colágeno, costuma-se administrar esteroides pela via intralesional (RAJPARA, AFFLECK & VARMA, 2010).

A degeneração hidrópica apresentou menor média no grupo ADSC\_G que em SS\_G e uma tendência de menor média ao comparar ADSC\_G com os outros grupos. Essa alteração não foi encontrada em nenhuma referência consultada sobre enxertos livres de pele. Mas sabe-se que a degeneração hidrópica é o acúmulo reversível de água e eletrólitos no interior das células, causador de tumefação e aumento de volume. Pode ser causada por hipóxia; desacopladores da fosforilação mitocondrial; inibidores da cadeia respiratória e agentes tóxicos que alteram a membrana mitocondrial, por reduzir a produção de ATP (PEREIRA, 2011). Ao mesmo tempo, a ocorrência de edema intracelular em 40% dos enxertos do grupo SHAM pode sugerir que as células deste grupo tenham sofrido ainda mais que os outros com o ambiente de hipóxia.

Percebe-se uma tendência de menor acúmulo de tecido de granulação no grupo ADSC\_G, contudo obteve-se diferença estatística apenas entre os grupos SS\_B e ADSC\_GB, este último com maior quantidade. Quanto ao tecido de granulação, outros autores não encontraram diferenças entre os grupos tratados e controles (VURAL et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014). Contudo Vural et al. (2010) obtiveram maior quantidade de tecido de granulação nos animais com menor epitelização, e Rodrigues et al. (2014) obtiveram maior expressão de citoqueratina no tecido de granulação de seus grupos tratados. Kim e colaboradores (2013) obtiveram deposição de colágeno mais intensa e com fibras de colágeno mais largas e com maior número de vasos maduros em feridas com cicatrização em caninos tratadas com MSC tópica na dose de  $1 \times 10^6$  células, sendo a deposição ainda maior na dose de  $1 \times 10^7$ . Mas os níveis de

Metaloproteinases de matriz acompanharam esse aumento, causando o equilíbrio necessário para evitar a excessiva acumulação do colágeno (KIM et al, 2013). Seria interessante adicionar essa avaliação em estudos futuros a fim de elucidar se há um maior equilíbrio da deposição de colágeno dos enxertos tratados com ADSCs.

Em feridas tratadas com MSCs, ao mesmo tempo que os fibroblastos produzem fibras colágenas em maior quantidade e mais densas, gerando aumento da resistência da cicatriz (CHEN, WONG & GURTNER, 2012; MAXSON, 2012; KIM et al., 2013), 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, WONG & GURTNER, 2012; KIM et al., 2013). Contribuem ainda para remodelamento apropriado da cicatriz, o aumento da secreção de VEGF e HGF, o balanço adequado entre TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 (MAXSON, 2012) e o aumento de bFGF e TGF- $\beta$ , que inibem a expressão de  $\alpha$ -SMA (UYSAL et al., 2014).

Foram encontrados, na literatura, trabalhos que testaram a maior sobrevivência dos enxertos relacionada à menor atividade do sistema imune contra o mesmo, mas estes não utilizaram o infiltrado inflamatório como parâmetro (LAROCCA et al., 2013). Em modelos de redução de feridas com substituto dérmico associado a ADSCs, foi possível notar uma quantidade quase imperceptível de infiltrado inflamatório nos grupos tratados (ALTMAN et al., 2009). Ao quantificar citocinas pró-inflamatórias em modelo de segunda intenção em cães, obteve-se também menor inflamação nos grupos tratados com células tronco mesenquimais (KIM et al., 2013). Kim e colaboradores (2013) observaram que os níveis de expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$  mantiveram-se mais baixos nos grupos tratados com MSC do que nos controles.

Kim e colaboradores (2013) obtiveram maior número de vasos no sétimo dia de pós-cirúrgico no grupo tratado com MSC, utilizando a marcação com anticorpo anti- $\alpha$ SMA. Contudo ao 14º dia, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o controle e houve diminuição da quantidade de vasos entre o sétimo e o 14º dia. Richter e colaboradores (2006 & 2009) não encontraram diferença entre a vascularização dos enxertos de pele tratados com VEGF. Tanto as ADSCs quanto a SS aumentaram a expressão de VEGF nos enxertos aos 14 dias de pós-cirúrgico, quando comparados ao SHAM. Seria interessante realizar a mesma avaliação com menor tempo de cicatrização a fim de procurar diferenças entre estes grupos.

Amâncio e colaboradores (2006) obtiveram maior proliferação celular na epiderme no grupo irradiado com ultrassom terapêutico. Kim e colaboradores (2013) obtiveram maior marcação de células epidermais em proliferação no grupo tratado com MSCs, marcadas com anticorpo anti-PCNA, no sétimo e no 21º dia de pós-operatório. É possível que a proliferação celular aumentada na camada basal da epiderme dos enxertos do grupo SHAM tenha relação com a maior ocorrência de epidermólise nesse grupo. Dito isso, seria correto atribuir essa maior proliferação a uma necessidade maior de reparação dessa camada.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a administração subcutânea das ADSCs nos enxertos de pele de espessura total podem contribuir para sua melhor integração no tratamento de feridas por segunda intenção, diminuindo os efeitos deletérios da lesão por isquemia e reperfusão ocorridos durante o transplante da pele. A partir desses resultados, sugere-se a realização de novo estudo com avaliações com menos tempo de pós-cirúrgico.

### 3.7. Referências bibliográficas

AMÂNCIO, A.C.G. et al. Estimulação Ultra-Sônica Da Integração de Enxertos de Pele Total. Estudo Experimental Em Coelhos. **Acta Ortop Bras**, v. 14, n. 5, p. 276–79, 2006.

ANGELI, A. L., BRANDÃO, C.V.S. & FREITAS, R.S. Cirurgia Reconstructiva : Retalhos Cutâneos Em Pequenos Animais. **MEDVEP - Rev Cientif Vet Pequenos Anim Esti** V. 4, n. 12, p. 87–95, 2006.

CHEN, J.S., WONG, V.W. & GURTNER, G.C. Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cutaneous Wound Healing. **Frontiers in immunology**, v. 3, p.192-198, 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.315–17, 2006.

ELTZSCHING, H.K. & COLLARD, C.D. Vascular Ischemia and Reperfusion Injury. **British medical bulletin**, v. 70, p. 71–86, 2004.

FOSSUM, T.W. *Small Animal Surgery*. 4 ed. Elsevier, Missouri, 1619 p., 2013.

GAO, W. et al. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2575–2585, 2011.

ICHIOKA, S. et al. Bone Marrow Cell Implantation Improves Flap Viability after Ischemia-Reperfusion Injury. **Annals of plastic surgery**, v. 52, n. 4, p. 414–418, 2004.

JACKSON, W.M., NESTI, L.J. & TUAN, R.S. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Attenuation of Scar Formation during Wound Healing. **Stem cell research & therapy**, v. 3, n.20, p. 1–9, 2012

KIM, J. et al. The Effects of Topical Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Canine Experimental Cutaneous Wounds. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 242–e53, 2013.

LOFÊGO FILHO, J.A. et al. Exertia de Pele Em Oncologia Cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 5, p. 465–72, 2006.

MAXSON et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–49, 2012.

MILCHESKI, D.A. et al. Tratamento Cirúrgico de Ferimentos Descolantes Nos Membros Inferiores - Proposta de Protocolo de Atendimento. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 37, n. 3, p. 199–203, 2010.

MIZUNO, H. Concise Review : Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. **Stem Cell Regenerative Medicine** v. 30, p. 804–10, 2012.

NICOLA, M. Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli Human Bone Marrow Stromal Cells Suppress T-Lymphocyte Proliferation Induced by Cellular or Nonspecific Mitogenic Stimuli. **Transplantation**, v. 99, n. 10, p.3838–3843, 2013.

PAVLETIC, M. *Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery*. 3 ed. Wiley-Blackwell, Iowa, 679p., 2010.

PEREIRA, C.M.B. et al. Anestesia e retalhos microvascularizados. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 62, n. 4, p. 1-12, 2012.

- 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.
- REHMAN, J. et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. **Journal of the American Heart Association**, v. 109, n. 10, p. 1292–1298, 2004.
- REICHENBERGER, M. et al. Adipose Derived Stem Cells Protect Skin Flaps against Ischemia-Reperfusion Injury.” **Stem cell reviews**, v. 8, n. 3, p.854–862, 2012.
- RICHTER et al. Impact of Vascular Endothelial Growth Factor on Skin Graft Survival in Irradiated Rats. **Arch. Facial Plast Surg**, v. 11, n. 2, p. 110–113, 2009.
- RICHTER et al. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Skin Graft Survival in Sprague-Dawley Rats. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, p. 637–41, 2006.
- SIEMIONOV, M. & ARSLAN, E. Ischemia/reperfusion Injury: A Review in Relation to Free Tissue Transfers. **Microsurgery** v. 24, p. 468–475, 2004.
- SIMMAN, R. & MCKINNEY, C.C. Improved Survival of Ischemic Random Skin Flaps through the Use of Bone Marrow Nonhematopoietic Stem Cells and Angiogenic Growth Factors. **Annals of plastic surgery** v. 54, n. 5, p. 546–552, 2005.
- SUARTZ, C.V. et al. Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) in the Viability of Random Skin Flap in Rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, supl. 2, p. 6–9, 2014.
- TERRACIANO, P. et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cell International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- TSIROGIANNI, A.K. et al. Wound Healing: Immunological Aspects. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 37, Suppl, p.S5–S12, 2006.
- UYSAL, C.A. et al. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. **Plast Reconstr Surg**, v. 124, p. 804-815, 2009.

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

VURAL, E. et al. Skin Graft Take Rates, Granulation, and Epithelialization. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 136, n. 7, p. 720–723, 2010.

WHITE, R.A.S. **Enxerto de pele livre**. In: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). *Manual de Feridas em Cães e Gatos*. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.

ZHANG, F. et al. Improvement of Full-Thickness Skin Graft Survival by Application of Vascular Endothelial Growth Factor in Rats. **Annals of plastic surgery** v. 60, n. 5, p. 589–593, 2008.

ZHANG, F. et al. Stro-1 positive human mesenchymal stem cells prolong skin graft survival in mice. **Transplantation proceedings**, v. 45, p. 726-729, 2013.

ZHANG, F. & TANG, X. New Advances in the Mesenchymal Stem Cells Therapy against Skin Flaps Necrosis. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 4, p. 491–496, 2014.

ZOGRAFOU, A. et al. Improvement of Skin-Graft Survival after Autologous Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Rats. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery**, v. 64, n. 12, p. 1647–1656, 2011.

### 3.8 Dados complementares

#### 3.8.1 Desenho experimental



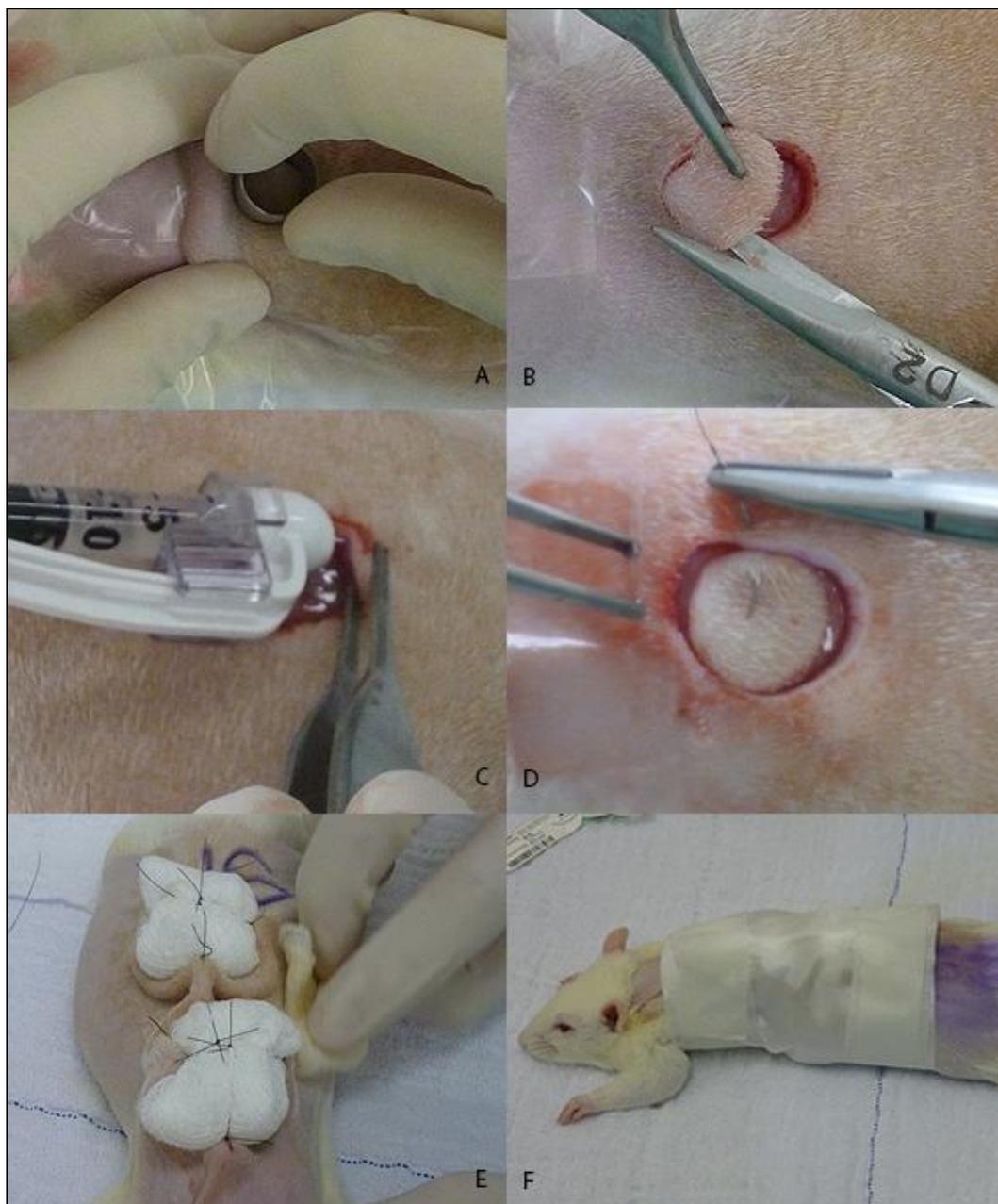
**Figura 7.** Esquema representando os grupos experimentais: ADSC\_G recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 μL de Solução Salina a 0,9% no espaço subcutâneo do enxerto; ADSC\_B recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 μL de Solução Salina a 0,9% injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; ADSC\_GB recebeu 1 x 10<sup>6</sup> ADSCs ressuspensas em 200 μL de Solução Salina a 0,9%, metade no espaço subcutâneo do enxerto e outra metade injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; SS\_G recebeu 200 μL de Solução Salina a 0,9% no espaço subcutâneo do enxerto; SS\_B recebeu 200 μL de Solução Salina a 0,9% injetadas nas bordas do leito receptor do enxerto na via intradérmica; SHAM foi submetido à cirurgia, sem a aplicação de nenhum tratamento.

#### 3.8.2 Linha do tempo do estudo



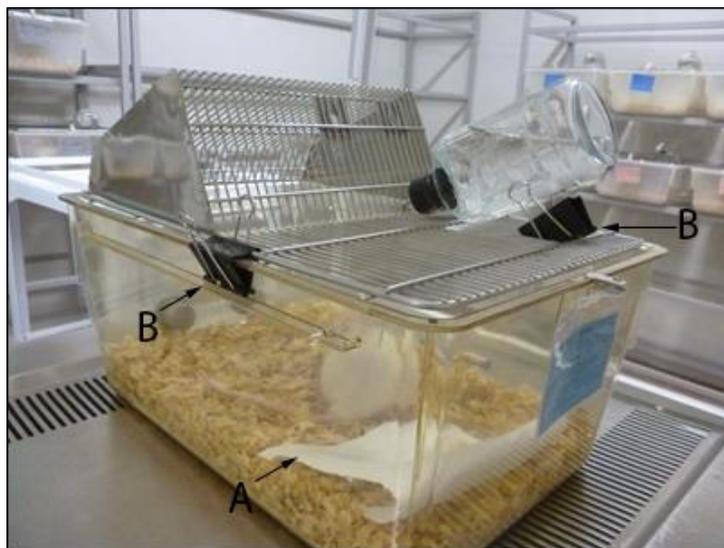
**Figura 8.** Esquema representando as etapas do estudo. D0: dia zero, em que foi realizada a cirurgia, com a injeção de ADSCs ou SS nos enxertos; D5: dia cinco, em que ocorreu a remoção dos curativos e algumas avaliações clínicas; D14: dia 14, quando os animais foram eutanasiados e as biópsias de pele dos enxertos foram coletadas.

### 3.8.3 Modelo cirúrgico



**Figura 9** - Fotografias realizadas nas cirurgias-piloto do estudo. A. Incisão da pele realizada com trépano corneal de 12 mm para retirada do enxerto de pele; B. Finalização da incisão da pele com tesoura; C. Aplicação da suspensão de ADSCs em SS na borda do leito receptor; D. Sutura do enxerto ao leito

receptor com fio mononylon 6-0 em padrão simples separado; E. Rato com curativo primário, do tipo *tie-over*; F. Rato com curativo secundário.



**Figura 10.** Caixa adaptada para evitar que o rato roçasse o dorso na tampa. A. a ração, o amendoim e as sementes de girassol foram colocadas no chão da caixa, junto com a maravalha; B. a garrafa d'água foi fixada com presilha metálica, assim como a tampa.

#### 3.8.4 Tempo de cirurgia

Tabela 1 - Tempo de realização da cirurgia para retirada dos dois fragmentos de pele, dissecação do músculo panículo carnoso, aplicação do tratamento (exceto no grupo SHAM) e sutura do enxerto no leito receptor; tempo transcorrido para colocação do curativo e tempo total.

Grupos	Tempo médio da cirurgia (minutos)	Tempo médio da colocação do curativo (minutos)	Tempo médio total (minutos)
SHAM	17	12,2	29,2
SS_G	20,4	18,2	38,6
SS_B	26,8	16,4	43,2
ADSC_G	23,4	16	39,4
ADSC_B	26	16,6	42,6
ADSC_GB	26,2	14,8	41

## 3.8.5 Epidermólise

Tabela 2 - Médias e desvios padrão da área de ulceração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.

<b>Grupos</b>	<b>Média da quantidade de enxertos com epidermólise</b>	<b>Desvio padrão</b>
SHAM	100%	0%
SS_G	80%	3,98%
SS_B	70%	8,01%
ADSC_G	30%	4,92%
ADSC_B	90%	4,92%
ADSC_GB	70%	4,92%

## 3.8.6 Planimetrias

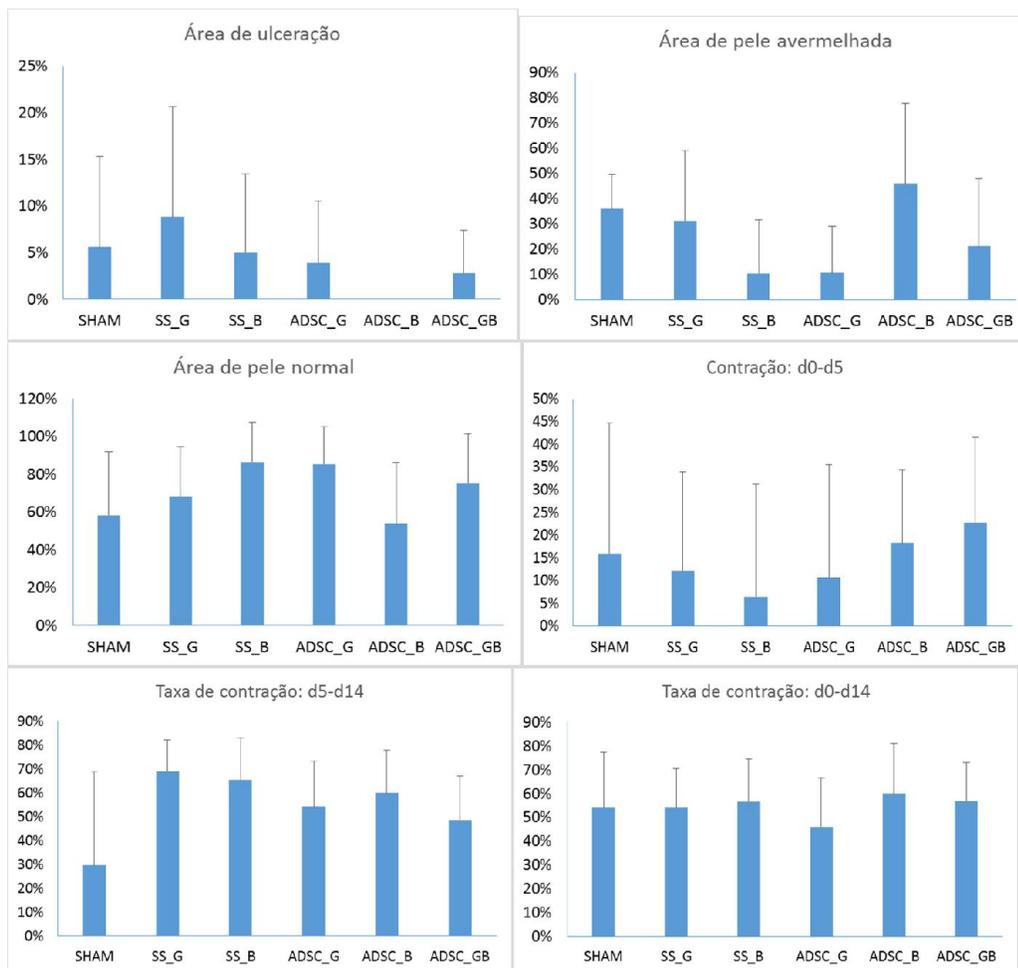
Tabela 3 - Médias e desvios padrão da área de ulceração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.

Grupo	Área de ulceração		Pele avermelhada		Pele normal	
	Desvio		Desvio		Desvio	
	Média	Padrão	Média	Padrão	Média	Padrão
SHAM	5,62%	9,75%	36,12%	13,69%	58,26%	33,68%
SS_G	8,86%	11,82%	31,30%	27,71%	68,12%	26,58%
SS_B	5,02%	8,46%	10,51%	21,10%	86,46%	21,18%
ADSC_G	3,95%	6,58%	10,67%	18,53%	85,27%	20,14%
ADSC_B	0,00%	0,00%	46,04%	31,97%	53,86%	32,39%
ADSC_GB	2,81%	4,58%	21,21%	26,90%	75,38%	26,07%

Tabela 4 - Médias e desvios padrão da contração, área de pele avermelhada e área de pele normal, calculadas em relação à área total dos enxertos.

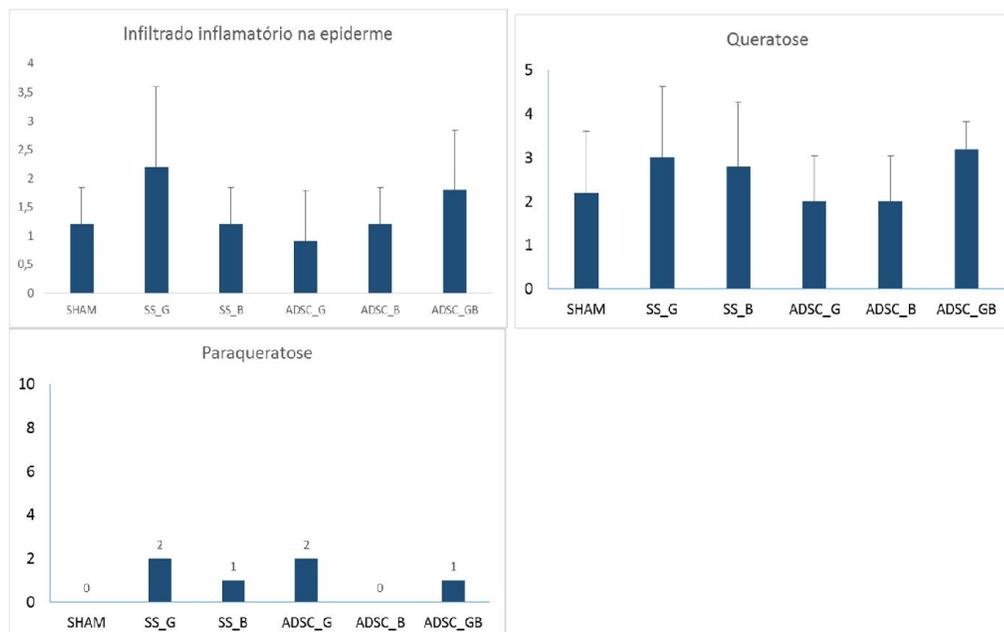
Grupo	Contração d <sub>0</sub> d <sub>5</sub>		Contração d <sub>5</sub> d <sub>14</sub>		Contração d <sub>0</sub> d <sub>14</sub>	
	Desvio		Desvio		Desvio	
	Média	Padrão	Média	Padrão	Média	Padrão
SHAM	15,98%	28,69%	29,58%	39,49%	54,21%	23,21%
SS_G	12,12%	21,81%	69,01%	13,16%	54,21%	16,23%
SS_B	6,41%	24,86%	65,41%	17,60%	56,74%	17,72%
ADSC_G	10,64%	24,81%	54,18%	19,04%	45,99%	20,47%

ADSC_B	18,26%	16,14%	59,88%	18,01%	59,98%	21,26%
ADSC_GB	22,68%	18,85%	48,47%	18,39%	56,99%	16,19%



**Figura 11.** Médias e desvios padrão obtidos com as planimetrias no dia da eutanásia ( $d_{14}$ ): A. Área de ulceração dos grupos; B. Área de pele avermelhada; C. Área de pele normal; D. Taxa de contração entre  $d_0$  e  $d_5$ ; E. Taxa de contração entre  $d_5$  e  $d_{14}$ ; F. Taxa de contração entre  $d_0$  e  $d_{14}$ .

## 3.8.7 Histopatologia



**Figura 12.** Médias e desvios padrão das análises histopatológica da epiderme, realizadas com HE em d<sub>14</sub>: A. Infiltrado inflamatório; B. Ceratose; C. Paraceratose.

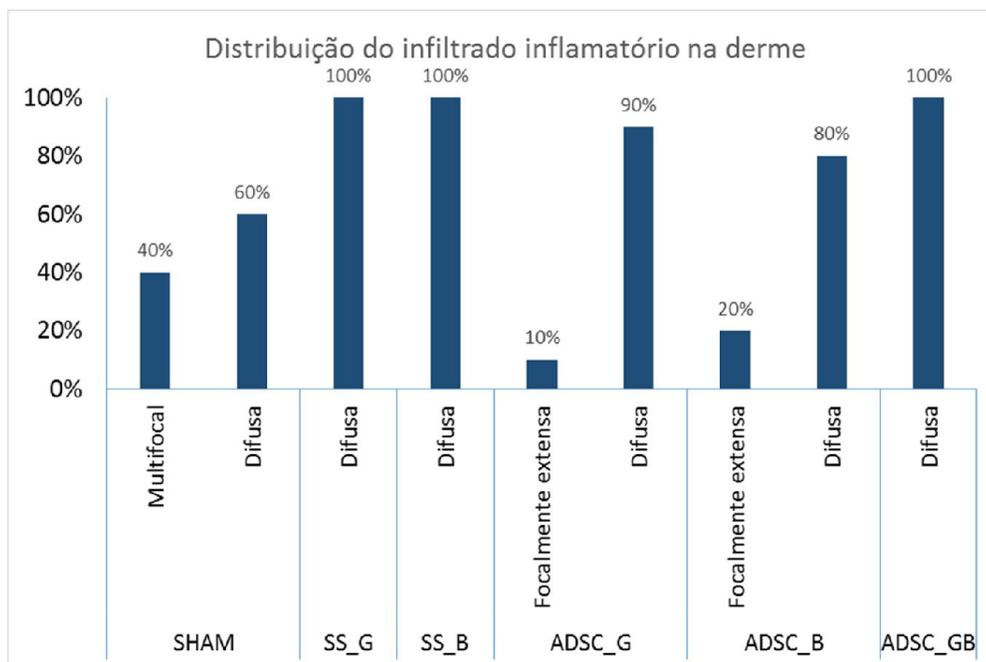
Tabela 5 - Médias e desvios padrão dos parâmetros de avaliação da epiderme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE aos 14 dias de pós-cirúrgico.

	SHAM	SS_G	SS_B	ADSC_G	ADSC_B	ADSC_GB
Adelgaçamento (média)	0	0	0	0	0	0
Desvio padrão	–	–	–	–	–	–
Espessamento (média)	3	2,8	2,6	2,2	2,8	4,4
Desvio padrão	1,33	1,69	1,78	1,69	1,69	0,97
Queratose (média)	2,2	3	2,8	2	2	3,2
Desvio padrão	1,4	1,63	1,48	1,05	1,05	0,63
Acantose (média)	1,6	3,4	2,6	2,0	2,4	4,3
Desvio padrão	1,35	1,84	1,26	1,05	1,58	0,95
Infiltrado inflamatório	1,2	2,2	1,2	0,9	1,2	1,8

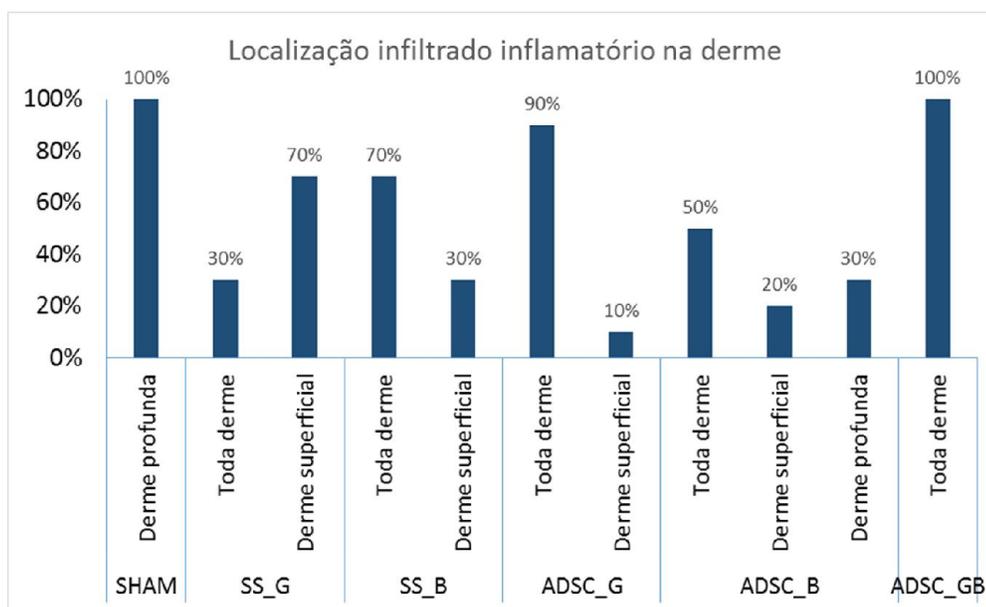
(média)							
Desvio padrão		0,63	1,4	0,63	0,88	0,63	1,03
Deg. (média)	Hidrópica	2,8	3,4	2,2	2	2,3	2,7
Desvio padrão		1,14	1,84	1,03	1,05	1,16	0,95

Tabela 6 - Médias e desvios padrão dos parâmetros de avaliação da derme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE (tecido de granulação e infiltrado inflamatório) e Tricrômico de Masson (depósito de colágeno) aos 14 dias de pós-cirúrgico.

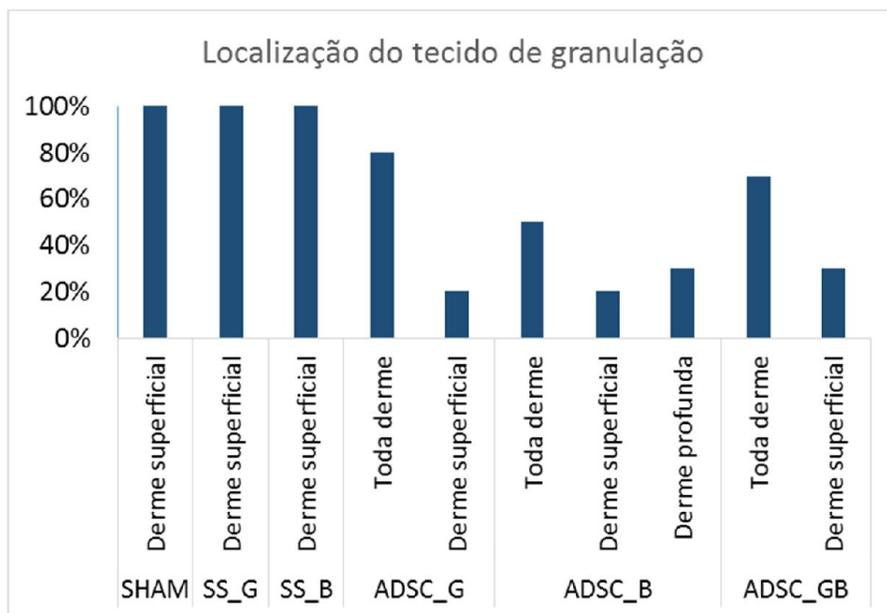
	SHAM	SS_G	SS_B	ADSC_G	ADSC_B	ADSC_GB
Tecido de granulação (média)	3,60	3,50	3,20	2,90	3,70	4,50
Desvio padrão	1,26	0,85	0,92	1,37	1,34	0,70
Infiltrado Inflamatório (média)	2	3,9	2,8	2,3	3	2,8
Desvio padrão	1,05	1,19	1,13	1,76	0,94	0,63
Deposição de colágeno(média)	3,70	3,30	2,80	2,70	3,40	3,50
Desvio padrão	1,34	0,95	1,03	1,49	1,58	0,85
Deposição de Colágeno entre bordas (média)	2,60	3,30	3,10	3,80	3,00	4,00
Desvio padrão	1,26	0,95	0,99	1,40	0	1,05
Rarefação pilosa (média)	30%	30%	30%	0%	0%	0%



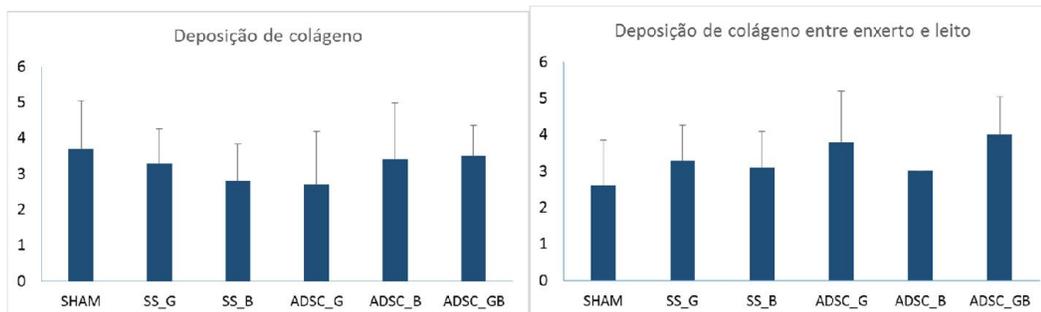
**Figura 13.** Médias de distribuição do infiltrado inflamatório na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de HE aos 14 dias de pós-cirúrgico.



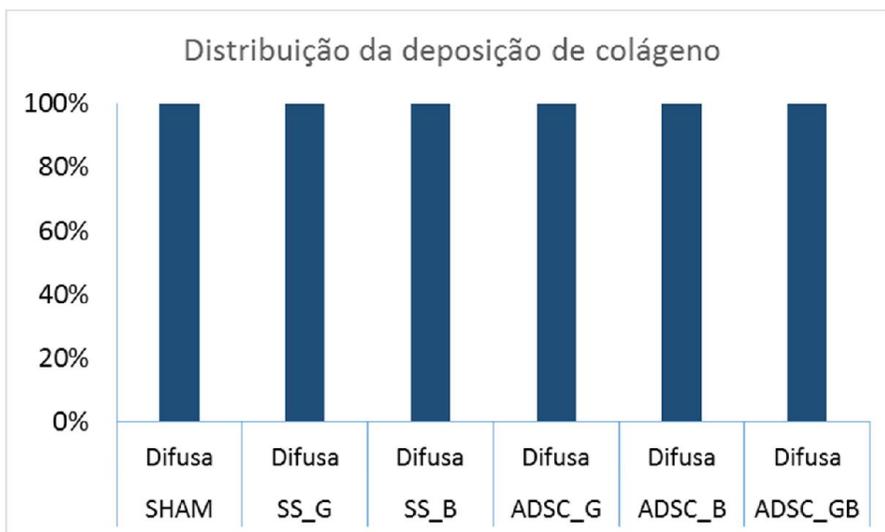
**Figura 14.** Médias de localização do infiltrado inflamatório na derme dos enxertos, na histopatologia com coloração de HE, aos 14 dias de pós-cirúrgico.



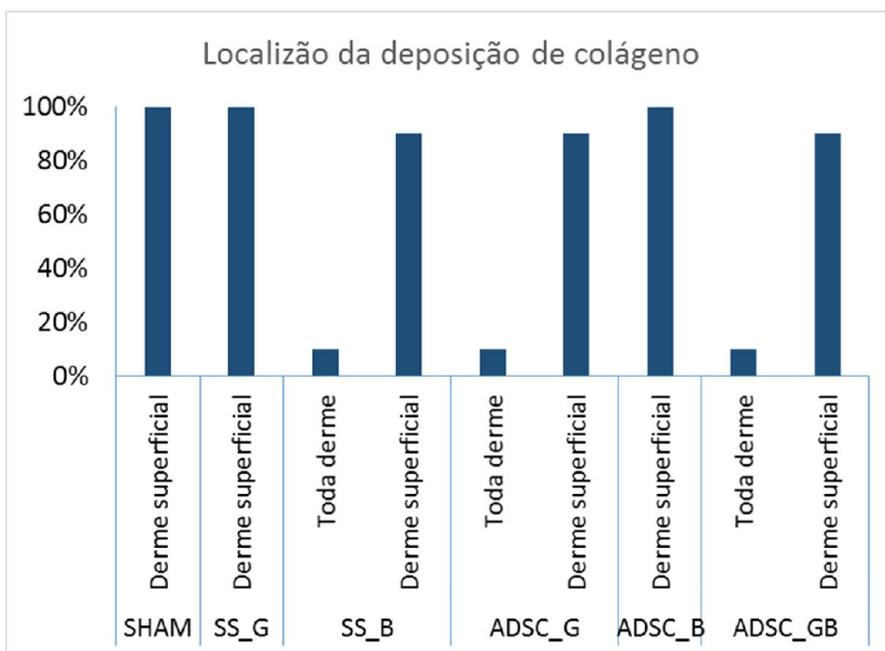
**Figura 15.** Médias de localização do tecido de granulação na derme dos enxertos, na histopatologia com coloração de HE, aos 14 dias de pós-cirúrgico.



**Figura 16.** Médias e desvio padrão da deposição de colágeno na derme, na análise histológica com Tricrômico de Masson aos 14 dias de pós-cirúrgico: A. deposição de colágeno no enxerto; B. deposição de colágeno na interface entre os enxertos e as bordas dos leitos receptores.



**Figura 17.** Médias de distribuição da deposição de colágeno na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de TM aos 14 dias de pós-cirúrgico.



**Figura 18.** Médias da localização da deposição de colágeno na derme dos enxertos na histopatologia com coloração de TM aos 14 dias de pós-cirúrgico.

### 3.8.8 Imuno-histoquímica

Tabela 7 - Médias e desvios padrão da avaliação de quantidade de células marcadas com anticorpo anti-VEGF no subcutâneo e no tecido de granulação aos 14 dias de pós-cirúrgico.

	SHAM	SS_G	SS_B	ADSC_G	ADSC_B	ADSC_GB
Subcutâneo (média)	2	2,9	2,7	3,2	2,7	2,9
Desvio padrão	0	0,88	0,48	0,79	0,95	0,88
Tecido de granulação (média)	2	2,7	2,8	3	2,6	2,6
Desvio padrão	0,82	0,95	0,92	0,94	1,07	1,43

Tabela 8 - Médias e desvios padrão da avaliação de quantidade de células marcadas com anticorpo ki67 na camada basal da epiderme aos 14 dias de pós-cirúrgico.

	SHAM	SS_G	SS_B	ADSC_G	ADSC_B	ADSC_GB
Subcutâneo (média)	123,05	83,96	88,22	104,18	91,59	78,52
Desvio padrão	0,82	0,95	0,92	0,94	1,07	1,43

## 4 CONCLUSÕES

1. Os enxertos tratados com ADSCs apresentaram maior viabilidade da epiderme. Quanto à viabilidade da derme, sugere-se estudos adicionais com maiores amostras, visto que a literatura consultada aponta para esse desfecho;
2. A aplicação de SS ou de ADSCs aumenta a expressão de VEGF no tecido subcutâneo, enquanto a aplicação de ADSCs aumenta a sua expressão no tecido de granulação;
3. Enxertos tratados com SS ou com ADSCs apresentam a mesma taxa de proliferação celular na camada basal da epiderme, contudo essa proliferação é maior em enxertos sem tratamento;
4. Os grupos tratados com ADSC ou SS apresentamos mesmo níveis de infiltrado inflamatório na epiderme. Enquanto, os grupos tratados com ADSCs apresentaram menor infiltrado inflamatório na derme que os tratados com SS;

5. Não há diferença entre a deposição de colágeno entre os grupos tratados com ADSCs ou SS;
6. Não há diferença entre a contração dos enxertos tratados com SS ou ADSC;
7. Os enxertos que recebem ADSCs no seu espaço subcutâneo apresentam menor epidermólise e espessamento da epiderme, menor acantose e maior proliferação celular da camada basal da epiderme.

Dessa forma conclui-se que a administração subcutânea das ADSCs em enxertos de pele de espessura total podem melhorar a sua integração ao leito receptor, diminuindo suas alterações histopatológicas e macroscópicas. Adicionalmente, sugerem-se novos estudos, em momentos iniciais da cicatrização para compreender os mecanismos de ação das ADSCs nesse modelo experimental.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Rev and Rep**, v. 9, p. 32–43, 2013.
- ALTMAN, A. M. et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 1, p. 250–8, 2009.
- AMÂNCIO, A.C.G. et al. Estimulação Ultra-Sônica Da Integração de Enxertos de Pele Total. Estudo Experimental Em Coelhos. **Acta Ortop Bras**, v. 14, n. 5, p. 276–79, 2006.
- ANDERSON, D. **Tratamento de feridas abertas**. In: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). Manual de Feridas em Cães e Gatos. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.
- ANGELI, A. L., BRANDÃO, C.V.S. & FREITAS, R.S. Cirurgia Reconstructiva : Retalhos Cutâneos Em Pequenos Animais. **MEDVEP - Rev Cientif Vet Pequenos Anim Esti** V. 4, n. 12, p. 87–95, 2006.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M. & CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BANKS, W. Histologia Veterinária Aplicada. 2ª ed. Manole, São Paulo. 629p., 1992.

BIGOLIN et al. Um modelo murino para tratamento de lesão por isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos com o uso de células-tronco adiposo-derivadas. *Revista de Iniciação científica da ULBRA*, v. 1, p. 53-61, 2010

BLANES, L. **Tratamento de feridas**. In: BAPTISTA-SILVA, J.C.C. *Cirurgia vascular: guia ilustrado*. São Paulo, 2004.

BOUDANA, D. *et al.* History of skin graft. **Annales de chirurgie plastique esthétique**, v. 55, n. 4, p. 328–332, 2010.

BRUNNER & SUDDARTH. **Tratado de enfermagem médico cirúrgico**. 10<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2005.

BYDLOWSKI S. et al. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Ver Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009

CAMPAGNOLLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.

CESARETTI, I. Processo fisiológico de cicatrização da ferida. **Pelle Sana**, v. 2, p. 10-12, 1998.

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.

CHENG, K. et al Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. **Genomic Medicine**, v.3, p. 53-63, 2011.

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

CLARK R.A. et al. Tissue engineering for cutaneous wounds. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

CONDUTA J. L. et al. Uso de matriz dérmica associado ao curativo por pressão negativa na abordagem da contratatura em pacientes queimados. **Rev Bras Cir Plast**, v. 27, n. 3, p. 369-73, 2012.

CONNICK P. et al. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. **Lancet Neurol**, v. 11, n. 2, p. 150–156, 2012.

COUTINHO B.B.A., et al. Uso de retalhos microcirúrgicos em pacientes queimados: revisão da literatura. **Rev Bras Cir Plast**, v. 27, n. 2, p. 316-320, 2012.

- CHEN, C.H. et al. Porous tissue grafts sandwiched with multilayered mesenchymal stromal cell sheets induce tissue regeneration for cardiac repair. **Cardiovascular Research**, v. 80, p. 88–95, 2008.
- CHEN, J.S., WONG, V.W. & GURTNER, G.C. Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cutaneous Wound Healing. **Frontiers in immunology**, v. 3, p.192-198, 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.315–17, 2006.
- DYCE, J.M., SACK, W.O., WENSING, C.I.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 238 p., 1990.
- ELTZSCHING, H.K. & COLLARD, C.D. Vascular Ischemia and Reperfusion Injury. **British medical bulletin**, v. 70, p. 71–86, 2004.
- FANG B. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graft-vs.-host disease in two children. **Pediatr Transplant**, v. 11, p. 814-817, 2007.
- FOSSUM, T.W. Small Animal Surgery. 4 ed. Elsevier, Missouri, 1619 p., 2013.
- 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.
- FRIEND, E. **Complicações na cicatrização de feridas** In: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). Manual de Feridas em Cães e Gatos. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.
- GAO, W. et al. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, p. 2575–2585, 2011.
- GARCIA-OLMO D. et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. **Dis Colon Rectum**, v. 52, n. 1, p. 79–86, 2009.
- GEBLER, A., ZABEL, O. & SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 2, p. 128–34, 2012.
- GEORGE, G. Wound Management. PJB Publications, Richmond, 1996.

GINANI, F., SOARES, D.M. & BARBOZA, C.A.G. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Rev Bras Cir Plást**, v. 27, n. 3, p. 359–363, 2012.

GOMILLION, C.T. & BURG, K.J. L. Stem cells and adipose tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 36, p. 6052–6063, 2006.

GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 15, p. 314–321, 2008.

HARRISON, C. A. & MACNEIL, S. The mechanism of skin graft contraction: an update on current research and potential future therapies. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 34, n. 2, p. 153–63, 2008.

HERRMAN R. *et al.* Mesenchymal stromal cell therapy for steroid-refractory acute and chronic graft versus host disease: a phase 1 study. **Int J Hematol**, v. 95, n. 2, p. 182–188, 2012.

HOSGOOD, G. **Biologia da cicatrização de feridas**. *In*: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). Manual de Feridas em Cães e Gatos. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.

ICHIOKA, S. *et al.* Bone Marrow Cell Implantation Improves Flap Viability after Ischemia-Reperfusion Injury. **Annals of plastic surgery**, v. 52, n. 4, p. 414–418, 2004.

JACKSON, W.M., NESTI, L.J. & TUAN, R.S. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Attenuation of Scar Formation during Wound Healing. **Stem cell research & therapy**, v. 3, n.20, p. 1–9, 2012.

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.

KIM, J. *et al.* The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Vet Dermatol**, v. 24, p. 242-253, 2013

KOLF, C. *et al.* Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 204-213, 2007

LE, B. K. *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579–1586, 2008.

LEBLEBICI, B. *et al.* Quality of life after burn injury: the impact of joint contracture. **Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association**, v. 27, n. 6, p. 864–8, 2006.

- LEE, S. H., LEE, J. H., & CHO, K. H.. 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.
- LU F., et al. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. **Plast Reconstr Surg**, v. 15, p. 121-130, 2008.
- 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–e53, 2013.
- KHOSROTEHRANI, K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? Kiarash. **Experimental Dermatology**, v. 22, p. 307-310, 2013.
- LIANG, J. et al. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 8, p. 1423-1429, 2010.
- LOFÊGO FILHO, J.A. et al. Enxertia de Pele Em Oncologia Cutânea. **Anais Brasileiros de Dermatologia** v. 5, p. 465–72, 2006.
- MANDELBAUM D.D., Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 78, n. 5, p. 525-542, 2003.
- MARTINELLO T. et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Res Vet Sci.**, v. 91, n. 1, p. 18-24, 2011.
- MAXSON et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–49, 2012.
- MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P.C. & NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–2213, 2006.
- 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.
- MILCHESKI, D.A. et al. Tratamento Cirúrgico de Ferimentos Descolantes Nos Membros Inferiores - Proposta de Protocolo de Atendimento. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 3, p. 199–203, 2010.

MISHRA, P. et al. Cell-free derivatives from mesenchymal stem cells are effective in wound therapy. **World J Stem Cells**, v. 4, n. 5, p. 35–43, 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.

NAMBU M. et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with collagen matrix. **Ann Plast Surg Mar**, v. 62, n. 3, p. 317-321, 2009

PAVLETIC, M. Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery. 3 ed. Wiley-Blackwell, Iowa, 679p., 2010.

PARK, J.E. et al. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American journal of surgery**, v. 187, n. 5A, p. 11S–16S, 2004.

PEREIRA, C.M.B. et al. Anestesia e retalhos microvascularizados. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v. 62, n. 4, p. 1-12, 2012.

PEREIRA R.F., et al. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. *Nanomedicine*, 2013, 8 (4), 603-621.

PRASAD, V. K., et al. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 534–541

RAMALHO, R. et al. Enxerto Epidermogorduroso e suas Aplicações. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, v. 2, n. 12, p. 65–70, 1997.

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.

REHMAN, J. et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. **Journal of the American Heart Association**, v. 109, n. 10, p. 1292–1298, 2004.

REICHENBERGER, M. et al. Adipose Derived Stem Cells Protect Skin Flaps against Ischemia-Reperfusion Injury.” **Stem cell reviews**, v. 8, n. 3, p.854–862, 2012.

RICHTER et al. Impact of Vascular Endothelial Growth Factor on Skin Graft Survival in Irradiated Rats. **Arch. Facial Plast Surg**, v. 11, n. 2, p. 110–113, 2009.

RICHTER et al. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor on Skin Graft Survival in Sprague-Dawley Rats. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, p. 637–41, 2006.

RINGDEN O. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. **Transplantation**, v. 81, n. 10, p. 1390–1397, 2006.

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

SCUDERI, N. et al. Human adipose-derived stromal cells for cell-based therapies in the treatment of systemic sclerosis. **Cell Transplant**, v. 22, n. 5, p. 779-795, 2013.

SEEBERGER, K.L., ESHPETER, A. & KORBUTT G.S., Isolation and culture of human multipotent stromal cells from the pancreas. **Methods Mol Biol**, v. 698, p. 123-140, 2011.

SIEMIONOV, M. & ARSLAN, E. Ischemia/reperfusion Injury: A Review in Relation to Free Tissue Transfers. **Microsurgery** v. 24, p. 468–475, 2004.

SIMMAN, R. & MCKINNEY, C.C. Improved Survival of Ischemic Random Skin Flaps through the Use of Bone Marrow Nonhematopoietic Stem Cells and Angiogenic Growth Factors. **Annals of plastic surgery** v. 54, n. 5, p. 546–552, 2005.

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

SUARTZ, C.V. et al. Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) in the Viability of Random Skin Flap in Rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, suppl. 2, p. 6–9, 2014.

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. 1886–92, 2010.

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

TSIROGIANNI, A.K. et al. Wound Healing: Immunological Aspects. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 37, Suppl, p.S5–S12, 2006.

TOMA. J.G. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. **Stem Cells**, v. 23, n. 6, p. 727-37, 2005.

TSIROGIANNI, A. K., MOUTSOPOULOS, N. M., MOUTSOPOULOS, H. M. Wound healing: immunological aspects. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 37, n. Suppl 1, p. S5–12, 2006.

TSUJI, W., RUBIN, J. P. & MARRA, K. G. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 3, p. 312–21, 2014.

UYSAL, C.A. et al. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. **Plast Reconstr Surg**, v. 124, p. 804-815, 2009.

UYSAL, C.A. et al. Effect o mesenchymal stem cells on skin graft to flap fabrication, an experimental study. **Annals of Plastic Surg**, 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.

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

VIDINSK, B. et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats. **Acta Vet**, v. 75, p. 197–202, 2006.

VURAL, E. et al. Skin Graft Take Rates, Granulation, and Epithelialization. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 136, n. 7, p. 720–723, 2010.

WERNER, S. & GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**, v. 83, p. 835-870, 2003.

WHITE, R.A.S. **Enxerto de pele livre**. In: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). Manual de Feridas em Cães e Gatos. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.

WILLIAMS, J. **Tomada de decisão no fechamento de feridas** In: WILLIAMS, John; MOORES, Alison (Orgs.). Manual de Feridas em Cães e Gatos. 2a. ed. São Paulo: Roca, 2013, p. 261.

WONG, V.W. et al. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, p. 1–8, 2010.

YARAK, S. & OKAMOTO, O. K.. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647–656, 2010.

YANG, M. et al., Stem Cell Therapy for Lower Extremity Diabetic Ulcers: WhereDoWeStand? **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

ZAGO, A.; COVAS, T. **Células-tronco - A fronteira da medicina**. Atheneu, São Paulo. 245 p., 2006.

ZHANG, F. et al. Improvement of Full-Thickness Skin Graft Survival by Application of Vascular Endothelial Growth Factor in Rats. **Annals of plastic surgery** v. 60, n. 5, p. 589–593, 2008.

ZHANG, F. et al. Stro-1 positive human mesenchymal stem cells prolong skin graft survival in mice. **Transplantation proceedings**, v. 45, p. 726-729, 2013.

ZHANG, F. & TANG, X. New Advances in the Mesenchymal Stem Cells Therapy against Skin Flaps Necrosis. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 4, p. 491–496, 2014.

ZHOU H. et al. Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 16, p. 403–412, 2010.

ZOGRAFOU, A. et al. Improvement of Skin-Graft Survival after Autologous Transplantation of Adipose-Derived Stem Cells in Rats. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery**, v. 64, n. 12, p. 1647–1656, 2011.

ZUK, P.A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. december, p. 4279–4295, 2002.