

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AUTO-ENXERTOS CUTÂNEOS EM LEITO RECEPTOR  
DESPROVIDO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ASSOCIADO  
OU NÃO DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
XENÓGENAS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus* )**

**MV. Jorge Luis Alvarez Gómez**  
Médico veterinário

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AUTO-ENXERTOS CUTÂNEOS EM LEITO RECEPTOR  
DESPROVIDO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ASSOCIADO  
OU NÃO DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
XENÓGENAS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

**Jorge Luis Alvarez Gómez**

**Orientador: Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**2016**

A473a Alvarez Gómez, Jorge Luis  
Auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não do uso de células tronco mesenquimais xenógenas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) / Jorge Luis Alvarez Gómez. -- Jaboticabal, 2016  
xiii, 41 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016  
Orientador: Andriago Barboza de Nardi  
Banca examinadora: Jorge Luiz Costa Castro, Wilson Gómez Manrique  
Bibliografia

1. *Células tronco*. 2. Cirurgia reconstrutiva. 3. Pele. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-089.8:636.92

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

# CERTIFICADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AUTO-ENXERTOS CUTÂNEOS EM LEITO RECEPTOR DESPROVIDO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ASSOCIADO OU NÃO DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS XENÓGENAS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

**AUTOR: JORGE LUIS ALVAREZ GÓMEZ**

**ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JORGE LUIZ COSTA CASTRO

Departamento de Cirurgia Veterinária / PUC/Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Curitiba/PR

Prof. Dr. WILSON GÓMEZ MANRIQUE

Departamento de Medicina Veterinária / UNICASTELO - Campus Descalvado, SP

Jaboticabal, 29 de julho de 2016

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Jorge Luis Alvarez Gómez** – nascido no dia 01 de janeiro de 1982, natural de Píllaro – Tungurahua – Equador. Graduado no curso de Medicina Veterinária na Universidade Técnica de Cotopaxi, no ano 2006. No período 2005 – 2007 foi residente do Hospital Veterinário “ALL PETS” em Quito - Equador. No período de 2007 a 2009 fez internado e residência no Hospital Veterinário para Pequenos Animais (HVPE-UAEM) na Universidade Estadual de México - UAEM – México, obtendo o certificado de Especialização em Clínica Médica e Cirurgia Veterinária de Pequenos Animais. No período 2010 a 2012 foi diretor do Hospital veterinário “All Pets” em Quito, Equador, e nesse mesmo período foi professor das disciplinas de cirurgia geral, diagnóstico clínico e tópicos especiais na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Das Américas, Quito - Equador. No período 2013 a 2015 foi Diretor da Clínica Veterinária para pequenos Animais Udla e professor da cátedra Cirurgia Geral na Universidade Das Américas – Udla, Quito - Equador. Em outubro de 2014 foi aprovado no Programa de Pós-graduação (mestrado) em cirurgia veterinária, na FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, tendo iniciado as atividades em março 2015. Também participa do atendimento especializado no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi.

## DEDICATORIA

A minha família: Blanca Gómez, Blasco Alvarez, Pedro, Daniel, María Fernanda, Lorena, Camila, Mateo e Nathalia. Eles são o ponto de equilíbrio na minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Sem dúvida, cumprir esta meta pessoal na Unesp-Jaboticabal não teria sido possível sem a cooperação e ajuda do professor Andriago Barboza de Nardi. Muito obrigado professor por concordar em ser meu orientador, por confiar em mim. Obrigado pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de trabalho.

Para Michele Andrade de Barros, diretora científica e fundadora da empresa Regenera® Stem Cells, muito obrigado pela sua disposição em colaborar neste projeto e por doar as células tronco mesenquimais. Também agradeço a Bruna Moraes, responsável técnica da equipe Regenera. As suas recomendações serão sempre aceitas e recebidas na medicina veterinária regenerativa.

A todas as pessoas que estiveram envolvidas nesta pesquisa especialmente Eduarda Moutinho, Bruna Fernanda Firmo, Alfredo Calpa, Andresa Matsui, Ana Pascoli, Paloma Silva, Rafaela Bortolotti, Denise Granato Chung, María Lucía Correal, Mar Roldan, Wilson Gómez, Ricardo Ramírez e ao professor João Ademir de Oliveira. A contribuição de cada um de vocês foi essencial para a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meu pais Blasco e Blanca, aos meus irmãos Pedro, Daniel, minha irmã Maria Fernanda, e minha namorada Nathalia Segovia, obrigado pela paciência, compreensão e apoio incondicional.

Aos professores do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, ao pessoal do serviço de Oncologia Veterinária, aos residentes e ao pessoal do Hospital Veterinário de pequenos animais que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e à fundação CAPES pelo auxílio financeiro.

**SUMÁRIO**

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	IX
RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
Anatomia e fisiologia do sistema tegumentar.....	2
Cicatrização da pele.....	4
Enxertos cutâneos.....	7
Células tronco.....	11
REFERÊNCIAS.....	15
CAPITULO 2 – Auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não do uso de células tronco mesenquimais xenógenas em coelhos ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ).....	.21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	35



## CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Efeitos das células tronco mesenquimais xenógenas de tecido adiposo na neovascularização e cicatrização em auto-enxertos cutâneos em coelhos”**, protocolo nº 17346/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião extraordinária de 06 de novembro de 2015.

Vigência do Projeto	Setembro/2015 a Setembro de 2016
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (coelho-europeu)
Nº de animais	80
Peso / Idade	Acima de 2,5 Kg, idade > 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Unesp - Botucatu

Jaboticabal, 06 de novembro de 2015.

  
**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
 Coordenadora – CEUA

## **AUTO-ENXERTOS CUTÂNEOS EM LEITO RECEPTOR DESPROVIDO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO ASSOCIADO OU NÃO DO USO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS XENÓGENAS EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

**RESUMO** - Tradicionalmente um enxerto é realizado em um leito receptor coberto por tecido de granulação saudável, e na atualidade, as células tronco mesenquimais representam uma excelente alternativa para estimular a cicatrização de feridas agudas e crônicas. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de células tronco mesenquimais xenógenas na cicatrização de auto-enxertos cutâneos em leito receptor sem tecido de granulação de coelhos. Foram utilizados 60 coelhos, divididos em três grupos de 20 pacientes. O primeiro grupo (GIL) e o segundo (GIV) receberam tratamento de  $2 \times 10^6$  células tronco, por vias intralesional e intravenosa respectivamente, enquanto o grupo controle (GC) recebeu apenas o auto-enxerto cutâneo. Na avaliação macroscópica, enxertos dos grupos GIL e GIV apresentaram melhor coloração comparado com o grupo controle, no entanto, na avaliação microscópica as variáveis inflamação, reepitelização, necrose e neovascularização não mostraram diferença significativa entre os três grupos ( $p > 0,05$ ). Conclusão: a reepitelização dos auto-enxertos cutâneos em malha em leito receptor desprovido de tecido de granulação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) provavelmente não precisam de técnica adjuvante para estimular a cicatrização. A versatilidade da malha permite uma aderência estável ao leito receptor, e através das fendas criadas permite a eliminação da secreção inflamatória, evitando assim a presença de seroma e garantindo a nutrição e revascularização do enxerto.

**Palavras-chave:** células tronco, cirurgia reconstrutiva, pele

**SKIN AUTOGRAFT IN THE RECEPTOR DEVOID OF GRANULATION TISSUE  
ASSOCIATED OR NOT THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS  
XEROGENOUS IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)**

**ABSTRACT** - Traditionally, a graft is performed in a healthy granulation tissue bed, although nowadays, the mesenchymal stem cells represent an excellent alternative to stimulate wound healing in a recipient bed without a healthy granulation tissue bed. Thus, this study aimed to evaluate the effects of mesenchymal stem cells xenogeneic at the healing of skin autografts in a recipient bed without granulation tissue in rabbits. A total of 60 rabbits were divided into three groups of 20 patients. The first (GIL) and the second group (GIV) were treated with  $2 \times 10^6$  intralesional and intravenous stem cells respectively; meanwhile the control group (CG) received only skin autograft. At the macroscopic examination, the grafts GIL and GIV groups showed better color than the control group, however, microscopic evaluation of the variables: inflammation, re-epithelization, necrosis and angiogenesis showed no significant difference among the three groups ( $p > 0,05$ ).

Conclusion: reepithelialization of meshed skin autografts from recipient bed without granulation tissue in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) probably does not need an adjuvant technique to stimulate wound healing. The versatility of the mesh allows a stable adherence to the recipient bed, and through the created slits allows the evacuation of inflammatory secretion, avoiding the presence of seroma and providing nutrition and graft revascularization.

**Keywords** – stem cell, reconstructive surgery, skin

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Distribuição dos três grupos de experimentação. Foram realizadas avaliações macroscópicas e coleta de amostras no terceiro, sétimo, 14 e 30 dia do pós-operatório.....25

**Tabela 2.** Percentagem de secreção em pacientes do grupo controle (GC), grupo com tratamento de células tronco mesenquimais xenógenas pela via intravenosa (GIV) e do grupo tratado com células tronco mesenquimais xenógenas por via intralesional (GIL) na avaliação macroscópica nos dias três, sete, 21 e 30 dias do pós-operatório em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).....28

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotografias representando **(A)** leito receptor, na região crânio lateral com exposição de tendões do músculo extensor carpo radial, extensor digital comum e extensor digital lateral. **(B)** Administração intralesional subcutânea de  $2 \times 10^6$  células MSCs, ressuspendidas em 0,5 mL de solução ringer com lactato. **(C)** Infusão intravenosa lenta pela veia auricular marginal de  $2 \times 10^6$  células MSCs ressuspendidas em 2,0 mL de solução ringer com lactato.....24
- Figura 2.** Fotografias apresentando a evolução macroscópica da cicatrização de auto-enxertos cutâneos em coelhos. GIV grupo tratamento com células tronco mesenquimais xenógenas pela via intravenosa, GC grupo controle e GIL grupo tratamento com células tronco mesenquimais xenógenas intralesional.....27
- Figura 3.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo tratado com células tronco pela via intravenosa. Avaliações macroscópicas nos dias 3, 7, 14 e 30 dias pós-operatório.....28
- Figura 4.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo controle (GC), avaliado 3, 7, 14 e 30 dias pós-operatório.....29
- Figura 5.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo tratado com células tronco pela via intralesional. Avaliações macroscópicas 3, 7, 14 e 30 dias pós-operatório.....29
- Figura 6. A)** Fotomicrografia de um auto-enxerto cutâneo de coelho (GIL) no terceiro dia do pós-operatório. Observar a re-epitelização discreta embaixo do enxerto cutâneo (seta preta), íntegro no leito receptor (seta azul) e presença de focos de hemorragia local (estrela). **B)** Fotomicrografia de auto-enxerto de coelho (GIL) no sétimo dia do pós-operatório. Observa-se neovascularização na derme superficial e moderada proliferação epitelial e presença de crosta acima da linha de reepitelização (seta vermelha). Objetiva de 20x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal 2016. ....32
- Figura 7. A)** Fotomicrografia de um auto-enxerto cutâneo de coelho (GIV) no dia 14 do pós-operatório. Observar a reepitelização íntegra do leito receptor (seta preta) e a liberação da crosta pertencente ao enxerto desintegrado (seta azul). **B)** Fotomicrografia de auto-enxerto de coelho (GIV) no dia 30 do pós-operatório. Observar os quatro estratos da epiderme (seta preta), fibroblastos reativos e tecido conjuntivo denso, homogêneo (setas de duas pontas). Objetiva (A) 10x e (B) 40X, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2016.....33

## **CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais**

### **1. Introdução**

O enxerto cutâneo é um segmento de pele separado por completo a partir de uma área do corpo e utilizado novamente para cobrir outra área desprovida de superfície epitelial (PAVLETIC, 2010; YOU; HAN, 2014). Os enxertos são recomendados em áreas onde a ferida é ampla e não é possível aproximar as bordas da pele circundante ou realizar retalhos, como em pacientes com extensas queimaduras e, nas áreas em que a cicatrização por segunda intenção resultaria em contrações que alterariam a funcionalidade ou o retorno venoso, além disso, os enxertos em malha são uma excelente alternativa para cobrir feridas de tumores em superfícies flexoras e irregulares de difícil imobilização (BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013; YOU; HAN, 2014).

Embora os enxertos cutâneos exijam para sobreviver um leito receptor vascularizado, o tecido de granulação não é necessário antes da aplicação de um enxerto (PAVLETIC, 2010), eles também podem ser aplicados sobre superfície “fresca” isenta de infecção e debris, ou em feridas limpas causadas por abrasão ou avulsão (SWAIM, 2007); no entanto, poucos são os relatos utilizando enxertos cutâneos para cobrir feridas cirúrgicas recém feitas especialmente em áreas tais como tendões e retináculo na região distal das extremidades (TONG; SIMPSON, 2012).

Na atualidade, as células tronco mesenquimais (MSCs) são excelente alternativa para estimular a cicatrização de feridas agudas e crônicas, mediante uma complexa variedade de funções de suporte trófico, anti-inflamatória e imunomoduladora, revascularização, atividade anti-apoptótica, capacidade de diferenciação e quimiotaxia (REHMAN et al., 2004; HARMAM 2013; KIM et al., 2013). MSCs podem ser autógenas (do próprio paciente), alógenas (de um doador da mesma espécie) ou xenógenas (de outra espécie) (FOSSUM; SCHULZ, 2013).

A eficiência das células tronco na cicatrização de feridas é amplamente reportada, estimulando a sínteses de colágeno; ativação, proliferação e migração de fibroblastos (KIM et al., 2007, LIM; YOO 2010). As MSCs de uma espécie pode diferenciar-se e promover a recuperação de tecidos quando transplantadas em outras espécies, MSCs retêm a capacidade multipotencial, e têm características imunológicas únicas que permite persistência no meio ambiente xenogênico (LI et al., 2012).

Sendo assim, este trabalho de investigação tem por objetivo geral avaliar a epitelização e cicatrização de auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não do uso de células tronco mesenquimais xenógenas. Os objetivos específicos são: avaliar a inflamação, re-epitelização e angiogênese no terceiro, sétimo, 14 e 30 dias do pós-operatório nos grupos tratados com células tronco em relação ao grupo controle, e determinar diferenças na inflamação, re-epitelização e angiogênese entre as vias de administração endovenosa e tópica para as células tronco mesenquimais xenógenas.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1 Anatomia e fisiologia do sistema tegumentar**

A pele é o maior e mais visível órgão do corpo, além disto é uma barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o meio ambiente. A pele, pelo e tecido subcutâneo representam 24% do peso corporal de um animal filhote, e 12% em adultos (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Como um órgão sensitivo, a pele é o receptor para percepção do tato, pressão, vibração, estímulos nocivos, calor, frio, dor, além de impedir trauma, proteger o corpo contra micro-organismos invasores e produtos químicos nocivos, e regula a mudança de temperatura (AL-BAGDADI, 2013). A função mais importante da pele é fazer possível um ambiente interno para todos os outros órgãos pela manutenção de uma barreira eficaz contra a perda de água, eletrólitos e macromoléculas (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Outras

funções da pele são a produção de vitamina D, imunorregulação, movimento e forma, elasticidade e resistência, pigmentação, e reservatório de eletrólitos, água, lipídios, carboidratos e proteínas (PAVLETIC, 2010; AL-BAGDADI, 2013).

A pele é composta pela epiderme, derme e anexos associados. A epiderme deriva-se do ectoderma embrionário, enquanto a derme tem origem mesenquimatosa. A interface entre a epiderme e derme é formada por uma membrana basal funcional composta de proteínas da matriz. A pele é sustentada por tecido subcutâneo, que lhe permite deslizar sobre tecidos subjacentes, mas ele não faz parte da pele (PAVLETIC, 2010; AL-BAGDADI, 2013).

A epiderme é fina, porém protetora; ela é particularmente delgada em áreas com muitos pelos e ligeiramente mais grossa em áreas com pouco pelos. A epiderme é avascular, recebendo sua nutrição do fluido que penetra nas camadas mais profundas e dos capilares dérmicos (MACPHAIL, 2013). A derme é mais grossa e vascular e fica abaixo da epiderme, que nutre e suporta à epiderme. A derme é composta de fibras colágenas reticulares e elásticas cercadas por uma substância básica de mucopolissacarídeos. Os fibroblastos, macrófagos, células de plasma e mastócitos são encontrados em toda esta camada. (AL-BAGDADI, 2013; MACPHAIL, 2013).

Os vasos musculocutâneos são os principais vasos que nutrem a pele em seres humanos, macacos e suínos; no entanto, estão ausentes nos cães e em outros animais de pele solta (PAVLETIC, 2010; MACPHAIL, 2013;). Em cães, a pele tem um suporte arterial segmentar de 16 artérias cutâneas simples e 23 artérias cutâneas mistas (AL-BAGDADI, 2013) que correm entre ou através dos músculos, respectivamente, para ramificar em três plexos (HUNT, 2012). Os três níveis interligados para formar o sistema vascular cutâneo são: (1) o plexo profundo subdérmico ou subcutâneo, (2) plexo intermediário ou cutâneo, e (3) plexo superficial ou subpapilar. Essa disposição vascular geralmente está presente na pele provida de pelos, mas pode apresentar variações neste arranjo vascular no ouvido externo, coxins plantares, mamilos, e junções mucocutâneas da narina, dos lábios, da pálpebra, do prepúcio, da vulva e do ânus (PAVLETIC, 2010).



O plexo subdérmico é a rede vascular primária, os vasos deste plexo geralmente estendem-se no tecido adiposo e subcutâneo na face profunda das partes média e distal dos membros, onde inexistem o músculo panicular. Em locais onde existe uma camada de músculo cutâneo, o plexo subdérmico permanece superficial e profundo em relação ao músculo cutâneo (PAVLETIC, 2010).

O plexo subcutâneo fornece bulbos e folículos capilares, glândulas tubulares, a porção mais profunda dos ductos de glândulas e músculo eretor dos pelos (PAVLETIC, 2010; MACPHAIL, 2013). O plexo intermediário ou cutâneo fornece as glândulas sebáceas e reforça as redes capilares ao redor dos folículos, ductos de glândulas tubulares e músculos levantadores dos pelos (AL-BAGDADI, 2013; MACPHAIL, 2013). O plexo subpapilar fica na camada externa da derme, e as alças capilares projetam-se a partir deste plexo para a epiderme (PAVLETIC, 2010; MACPHAIL, 2013).

## **2.2 Cicatrização da pele**

Imediatamente após ocorrer uma lesão, várias vias intracelulares e intercelulares são ativadas para restaurar a integridade e homeostase dos tecidos. Componentes celulares do sistema imunitário, a cascata de coagulação sanguínea e vias inflamatórias são ativadas. Vários tipos de células, incluindo células imunes (neutrófilos, monócitos, linfócitos e células dendríticas), células endoteliais, ceratinócitos e fibroblastos, sofrem alterações marcantes na expressão dos genes e fenótipo, que conduzem à proliferação celular, diferenciação e migração (GURTNER et al., 2008).

O processo de cicatrização de uma ferida divide-se em três fases contínuas e sobrepostas: uma reação inflamatória, um processo proliferativo que conduz à restauração do tecido, e uma fase de maturação e remodelamento da ferida cutânea. Estes processos são estritamente regulados por vários fatores de crescimento e citocinas liberadas no local da ferida (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A fase inflamatória, inicia logo após a lesão, subdivide-se em fase inflamatória

precoce e tardia. A primeira é uma resposta imediata, correspondendo à dinâmica do tônus vascular e hemostasia pela formação de tampão composto principalmente por fibrina, que se torna um andaime para as células infiltrantes. Enquanto que a fase tardia é caracterizada por respostas vasculares e recrutamento e ativação de células inflamatórias (AMALSADVALA; SWAIM, 2011).

A vasoconstrição inicial ocorre devido à produção de endotelina e a liberação de epinefrina, norepinefrina, prostaglandinas, serotonina, bradicinina e histamina. No entanto, dentro de 5 a 10 minutos, há aumento da permeabilidade vascular que provoca os sinais clássicos de inflamação. Este aumento da permeabilidade vascular facilita a quimiotaxia de células circulatórias e liberação de citocinas e fatores de crescimento a partir de plaquetas ativadas (HOSGOOD, 2012; BALSÁ; CULP, 2015).

Os neutrófilos são recrutados para a ferida em resposta à ativação do complemento, a degranulação de plaquetas e a degradação de produtos bacterianos. Após dois a três dias, os monócitos aparecem na ferida e diferenciam-se em macrófagos (GURTNER et al., 2008). Os macrófagos são considerados como a célula regulamentar mais importante na reação inflamatória pela capacidade de produzir muitas citocinas incluindo o fator do crescimento do endotélio vascular, fator de crescimento de fibroblastos. Estas citocinas são importantes para indução de migração celular, assim como proliferação e produção de matriz extracelular. Os macrófagos, desempenham um papel essencial na transição entre a inflamação e reparação (PAVLETIC 2010; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A fase proliferativa, é a segunda fase de reparação de feridas, ocorre 2-10 dias após a lesão e caracteriza-se pela migração e proliferação celular de diferentes tipos de células (GURTNER et al., 2008). Segundo Pavletic (2010) a fase proliferativa ocorre cinco a 20 dias após a lesão, e envolve quatro processos fundamentais: neovascularização/angiogênese; fibroplasia e deposição de colágeno; epitelização; e contração da ferida (HOSGOOD, 2012; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; AMALSADVALA; SWAIM, 2011; BALSÁ; CULP, 2015).

A angiogênese corresponde ao crescimento de novos vasos sanguíneos

capilares a partir dos vasos pré-existentes nas áreas que antes não eram ocupadas por tecido vascular. Este processo depende da interação da matriz extracelular com citocinas que estimulam a migração e proliferação de células endoteliais. (HOSGOOD, 2007; MACPHAIL, 2013). Os novos capilares, fibroblastos, tecido fibroso, e uma matriz extracelular ativa formam o tecido de granulação que está normalmente presente quatro a cinco dias após ocorrência da lesão. A formação de tecido de granulação desempenha um papel na contração da ferida e fornece condição para epitelização (PAVLETIC, 2010; BALSAS; CULP, 2015).

A fibroplasia é componente de tecido de granulação, incluem fibroblastos e matriz extracelular associada (PAVLETIC, 2010) e produção de novo colágeno e outras proteínas da matriz (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). Os fibroblastos originam-se a partir de células mesenquimais indiferenciadas presentes no tecido conjuntivo circunjacente à ferida, e migram para os ferimentos ao longo de filamentos de fibrina no coágulo de fibrina que invadem os ferimentos para sintetizar e depositar colágeno, elastina e proteoglicanos que amadurecem o tecido fibroso (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; MACPHAIL, 2013). A proliferação de fibroblastos é estimulada por macrófagos, moléculas da matriz extracelular e citocinas como o fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de transformação de crescimento -  $\beta$  e fator de crescimento endotelial (BALSAS; CULP, 2015).

À medida que o ferimento amadurece, existe aumento notável na proporção entre o colágeno do tipo I (maduro) e tipo III (imaturo). A quantidade de colágeno atinge o máximo de deposição dentro de duas ou três semanas após a lesão. À medida que o conteúdo de colágeno do ferimento aumenta, o número de fibroblastos e o ritmo da síntese de colágeno diminuem, marcando o final da fase de proliferação (PAVLETIC, 2010; MACPHAIL, 2013).

A epitelização ocorre independentemente da contração e, em feridas abertas, acontece depois do tecido de granulação; já em feridas fechadas, no entanto, começa quase imediatamente e é completada em dois dias. As células epiteliais começam a proliferar na zona basal e sobre a camada de células espinhosas ao longo da borda viável do defeito cutâneo, a migração epitelial é guiada por fibras colágenas. A epitelização ocorre mais rapidamente em ambiente úmido do que em

ambiente seco e não ocorre sobre tecido inviável. A epitelização protege os tecidos subjacentes da infecção externa e perda de fluidos (PAVLETIC, 2010; AMALSADVALA; SWAIM, 2011).

A contração refere-se à diminuição do tamanho da ferida, acontece de forma centrípeta e começa logo após os fibroblastos presentes, na matriz extracelular assumirem o fenótipo de miofibroblastos, em resposta a  $\text{FTC-}\beta 1$ . A medida que o reparo progride, o número de miofibroblastos na ferida diminui, correspondendo à diminuição na velocidade de contração da ferida (HOSGOOD, 2007; PAVLETIC, 2010; CORNELL, 2012).

Experimentalmente, a contração da ferida decorre a uma taxa de 0,6-0,75 mm por dia, após 42 dias, a contração da ferida parece diminuir em coelhos. Portanto, seis semanas é uma diretriz geral sobre o que esperar para feridas no qual contração da ferida é considerada a melhor opção para fechar uma ferida problemática (PAVLETIC, 2010).

A terceira fase da reparação de feridas, começa duas a três semanas após a lesão, e dura mais de um ano. Esta fase caracteriza-se pela mudança da composição da matriz extracelular em presença de metaloproteinases da matriz que são secretadas pelos fibroblastos, pelos macrófagos, pelas células epiteliais e endoteliais. Ao longo do tempo, as fibras de colágeno, principalmente do tipo III diminuem de forma gradual à medida que aumenta o colágeno tipo I, mais espessas e progressivamente mais reticuladas e assumem orientação específica ao longo das linhas de tensão do corpo. A deposição de colágeno está diretamente relacionada com a resistência à tração de uma ferida. A fase de maturação pode continuar durante meses, eventualmente, deixando cicatriz que é 80% da força do tecido original antes do ferimento (LI; CHEN; KIRSNER, 2007; HOSGOOD, 2007; GURTNER et al., 2008; PAVLETIC, 2010; CORNELL, 2012).

### **2.3 Enxertos cutâneos**

O enxerto cutâneo é um segmento de pele separado por completo a partir de

uma área do corpo e utilizado novamente para cobrir outra área desprovida de superfície epitelial (PAVLETIC, 2010; YOU; HAN, 2014). A sobrevivência nesse local depende da absorção de líquidos teciduais e do desenvolvimento de nova irrigação sanguínea (SWAIM, 2007).

Os enxertos podem ser de espessura total ou de espessura parcial. Enxertos cutâneos de espessura total ou dermo-epidérmico, estão indicados para cobrir grandes defeitos em superfícies flexoras e defeitos em extremidades distais. As técnicas de enxerto de espessura total incluem malhas, tampões, faixas e camadas de pele. Os enxertos cutâneos de espessura parcial ou laminares são compostos de epiderme e por espessuras variáveis da derme, podem ser delgados, de espessura intermediária ou espessos, dependendo da quantidade de derme incluída (SWAIM, 2007; BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013).

Enxertos em malha, podem ser de espessura total ou parcial, são enxertos nos quais são realizadas incisões em fileiras paralelas de fendas alternadas (MACPHAIL, 2013). Este tipo de enxertos é recomendado para revestir feridas com sangue ou soro; para revestimento de amplo defeito cutâneo, como em pacientes com extensas queimaduras; e para reconstrução de superfícies irregulares (côncavas ou convexas) de difícil imobilização (SWAIM, 2007). Quando os enxertos em malhas são aplicados sobre leitos de granulação saudáveis e adequadamente tratados, a sobrevivência é de 90% a 100% (SWAIM, 2007; BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013). A possível desvantagem é a possibilidade de crescimento excessivo do tecido de granulação através das fendas e sobre o ápice do enxerto (SWAIM, 2007; BOHLING; SWAIM, 2012).

Geralmente, os enxertos cutâneos são recomendados em áreas onde a ferida é ampla e não é possível aproximar as bordas da pele circundante ou realizar retalhos, e nas áreas em que a cicatrização por segunda intenção resultaria em contrações que alterariam a funcionalidade ou o retorno venoso (OROZCO; SANCHEZ DE LA MUELA, 2009; PAVLETIC, 2010; YOU; HAN, 2014). Além disso, o enxerto cutâneo é uma excelente alternativa para cobrir feridas pós-operatórias de tumores nas regiões distais das extremidades (TONG; SIMPSON, 2012).

Os enxertos cutâneos exigem para sobreviver um leito receptor vascularizado afim de estabelecer conexões arteriais e adequada drenagem para garantir a sobrevida e cicatrização bem sucedida (PAVLETIC, 2010). Poucos são os relatos de casos utilizando enxertos para cobrir feridas cirúrgicas recém feitas especialmente em áreas tais como tendões e retináculo na região distal das extremidades (TONG; SIMPSON, 2012).

A sobrevida do enxerto e cicatrização bem sucedida requerem o estabelecimento de conexões arteriais e drenagem adequada (BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013). Este processo depende da aderência, da embebição plasmática e da inosculação ou revascularização (OROZCO; SANCHEZ DE LA MUELA, 2009; BOHLING; SWAIM, 2012; LIPTAK, 2012, MACPHAIL, 2013).

A aderência é o processo pelo qual o enxerto cutâneo adere-se ao leito receptor através do desenvolvimento de uma rede de fibrina, esta primeira fase ocorre durante as primeiras oito horas subsequentes à aplicação do enxerto. Posteriormente, a fibrina é invadida por leucócitos, fagócitos e fibroblastos, eles começam produzir colágeno, criando aderência fibrosa, esta segunda fase começa 72 horas após a aplicação do enxerto. A aderência de fibrina não serve só para ancorar o enxerto, mas também para facilitar o crescimento de novos vasos capilares a partir do tecido do leito receptor (OROZCO; SANCHEZ DE LA MUELA, 2009; BOHLING; SWAIM, 2012).

Até a vascularização ser estabelecida, a nutrição do enxerto cutâneo depende da difusão de líquidos a partir do leito da ferida. Após aplicar o enxerto os vasos dilatam-se e um líquido semelhante ao soro, isento de fibrinogênio, bem como as células são absorvidos pelo enxerto. A ação capilar traciona as células e o soro para os vasos dilatados do enxerto, mantendo esses vasos dilatados até a revascularização do enxerto e proporcionando a nutrição para os tecidos do enxerto. Esse fenômeno tem sido denominado de embebição plasmática e ocorre durante os primeiros dois a três dias após a enxertia. A absorção de produtos da hemoglobina confere ao enxerto uma coloração enegrecido azulada. (OROZCO; SANCHEZ DE LA MUELA, 2009; BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013).

Inosculação, refere-se à anastomose dos vasos seccionados preexistentes no enxerto com os vasos do leito receptor de, aproximadamente, o mesmo diâmetro. Este processo pode ter início até 22 horas após a colocação do enxerto, mas isso acontece com mais frequência entre 48 e 72 horas após da aplicação do enxerto. Inicialmente, o fluxo de sangue é lento e desorganizado, mas melhora e aproxima-se do normal no quinto ou sexto dia (BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013).

Os enxertos também apresentam revascularização que ocorre pelo crescimento interno de novos vasos do leito para o interior do enxerto (LIPTAK, 2012, MACPHAIL, 2013). O novo crescimento interno capilar ocorre em aproximadamente 0,5 mm/dia. Os vasos que recebem a maior parte do suprimento de sangue passam por aumento no diâmetro e perdem sua tortuosidade, formando arteríolas. O processo de maturação (dentro de 48 horas) e diferenciação continuam até o desenvolvimento de novo sistema de arteríolas, vênulas e capilares (SWAIM, 2007; BOHLING; SWAIM, 2012). Além dos vasos sanguíneos, também formam-se novos vasos linfáticos por volta do quarto ou quinto dia. A vascularização do enxerto está sob controle de algumas citocinas, particularmente do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que apresenta maior atividade de crescimento vascular nos dias cinco a sete após aplicação do enxerto cutâneo (BOHLING; SWAIM, 2012).

Pela avaliação macroscópica, no início, os enxertos são pálidos, durante as 48 horas seguintes parecem enegrecidos e azuis. As cores escuras esmaecem e em 72 – 96 horas surge tonalidade avermelhada-clara. No sétimo ou oitavo dia de pós-operatório, o enxerto deverá estar totalmente vermelho, e a coloração normal retorna, gradualmente, no dia 14. As áreas persistentemente pálidas são avasculares e sofrerão necrose. Coloração preta indica necrose isquêmica seca (MACPHAIL, 2013).

O fracasso da cicatrização e epitelização de enxertos cutâneos surgem pela separação do enxerto do leito, infecção e movimentação, além disso, a formação concomitante de hematoma ou seroma embaixo do enxerto prejudicam a nutrição e revascularização do enxerto (BOHLING; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013). A técnica do enxerto também pode ter influência sobre a sobrevivência do enxerto cutâneo (LIPTAK, 2012).

A aplicação de bandagens e talas imobilizam a área enxertada e facilitam a absorção de líquido facilitando a adesão do enxerto. A frequência de trocas variam para cada tipo de enxerto, mas recomenda-se trocar entre 48 horas ou três a cinco dias após a cirurgia. A aplicação da bandagem habitualmente é feita por duas a três semanas. No entanto, a imobilização inadequada pode provocar necrose do enxerto (BOHLING, M.; SWAIM, 2012; MACPHAIL, 2013).

## 2.4 Células tronco

As células tronco são definidas como células indiferenciadas com capacidade de dividir-se na cultura por períodos indefinidos ou prolongados e podem resultar em células altamente especializadas com características de cada camada germinativa, embrionária: mesoderma, ectoderma, endoderma (ZUK et al., 2002; FORTIER; TUAN, 2012).

De acordo com a origem, as células tronco são classificadas como células tronco embrionárias (*ESCs*), células tronco germinativa, células tronco fetais ou perinatais, células tronco adultas (*ASCs*) e células tronco pluripotentes induzidas (*iPSCs*) (FORTIER; TUAN, 2012; RANERA, 2012; VOLK; THEORET, 2013; NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2009).

As células tronco adultas (*ASCs*) são células indiferenciadas encontradas entre células diferenciadas em um tecido ou órgão. Elas permanecem em repouso por longos períodos de tempo numa área específica de cada tecido chamado "nicho de células tronco. Estes nichos foram identificados em muitos órgãos e tecidos, incluindo o cérebro, medula óssea, sangue periférico, vasos sanguíneos, músculo esquelético, pele, dentes, coração, intestino, fígado e órgãos reprodutivos. As células tronco servem como uma espécie de sistema de reparação interno para a reconstituição de outras células (FORTIER; TUAN, 2012; RANERA, 2012; HARMAM, 2013; NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2009).

As células tronco mesenquimais (*MSCs*) são células tronco adultas (*ASCs*) ou somáticas provenientes da camada embrionária do mesoderme, capazes de



diferenciarem em osso, cartilagem, músculo, estroma da medula, tendão, ligamento, gordura e outros tecidos conjuntivos. Elas também tem capacidade de diferenciar-se em células de outras camadas, tais como tecidos neurogênico, células pancreáticas ou células hepáticas (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007; RANERA, 2012; TAKEMITSU et al., 2012; HARMAM, 2013; VOLK; THEORET, 2013).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as células tronco mesenquimais (MSCs) isoladas de humanos devem cumprir com três diretrizes: 1) ter a propriedade de aderir-se ao plástico quando mantidas em frascos de cultura; 2) expressar marcadores de superfície celular em mais de 90% das células (CD105, CD73 e CD90) e expressão menos que 2% ou ausência de CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, HLA-DR e CD19 e demonstrar capacidade de diferenciação *in vitro*, em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007; RANERA, 2012; TAKEMITSU et al., 2012; BOURIN et al., 2013; HARMAM, 2013; KIM et al. 2013).

As células tronco mesenquimais (MSCs) podem ser autógenas (do próprio paciente), alógenas (de um doador da mesma espécie) ou xenógenas (de outra espécie) (FOSSUM; SCHULZ, 2013). O uso de MSCs alógenas são, amplamente testadas em ensaios clínicos humanos e em animais envolvendo doenças cardiovasculares, neurológicas e imunológicas com resultados promissores (REHMAN et al., 2004; PARK et al., 2009; FOSSUM; SCHULZ, 2013; PARK et al., 2013). Na cirurgia reconstrutiva humana tiveram sucesso modelos pré-clínicos de regeneração de tecidos, incluindo a cicatrização de feridas diabéticas usando células de tecido adiposo autólogo recentemente isolados (CIANFARANI et al., 2013). Experimentalmente, em modelos de cicatrização de feridas *in vitro*, as células tronco cultivadas de tecido adiposo mostrou efeito estimulante sobre a migração de fibroblastos. Em adição, também foi verificada num estudo em animais *in vivo* que ADSCs reduziu significativamente o tamanho da ferida e acelerou a re-epitelização das bordas (KIM et al., 2007; LIM; YOO, 2010).

As MSCs representam um tipo celular vantajoso para transplante alógeno, pesquisas sugerem que MSCs são células privilegiadas imunologicamente com baixa expressão de MHC I e ausência de MHC II, e dessa forma, há menor risco de

rejeição e de complicações secundárias ao transplante (FOSSUM; SCHULZ, 2013; MARX; SILVEIRA; SELBACH, 2014). Estas vantagens permitiram a utilização de células tronco alogênicas crio-preservadas, evitando a necessidade de coleta de tecido adiposo a partir do paciente. Quando as células autólogas cultivadas são utilizados, o tecido adiposo é coletado duas a três semanas antes do tratamento o que é uma desvantagem (MARX; SILVEIRA; SELBACH, 2014). A criopreservação das MSCs não afeta a morfologia original, imunofenotipagem, e o potencial de diferenciação das células tronco, apesar de induzir uma ligeira diminuição na atividade da telomerase e da relação de proliferação (MANSILLA et al., 2005; MARX; SILVEIRA; SELBACH, 2014).

Com respeito ao uso das células tronco mesenquimais xenógenas, Li, Ezzelarab e Cooper (2012) identificaram 94 relatórios de administração de MSCs entre diferentes espécies, a maioria envolvem a utilização de MSCs humanas em várias outras espécies, com estudos ocasionais usando MSCs de porco, rato ou cobaia. As vias de administração variam, embora quase metade dos estudos utilizaram a via intravenosa, mas nenhum estudo incluiu comparação rigorosa entre os resultados da administração da MSCs alogênica e xenogênica (LI; EZZELARAB; COOPER, 2012).

No entanto, MSCs de uma espécie pode diferenciar-se claramente e promover a recuperação de tecidos quando transplantadas em outras espécies. Em hospedeiros não modificados, as CTMs retêm a capacidade multipotencial, e têm características imunológicas única que permite persistência no meio ambiente xenogênico (MANSILLA et al., 2005; STOFF et al., 2008; LI; EZZELARAB; COOPER, 2012; TSAI et al., 2014).

As células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BM-MSCs) foram as mais estudadas em modelos animais (ratos, equino, canino) em busca aplicações clínicas para regenerar a cartilagem, tendões, ossos, músculos do coração, feridas (FORTIER; TUAN, 2012; RANERA, 2012; HARMAM, 2013; KIM et al., 2013). No entanto, atualmente o tecido adiposo é uma fonte alternativa de células tronco mesenquimais (ADSCs) porque os adipócitos também são capazes de diferenciar-se em células de origem ectodérmica e endodérmica (ZUK;ZHU et al.,

2002; SCHÄFFLER; BÜCHLER, 2007; JURGENS et al., 2008; AUXENFANS et al., 2012) apresentando fatores de crescimento que estimulam a angiogênese, remodelação de tecidos, diferenciação e eventos anti-apoptóticos (KIM et al., 2007; TAKEMITSU et al., 2012; HARMAM, 2013; KIM et al., 2013).

A quantidade (número) e a função das células tronco podem-se alterar pelos seguintes fatores: a idade, a condição física do doador, a fonte do tecido (isto é, gordura, medula óssea), o método de colheita, manuseio e armazenamento da amostra (ASTOR et al., 2013; FOSSUM; SCHULZ, 2013). Um estudo realizado em 1265 cães mostrou que a condição corporal e a raça não afetou as células viáveis (SVF) por grama de tecido adiposo, no entanto a idade sim é importante. Com relação à localização anatômica, o tecido adiposo proveniente do ligamento falciforme tem significativamente menos células viáveis por grama de tecido em relação ao tecido adiposo da parede torácica e da região inguinal (ASTOR et al., 2013).

Os mecanismos de ação das células-tronco mesenquimais (MSCs) para reparo tecidual ocorrem através de complexa variedade de funções, incluindo funções de suporte trófico, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, revascularização, atividade anti-apoptótica, capacidade de diferenciação e quimiotaxia (REHMAN et al., 2004; HARMAM, 2013; KIM et al., 2013).

Os efeitos tróficos são caracterizados pela liberação de citocinas e fatores de crescimento que diminuem os danos do tecido, promovem a neovascularização, recruta e induz proliferação de células tronco nos tecidos locais, e inibe a fibrose (FORTIER; TUAN, 2012; KIM et al., 2013). As citocinas associadas com a angiogênese são o VEGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), o fator de estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (HARMAM, 2013; KIM ET AL., 2013).

Com respeito às funções anti-inflamatórias e imunomoduladoras, as células tronco mesenquimais (MSCs) não expressam antígenos MHC de classe II, ou moléculas co-estimuladoras e, suprimem a proliferação de células T induzida por um

terceiro tipo de células ou por fatores mitogénicos (HARMAM, 2013) por estas razões, as células tronco mesenquimais são aplicadas em ensaios clínicos em humanos para tratamento de doenças auto-imunes tais como a doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD) ou doença Crohn (FORTIER; TUAN, 2012; RANERA, 2012; FOSSUM; SCHULZ, 2013).

## REFERÊNCIAS\*

AL-BAGDADI, F. The integument. In: EVAN, H. ; LAHUNTA, A. **Miller's Anatomy of the dog**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. cap. 3, p. 61- 67.

AMALSADVALA, T. ; SWAIM, S. Cicatrización de heridas cutáneas. In: BOJRAB, J.; MONNET, E. **Mecanismos de enfermedad en cirugía de pequeños animales**. 3. ed. Argentina: Inter-médica, 2011. cap. 61, p. 352 – 356.

ASTOR, D. E.; HOELZLER, M. G.; HARMAN, R.; BASTIAN, R. P. Patient factors influencing the concentration of stromal vascular fraction (SVF) for adipose-derived stromal cell (ASC) therapy in dogs. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 3, p.177-182, 2013.

AUXENFANS, C.; LEQUEUX, C.; PERRUSEL, E.; MOJALLAI, A.; KINIKOGLU, B.; DAMOUR, O. Adipose-derived stem cells (ASCs) as a source of endotelial cells in the reconstruction of endothelialized skin equivalents. **Journal of Tissue Engineering Regenerative Medicine**, v. 6, n. 7, p. 512-518, 2012.

BALSA, I. M.; CULP, W. T. Wound care. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 45, n. 5, p. 1049 – 1065, 2015.

BOHLING, M.; SWAIM, S. Skin Grafts. In: TOBIAS, K.; JOHNSTON, S. **Veterinary Suurgery Small Animal**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 78, p. 1270 – 1289.

---

\* Segundo as normas da ABNT- NBR 6023/2002 (ABNT)

BOURIN, P.; BUNNEL, B. A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A. J.; MARCH, K. L.; REDL, H.; RUBIN, J. P. C; YOSHIMURA, K.; GIMBLE, J. M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641-648, 2013.

CIANFARANI, F.; TOIETTA, G.; DI ROCCO, G.; CESAREO, E.; ZAMBRUNO, G.; ODORISIO, T. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. **Wound Repair Regeneration**, v. 21, n. 4, p. 545–553, 2013.

CORNELL, K. Wound Healing. In: TOBIAS, K.; JOHNSTON, S. **Veterinary Surgery Small Animal**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 9, p. 125 – 132.

FORTIER, L. A.; TUAN, R. S. Stem cells and regenerative therapy. In: TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S. **Veterinary Surgery Small Animal**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 4, p. 40 – 42.

FORTIER, L.A.; TRAVIS, A.J. Review Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n.1, p. 1-6, 2011.

FOSSUM, T. W.; SCHULZ, K. S. Regenerative Medicine and Stem Cell Therapy. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Small animal surgery**: St. Louis, Missouri: Mosby, 2013. Cap. 14, p. 167 – 172.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-319. 2008.

HARMAM, R. J. Stem cell therapy in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 90–e24, p. 90-96, 2013.

HOSGOOD, G. Open Wounds. In: TOBIAS, K.; JOHNSTON, S. **Veterinary Surgery Small Animal**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 76, p. 1210 – 1215.

HUNT, G. Local or Subdermal Plexus Flaps. In: TOBIAS, K.; JOHNSTON, S. **Veterinary Suergery Small Animal**. 1. ed. St. Louis: Elsevier, 2012. cap. 78, p. 1243 – 1249.

JURGENS, W. J.; OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J.; HERLDER, M. N.; ZANDIEHDOULABI, B.; SCHOUTEN, T. E.; KUIK, D. J.; RITT, M. J.; VAN MILLIGEN, F. J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell Tissue Research**, v. 332, n. 3, p. 415–426, 2008.

KIM, J. M.; LEE, J. H.; LYOO, Y. S.; JUNG, D. I.; PARK, H. M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 2, p. 242-253, 2013.

KIM, W. S.; PARK, B. S.; SUNG, J. H.; YANG, J. M.; PARK, S. B.; KWAK, S. J.; PARK, J. S. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Jounal Dermatology Science**, v. 48, n. 1, p. 15-24, 2007.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n.1, p. 9 – 19, 2007.

LI, J.; EZZELARAB, M. B.; COOPER, D. K. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. **Xenotransplantation**, v. 19, n. 5, p. 273-285, 2012.

LIM, J. M.; YOO, G. Effects of Adipose-derived stromal cells and of their extraction wound healing in a mouse model. **Journal Korean Medical Science**, v. 25, n.5, p. 746-751, 2010.

LIPTAK J. M. Editorial: Immediate skin grafting following tumour excision. **Journal of Small Animal Practice**, vol. 53, n.9, p. 493-494, 2012.

MACPHAIL, C. Surgery of the tegumentary system. In: FOSSUM, T. W. **Small Animal Surgery**. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. cap. 16, p. 190-191.

MANSILLA, E.; MARIN G. H.; STURLA, F.; DRAGO, H. E.; GIL, M. A.; SALAS, E.; GARDINER, M. C.; PICCINELLI, G.; BOSSI, S.; PETRELLI, L.; IORIO, G.; RAMOS, C. A., SORATTI, C. Human Mesenchymal Stem Cells Are Tolerized by Mice and Improve Skin and Spinal Cord Injuries. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n.1, p. 292–294, 2005.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; SELBACH, I.; DA SILVA, A. S.; BRAGA, L. M.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B. Acupoint Injection of autologous atromal vascular fraction and allogeneic adipose-derived stem cells to treat Hip Dysplasia in Dogs. **StemCells International**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MILLER, W.; GRIFFIN, C.; CAMPBELL, K. Structure and function of the skin. In: MULLER – KIRK´S. **Small Animal Dermatology**. 7. ed. Philadelphia. cap.1, p. 1-15.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Stem Cell Information**. EE.UU. Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/basics/SCprimer2009.pdf>. Acesso em: 04 jun. 2016.

OROZCO, A. W; SANCHEZ DE LA MUELA, M. Injertos cutâneos. En: SOPENA JUNCOSA JOAQUIN. **Manejo de heridas y principios de cirugía plástica en pequeños animales**. 1. ed. Zaragoza: Servet, 2009. Cap. 7, p. 179 – 188.

PARK, H., 2009. A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 285, n. 1-2, p. 67–77, 2009.

PARK, S. A.; REILLY, C. M.; WOOD, J. A.; CHUNG, D. J.; CARRADE, D. D.; DEREMER, S. L.; SERAPHIN, R. L.; CLARK, K. C.; ZWINGENBERGER, A. L.; BORJESSON, G. L.; HAYASHI, K.; RUSSELL, P.; MURPHY, C. J. Safety and immunomodulatory effects of allogeneic canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transplanted into the region of the lacrimal gland, the gland of the third eyelid and the knee joint. **Cytotherapy**, v. 15, n. 12, p. 1498-1510, 2013.

PAVLETIC, M. Tegumento. In: SLATER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Brasil: Barueri, 2007. cap. 20, p. 250 – 258.

PAVLETIC, M. Basic principles of wound healing. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 3. ed. Iowa: Wiley-BlackWell, 2010. cap. 2, p. 17 – 28.

PAVLETIC, M. Free Grafts. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery**. 3. ed. Iowa: Wiley-BlackWell, 2010. cap. 14. p. 404 – 415.

RANERA, B. B. **Células madre mesenquimales equinas: Obtención y análisis de sus propiedades *in vitro***. 2012. Dissertação (Doutorado em Genética) – Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. Zaragoza, 2012.

REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI J.; MERFLED-CLAUSS, S.; TEMM-GROVE, C. J.; BOVENKERK, J. E.; PELL, C. L.; JOHNSTONE, B. H.; CONSIDINE, R. V.; MARCH K. L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292 – 1298, 2004.

SCHÄFFLER, A; BÜCHLER, C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem cells**, v. 25, n. 4, p. 818 – 827, 2007.

STOFF, A.; RIVERA, A. A.; SANJIB BANERJEE, N.; MOORE, S. T.; NUMNUM M. T.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; RICHTER, D. F.; SIEGAL, G. P.; CHOW, L. T.; FELDMAN, D.; VAZCONEZ, L. O.; CURIEL, D. T. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. **Journal compilation**, v. 18, n. 4, p. 362-369, 2008.

SWAIM, S. Enxertos Cutâneos. In: SLATER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3. ed. Brasil: Barueri, 2007. cap. 24, p. 321 – 337.

TAKEMITSU, H; ZHAO, D; YAMAMOT, I.; HARADA, Y; MICHISHITA, M; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v.31, n. 8, p. 1-9, 2012.

TONG, T.; SIMPSON, D. J. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, p. 520-525, 2012.



TSAI, S. Y.; HUANG, Y. C.; CHUEH, L. L.; YEH, L. S.; LIN, C. S., Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. **World Journal Transplant**, v.4, n. 3, p. 196-205, 2014.

VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 382–394, 2013.

YOU, H. J.; HAN, S. K. Cell therapy for wound healing. **Journal Korean Medical Science**, v. 29, n.3, p. 311-319, 2014.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H. ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HENDRICK, M. H. Human Adipose Tissues a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 13, n. 12, p. 4279–4295, 2002.

**CAPÍTULO 2 – Auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não do uso de células tronco mesenquimais xenógenas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)**

Jorge L. Alvarez Gómez<sup>2\*</sup>, Michele Andrade De Barros<sup>3</sup>, Bruna Moraes<sup>3</sup>, Bruna Fernanda Firmo<sup>2</sup>, Ana L.C.R. Pascoli<sup>2</sup>, Paloma Silva<sup>2</sup>, Alfredo Calpa<sup>2</sup>, Eduarda Moutinho<sup>2</sup>, Wilson Manrique<sup>4</sup>, Andriago Barboza De Nardi<sup>2</sup>

**ABSTRACT.**- Alvarez-Gómez J.L., De Barros M.A., Moraes B., Firmo B.F., Pascoli A.L.C.R., Silva P., Calpa A., Moutinho E., Manrique W., De Nardi A.B. 2016. [**Skin autograft in the receptor devoid of granulation tissue associated or not the use of mesenchymal stem cells xenogenous in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)**]. Efeitos das células tronco mesenquimais de tecido adiposo xenógenas na neovascularização e cicatrização em auto-enxertos cutâneos em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 - Jaboticabal, SP, Brazil. E-mail: [jorgeluisalgo@hotmail.com](mailto:jorgeluisalgo@hotmail.com)

Traditionally, a graft is performed in a healthy granulation tissue bed, although nowadays, the mesenchymal stem cells represent an excellent alternative to stimulate wound healing in a recipient bed without a healthy granulation tissue bed. Thus, this study aimed to evaluate the effects of mesenchymal stem cells xenogeneic at healing of skin autografts in a recipient bed without granulation tissue in rabbits. A total of 60 rabbits were divided into three groups of 20 patients. The first (GIL) and the second group (GIV) were treated with  $2 \times 10^6$  intralesional and intravenous stem cells respectively; meanwhile the control group (CG) received only skin autograft. At the macroscopic examination, the grafts GIL and GIV groups showed better color than the control group, however, microscopic evaluation of variables inflammation, re-epithelization, necrosis and angiogenesis showed no significant difference among the three groups ( $p > 0,05$ ). Conclusion: reepithelialization of meshed skin autografts from recipient bed without granulation tissue in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) probably does not need an adjuvant technique to stimulate wound healing. The versatility of the mesh allows a stable adherence to the recipient bed, and through the created slits allows the evacuation of inflammatory secretion, avoiding the presence of seroma and providing nutrition and graft revascularization.

INDEX TERMS – stem cell, reconstructive surgery, skin

**RESUMO.**- Tradicionalmente o enxerto cutâneo é depositado em um leito receptor coberto por tecido de granulação saudável, e na atualidade, as células tronco mesenquimais representam uma excelente alternativa para estimular a cicatrização de feridas agudas e crônicas. Sendo assim, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de células tronco mesenquimais xenógenas na cicatrização de auto-enxertos cutâneos em leito receptor sem tecido de granulação em coelhos. Foram utilizados 60 coelhos, divididos em três grupos de 20 pacientes. O primeiro grupo (GIL) e o segundo (GIV) receberam tratamento de  $2 \times 10^6$  células tronco, por vias intralesional e intravenosa, respectivamente, enquanto o grupo controle (GC) recebeu apenas o auto-enxerto cutâneo. Na avaliação macroscópica, enxertos dos grupos GIL e GIV apresentaram melhor coloração do que o grupo controle, no entanto, na avaliação microscópica as variáveis inflamação, reepitelização, necrose e neovascularização não apresentaram diferença significativa entre os três grupos ( $p > 0,05$ ). Conclusão, a reepitelização dos auto-enxertos cutâneos em malha em leito receptor desprovido de tecido de granulação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) provavelmente não

precisam de técnica adjuvante para estimular a cicatrização. A versatilidade da malha permite uma aderência estável ao leito receptor, e através das fendas criadas permite a eliminação da secreção inflamatória, evitando assim a presença de seroma e garantindo a nutrição e revascularização do enxerto.

1 Recebido em....

Aceito para publicação em.....

2 Departamento de Cirurgia Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n 14884-900 – Jaboticabal, SP, Brasil. Pesquisa de mestrado com apoio CAPES. \*Autor para correspondência: jorgeluisalgo@hotmail.com

3Regenera Stem Cells. Campinas, Rua Bagaçu, 26 – Alphaville Empresarial, Edifício Business Center II, Campinas, SP, Brasil

4Laboratório de Patologia Animal. Universidade Camilo Castelo Branco, câmpus de Descalvado.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: células tronco, cirurgia reconstrutiva, pele

## INTRODUÇÃO

O enxerto cutâneo é um segmento de pele separado por completo a partir de uma área do corpo e utilizado novamente para cobrir outra área desprovida de superfície epitelial (Pavletic 2010, You & Han 2014). Embora seja verdade que os enxertos cutâneos exigem para sobreviver um leito receptor vascularizado para estabelecer conexões arteriais e adequada drenagem garantindo a sobrevida e cicatrização bem sucedida (Shahar et al. 1999, Swaim 2007, Pavletic 2010) eles também podem sobreviver em superfícies anatômicas capazes de produzir tecido de granulação, tais como subcutâneo, músculo, perióstio e pericôndrio (Andreassi et al. 2005, Miraliakbari & Mackay 2006). Além disso, os enxertos em malha são excelente alternativa para cobrir feridas resultantes de remoções de tumores (Tong & Simpson 2012, You & Han 2014) em superfícies flexoras e em superfícies irregulares de difícil imobilização (Bohling & Swaim 2012, Macphail 2013), além de também puderem ser aplicados em feridas causadas por abrasão ou avulsão (Swaim, 2007).

Na atualidade, as células tronco mesenquimais (MSCs) são excelente alternativa para estimular a cicatrização de feridas agudas e crônicas mediante uma complexa variedade de funções de suporte trófico, anti-inflamatória e imunomoduladora, revascularização, atividade anti-apoptótica, capacidade de diferenciação e quimiotaxia (Rehman et al. 2007, Harmam 2013, Kim et al. 2013). A eficiência das células tronco na cicatrização de feridas é amplamente reportada, estimulando a sínteses de colágeno; ativação, proliferação e migração de fibroblastos (Kim et al. 2007, Lim & Yoo 2010). MSCs podem ser autógenas, alógenas ou xenógenas (Fossum & Schulz, 2013). As MSCs de uma espécie podem diferenciar-se e promover a recuperação de tecidos quando transplantadas em outras espécies. As MSCs retêm a capacidade multipotencial e têm características imunológicas únicas que permite sua persistência no meio ambiente xenogênico (Li et al. 2012).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a epitelização e cicatrização de auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação associado ou não ao uso de células tronco mesenquimais xenógenas em coelhos *Oryctolagus cuniculus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados neste experimento seguem segundo os Princípios Éticos de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCAV) protocolo número 173466/15, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

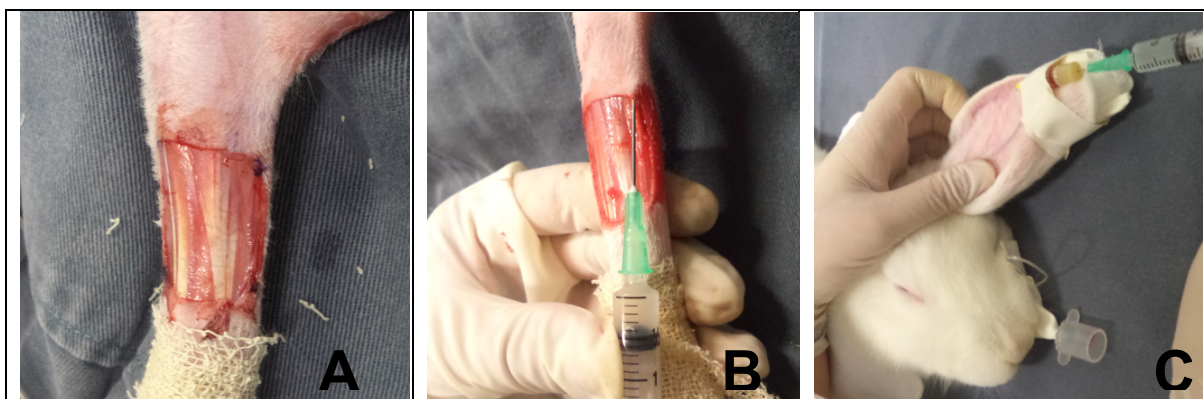
**Origem das células tronco mesenquimais (MSCs).** As células tronco mesenquimais foram obtidas a partir do banco Regenera células-tronco. Resumidamente, o tecido adiposo de cães colhido a partir de doadores saudáveis e jovens foi triturado, lavado e incubado durante 1 h em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) com 0,1% de colagenase de tipo I e centrifugado. Os grupos de células foram ressuspensos com meio de cultura (meio de alta concentração de glicose de Eagle modificado [LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil], soro bovino fetal a 15% (Hyclone Inc., Logan, UT, EUA) e 1% de penicilina / estreptomicina [LGC Biotecnologia]) e incubou-se a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando chegou a aproximadamente 70% de confluência as células, estas foram totalmente caracterizadas e criopreservadas para utilização posterior.

**Modelo animal experimental.** 60 coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, raça Nova Zelândia Branco, fêmeas, com peso médio 2,8 kg, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Botucatu, foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de 20 coelhos (Tabela 1) e mantidos durante todo o experimento em gaiolas individuais nas instalações do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”.

**Procedimento anestésico.** Os animais foram pré-medicados com 0,07 mg/kg de acepromazina (Acepran® Vetnil, São Paulo, Brasil) e 0,5 mg/kg de morfina (Dimorf®, Cristália, São Paulo, Brasil) por via intramuscular. Após 15 minutos os animais foram pré oxigenados durante um minuto por meio de máscara facial acoplada a um sistema semi aberto (“Baraka”) ligado ao aparelho de anestesia. Então foi fornecido isoflurano (Isoforine®, Cristália, São Paulo, Brasil) 5V% até que o animal apresentasse tônus muscular e reflexos protetores reduzidos e permitisse instilar, por via oral, Lidocaína Spray (Xylestesin®, Cristália, São Paulo, Brasil). Em seguida, os coelhos foram colocados em decúbito lateral com a cabeça estendida e procedeu-se a intubação orotraqueal com sonda de Magil número 3,0. A concentração de isoflurano era então ajustada a fim de manter plano anestésico adequado para o procedimento. A veia auricular foi cateterizada (Cateter 22G BD Insyte, Minas Gerais, Brasil) para fornecimento de NaCl 0,9%, 5mL/kg/h, e a artéria do pavilhão auricular contralateral também foi cateterizada (Cateter 22G BD Insyte, Minas Gerais, Brasil) para monitoração da pressão arterial invasiva durante todo o procedimento. Todos os animais receberam uma única dose profilática de 5 mg/kg de enrofloxacin (Chemitril injetável 2.5%, Chemitec, Brasil) por via subcutânea. Não foi administrado nenhum tipo de anti-inflamatório.

**Procedimento cirúrgico.** Imediatamente após os pacientes serem anestesiados, foi realizado tricotomia e antissepsia prévia e definitiva com clorexidine (degermante 2%) tanto da parede lateral direita do tórax (local doador) e do membro torácico direito (local receptor). Em cada coelho dos três grupos, com o auxílio de uma régua e caneta dermatográfica foi demarcado na pele a área que foi excisada, em formato quadrado 2 cm x 2 cm. A primeira ferida cutânea foi realizada no local receptor, na região crânio lateral, no terço médio e distal

de rádio e ulna direita (Figura. 1A). A segunda ferida foi realizada na pele da região dorso ventral, entre o quarto e quinto espaço intercostal direito (local doador) para coletar o fragmento de pele e confeccionar o auto enxerto. A ferida da região torácica foi fechada por primeira intenção, com fio de náilon 3-0, em padrão simples interrompido, de forma centrípeta.



**Figura 1.** Fotografias representando (A) leito receptor, na região crânio lateral com exposição de tendões do músculo extensor carpo radial, extensor digital comum e extensor digital lateral. (B) Administração marginal subcutânea de  $2 \times 10^6$  células MSCs, ressuspensas em 0,5 mL de solução ringer com lactato. (C) Infusão intravenosa lenta pela veia auricular marginal de  $2 \times 10^6$  células MSCs ressuspensas em 2,0 mL de solução ringer com lactato.

Após a colheita do enxerto (local doador), o tecido subcutâneo foi removido com tesouras de Metzenbaum, sendo na sequência preparado a malha dermo-epidérmica, com auxílio de bisturi de lâmina 11. Foram realizadas nove incisões de espessura total e distribuídas por todo o enxerto, seguindo o sentido do crescimento do pelo do enxerto. O enxerto dermo-epidérmico em malha foi posicionado na ferida do leito receptor e fixado na pele adjacente através das bordas com fio de náilon 4-0, com ponto simples separado.

Em cada paciente do grupo GIL, antes do posicionamento do enxerto na ferida do leito receptor e imediatamente após descongelar as células tronco e ressuspender as MSCs em um volume de 0,5 mL de solução ringer com lactato, foi injetado pela via subcutânea 0,1 mL da solução em cada canto da ferida (Figura 1. B) e 0,1 mL no meio da ferida, na fascia antebraquial, usando seringa de 3ml e agulha 21 G (25 x 0,8 mm). A eleição da espessura da agulha foi para evitar lise das células tronco. Este procedimento foi repetido do mesmo modo no dia sete e 14 do pós-operatório, mas através das fendas da malha. Nos pacientes do grupo GIV, após ressuspender as células tronco em volume de 1,0 mL de solução ringer com lactato, a administração das células tronco foi lenta (um minuto) pela via intravenosa, através da veia auricular marginal (Figura 1. C), empregando um cateter 22 G. Nos pacientes do grupo GC foram realizado apenas o auto-enxerto cutâneo dermo-epidérmico (Tabela 1).

Ao finalizar cada procedimento cirúrgico, tanto na ferida do local doador como do local receptor foram realizados curativos com bandagem, composto por gaze estéril e atadura de algodão, fixada com esparadrapo.

**Pós-operatório.** Após a recuperação anestésica os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas, receberam analgesia com cloridrato de tramadol (Tramal<sup>®</sup> ampola 50mg/ml) na dose de 3 mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas durante dois dias. Os curativos foram trocados a cada três dias, sem realizar limpeza das crostas.

No dia sete, os pacientes do grupo GIL e do grupo GIV receberam por via intralesional subcutânea e intravenosa, respectivamente, a segunda dose de células tronco, e no dia 14 receberam do mesmo modo, a terceira dose. As avaliações macroscópicas da lesão, foram realizadas por um avaliador único, a cegas, no dia três, sete, 14 e 30 do pós-operatório. As observações sobre a evolução da ferida foram anotadas em uma ficha individual para cada paciente contendo as seguintes parâmetros: edema, rubor, exsudato e coloração do enxerto. Além dos parâmetros citados, o avaliador podia anotar outras observações como presença de tecido desvitalizado, crostas, aspecto da secreção e deiscência de sutura. Todas as observações foram transformadas em dados numéricos: ausência de exsudato 0, discreta 1, moderada 2, intensa 3. Coloração do enxerto: pele de cor normal 0, rósea 1, azulada 2, enegrecida 3, pálida 4. Para avaliação do edema: ausência de edema 0, discreto 1, moderado 2 e intenso 3. O rubor da pele foi graduado em ausente 0 e presente 1.

**Tabela 1.** Distribuição dos três grupos de experimentação. Foram realizadas avaliações macroscópicas e coleta de amostras no terceiro, sétimo, 14 e 30 dias do pós-operatório

<b>Dia avaliação</b>	<b>Grupo controle (GC) (n=20)</b>	<b>Grupo intravenoso (GIV) (n=20)</b>	<b>Grupo intralesional (GIL) (n=20)</b>
<b>Transoperatório</b>	não tratado	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs
<b>DIA 03</b>			
<b>DIA 07</b>	não tratado	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs
<b>DIA 14</b>	não tratado	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs	2 x10 <sup>6</sup> células MSCs
<b>DIA 30</b>			

**Eutanásia e colheita de material.** No terceiro, sétimo, 14 e 30 dias do pós operatório cinco coelhos de cada grupo foram submetidos eutanásia para colheita de material para avaliação microscópica. A eutanásia foi realizada com propofol, dose-efeito, administrado por via intravenosa, a fim de aprofundar o plano anestésico, ato contínuo realizou-se a infusão de cloreto de potássio, obedecendo-se os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA).

Em seguida, os enxertos foram excisados com margem extra de 0,5 cm de pele íntegra em torno da lesão de 2 cm x 2 cm, e em relação à profundidade a fáscia muscular foi o limite. Identificou-se os fragmentos individualmente e imediatamente foram imersos durante 36 horas em formol tamponado 10%. Após este período foram transferidos para solução de álcool 70% (álcool etílico 70%) até o momento do processamento de inclusão em parafina e realizações de cortes transversais de 4µ em micrótomo. Após o preparo das lâminas, estas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

**Avaliação microscópica.** A avaliação microscópica dos enxertos, das lâminas coradas com HE, foi feita em microscópio de luz Olympus BX51, utilizando objetivas de 4x,

10x, 20x, 40x e 100x. Para realizar as fotomicrografias foi utilizado a câmara DP72 e software Olympus cellSens, versão 1.5. Os dados obtidos durante a avaliação microscópica foram classificados de acordo com a intensidade em que eram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico, conforme preconizado por Garros et al. (2006).

A inflamação foi classificada como ausente (0) quando as células inflamatórias, polimorfonucleares e linfócitos não eram visibilizadas no campo óptico; inflamação discreta (1) quando as células inflamatórias eram evidenciadas de forma isolada, possibilitando distinguir áreas livres de infiltrado inflamatório; inflamação moderada (2) quando as células inflamatórias apareciam com maior frequência, constituindo agregados densos, mas possibilitando observar áreas livres de infiltrado; e acentuada (3) quando as células foram evidenciadas com grande frequência, constituindo agregados densos e justapostos, sem áreas livres de infiltrados.

A reepitelização do enxerto foi classificada como ausente (0), quando não havia epitélio no campo óptico; discreta (1) quando a epitelização aparecia de forma incompleta, entretanto a área não reepitelizada era predominante; moderada (2) quando a epitelização aparecia de forma incompleta, entretanto a área reepitelizada era predominante; acentuada (3), quando a re-epitelização era visibilizada de forma completa sobre o tecido conjuntivo. A presença de necrose no tecido enxertado foi classificada como ausente (0) quando as células do enxerto em sua totalidade não apresentavam sinais como picnose nuclear, cariólise e eosinofilia do citoplasma; discreta (1) quando os sinais de necrose das células do enxerto estavam presentes de forma isolada; moderada (2) quando estes sinais ocorriam de forma multifocal; e acentuada quando em toda a extensão do enxerto era possível visibilizar sinais de necrose celular.

A proliferação vascular foi considerada ausente (0), quando não se evidenciou vasos no corte histológico. Discreta (1), quando foram visibilizados poucos vasos esparsamente situados, de forma isolada. Moderada (2), quando os vasos apareceram com maior frequência e dispersos no campo óptico; e acentuada (3) quando foi possível evidenciar com grande frequência a presença de vasos, dispostos em todo o campo óptico.

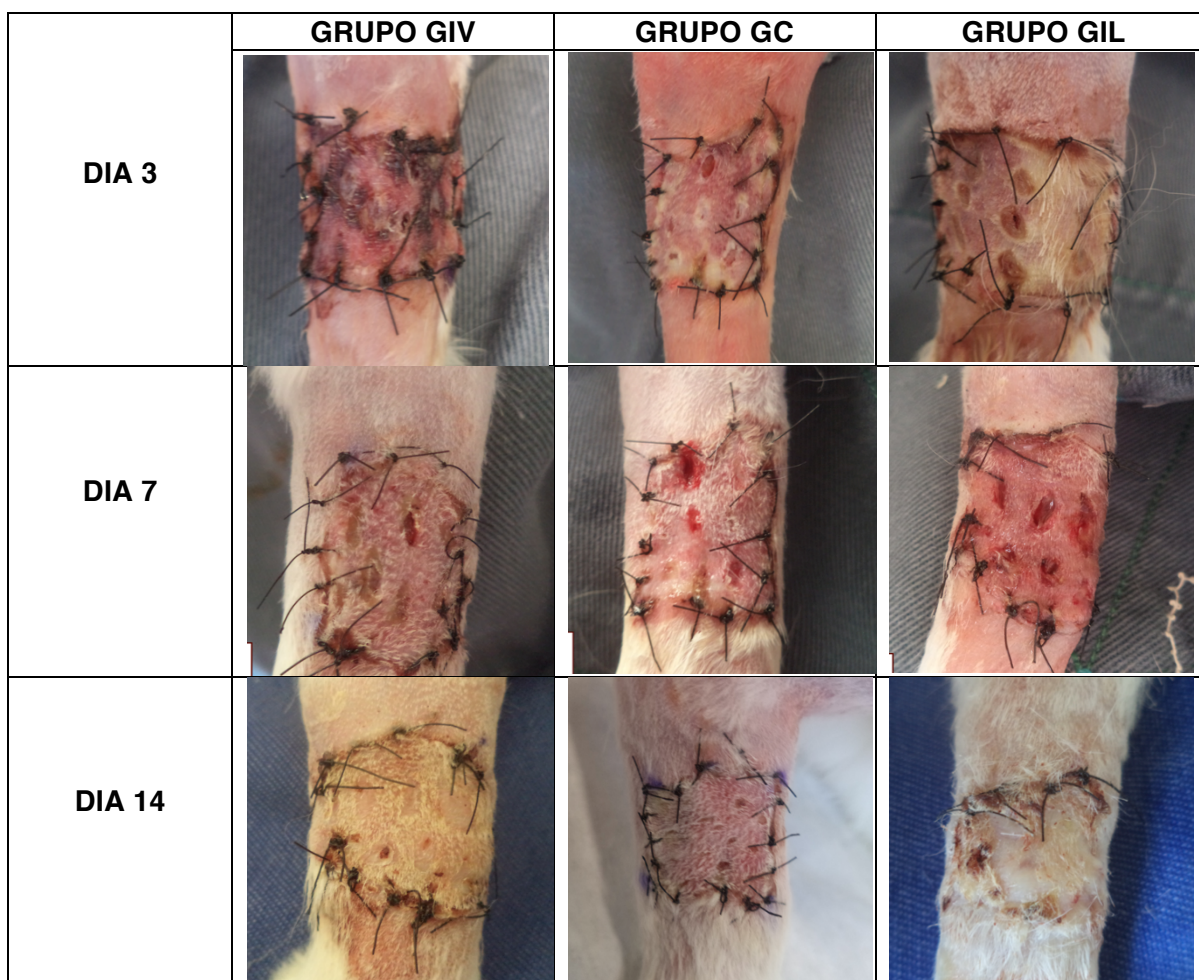
**Análise estatística.** A comparação entre os grupos (GIV, GIL, GC), nos dias 3, 7, 14 e 30, entre os dias dentro do grupo e entre os grupos dentro do dia em relação às variáveis categóricas (edema, rubor, coloração, secreção, inflamação, reepitelização, necrose e neovascularização) foi efetuada pelo teste Friedman, com posterior utilização do teste de comparação múltipla de Dunn, para os casos em que houve diferença significativa entre as medianas. Em todos os testes, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados significativos. Para as análises foi utilizado o Software R Project.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Avaliação macroscópica

O processo de epitelização dos enxertos cutâneos em coelhos foi idêntico nos três grupos avaliados. No dia sete do pós-operatório os enxertos apresentaram discreta presença de crostas, localizadas nas margens com o tecido intato, ou entre as fendas da malha. Na avaliação do dia 14, as fendas da malha no enxerto apresentavam reepitelização, mas o grupo GIL apresentou maior quantidade de crostas e descamação epitelial generalizada na epiderme do enxerto. O crescimento de pelos começou no dia 21, e já no dia 30 foi mais evidente em todos os pacientes dos três grupos.

A secreção (exsudato) não foi estatisticamente significativa entre os grupos GIV, GIL e GC ( $p > 0,05$ ), porém, a secreção foi maior no dia três e sete em relação ao dia 14 enquanto que, no dia 30 não foi observada ( $p=0,0261$ ). Na maioria dos pacientes a secreção foi de aspecto serosa e sanguinolenta, de volume discreto e moderado, mas alguns animais do grupo GIL e GC apresentaram secreção serosa intensa na primeira semana do pós-operatório. Após o dia 14, a secreção foi discreta (Tabela 2). Não houve secreções purulentas em nenhum paciente dos três grupos. Segundo Amalsadvala & Swaim (2011) na fase inflamatória das feridas, o mecanismo para controlar a hemorragia é através da vasoconstrição inicial, seguida imediatamente por vasodilatação reflexa e aumento da permeabilidade vascular, causando exsudação de plasma e fuga de mediadores inflamatórios.



**Figura 2.** Fotografias apresentando a evolução macroscópica da cicatrização de auto-enxertos cutâneos em coelhos. GIV grupo tratamento com células tronco mesenquimais xenógenas pela via intravenosa, GC grupo controle e GIL grupo tratamento com células tronco mesenquimais xenógenas intralesional. Nestas fotos os membros torácicos direitos estão em posição crânio – caudal.

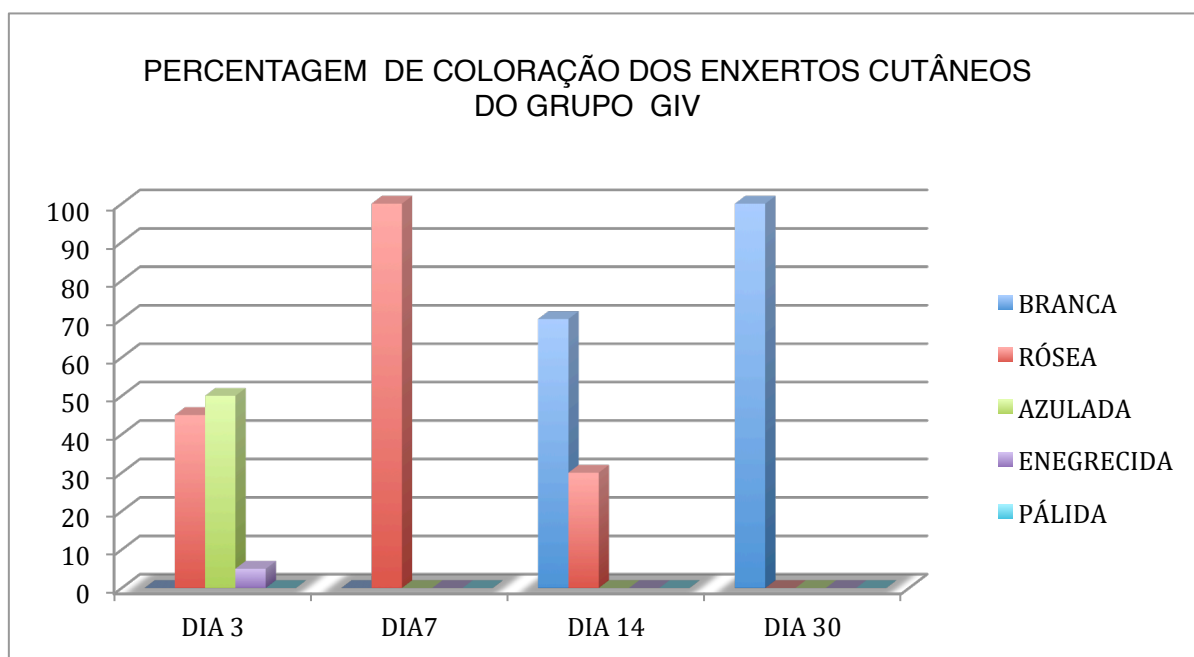
Em relação ao edema, também não houve diferença significativa ( $p= 0,369$ ) entre os três grupos; porém, o edema foi discreto no terceiro dia do pós-operatório ( $p=0,0174$ ) e foi diminuindo com a passagem do tempo (Figura 2). O rubor foi significativo no grupo controle ( $p=0,0324$ ) em relação aos grupos que receberam tratamento por via intravenosa (GIV) e via intralesional (GIL). O rubor foi mais evidente no terceiro dia do pós-operatório e foi



diminuindo gradativamente. O edema e rubor respondem à evolução normal da cicatrização de feridas. O edema e a inflamação localizada são resultado da oclusão dos vasos linfáticos pela presença de coágulos que reduzem a hemorragia, e mais tarde a fibrinólise dissolve os coágulos de fibrina nos vasos linfáticos e retomam a sua função de drenagem (Amalsadvala & Swaim 2011).

**Tabela 2.** Percentagem de secreção em pacientes do grupo controle (GC), grupo com tratamento de células tronco mesenquimais xenógenas pela via intravenosa (GIV) e do grupo tratado com células tronco mesenquimais xenógenas por via intralesional (GIL) na avaliação macroscópica nos dias três, sete, 21 e 30 dias do pós-operatório em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)

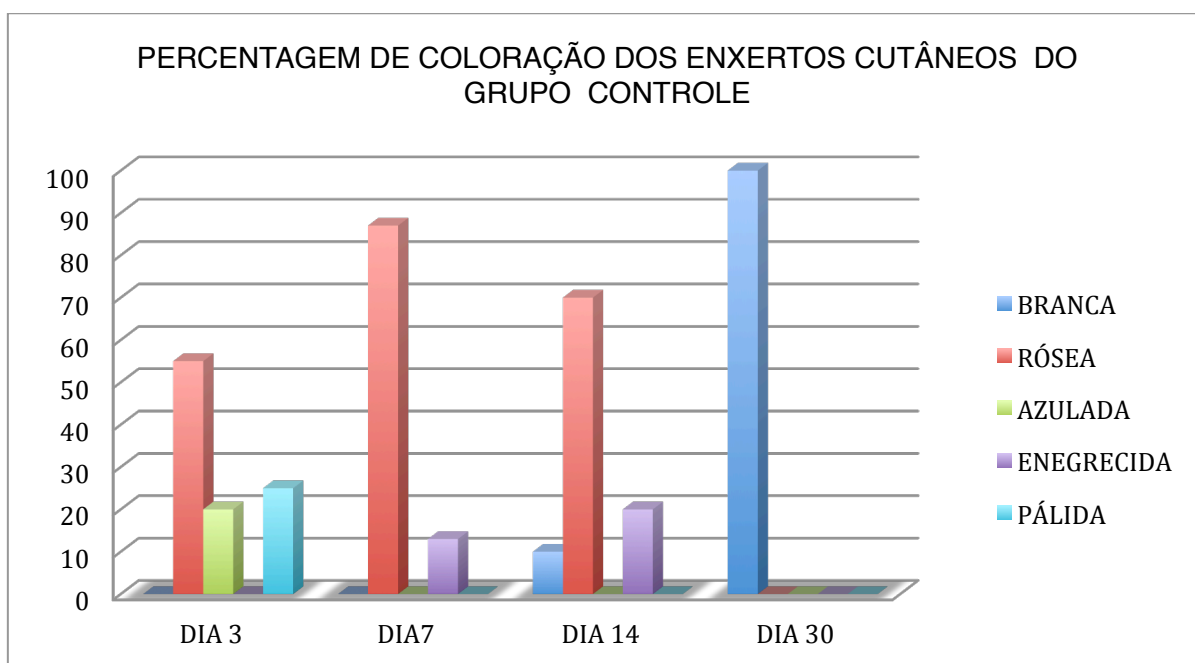
SECREÇÃO	DIA 3			DIA 7			DIA 14			DIA 30		
	GC	GIV	GIL	GC	GIV	GIL	GC	GIV	GIL	GC	GIV	GIL
AUSENTE	--	--	--	40	27	5	90	90	30	100	100	100
DISCRETO	15	35	45	47	53	40	10	10	50	---	---	---
MODERADO	70	55	35	13	20	50	--	--	20	---	---	---
INTENSO	15	10	20	--	--	15	--	--	--	---	---	---



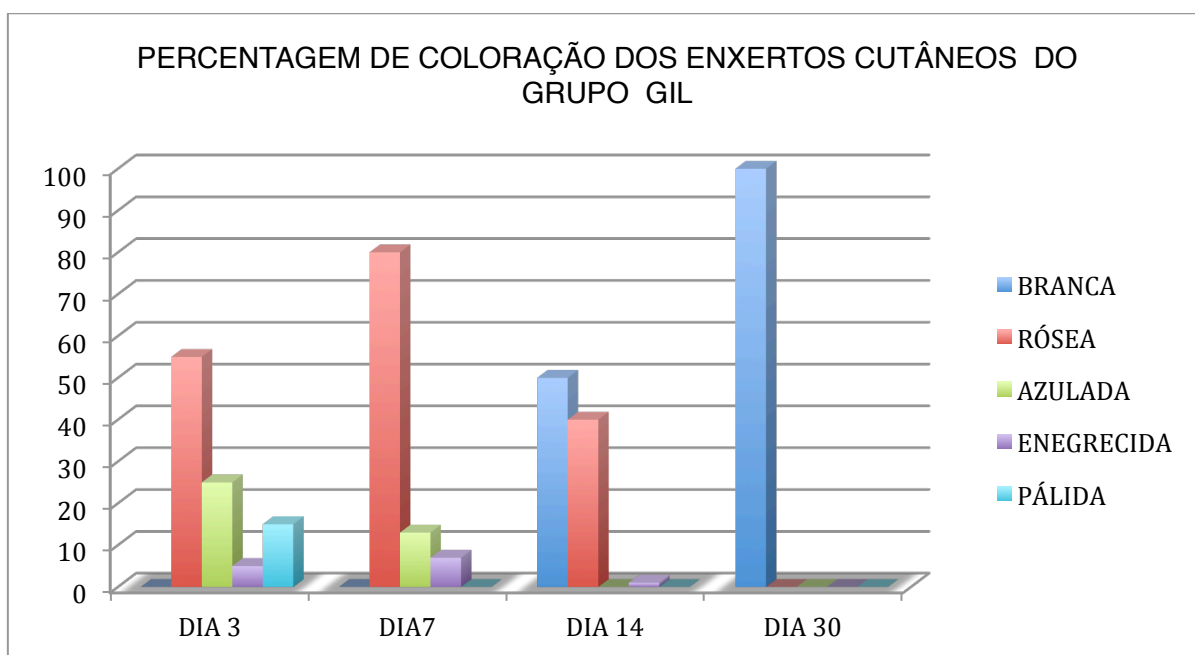
**Figura 3.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo tratado com células tronco pela via intravenosa (GIV). Avaliações macroscópicas nos dias 3, 7, 14 e 30 do pós-operatório.

A evolução da cor dos enxertos apresentou no dia 14 diferença significativa entre os grupos ( $p=0,013$ ), nesse dia, a maioria dos enxertos do grupo GIV tinham cor branca ou normal (Figura 3); enquanto no grupo GC predominou a cor rosa (Figura 4). No terceiro dia do pós-operatório a cor rósea foi maior nos grupo GIL (Figura 5) e GC, mas no grupo GIV foi a cor azulada. Poucos foram os casos que apresentaram cor pálida (isquêmica). Já no sétimo dia do pós-operatório, a cor rosa foi dominante entre os enxertos, e foi

progressivamente mudando até o dia 30, evoluindo para a cor branca, semelhante a pele intata. Segundo Andreassi et al. (2005), do ponto de vista clínico, o enxerto é inicialmente pálido, mas o aparecimento posterior de uma coloração rosa confirma “pega” ao leito receptor. As cores escuras esmaecem e em 72 – 96 horas surge uma tonalidade avermelhada-clara. A coloração normal retorna, gradualmente, no dia 14. As áreas persistentemente pálidas são avasculares e sofrerão necrose (Macphail 2013).



**Figura 4.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo controle (GC), avaliado nos dias 3, 7, 14 e 30 do pós-operatório.



**Figura 5.** Média percentual da cor dos enxertos em coelhos do grupo tratado com células tronco pela via intralesional (GIL). Avaliações macroscópicas nos dias 3, 7, 14 e 30 do pós-operatório.

Nesta pesquisa, a enxertia em malha de espessura dermo-epidérmica tanto no grupo controle, como nos grupos GIV e GIL foi bem sucedida no leito receptor desprovido de tecido de granulação na região crânio lateral do rádio e ulna direita (Figura 1. A). A aplicação de bandagens e talas, e a troca a cada três dias foi fundamental para imobilizar a área enxertada e facilitar a absorção das secreções, evitando assim hematoma ou formação de seroma abaixo do enxerto, os quais, causam prejuízo na nutrição e revascularização, levando à falha da enxertia (Bohling & Swaim 2012, Macphail 2013). No entanto, a imobilização inadequada pode provocar necrose do enxerto (Bohling & Swaim 2012).

Embora seja verdade que o leito receptor coberto de tecido de granulação saudável garante a sobrevivência do enxerto e o sucesso da técnica (Shahar et al. 1999, Swaim 2007, Pavletic 2010), neste trabalho observamos que o tecido de granulação não é necessário antes da aplicação de um enxerto (Pavletic 2010). Os enxertos podem ser aplicados sobre superfície "fresca" isenta de infecção e debris, ou em feridas limpas causadas por abrasão ou avulsão (Swaim 2007). Mas poucos são os relatos clínicos sobre a utilização de auto-enxertos cutâneos em feridas cirúrgicas recém feitas, na região distal dos membros (Tong & Simpson 2012).

### **Avaliação microscópica**

A avaliação microscópica de inflamação, re-epitelização, necrose e formação de novos vasos sanguíneos em amostras de enxertos cutâneos de coelhos pertencentes aos grupos tratados com células tronco mesenquimais xenógenas administradas pela via intravenosa (GIV) e pela via intralesional (GIL) em relação ao grupo controle (GC), não apresentaram diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre os três grupos.

Na avaliação de células inflamatórias em amostras de enxertos no terceiro dia do pós-operatório, no grupo controle as células predominantes foram neutrófilos e raros macrófagos, enquanto que, no grupo GIV e GIL houveram mais macrófagos do que neutrófilos. Em amostras do dia sete, tanto no grupo controle quanto no grupo GIL houve equilíbrio entre neutrófilos e macrófagos, mas no grupo GIV as células predominantes foram macrófagos e poucos linfócitos. No dia 14, as amostras dos três grupos avaliados demonstraram predominância de células mononucleares, a maioria macrófagos e poucos linfócitos. No dia 30, ainda houve presença discreta de macrófagos e neutrófilos nos grupos GC e GIV, mas no grupo GIL houve moderada presença de macrófagos e poucos neutrófilos. Normalmente a presença de células inflamatórias na fase inflamatória da cicatrização de feridas cumpre a função de desbridamento e caracteriza-se pela migração de neutrófilos e monócitos para dentro da ferida (Amalsadvala & Swaim 2011, Balsa & Culp 2015) em aproximadamente seis e 12 horas depois da lesão, respectivamente. O número de neutrófilos aumenta em 2 – 3 dias e os monócitos tornam-se macrófagos em 24 a 48 horas (Macphail 2013). Os macrófagos são numericamente predominantes no quinto dia em feridas não complicadas e reduzem à medida que a fase inflamatória diminui (Pavletic 2010).

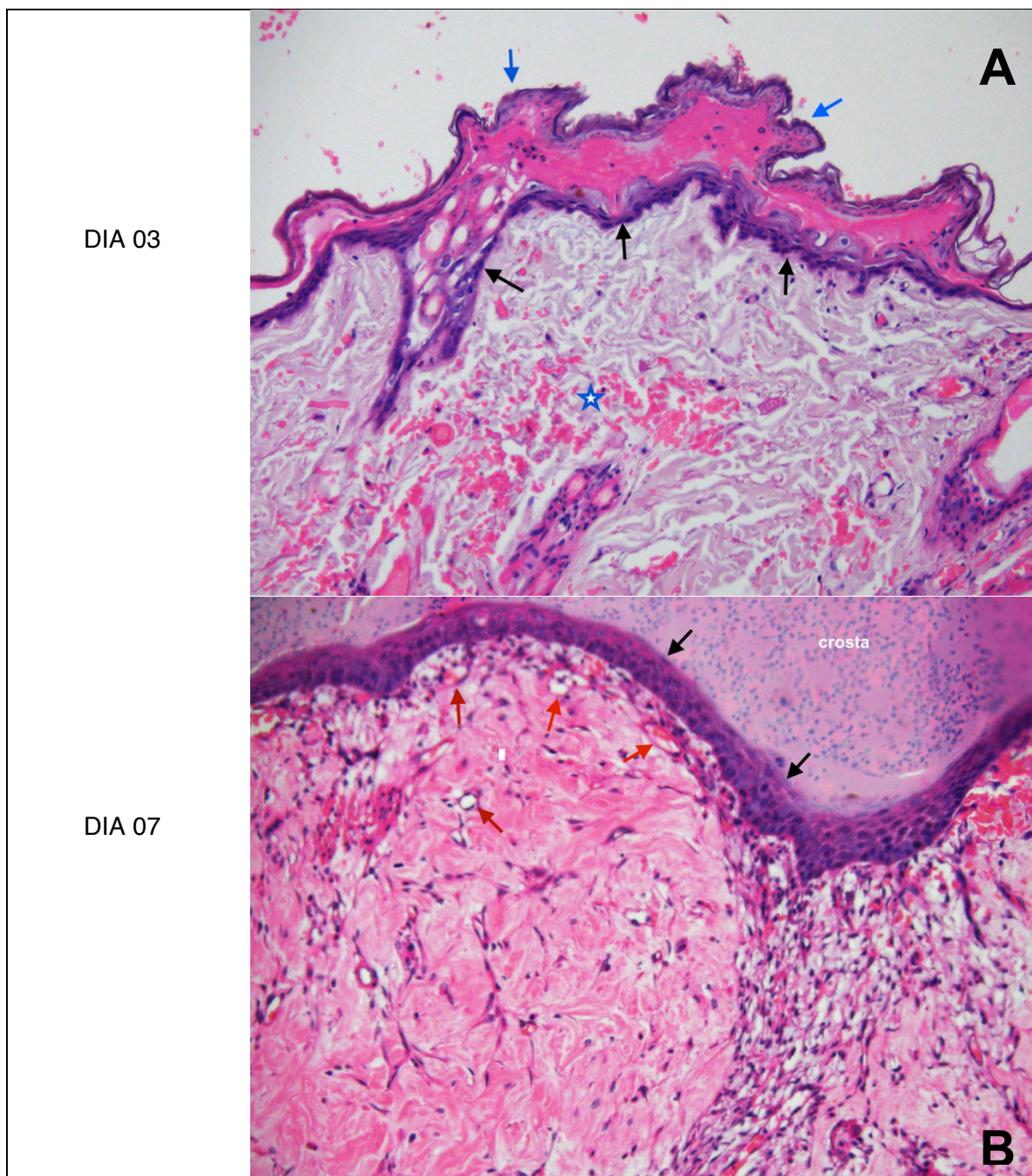
Segundo Gurtner et al. (2008) a importância de neutrófilos e macrófagos na cicatrização de feridas não é inteiramente compreendida, porém, a função principal dos neutrófilos no leito da ferida é destruir bactérias pela liberação de enzimas e radicais livres de oxigênio (Balsa & Culp 2015). Normalmente, os neutrófilos no interior do tecido sofrem apoptose dentro de alguns dias (Pavletic 2010), mas a presença de bactérias, detritos celulares, tecido necrosado e outros organismos contaminantes prolongam sua permanência na ferida (Li et al. 2007, Pavletic 2010). Os macrófagos são células inflamatórias fundamentais na transição entre a fase inflamatória e a fase de reparação das feridas (Pavletic 2010, Amalsadvala & Swaim 2011). Os macrófagos tem capacidade de fagocitar, digerir e matar organismos patogênicos; limpar os restos de tecido e destruir qualquer remanescente de neutrófilos. Além disso, os macrófagos estimulam a angiogênese,

recrutam células mesenquimais e modulam a produção de matriz em feridas (Li et al. 2007).

A re-epitelização dos enxertos tanto no grupo GC, GIV e GIL foi progressiva com o passar dos dias, sendo acentuada no dia 30 ( $p < 0,01$ ) mas poucas amostras apresentaram todas as camadas da epiderme. No terceiro dia, quando presente, o epitélio era descontínuo e fino (Figura 6. A) com presença de crostas infiltradas por células inflamatórias. No sétimo e 14 dias do pós-operatório a re-epitelização foi moderada na maioria das amostras de enxertos cutâneos (Figura 7). Segundo Li et al. 2007, Pavletic 2010, Amalsadvala & Swaim 2011, Macphail 2013, a epitelização é uma barreira importante que protege à ferida das infecções externas e da perda do fluido interno. O processo de re-epitelização começa a partir da migração e proliferação de queratinócitos basais adjacentes à incisão. A mitose das células basais nas bordas da ferida é induzida por fatores de crescimento provenientes de células epidérmicas, de macrófagos e de células do parênquima dérmico. As células epiteliais além de sofrer uma alteração fenotípica, produzem proteases para dissecar o tecido viável do tecido não viável, migram e proliferam para cobrir a ferida e restabelecer a membrana basal. Em feridas fechadas pela primeira intenção, a epitelização começa imediatamente em 24 a 48 horas; no entanto, em feridas abertas ocorre quando um bom leito de granulação foi formado, e acontece normalmente 4 a 5 dias após a lesão (Pavletic 2010, Amalsadvala & Swaim 2011, Macphail 2013).

Nas amostras de enxerto dos três grupos observou-se necrose moderada no terceiro dia do pós-operatório, já no dia sete foi discreta na maioria delas e no dia 14 ainda esteve presente em dois pacientes do grupo controle e do grupo intralesional, ou seja, a necrose diminuiu gradativamente. Além das variáveis inflamação, re-epitelização e necrose, também foi avaliada presença de novos vasos sanguíneos (Figura 6. B) mas não houve diferença entre as amostras dos três grupos ( $p = 0,84$ ). No sétimo dia e no 14 dia ( $p < 0,01$ ) houve crescimento vascular, porém no dia 30 ainda tinha discreta presença de vasos no grupo GIL. Em relação aos fibroblastos, no sétimo dia do pós-operatório o grupo controle apresentou mais fibroblastos em relação aos grupos tratados com células tronco, mas no dia 14 aconteceu o contrário. De modo geral, segundo Pavletic (2010) a angiogênese é um acontecimento chave no processo de cicatrização, porque sem circulação adequada, os fibroblastos não podem sobreviver no ambiente da ferida. Os novos capilares, fibroblastos, tecido fibroso, e uma matriz extracelular ativa vão formar o tecido de granulação que está normalmente presente no quarto ou quinto dia e é um ponto de referência na cicatrização de feridas, porque é resistente à infecção, desempenha um papel na contração da ferida e fornece um andaime para epitelização (Li et al. 2007).

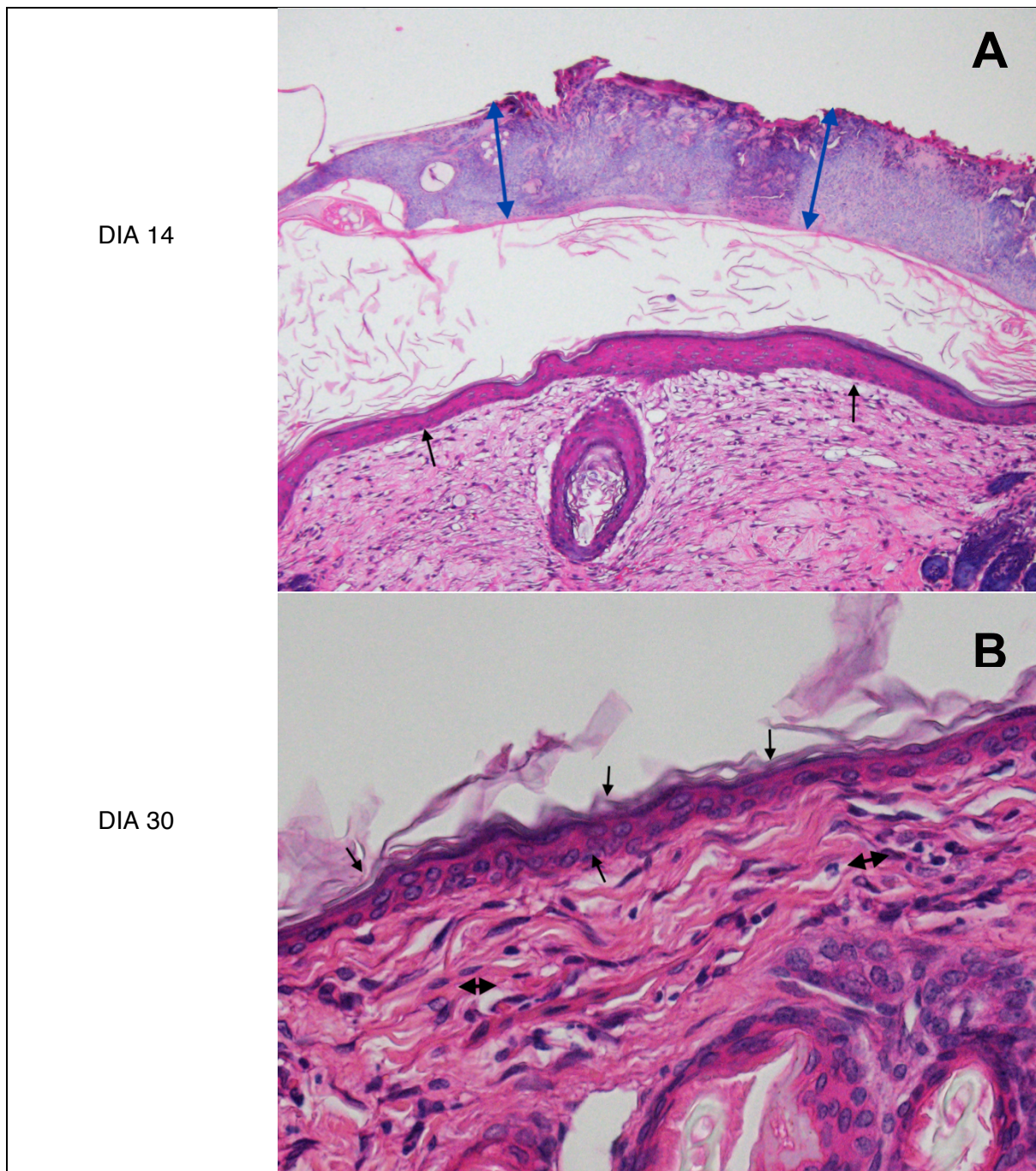
Segundo Andressi et al 2005, o processo de cicatrização do enxerto é idêntica à cicatrização das feridas. Há uma fase de embebição inicial de 24 a 48 horas correspondentes a inflamação, uma fase de revascularização de 5 a 7 dias, semelhante ao da fibroplasia e, finalmente, o ajuste e a retração, seguido pela distensão. A revascularização ocorre pelo crescimento interno de novos vasos do leito para o interior do enxerto (Swaim 2007, Bohling & Swaim 2012, Liptak 2012, Macphail 2013) no entanto, a inosculação acontece com mais frequência entre 48 a 72 horas após a aplicação do enxerto no leito receptor e refere-se a anastomose dos vasos seccionados preexistentes no enxerto com os vasos do leito receptor do mesmo diâmetro aproximadamente (Swaim 2007, Bohling & Swaim 2012, Macphail, 2013). Observou-se também edema discreto na epiderme superficial em três amostras do grupo GIV e edema moderado em três amostras do grupo GIL, no sétimo dia do pós-operatório. No dia 14 o edema foi discreto em três amostras dos grupo GIL e em uma amostra do grupo GIV e GC, respectivamente.



**Figura 6. A)** Fotomicrografia de um auto-enxerto cutâneo de coelho (GIL) no terceiro dia do pós-operatório. Observar a re-epitelização discreta embaixo do enxerto cutâneo (seta preta) íntegro no leito receptor (seta azul) e presença de focos de hemorragia local (estrela). **B)** Fotomicrografia de auto-enxerto de coelho (GIL) no sétimo dia do pós-operatório. Observar neovascularização na derme superficial e moderada proliferação epitelial e presença de crosta acima da linha de reepitelização (seta vermelha). Objetiva de 20x, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2016.

Possivelmente, o edema no grupo GIL pode ter relação com a administração intralésional das células tronco (tamanho da agulha) ou pela presença de bactérias (Hargis & Ginn 2007). Segundo Pope (1990) os enxertos cutâneos de espessura total podem desenvolver infecção superficial, especialmente se houver retardo da revascularização. A

infecção geralmente é o resultado do supercrescimento da microbiota cutânea normal em uma pele anormal e não afeta acentuadamente o sucesso do enxerto, mas em certos casos provavelmente os pacientes precisaram de antibiótico durante vários dias do pós-operatório (Tong & Simpson 2012).



**Figura 7. A)** Fotomicrografia de um auto-enxerto cutâneo de coelho (GIV) no dia 14 do pós-operatório. Observar a reepitelização íntegra do leito receptor (seta preta) e a liberação da crosta pertencente ao enxerto desintegrado (seta azul). **B)** Fotomicrografia de auto-enxerto de coelho (GIV) no dia 30 do pós-operatório. Observar os quatro estratos da epiderme (seta preta), fibroblastos reativos e tecido conjuntivo denso, homogêneo (setas de duas pontas) Objetiva (A) 10x e (B) 40X, coloração hematoxilina e eosina. Jaboticabal, 2016.

No presente estudo, todos os pacientes tiveram as ataduras trocadas cada três dias, mas em relação aos enxertos não foram realizadas limpezas com soluções antissépticas ou com solução fisiológica, além disso, as suturas não foram removidas até o dia 30 do pós-operatório; porém, no pré-operatório, todos os pacientes receberam uma única dose profilática de 5mg/kg de enrofloxacin. Considerando que as células tronco são atraídas por quimiotaxia para o local da lesão nenhum paciente foi administrado anti-inflamatórios. Segundo Bohling & Swaim (2012), a frequência de trocas de bandagens variam para cada tipo de enxerto, mas recomendam trocar entre 48 horas ou três a cinco dias após a cirurgia. Além disso, segundo Shahar (1999) o uso de antibióticos não é necessário no pós-operatório se o leito receptor é constituído por tecido de granulação saudável e quando estrita técnica asséptica é praticada durante todo o procedimento, ou quando após a enxertia é empregada a pressão negativa (Stanley, 2013) na estimulação da cicatrização de enxertos cutâneos.

Nossa hipótese foi que o transplante xenogénico de células tronco mesenquimais de cães tanto pela via intravenosa e via intralesional diminui a inflamação e acelera a epitelização e cicatrização de auto-enxertos cutâneos em malha em coelhos, porém não houveram vantagens no controle da inflamação e necrose, nem na estimulação da reepitelização e na formação de novos vasos. Nesta pesquisa o processo de reepitelização foi equilibrado entre os três grupos e aconteceu gradualmente no transcorrer do tempo (Figuras 6 e 7), demonstrando que neste modelo de transplante de células xenógenas não apresentaram vantagens em relação ao grupo controle, em concordância com Stoff et al. (2008) os quais avaliaram o efeito de células tronco mesenquimais humanas (hMSCs) na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos fechadas por primeira intenção e também não observaram diferenças no processo de epitelização e na presença de tecido de granulação entres os grupos controle e o tratado com hMSCs nos dias três e sete do pós-operatório; mas no dia 14 e no dia 21 após a cirurgia, observaram maior quantidade de tecido de granulação em feridas não tratadas do que feridas tratadas com hMSC; no entanto, em nenhum grupo foi observado sinais de inflamação. A dose administrada pela via subdérmica foi  $1,5 \times 10^6$  hMSCs.

Os mecanismos de ação das células tronco mesenquimais para o reparo tecidual ocorrem através de complexas funções tais como, anti-inflamatória e imunomoduladora, antifibrótica, anti-apoptótica, angiogênica e quimiotaxia (Kim et al. 2007, Lim & Yoo 2010, Harman 2013) mas todas estas ações são demonstradas em modelos autógeno e alogênico, porém são poucas as pesquisas desenvolvidas em modelos xenógeno. Li et al. (2012) identificaram que 88 de 94 pesquisas (93,6%), apresentaram evidências de que o MSC xenógenas funcionou e em apenas seis projetos (6,4%) não houve provas da função ou de um efeito prejudicial de MSCs xenógenas. A maioria das pesquisas envolveram a utilização de MSCs humanas em várias outras espécies e as vias de administração foram variadas; segundo eles, as células tronco mesenquimais de uma espécie podem diferenciar-se claramente e promover a recuperação de tecidos quando transplantadas em outras espécies, porque as células tronco mesenquimais não expressam MHC II, e dessa forma, há menor risco de rejeição e de complicações secundárias ao transplante.

Nesta pesquisa pode surgir a dúvida se as células tronco mesenquimais ficaram no leito receptor após administração pelas vias intravenosa e intralesional, mas existem vários estudos que demonstraram a capacidade das células de migrar para o tecido danificado após a sua administração sistêmica. McFarlin et al. (2006) observaram a presença de células tronco mesenquimais em feridas de pele na região abdominal no sexto dia após a administração intravenosa de  $1 \times 10^6$  células tronco mesenquimais marcadas com ferro Dil e administradas pela veia caudal em ratos. Em relação a administração de células tronco mesenquimais intralesional e seu efeito local, Stoff et al. (2008) demonstraram em amostras

de feridas de coelhos a presença de células tronco mesenquimais humanas no dia três e sete, apresentando um padrão de dispersão difusa na área imediata da ferida, e no dia 14, as células tronco mesenquimais marcadas ficavam concentradas na junção da interface dermo-epidérmica.

Considerando que as células tronco são xenógenas, procedentes do tecido adiposo de cão e foram administradas em coelhos tanto pela via intravenosa e intralesional, não foram observados sinais clínicos de reações de hipersensibilidade, o qual sugere que as células tronco mesenquimais são células privilegiadas imunologicamente com baixa expressão de MHC I e além disso elas não expressam marcadores para as moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II), dessa forma, há menor risco de rejeição e de complicações secundárias ao transplante neste caso xenogênico (Fortier & Tuan, 2012; Harmam, 2013; Kim et al. 2013).

Provavelmente, a administração de células tronco autógenas ou alógenas em relação as células tronco xenógenas apresentam vantagens na cicatrização de auto-enxertos cutâneos, estimulando a re-epitelização, angiogênese e controle da inflamação e estimulando a síntese de colágeno, independentemente da via de administração.

### CONCLUSÃO

A reepitelização dos auto-enxertos cutâneos em leito receptor desprovido de tecido de granulação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) provavelmente não precisam de técnica adjuvante para estimular a cicatrização. A versatilidade da malha permite uma aderência estável ao leito receptor, e através das fendas criadas permite a evacuação da secreção inflamatória, evitando assim a presença de seroma e garantindo a nutrição e revascularização do enxerto.

### REFERÊNCIAS

- Amalsadvala T., Swaim S. 2011. Cicatrización de Heridas cutâneas, p. 352–356. In: Bojrab, J. & Monnet E. (Eds.), Mecanismos de enfermedad en cirugía de pequeños animales. 3ed. Buenos Aires – Argentina.
- Andreassi A., Bilenchi R., Biagioli M. & D'aniello C. 2005. Classification and pathophysiology of skin grafts. Clin. Dermatol, v.23, n. 4, p. 332-337.
- Balsa I.M., Culp W.T. 2015. Wound care. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, v.45, n. 5, p. 1049 –1065.
- Bohling M. & Swaim S. 2012. Skin Grafts, p. 1270–1289. In: Tobias, K.; Johnston, S. (Eds), Veterinary Surgery Small Animal. 1. ed. St. Louis, Missouri.
- Fortier L.A. & Travis A.J. 2011. Review Stem cells in veterinary medicine. Stem Cell Research & Therapy, v.2, n.1, p.1-6.
- Fossum T. & Schulz K.S. 2013. Regenerative Medicine and Stem Cell Therapy, p. 167-172. In: Fossum T.W. (Ed.), Small Animal Surgery. 4th ed. St. Louis, Missouri.
- Garros I.C., Campos A.C.L., Tâmbara E.M., Tenório S.B., Torres O.J.M., Agulham M.A., Araújo A.C.F., Santis-isolan P.M.B., Oliveira R.M., & Arruda E.C.M. 2006. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cirúrgica Brasileira, v.21, n. 3, p.55-65.



- Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., & Longaker M.T. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*, v. 453, n. 7193, p. 314-319.
- Hargis A.M. & Ginn P.E. 2007. The Integument, p. 1130 – 1131. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. St. Louis, Missouri.
- Harmam R.J. 2013. Stem cell therapy in veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*, v.24, n.90–e24, p. 90-96.
- Kim J.M., Lee J.H., Lyoo Y.S., Jung D.I. & Park H.M. 2013. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. *Veterinary Dermatology*, v.24, n.2, p.242-253.
- Kim W.S., Park B.S., Sung J.H., Yang J.M., Park S.B., Kwak S.J. & Park, J.S. 2007. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatology Science*, v.48, n.1, p.15-24.
- Li J., Chen J. & Kirsner R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*, v. 25, n.1, p. 9–19.
- Li J., Ezzelarab M.B., & Cooper D.K. 2012. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 19 (5):273-285.
- Lim, J.S. & Yoo, G. 2013. Effects of Adipose-derived Stromal Cells and of their Extract on Wound Healing in a Mouse Model. *Journal of Korean Medical Science*. 25 (5):746-751.
- Macphail, C. 2013. Surgery of the Tegumentary System, p. 190-191. In: Fossum T.W. (Ed.), *Small Animal Surgery*. 4th ed. St. Louis, Missouri.
- Mc Farlin K., Gao X., Dulchavsky D.S., Kwon D., Arbab A.S., Bansal M., Li Y., Chopp M., Dulchavsky S.A. & Gautam SC. 2006. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regeneration*. 14 (4): 471-478.
- Miraliakbari R. & Mackay D.R. 2006. Skin Grafts. *Operative Techniques in General Surgery*. 8 (4):197-206.
- Leung J. J., Mus H.B. 2009. Skin Grafts. *UTMJ*. 86 (2):61-64.
- Liptak J. 2012. Editorial: Immediate skin grafting following tumour excision. *Journal of Small Animal Practice*. v. 53
- Pavletic, M. Tegumento. In: Slater, D. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3.ed. Brasil, 2007. cap. 20. p. 250 – 258.
- Pavletic, M. Free Grafts. In: Pavletic M. *Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery*. 3. ed. Iowa: Wiley-BlackWell, 2010. cap. 14. p. 404 – 415.
- Pope E.R. 1990. Enxertamento Cutâneo de Malha. In: Bojrab J., Birchard S., Tomlinson J. (Eds.) *Técnicas Atuais em Cirurgia de Pequenos Animais*. 3. Ed. Brasil.

- Rehman J., Traktuev D., Li J., Merfeld-Clauss S., Temm-Grove C.J., Bovenkerk J.E., Pell C.L., Peli, C.L., Johnstone B.H., Considine R.V., March K.L. 2004. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292 – 1298.
- Schäffler, A; Büchler, C. 2007. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem cells**, v. 25, n. 4, p. 818 – 827.
- Shahar R., Shamir M. H., Brehm D.M., & Johnston D.E. 1999. Free skin grafting for treatment of distal limb skin defects in cats. *Journal of Small Animal Practice*, v. 40, p. 378 – 382.
- Stanley B.J., Pitt K.A., Weder C.D., Fritz M.C., Hauptman J.G., & Steficek B.A. 2013. Effects of Negative Pressure Wound Therapy on Healing of Free Full-Thickness Skin Grafts in Dogs. *Veterinary Surgery*. v. 42. p. 511–522.
- Stoff A., Rivera A.A., Sanjib Banerjee N., Moore S.T., Numnum M.T., Espinosa de los Monteros A., Richter D.F., Siegal G.P., Chow I.T., Feldman D., Vazconez I.O., & Curiel D.T. 2008. Promotion of incisional wound repair by human mesenchymal stem cell transplantation. *Journal compilation*. v. 18, n. 4, p. 362-369.
- Swaim S. Enxertos Cutâneos. 2007, p. 321-337. In: SLATER, D. (Ed.) *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3. ed. Brasil.
- Tong T., & Simpson D.J. 2012. Free skin grafts for immediate wound coverage following tumour resection from the canine distal limb. *Journal of Small Animal Practice*. v. 53. p. 520–525.
- You H.J., Han S.K. 2014. Cell therapy for wound healing. *Journal Korean Medical Science*, v. 29, n.3, p. 311- 319.

## APÊNDICE

### NORMAS REVISTA

#### Apêndice A. Instruções para autores Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

##### Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

**Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do sistema de submissão <<http://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>.**

Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

**Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

##### Apresentação de manuscritos

**1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** (ou combinação destes dois últimos), **Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva

S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores; c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)).

## **2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:**

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores"** ([www.pvb.com.br](http://www.pvb.com.br)). A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser no **formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens

copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez.** A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

**3. As Figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. **Nesse caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias

deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

**4. As legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

**5. Os Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com "a" em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.