UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

SOFIA SAGGIORO REZK

BOTUCATU – SP
AGOSTO/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre.

Sofia Saggioro Rezk

Orientadora: Cláudia Valéria Seullner Brandão

BOTUCATU – SP
AGOSTO/2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Rezk, Sofia Saggioro.
Meio condicionado de células-tronco mesenquimais na cicatrização de feridas / Sofia Saggioro Rezk. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Cláudia Valéria Seullner Brandão
Capes: 50501070

1. Cães. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Hidrogéis. 4. Ratos. 5. Secretoma.

Palavras-chave: Cães; Dose; Hidrogel; Rato; Secretoma.

Nome do autor: SOFIA SAGGIORO REZK

TÍTULO: MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Drª. Cláudia Valéria Seullner Brandão

Presidente e Orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal. FMVZ UNESP – Botucatu – SP.

Prof. Dr. Victor José Vieira Rossetto

Membro externo

Departamento de Medicina Veterinária. PUC Minas – Poços de Caldas – MG

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro interno

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal. FMVZ UNESP – Botucatu – SP

Data da defesa: 29 de agosto de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meus pais, Nilton Saggioro e Maria José Saggioro que me permitiram correr atrás do meu sonho de ser veterinária desde o início, e proporcionaram tudo o que eu precisei para estar aqui hoje. À minha irmã Vitória Saggioro Garcia e cunhado João Sormani Garcia; sem este suporte familiar, eu nada teria conquistado.

A todos os amigos que fiz no caminho, que iniciaram como colegas de graduação ou residência; mas que com o tempo se tornaram parceiros de profissão e de vida, tornando a caminhada mais fácil e mais leve.

Agradeço ao meu melhor amigo, que durante a jornada deste projeto se tornou meu marido, Eduardo Rezk, sem o qual eu não seria metade do ser humano e profissional que sou.

À minha orientadora, professora Dra. Cláudia Valéria Brandão, que me viu crescer na caminhada desde a graduação, residência, até o mestrado; agradeço a parceria desde o início. Às médicas veterinárias Dra. Fernanda Landim e Msc. Marina Alvarenga, pela confiança em mim depositada para realização deste projeto.

À professora Dra. Cláudia Pelizzon e colegas de laboratório, pelas longas jornadas de experimentação com os ensaios de ELISA; cada conhecimento e experiência partilhados foram fundamentais para a concretização deste trabalho. Ao professor Dr. Carlos Padovani, que tive o prazer de conhecer durante esta jornada; obrigada por todas as discussões estatísticas que tanto me fizeram crescer.

Agradeço à empresa OMICS Biotecnologia Animal, que idealizou e possibilitou a existência deste projeto. Agradeço ao programa MAI/DAI, estruturado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001), sem os quais o projeto não se sustentaria.

Aos tutores colaborativos com nossa pesquisa e residentes da Cirurgia de Pequenos Animais, meu muito obrigada. Agradeço também à cada vida animal, seja canina ou roedora, que contribuiu para a construção de um bem científico maior.

Ao meu melhor amigo de quatro patas, Fred, que me faz lembrar todos os dias por quê e por quem continuamos estudando.

E por fim, e não menos importante, agradeço à Deus, que inicia, sustenta e é o sentido final de tudo que faço. À Ele seja a glória por tudo!

“A pesquisa é a curiosidade formalizada. É procurar e indagar com um propósito.” Zora Neale Hurston

REZK, SOFIA SAGGIORO. MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. Botucatu, 2023. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

RESUMO

Com a evolução da ciência e aumento do entendimento da cicatrização a nível molecular, o desenvolvimento de novos tratamentos de feridas compõe uma área de pesquisa emergente. Estudos recentes demonstram que os benefícios clínicos observados com o emprego de terapias com células-tronco mesenquimais (CTM) também podem ser atingidos com o uso do secretoma produzido por estas células. O meio condicionado (MC-CTM) é um composto obtido em cultura celular, rico em citocinas, interleucinas e fatores de crescimento, que apresenta inúmeras vantagens em sua aplicabilidade clínica em feridas. Por meio de uma extensa revisão de literatura, foram sumarizadas as perspectivas atuais do uso clínico de MC-CTM em feridas, visando emprego final em animais de companhia. O presente estudo também investigou a eficácia de terapia tópica com uma formulação de hidrogel-alginato (HA) enriquecida com MC-CTM oriundo de tecido adiposo visceral canino em feridas cutâneas. Na primeira etapa, foi realizado um ensaio de dose-resposta em feridas experimentais de ratos, sob a hipótese de ação cicatrizante dose-dependente. Feridas tratadas com MC-CTM a 5%, 10% e 20% obtiveram desempenho clínico similar àquelas tratadas com hidrogel-alginato e àquelas submetidas somente a limpeza diária. Nenhuma atividade anti-inflamatória via TNF-α, IL-6, IL1-1β e IL-10; ou regenerativa, via TGF-β1 e CD68, foram atribuídas ao MC-CTM nas concentrações testadas. Em uma segunda etapa, foi realizado, de forma inovadora, ensaio clínico com 14 feridas de ocorrência natural em cães, no qual os grupos tratados com MC-CTM a 10% e HA também obtiveram desempenho clínico similar. Os autores sugerem que as doses estudadas, nas condições do presente estudo, podem não ser suficientes para observação de cicatrização acelerada, melhor desempenho clínico e modulação das vias de sinalização moleculares.

Palavras-chave: cães, rato, secretoma, hidrogel, dose.

REZK, SOFIA SAGGIORO. MESENCHIMAL STEM CELLS-CONDITIONED MEDIUM IN WOUND HEALING. Botucatu, 2023. 77 p. Thesis (Master's Degree in Animal Biotechnology) – School of Veterinary Medicine and Animal Science. Botucatu Campus, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

ABSTRACT

Scientific developments have increased our knowledge in wound healing at molecular level, and innovative wound treatment is an emerging area of research. Recent studies demonstrate that the clinical benefits observed with mesenchymal stem cells (MSC) therapies can also be achieved with the secretome produced by these cells. Conditioned medium (MSC-CM) is a compound obtained in MSC culture, rich in cytokines, interleukins and growth factors, and has numerous advantages in its clinical applicability. Through an extensive literature review, current perspectives of MSC-CM in wound treatment were summarized, aiming at final use in companion animals. The present study also investigated the efficacy of topical therapy with an alginate-based hydrogel (AH) formulation enriched with MSC-CM derived from canine visceral adipose tissue on cutaneous wounds. First, a dose-response study was performed on rat experimental wounds, under the hypothesis of dose-dependent healing action. Wounds treated with MSC-CM at 5%, 10% and 20% demonstrated clinical performance similar to those treated with alginate hydrogel and those subjected only to daily cleaning. No anti-inflammatory activity via TNF-α, IL-6, IL1-1β and IL-10; or regenerative, via TGF-β1 and CD68, were attributed to MSC-CM at the tested concentrations. In a second stage, an innovative clinical trial was carried out with 14 naturally occurring wounds in dogs, in which the groups treated with 10% MSC-CM and AH also achieved similar wound healing performance. The authors suggest that the doses evaluated, under the conditions of the present study, may not have been sufficient to observe healing improvement and molecular signaling pathways modulation.

Keywords: dog, rat, secretome, hydrogel, dose.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
cm: centímetros
cm²: centímetros quadrados
CTM: células-tronco mesenquimais
EGF: fator de crescimento epidérmico
ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática
FGF: fator de crescimento fibroblástico
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g: gramas
GC: grupo controle (feridas sem formulação tópica)
HA: grupo tratado com formulação de hidrogel-alginato
ID: identificador
IL-10: interleucina-10
IL-1β: interleucina-1beta
IL-6: interleucina-6
kg: quilogramas
MC10: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 10%
MC20: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 20%
MC5: grupo tratado com hidrogel-alginato acrescido de meio condicionado de células-tronco mesenquimais a 5%
MC-CTM: meio condicionado de células-tronco mesenquimais
mg/kg: miligramas por quilograma
mg: miligramas
ml: mililitros
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
pg: picogramas
SRD: sem raça definida
TGF-α: fator de crescimento transformador alfa
TGF-β: fator de crescimento transformador-beta
TGF-β1: fator de crescimento transformador-beta1
TNF-α: fator de necrose tumoral-alfa
UNESP: Universidade Estadual Paulista
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
µL: microlitros

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 1
ABSTRACT 3
Introdução à fisiopatologia da cicatrização de feridas 4
Fase inflamatória ou de hemostasia 4
Fase proliferativa 5
Fase de remodelamento 6
Fatores prejudiciais à cicatrização em animais de companhia 7
Lesão por pressão 8
Idade avançada 9
Doenças metabólicas 9
Déficit proteico 9
Localização anatômica 9
Quimioterapia e radiação 10
Corticoterapia 10
Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) 10
Terapia celular na cicatrização de feridas 10
Meio condicionado de células-tronco mesenquimais 12
Perspectivas do uso de MC-CTM na cicatrização de feridas em Medicina Veterinária 13
Desafios 14
Intrínsecos à obtenção do MC-CTM 15
Intrínsecos à liberação de proteínas no leito da ferida 15
Conclusões 16
Referências 17

CAPÍTULO II 24
ABSTRACT 26
1 INTRODUÇÃO 27
2 MATERIAIS E MÉTODOS 28
2.1 Obtenção do meio condicionado 28
2.2 Manipulação do produto tópico final 28
2.3 Animais 28

2.4 Feridas experimentais 29
2.5 Grupos experimentais e tratamentos 29
2.6 Momentos e avaliação clínica 29
2.7 Colheita de material biológico 30
2.8 Avaliação molecular 30
2.9 Análise estatística 31
3 RESULTADOS 31
3.1 Análise clínica 31
3.2 Análise molecular 32
4 DISCUSSÃO 33
4.1 Análises clínicas 33
4.2 Análises moleculares 35
4.3 Fatores potencialmente associados aos resultados obtidos 40
5 CONCLUSÃO 41
REFERÊNCIAS 42

CAPÍTULO III 49
ABSTRACT 51
1 INTRODUÇÃO 52
2 MATERIAIS E MÉTODOS 53
2.1 Delineamento experimental 53
2.2 Manipulação do produto tópico 53
2.3 Seleção das feridas 53
2.4 Orientação aos tutores 54
2.5 Grupos experimentais 54
2.6 Momentos de avaliação e variáveis estudadas 55
2.7 Análise estatística 56
3 RESULTADOS 56
3.1 Análise de casuística 56
3.2 Contração das feridas 57
3.3 Avaliação clínica por escores 57
4 DISCUSSÃO 57
4.1 Contração relativa das feridas 57
4.2 Avaliação de variáveis clínicas 58

4.3 Limitações do estudo 60
4.4 Variáveis potencialmente associadas aos resultados obtidos..... 61
5 CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62
APÊNDICE A – Material informativo entregue ao tutor..... 66

CAPÍTULO I

Trabalho a ser enviado para a revista “Journal of Wound Care”, seguindo as seguintes normas: https://www.magonlinelibrary.com/page/authors/submissions

CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM ANIMAIS DOMÉSTICOS: PERSPECTIVAS ATUAIS DE MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Sofia Saggioro REZK, Cláudia Valéria Seullner BRANDÃO

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu, São Paulo 18616-681, Brasil

Corresponding author: Cláudia Valéria Seullner Brandão

Email: valeria.brandao@unesp.br

WOUND HEALING IN PETS: CURRENT PERSPECTIVES OF STEM CELL CONDITIONED MEDIUM

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) therapy has been studied for decades and exhibit positive results in wound healing. Recent studies demonstrate that MSC-derived products have similar or superior effect compared to traditional cell therapy, in addition to easier clinical applicability and storage. In this field, conditioned medium (MSC-CM) is a protein concentrate rich in cytokines, interleukins and growth factor secreted by MSC under cell culture. Several evidence demonstrate that topical use of MC-MSC promotes improvement in wound healing via paracrine mechanism in rodents and suggest it as a promising approach especially for impaired healing; a condition frequently faced by veterinarians in clinical routine. To the knowledge of the authors, no clinical trials have evaluated MC-MSC effectiveness in companion animals wound healing. In the present study, the benefits, limitations, and future perspectives of topical therapy with MC-MSC in the management of cutaneous wounds in domestic animals will be addressed. We point to a relevant research field in veterinary medicine, which makes room for new studies that demonstrate clinical efficacy and standardize features of this new therapeutic modality.

Key words: veterinary medicine, protein concentrate, secretome, growth factor, dose, hydrogel.

Introdução à fisiopatologia da cicatrização de feridas

Ferida é um termo que define a quebra da continuidade celular e anatômica da pele.[1] A cicatrização consiste em um complexo processo fisiológico que visa restauração da integridade cutânea, seja ocasionada por um acidente ou procedimento médico.[2]

Com a evolução da ciência, tem sido possível elucidar a complexa heterogeneidade fenotípica nos tipos celulares participantes na cicatrização.[3] Processos biológicos como migração celular, inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação e remodelamento da matriz extracelular são orquestrados por uma variedade sinalizadores que atuam de forma sincronizada no tempo e no espaço no microambiente da ferida.[3,4]

A cicatrização é classicamente organizada em três fases sucessivas, a saber: fase inflamatória ou de hemostasia, fase proliferativa e fase de remodelamento.[2] Alguns autores consideram as fases de hemostasia e inflamatória como duas fases distintas.[5] Outros autores ainda subdividem a primeira fase inflamatória em uma segunda fase intermediária de debridamento.[6] Embora sejam descritas didaticamente em diferentes etapas, estas se sobrepõem no decorrer da cicatrização, além do fato que uma mesma ferida poder ser heterogênea a ponto de compor áreas em diferentes estágios de evolução.[6]

Fase inflamatória ou de hemostasia

Imediatamente após a lesão, inicia-se o processo de hemostasia que possui dois objetivos principais: prevenir a sangramento excessivo e promover um ambiente favorável para receber células para o leito da ferida e contribuir

com o processo cicatricial.[5] A exposição com o colágeno presente no subendotélio vascular ativa a agregação plaquetária, o qual resulta na formação do coágulo que participa da hemostasia, além de promover degranulação e liberação de citocinas e fatores de crescimento.[2]

Na fase inflamatória ocorre liberação de quimioatrativos e fatores de crescimento pelas plaquetas, os quais participam do processo de recrutamento de outras células que exercem importante papel na progressão da ferida.[6] As primeiras células a aparecerem no local de injúria são neutrófilos, que providenciam melhora do microambiente por meio de limpeza de debris; seguida dos macrófagos, que realizam fagocitose de bactérias e tecido lesado.[2]

Os macrófagos exercem papel fundamental no processo inicial da cicatrização devido a seu papel microbicida e pró inflamatório, ao expressar fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1-beta (IL-1 β).[3]

Entre outros importantes fatores envolvidos na fase inflamatória, estão: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador-α (TGF-α), fator de crescimento transformador-β (TGF-β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF).[6]

A fase inflamatória se inicia com o estabelecimento da ferida, e geralmente perdura de seis até 12 horas.[6]

Fase proliferativa

Quando o processo de hemostasia e primeira resposta imune local são finalizados, a ferida evolui para a etapa de reparação tecidual.[5] Nesta, novo

tecido conjuntivo ou de granulação é formado de modo concomitante a outros processos como reepitelização, imunomodulação e neovascularização.[3]

Fibroblastos ativados são responsáveis por sintetizar o tecido de granulação e matriz extracelular, que participam da contração da ferida e funcionam como suporte para outras células inflamatórias e vasos sanguíneos.[3] Os principais sinalizadores para fibroblastos nesta fase são o PDGF e EGF, derivados de plaquetas e macrófagos.[7]

Nesta etapa, o ambiente da ferida é ligeiramente ácido, o que juntamente com boa oxigenação tecidual estimula os fibroblastos a proliferarem e sintetizarem colágeno.[6] Macroscopicamente, este estágio consiste em abundante formação e deposição de tecido de granulação no leito da ferida.[5]

A neovascularização tecidual é crítica para uma eficiente cicatrização, ao promover entrega de nutrientes, oxigênio e manutenção da homeostase que permite proliferação celular adequada,[3] sendo que a falha nesse processo resulta em uma ferida crônica que não cicatriza.[7] O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) é responsável por estimular o processo de angiogênese, marcado pela migração endotelial e formação de novos vasos capilares sanguíneos.[7]

A fase proliferativa geralmente tem duração de 3 a 12 dias após estabelecimento da lesão inicial.[6]

Fase de remodelamento

Como etapa final do processo de cicatrização, é nessa fase em que é desenvolvido novo epitélio e formação de cicatriz.[5] Há regressão da neovascularização e deposição periódica de matriz extracelular para subsequente substituição do tecido de granulação para tecido cicatricial.[3]

O principal evento dessa etapa é a deposição e organização de colágeno, que é clinicamente relevante pois problemas na deposição de matriz podem resultar em comprometimento da força de contração da ferida; enquanto excesso de síntese de colágeno pode resultar em queloide ou cicatriz hipertrófica.[7]

Mediado principalmente por PDGF, TGF-β e FGF, o tecido conjuntivo abaixo do leito da ferida se contrai, aproximando suas margens e permitindo interação de fibroblastos com a matriz extracelular.[5] Os macrófagos desempenham importante papel fibrolítico nesta etapa, ao impedir formação excessiva de matriz extracelular, fagocitar debris e células apoptóticas.[3]

Com o tempo, as finas fibras de colágeno depositadas de forma desorganizada no leito da ferida são reabsorvidas, substituídas por novas fibras espessas e organizadas de acordo com as linhas de tensão do tecido.[7] Com a epitelização, o leito curado sai de um estado de hipóxia e altera a sua responsividade, entrando em quiescência celular.[3]

A fase de remodelamento pode perdurar de sete dias até meses ou anos após o estabelecimento da ferida. [6,7]

Fatores prejudiciais à cicatrização em animais de companhia

Por ser tratar de um fenômeno multifatorial, a cicatrização está sujeita a falhar em diversas etapas.[7] Em condições patológicas, a progressão não ocorre e a evolução da cicatrização se estagna; geralmente na fase inflamatória.[8] Uma ferida aberta é uma porta de entrada para patógenos, podendo compor uma ameaça à vida do paciente.[9]

Em humanos, as principais ocorrências de feridas crônicas são, respectivamente: úlceras em pés de pacientes diabéticos, úlceras venosas profunda nas pernas e lesões de pressão.[3] Além disso, outras afecções sistêmicas também são descritas como obstáculos na cicatrização, como hipotireoidismo, idade avançada, hipotermia, dor, queimaduras extensas, sepse, falência de órgãos, má nutrição, uso de corticosteroides, radiação ionizante e quimioterapia.[7]

Embora a medicina comparada seja uma abordagem, vale lembrar que, em se tratando de feridas cutâneas, a extrapolação de conceitos entre humanos e animais possui espaço para questionamento devido a diferenças anatômicas importantes, como por exemplo o cão e o rato serem espécies de "pele solta".[10,11] Abordaremos os principais mecanismos, intrínsecos à ferida e ao paciente, que interferem no processo de cicatrização observados na prática clínica de pequenos animais.

Lesão por pressão

Um estudo de 1993 utilizou cães da raça Greyhound como modelo experimental de úlceras de pressão em cães, e contribuiu para o entendimento do mecanismo dessas lesões ao demonstrar elevação de mediadores inflamatórios, como o tromboxano B2.[12] Geralmente, tais feridas não são capazes de progredir da fase inflamatória, tornando-se assim, crônicas.[13]. Em cães, um fator agravante para esta condição é o fato dessa espécie não possuir tecido subcutâneo robusto para amortecimento de cargas.[10] Muitos animais com afecções neurológicas ou ortopédicas resultam em decúbito prolongado, o que os coloca em risco para o desenvolvimento desse tipo de

úlcera.[14]

Idade avançada

Pacientes idosos geralmente possuem espessura da derme reduzida, além de microcirculação menos eficiente, o que contribui para a ocorrência de feridas crônicas.[15]

Doenças metabólicas

Há hipóteses de que a cicatrização de feridas em cães diabéticos possa ser prejudicada, como ocorre em humanos;[16] embora na literatura consultada não foram identificados estudos que efetivamente comparem a cicatrização de feridas em cães e gatos normais e diabéticos. Da mesma maneira, outras doenças como hiperadrenocorticismo, doença renal e hepática também são teorizadas como dificultadoras da cicatrização, entretanto, ainda não há evidência que suporte relação de causalidade com estas afecções.[15]

Déficit proteico

Dietas deficitárias em proteínas ou comorbidades que cursem com hipoproteinemia sérica demonstraram atraso na cicatrização em ratos.[17] Em cães e gatos com feridas extensas, preconiza-se manutenção do nível de proteínas totais séricas acima de 2.0 g/dL.[15]

Localização anatômica

A topografia da ferida também é descrita como possível fator agravante em animais, seja por uma área de maior tensão, como ocorre em regiões axilares e inguinais; ou também pelo maior risco de infecção, como ocorre em lesões perianais ou orais.[6,15]

Quimioterapia e radiação

Na medicina veterinária, foi descrito que feridas cirúrgicas de pacientes sujeitos à tratamento quimioterápico ou radioterápico são susceptíveis a estagnação do processo cicatricial, da mesma forma que ocorre em seres humanos.[6,18]

Corticoterapia

É descrito que uso de corticoesteroides em cães e gatos pode causar atrofia da epiderme e do tecido de granulação, culminando em atraso na cicatrização e redução da força tênsil de contração.[6]

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

Autores levantam a hipótese de que AINES possam influenciar negativamente a cicatrização, devido ao processo inflamatório constituir sua primeira etapa.[6] Entretanto, evidências que esses fármacos efetivamente atrasem a cicatrização ainda são controversas em ensaios feitos em ratos.[19,20]

Em feridas comórbidas e de evolução dificultada, faz-se necessário implementação de terapias e manejos que permitam atingir a completa cicatrização de maneira rápida e com mínima formação de tecido cicatricial, bem como proporcionar o bem-estar dos pacientes.[21]

Terapia celular na cicatrização de feridas

Células-tronco são populações de células indiferenciadas, geralmente de caráter clonal (oriundas de uma única célula), com capacidade de proliferação extensiva e de diferenciação em outros tipos celulares.[22,23] Três tipos de células-tronco são descritos: as células-tronco embrionárias, obtidas de blastocistos e associadas à dilemas éticos e carcinogênese;[22] as células-tronco

de pluripotência induzida, que consiste na reprogramação de células somáticas adultas em pluripotentes;[24] e por fim, células-tronco mesenquimais (CTM) que são células multipotentes encontradas em diversos tecidos como medula óssea, gordura, osso e sangue periférico; que possuem potencial de diferenciação em outros tecidos.[23]

Neste contexto, o uso terapêutico de CTM possui diversas vantagens, como a vasta variedade de tecidos-fonte, o fato de serem passíveis de cultura celular e facilmente caracterizadas por marcadores de membrana específicos.[23,25] A terapia celular com CTM representa uma modalidade promissora para diversas doenças devido a seu potencial de induzir regeneração celular de tecidos e promover restauração de suas funções originais.[26]

Em se tratando de feridas, as CTM estão envolvidas em todas as três fases do processo de cicatrização da pele.[25] A terapia celular com CTM demonstrou bons resultados em melhorar tanto a velocidade quanto a qualidade da cicatrização.[25] Entretanto, apenas uma fração das CTM transplantadas de fato sobrevivem no tecido hospedeiro, além de não apresentarem longa sobrevida; o que sugere um mecanismo de ação distinto da migração e diferenciação celular direta.[27,28]

As CTM são capazes de promover um microambiente favorável à cicatrização por meio da secreção abundante de diversos fatores de crescimento e citocinas, definidos como secretoma.[29] O conjunto de bioativos que as células produzem; como fatores de crescimento, citocinas e interleucinas, são os principais responsáveis pelo benefício clínico da terapia

celular na cicatrização de feridas.[4,29,30]

Meio condicionado de células-tronco mesenquimais

O meio condicionado (MC), também denominado secretoma celular, se refere à coleção de proteínas que são liberadas da superfície celular ou do meio intracelular; contendo enzimas, fatores de crescimento, citocinas, hormônios e outros mediadores solúveis.[31] Foram isolados em MC de CTM (MC-CTM) importantes mediadores proteicos, como: fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador β1 (TGF-β1), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de células-tronco (SCF), fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), interferon γ (IFN-γ); bem como interleucinas IL-6, IL-8, IL-10, IL-12.[4,29,32]

Tais bioativos produzidos pelas CTM são capazes de estimular mitose e promover incremento na vascularização de feridas.[33] Além disso, também é descrito efeito imunomodulatório por citocinas específicas produzidas pelas CTMs, via supressão do sistema imune local.[32–34]

No tratamento de feridas, a utilização de MC-CTM demonstrou efeito terapêutico semelhante à utilização de terapia celular direta, compondo uma promissora linha de pesquisa sobretudo em feridas de complexa cicatrização.[35,36] A utilização do MC-CTM, por ser livre de células apresenta vantagens de armazenamento e aplicabilidade clínica em relação ao uso da terapia celular convencional.[4,35] Um estudo demonstrou, em feridas experimentais em porquinhos da índia, a viabilidade do uso de MC-CTM na forma liofilizada, reconstituída em gel tópico.[4]

Estudos realizados em cobaias comprovaram que o uso tópico de MC-CTM reduziu efetivamente o tempo de cicatrização e aumentou a deposição de colágeno com menor formação de cicatriz.[4,37] Em humanos, tratamento com MC-CTM originárias de tecido adiposo alógeno em feridas promoveu maior expressão de procolágeno tipo III e cicatrização mais eficiente em comparação ao grupo controle.[38]

Enquanto a terapia celular clássica envolve riscos de transformação maligna das células, migração errática para outros tecidos e indução de resposta imunológica contra o tratamento,[26] a utilização de meio condicionado não está associada com carcinogênese.[39] Além disso, demonstra segurança e bons resultados clínicos em seu uso autólogo e xenólogo, embora alguns autores apontem resultados discretamente mais favoráveis com o uso de enxerto alógeno quando comparado ao xenólogo.[4,35]

O uso de concentrado proteico também reduz os custos da terapia celular, pois devido ao dano e rápida necrose/apoptose que as células transplantadas sofrem no leito da ferida, faz-se necessária aplicação de centenas de milhões de CTMs; processo que pode ser otimizado com a utilização de MC-CTM.[28,39]

Perspectivas do uso de MC-CTM na cicatrização de feridas em Medicina Veterinária

A aplicação tópica de MC-CTM em feridas possui particular vantagem na medicina veterinária devido à facilidade de transporte, armazenamento e fácil manuseio pelo próprio tutor do animal.[35]

Diversos estudos têm investigado o efeito tópico de MC-CTM em

modelos experimentais de feridas cutâneas em ratos[35,40–45] e porquinhos da índia;[4] em animais saudáveis e diabéticos;[35] em sua maioria pela via tópica, mas também injetável;[40,42] na forma pura ou associada a carreadores como o hidrogel com alginato de cálcio.[44] Exceto pela via injetável, na qual não foi observada melhora na cicatrização,[42] estudos demonstraram benefícios na utilização tópica de MC-CTM em feridas experimentais padronizadas em até 2 cm de diâmetro.[35,40,41,43–45]

Apesar da grande quantidade de trabalhos que comprovam a ação parácrina do MC-CTM em aplicação tópica em feridas experimentais, a metodologia da obtenção do produto tópico final difere, e ainda não está claro qual a concentração proteica mínima necessária para atividade biológica satisfatória. Da mesma forma, também há necessidade de padronização da frequência de aplicação do produto. Enquanto alguns estudos realizam tratamento tópico apenas no primeiro dia,[38,40,41,43,44] outros realizam aplicações seriadas.[4,42,45]

Até o momento, não foram identificados ensaios clínicos direcionados para a utilização de MC-CTM no tratamento de feridas em animais domésticos. Foi relatado um cão com ferida crônica que atingiu epitelização após aplicação subcutânea de concentrado proteico obtido de CTM.[46] Outro estudo realizou aplicação xenóloga de MC-CTM oriundas de cães, porém em feridas de ratos diabéticos; e levanta a hipótese de possível benefício clínico para uso em animais de companhia.[35]

Desafios

Intrínsecos à obtenção do MC-CTM

A cultura celular convencional pode não ser suficiente para produzir concentração satisfatória de bioativos parácrinos no MC obtido.[40] Culturas submetidas a condições de hipóxia demonstraram maior proliferação na cultura de CTM derivadas de gordura e melhora da cicatrização, sugerindo que esta metodologia pode ser aplicada para obtenção de melhores resultados.[47]

Intrínsecos à liberação de proteínas no leito da ferida

Outra importante limitação da terapia tópica com fatores de crescimento é a rápida degradação que as proteínas bioativas sofrem pelas metaloproteineses presentes no leito da ferida, além da dificuldade de absorção através da pele.[48,49] Por isso, é descrito que o sistema carreador da molécula para o leito da ferida compõe um elemento crucial para sua ação biológica.[50] A utilização de um excipiente adequado atua na estabilização e controle da liberação das proteínas,[49] visto que os fatores de crescimento agem de modo tempo e concentração-dependente.[51]

Diversos sistemas poliméricos de entrega de proteínas vêm sido estudados, como nanopartículas, nanofibras e hidrogéis.[52] Biomateriais naturais como ácido hialurônico, chitosan, alginato e colágeno; além de sintéticos como ácido poliglicólico e polietilenoglicol são alguns exemplos de substâncias estudadas como carreadores de fatores de crescimento.[49]

Em se tratando de cicatrização cutânea, autores sugerem que produtos convencionalmente empregados no manejo de feridas podem ser utilizados como sistemas carreadores de fatores de crescimento, promovendo benefício clínico.[51] Neste contexto, destaca-se o hidrogel, produto amplamente utilizado

em coberturas de feridas devido a suas propriedades não-aderentes, capazes de promover ambiente úmido favorável para a cicatrização e confortável ao paciente.[53] O interesse nesse tipo de curativo aumentou com evidências de um mecanismo de ação mais amplo do hidrogel, devido a sua alta biocompatibilidade e capacidade de induzir regeneração tecidual.[53] Devido a suas propriedades mecânicas de alta elasticidade e boa biocompatibilidade, hidrogéis vêm sido utilizados como carreadores de MC-CTM em cicatrização de feridas, pois promovem liberação prolongada dos fatores de crescimento e citocinas.[54,55]

Também ganham destaque os alginatos, biopolímeros obtidos de algas marinhas.[56] Devido a sua boa biocompatibilidade e capacidade de absorção de fluidos, alginatos frequentemente são utilizados no tratamento de feridas em conjunto com hidrogéis.[57] Há evidências de melhora na cicatrização de feridas em pés diabéticos em humanos tratados topicamente com associação de hidrogel com alginato.[58] Também é descrita a utilização de alginato como meio carreador de fatores de crescimento.[59]

Segundo Sabzevari et al. (2020), o uso conjunto de hidrogel com alginato de sódio enriquecido com MC-CTM foi efetivo em acelerar a cicatrização de feridas em ratos.[44] Os mesmos autores sugerem essa associação como potencialmente eficaz em prevenir a degradação proteica e regular a liberação dos fatores de crescimento no leito da ferida.[44]

Conclusões

A utilização de MC-CTM no tratamento de feridas demonstra resultados promissores na cicatrização, até o momento na modalidade experimental em

roedores, além de oferecer vantagens de manuseio e armazenamento. A literatura sugere que limitações da abordagem tópica com bioativos podem ser contornadas ou minimizadas com a utilização de um sistema carreador eficaz. Relatos de uso tópico de MC-CTM em feridas na medicina veterinária ainda são escassos, e não há estudos que sugerem concentração proteica mínima, vias de aplicação e frequência do tratamento. Desta forma, abre-se espaço para trabalhos que padronizem o seu uso e promovam ensaios clínicos direcionados para utilização em animais domésticos.

Conflito de interesses

Os autores declaram inexistência de conflitos de interesse.

Agradecimentos

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

Referências

(1) Schilling, J. A. Wound Healing. *Surg. Clin. North Am.* **1976**, *56* (4), 859–874. https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)40983-7.

(2) Wang, P.-H.; Huang, B.-S.; Horng, H.-C.; Yeh, C.-C.; Chen, Y.-J. Wound Healing. *J. Chin. Med. Assoc.* **2018**, *81* (2), 94–101. https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002.

(3) Rodrigues, M.; Kosaric, N.; Bonham, C. A.; Gurtner, G. C. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol. Rev.* **2019**, *99* (1), 665–706. https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017.

(4) Joseph, A.; Baiju, I.; Bhat, I. A.; Pandey, S.; Bharti, M.; Verma, M.; Pratap Singh, A.; Ansari, M. M.; Chandra, V.; Saikumar, G.; Amarpal; Taru Sharma, G. Mesenchymal Stem Cell-conditioned Media: A Novel Alternative of Stem Cell Therapy for Quality Wound Healing. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235* (7–8), 5555–5569. https://doi.org/10.1002/jcp.29486.

(5) Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **2009**, *37* (5), 1528–1542. https://doi.org/10.1177/147323000903700531.

(6) Balsa, I. M.; Culp, W. T. N. Wound Care. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2015**, *45* (5), 1049–1065. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009.

(7) Broughton, G.; Janis, J. E.; Attinger, C. E. Wound Healing: An Overview: *Plast. Reconstr. Surg.* **2006**, *117* (SUPPLEMENT), 1e-S-32e-S. https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9.

(8) Diegelmann, R., F. Wound Healing: An Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. *Front. Biosci.* **2004**, *9* (1–3), 283. https://doi.org/10.2741/1184.

(9) Pikuła, M.; Langa, P.; Kosikowska, P.; Trzonkowski, P. Stem Cells and Growth Factors in Wound Healing. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2015**, *69*, 874–885. https://doi.org/10.5604/17322693.1162989.

(10) Thompson, D. A Critical Review of the Literature on Pressure Ulcer Aetiology. *J. Wound Care* **2005**, *14* (2), 87–90. https://doi.org/10.12968/jowc.2005.14.2.26735.

(11) Dorsett-Martin, W. A. Rat Models of Skin Wound Healing: A Review. *Wound Repair Regen.* **2004**, *12* (6), 591–599. https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x.

(12) Swaim, S. F.; Bradley, D. M.; Vaughn, D. M.; Powers, R. D.; Hoffman, C. E. The Greyhound Dog as a Model for Studying Pressure Ulcers. *Decubitus* **1993**, *6* (2), 32–35, 38–40.

(13) Medical Advisory Secretariat. Management of Chronic Pressure Ulcers: An Evidence-Based Analysis. *Ont. Health Technol. Assess. Ser.* **2009**, *9* (3), 1–203.

(14) Dragonea, L.; Palladinia, S.; Glazarb, M. MLS Laser Therapy in Dogs with Pressure Ulcers and Open Wound. *Energy Health* **2011**, *7*, 20.

(15) Buote, N. J. Updates in Wound Management and Dressings. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2022**, *52* (2), 289–315. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.12.001.

(16) Bennett, N. Monitoring Techniques for Diabetes Mellitus in the Dog and the Cat. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* **2002**, *17* (2), 65–69. https://doi.org/10.1053/svms.2002.33044.

(17) Perez-Tamayo, R.; Ihnen, M. The Effect of Methionine in Experimental Wound Healing; a Morphologic Study. *Am. J. Pathol.* **1953**, *29* (2), 233–249.

(18) Laing, E. J. Problems in Wound Healing Associated with Chemotherapy

and Radiation Therapy. *Probl. Vet. Med.* **1990**, *2* (3), 433–441.

(19) Blomme, E. A. G.; Chinn, K. S.; Hardy, M. M.; Casler, J. J.; Kim, S. H.; Opsahl, A. C.; Hall, W. A.; Trajkovic, D.; Khan, K. N.; Tripp, C. S. Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition Does Not Affect the Healing of Cutaneous Full-Thickness Incisional Wounds in SKH-1 Mice. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *148* (2), 211–223. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05065.x.

(20) Fairweather, M.; Heit, Y. I.; Buie, J.; Rosenberg, L. M.; Briggs, A.; Orgill, D. P.; Bertagnolli, M. M. Celecoxib Inhibits Early Cutaneous Wound Healing. *J. Surg. Res.* **2015**, *194* (2), 717–724. https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.12.026.

(21) Jackson, W. M.; Nesti, L. J.; Tuan, R. S. Concise Review: Clinical Translation of Wound Healing Therapies Based on Mesenchymal Stem Cells. *STEM CELLS Transl. Med.* **2012**, *1* (1), 44–50. https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0024.

(22) Ding, D.-C.; Shyu, W.-C.; Lin, S.-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* **2011**, *20* (1), 5–14. https://doi.org/10.3727/096368910X.

(23) Kolios, G.; Moodley, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration* **2013**, *85* (1), 3–10. https://doi.org/10.1159/000345615.

(24) Tottoli, E. M.; Dorati, R.; Genta, I.; Chiesa, E.; Pisani, S.; Conti, B. Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (8), 735. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735.

(25) Nourian Dehkordi, A.; Mirahmadi Babaheydari, F.; Chehelgerdi, M.; Raeisi Dehkordi, S. Skin Tissue Engineering: Wound Healing Based on Stem-Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10* (1), 111. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2.

(26) Okano, H.; Sipp, D. New Trends in Cellular Therapy. *Development* **2020**, *147* (18), dev192567. https://doi.org/10.1242/dev.192567.

(27) Fui, L. W.; Lok, M. P. W.; Govindasamy, V.; Yong, T. K.; Lek, T. K.; Das, A. K. Understanding the Multifaceted Mechanisms of Diabetic Wound Healing and Therapeutic Application of Stem Cells Conditioned Medium in the Healing Process. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13* (12), 2218–2233. https://doi.org/10.1002/term.2966.

(28) Vizoso, F.; Eiro, N.; Cid, S.; Schneider, J.; Perez-Fernandez, R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (9), 1852. https://doi.org/10.3390/ijms18091852.

(29) Bhardwaj, R.; Ansari, M. M.; Parmar, M. S.; Chandra, V.; Sharma, G. T. Stem Cell Conditioned Media Contains Important Growth Factors and Improves *In Vitro* Buffalo Embryo Production. *Anim. Biotechnol.* **2016**, *27* (2), 118–125.

https://doi.org/10.1080/10495398.2015.1118383.

(30) Osugi, M.; Katagiri, W.; Yoshimi, R.; Inukai, T.; Hibi, H.; Ueda, M. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18* (13–14), 1479–1489. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0325.

(31) Dowling, P.; Clynes, M. Conditioned Media from Cell Lines: A Complementary Model to Clinical Specimens for the Discovery of Disease-Specific Biomarkers. *PROTEOMICS* **2011**, *11* (4), 794–804. https://doi.org/10.1002/pmic.201000530.

(32) Abumaree, M.; Al Jumah, M.; Pace, R. A.; Kalionis, B. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **2012**, *8* (2), 375–392. https://doi.org/10.1007/s12015-011-9312-0.

(33) Caplan, A. I.; Dennis, J. E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *98* (5), 1076–1084. https://doi.org/10.1002/jcb.20886.

(34) Kyurkchiev, D.; Bochev, Ivan; Ekaterina, I.-T.; Mourdjeva, Milena; Oreshkova, Tsvetelina; Belemezova, Kalina; Kyurkchiev, Stanimir. Secretion of Immunoregulatory Cytokines by Mesenchymal Stem Cells. *World J. Stem Cells* **2014**, *6* (5), 552. https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552.

(35) Ansari, M. M. Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and Its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2013**, *3* (3). https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000141.

(36) Li, M.; Zhao, Y.; Hao, H.; Dai, H.; Han, Q.; Tong, C.; Liu, J.; Han, W.; Fu, X. Mesenchymal Stem Cell–Conditioned Medium Improves the Proliferation and Migration of Keratinocytes in a Diabetes-Like Microenvironment. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* **2015**, *14* (1), 73–86. https://doi.org/10.1177/1534734615569053.

(37) Somal, A.; Bhat, I. A.; B., I.; Singh, A. P.; Panda, B. S. K.; Desingu, P. A.; Pandey, S.; Bharti, M. K.; Pal, A.; Saikumar, G.; Chandra, V.; Sharma, G. T. Impact of Cryopreservation on Caprine Fetal Adnexa Derived Stem Cells and Its Evaluation for Growth Kinetics, Phenotypic Characterization, and Wound Healing Potential in Xenogenic Rat Model. *Journal of Cellular Physiology*. August 2017, pp 2186–2200. http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.25731 (accessed 2021-03-30).

(38) Zhou, B.-R.; Xu, Y.; Guo, S.-L.; Xu, Y.; Wang, Y.; Zhu, F.; Permatasari, F.; Wu, D.; Yin, Z.-Q.; Luo, D. The Effect of Conditioned Media of Adipose-Derived Stem Cells on Wound Healing after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–9. https://doi.org/10.1155/2013/519126.

(39) Im, G.-B.; Kim, Y. H.; Kim, Y.-J.; Kim, S.-W.; Jung, E.; Jeong, G.-J.; Wang, K.; Kim, J.; Kim, D.-I.; Kim, T.-H.; Yi, G.-R.; Yu, T.; Bhang, S. H. Enhancing the Wound Healing Effect of Conditioned Medium Collected from Mesenchymal Stem Cells with High Passage Number Using Bioreducible Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (19), 4835. https://doi.org/10.3390/ijms20194835.

(40) Chen, L.; Xu, Y.; Zhao, J.; Zhang, Z.; Yang, R.; Xie, J.; Liu, X.; Qi, S. Conditioned Medium from Hypoxic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Enhances Wound Healing in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9* (4), e96161. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096161.

(41) Gao, M.; Zhang, J.; Wang, J. Z.; Liu, Y.; Zhang, X.; Shi, Y. [Effects of hypoxia-pretreated rat adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium on wound healing of rats with full-thickness defects]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin. J. Burns* **2020**, *36* (9), 803–812. https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501120-20200508-00258.

(42) Payushina, O. V.; Butorina, N. N.; Sheveleva, O. N.; Domaratskaya, E. I. Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2018**, *165* (4), 572–575. https://doi.org/10.1007/s10517-018-4215-6.

(43) Rong, X.; Chu, W.; Zhang, H.; Wang, Y.; Qi, X.; Zhang, G.; Wang, Y.; Li, C. Antler Stem Cell-Conditioned Medium Stimulates Regenerative Wound Healing in Rats. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10* (1), 326. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1457-9.

(44) Sabzevari, R.; Roushandeh, A. M.; Mehdipour, A.; Alini, M.; Roudkenar, M. H. SA/G Hydrogel Containing HCAP-18/LL-37-Engineered WJ-MSCs-Derived Conditioned Medium Promoted Wound Healing in Rat Model of Excision Injury. *Life Sci.* **2020**, *261*, 118381. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118381.

(45) Yang, J.; Chen, Z.; Pan, D.; Li, H.; Shen, J. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *Volume 15*, 5911–5926. https://doi.org/10.2147/IJN.S249129.

(46) Alvarenga, M.; Traldi, R.; Barberini, D.; Landim-Alvarenga, F. A Protein Concentrate Derived from Mesenchymal Stem Cells (MSC-PC) Induces Epithelialization of a Chronic Wound in a Dog – Case Report. *Cytotherapy* **2021**, *23* (5), S53. https://doi.org/10.1016/S1465324921003376.

(47) Lee, E. Y.; Xia, Y.; Kim, W.-S.; Kim, M. H.; Kim, T. H.; Kim, K. J.; Park, B.-S.; Sung, J.-H. Hypoxia-Enhanced Wound-Healing Function of Adipose-Derived Stem Cells: Increase in Stem Cell Proliferation and up-Regulation of VEGF and BFGF. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17* (4), 540–547. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x.

(48) Choi, J. U.; Lee, S. W.; Pangeni, R.; Byun, Y.; Yoon, I.-S.; Park, J. W. Preparation and in Vivo Evaluation of Cationic Elastic Liposomes Comprising Highly Skin-Permeable Growth Factors Combined with Hyaluronic Acid for Enhanced Diabetic Wound-Healing Therapy. *Acta Biomater.* **2017**, *57*, 197–215. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.04.034.

(49) Shakhakarmi, K.; Seo, J.-E.; Lamichhane, S.; Thapa, C.; Lee, S. EGF, a Veteran of Wound Healing: Highlights on Its Mode of Action, Clinical Applications with Focus on Wound Treatment, and Recent Drug Delivery Strategies. *Arch. Pharm. Res.* **2023**. https://doi.org/10.1007/s12272-023-01444-3.

(50) Guan, N.; Liu, Z.; Zhao, Y.; Li, Q.; Wang, Y. Engineered Biomaterial Strategies for Controlling Growth Factors in Tissue Engineering. *Drug Deliv.* **2020**, *27* (1), 1438–1451. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831104.

(51) Chen, R. R.; Mooney, D. J. Polymeric Growth Factor Delivery Strategies for Tissue Engineering. *Pharm. Res.* **2003**, *20* (8), 1103–1112. https://doi.org/10.1023/A:1025034925152.

(52) Dwivedi, C.; Pandey, H.; Pandey, A. C.; Patil, S.; Ramteke, P. W.; Laux, P.; Luch, A.; Singh, A. V. In Vivo Biocompatibility of Electrospun Biodegradable Dual Carrier (Antibiotic + Growth Factor) in a Mouse Model—Implications for Rapid Wound Healing. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (4), 180. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040180.

(53) Francesko, A.; Petkova, P.; Tzanov, T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *25* (41), 5782–5797. https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246.

(54) Brumberg, V.; Astrelina, T.; Malivanova, T.; Samoilov, A. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. *Biomedicines* **2021**, *9* (9), 1235. https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235.

(55) Zhang, Y.; Zheng, Y.; Shu, F.; Zhou, R.; Bao, B.; Xiao, S.; Li, K.; Lin, Q.; Zhu, L.; Xia, Z. In Situ-Formed Adhesive Hyaluronic Acid Hydrogel with Prolonged Amnion-Derived Conditioned Medium Release for Diabetic Wound Repair. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *276*, 118752. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118752.

(56) Rastogi, P.; Kandasubramanian, B. Review of Alginate-Based Hydrogel Bioprinting for Application in Tissue Engineering. *Biofabrication* **2019**, *11* (4), 042001. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab331e.

(57) Zhang, M.; Zhao, X. Alginate Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *162*, 1414–1428. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311.

(58) Barbosa, M. A.; Paggiaro, A. O.; Fernandes de Carvalho, V.; Isaac, C.; Gemperli, R. Effects of Hydrogel With Enriched Sodium Alginate in Wounds of

Diabetic Patients. *Plast. Surg. Nurs.* **2020**, *40* (2), 110–115. https://doi.org/10.1097/PSN.0000000000000317.

(59) Zia, K. M.; Zia, F.; Zuber, M.; Rehman, S.; Ahmad, M. N. Alginate Based Polyurethanes: A Review of Recent Advances and Perspective. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *79*, 377–387. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.04.07

CAPÍTULO II

Trabalho a ser enviado para a revista “Cytotherapy”, seguindo as seguintes normas: https://www.elsevier.com/journals/cytotherapy/1465-3249/guide-for-authors.

Estudo de dose-resposta de hidrogel e alginato enriquecido com meio condicionado de células-tronco mesenquimais em feridas de ratos

Sofia Saggioro REZK, Cláudia Valéria Seullner BRANDÃO

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu, São Paulo 18616-681, Brasil

Corresponding author: Cláudia Valéria Seullner Brandão

Email:valeria.brandao@unesp.br

DOSE-RESPONSE STUDY OF ALGINATE-BASED HYDROGEL ENRICHED WITH MESENCHYMAL STEM CELL CONDITIONED MEDIUM IN RAT WOUNDS

ABSTRACT

Wound care has been widely studied for innovative therapies. Due to mesenchymal stem cell's (MSC) paracrine activity, several studies have evaluated its conditioned medium (MSC-CM) obtained from cell culture as topical treatment. However, the minimum protein dose required to enhance hound healing has not yet been defined, nor the frequency of use. The present study evaluated clinical performance and molecular mechanisms of MSC-CM derived from adipose canine cells at three different concentrations, under the hypothesis that it would enhance wound healing in dose-response manner. Conversely, wounds that received daily treatment with sodium alginate-based hydrogel (AH) formulation alone or enriched with 5%, 10% and 20% MSC-CM and non-treated wounds demonstrated similar healing performance. Satisfactory contraction was noticed in all groups, and no adverse events were reported. The group treated with MSC-CM at 20% and the AH group stood out for less crust formation compared to non-treated group at day 10. Several biomarkers were analyzed by ELISA, and no anti-inflammatory activity was attributed to MSC-CM via TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10; neither regenerative mechanism via TGF-β1 and CD68 at 5, 10 and 20%, comparing to AH and control groups. To the knowledge of the authors, this is the first *in vivo* experiment with low dose of MSC-CM in wound healing. Under the conditions of the present study, 5%, 10% and 20% MSC-CM concentration may be insufficient to improve wound healing in rats.

Keywords: secretome, wound healing, topical, protein concentrate.

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um dos processos mais complexos do organismo [1] e ainda consiste em um desafio terapêutico, tanto em humanos quanto na medicina veterinária [2,3]. Este processo ocorre por meio das fases inflamatória/hemostasia, de proliferação e remodelamento [4]. Cada etapa é composta por marcadores biológicos e sinalizadores celulares específicos [1]. Estas podem ser interrompidas ou atrasadas por diversos fatores, como doenças metabólicas pré-existentes, infecção, estado nutricional desfavorável e uso de medicações [3].

A terapia celular é uma modalidade de tratamento que objetiva induzir a regeneração e restaurar as funções dos tecidos [5]. Existem evidências de que células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de tecido adiposo são eficazes em melhorar a cicatrização em feridas [6]. Inicialmente, atribuía-se os efeitos terapêuticos das CTM à sua capacidade de aderência local e diferenciação em diversos tipos teciduais [7]. Entretanto, sabe-se que as células implantadas não sobrevivem por muito tempo, e seu principal benefício terapêutico ocorre pelos importantes fatores bioativos que elas produzem [8].

As CTM são capazes de produzir um secretoma rico em fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas com potencial de enriquecer o microambiente de uma lesão [9]. Tais fatores exercem importante papel na regulação e sinalização de processos biológicos [8], sem afetar as demais células do organismo [9]. Neste contexto, a utilização de seu meio condicionado (MC-CTM) propõe um método alternativo ao uso de terapia celular convencional [10,11]. Entre suas vantagens estão a facilidade de transporte e aplicação [12], visto ser um produto livre de células; e, ao contrário da terapia celular convencional, não foi associado à carcinogênese [10].

Diversos estudos demonstraram que a utilização tópica de MC-CTM efetivamente melhorou a cicatrização de feridas em roedores [9,13–19]. Entretanto, há divergências metodológicas entre os estudos, visto que a concentração proteica mínima necessária para atividade biológica satisfatória ainda é incerta. Da mesma forma, também há necessidade de padronização da frequência de aplicação do produto.

O presente estudo tem por objetivo avaliar o desempenho clínico e mecanismos moleculares de terapia tópica diária com hidrogel e alginato (HA) enriquecido com MC-CTM em três concentrações distintas (5%, 10% e 20%), de forma comparada em grupos de tratamento padrão (HA puro) e controle. A hipótese é que o MC-CTM irá promover cicatrização precoce e evolução clínica favorável das feridas, ao exercer atividade anti-inflamatória e regenerativa tecidual via sinalizadores moleculares, de modo dose-dependente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do meio condicionado

O produto tópico utilizado no presente estudo tem como princípio ativo MC-CTM obtido por meio de cultura celular sob privação de nutrientes (depósito de patente código BR 10 2022 016233-6), proveniente de tecido adiposo canino, oriundo de gordura visceral periovariana de cadelas doadoras. Foram identificados por meio de espectrometria de massa o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFPB) no concentrado proteico obtido.

2.2 Manipulação do produto tópico final

O MC-CTM dessa cultura foi manipulado em hidrogel com alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1% nas proporções de 5%, 10% e 20%, denominados MC5, MC10 e MC20. Visto que a concentração proteica total do MC-CTM puro foi de 2 mg/ml, os produtos finais contém, respectivamente, 100 µg/ml, 200 µg/ml e 400 µg/ml de proteínas.

2.3 Animais

Trinta e cinco ratos da espécie *Rattus norvergicus* variedade *albinus*, machos, com 45 dias, sadios, pesando em média 200 g, oriundos do Biotério Central (UNESP – Botucatu), foram mantidos em gaiolas individuais, com alimento e água *ad libitum*. O projeto obteve aprovação do comitê de ética local (protocolo CEUA 0083/2022).

2.4 Feridas experimentais

Após ambientação, os animais foram pesados individualmente e submetidos à analgesia com morfina (2 mg/kg) e anestesia com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Todas as medicações foram aplicadas pela via intramuscular. Os animais foram então submetidos à tricotomia, antissepsia à base de clorexidine degermante 2% e clorexidine alcoólico a 0,5%, e ferida padronizada com *punch* cirúrgico circular de 3 cm de diâmetro na região interescapular.

2.5 Grupos experimentais e tratamentos

Cada grupo foi composto aleatoriamente por sete ratos. Todos os animais receberam limpeza diária da ferida com solução fisiológica e aplicação tópica de fina camada de tratamento de acordo com seu grupo, de forma asséptica. Os grupos experimentais MC5, MC10 e MC20 receberam hidrogel e alginato acrescido de ácido ascórbico a 0,1% e MC-CTM nas concentrações de 5%, 10% e 20%, respectivamente. O grupo HA (tratamento padrão) foi tratado com manipulação tópica de hidrogel com alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1%. O grupo controle (GC) foi submetido apenas à limpeza diária com solução fisiológica. Todos os tratamentos, com exceção do GC, foram realizados em modalidade cega ao tratador e avaliador. Os produtos foram armazenados sob refrigeração (1-4 ºC), e utilizados em até 6 meses desde a data de fabricação.

2.6 Momentos e avaliação clínica

Foram instituídos momentos de avaliação estratégicos para obtenção de dados clínicos da evolução das feridas, de acordo com o respectivo dia; a saber: dia da criação da ferida (D0), primeiro (D1), terceiro (D3), sétimo (D7) e décimo (D10) dia de tratamento.

Em todos os momentos de avaliação foi realizado registro fotográfico com escala. A fotografia com escala em formato digital foi submetida à mensuração da área da ferida em cm² pelo software *ImageJ*®. A partir da área, a contração relativa em cada momento foi calculada com comparação à medida de área inicial, utilizando-se o cálculo: % contração = 1 – (área no dia

de interesse [cm²] / área no dia 0 [cm²]) * 100.

Também foi instituída avaliação clínica para os quesitos: exsudação, edema, hemorragia, granulação e crosta, por meio de atribuição de escores de 0 a 3 (0 – ausência; 1 – presença discreta; 2 – moderada; 3 – intensa) em cada momento. Outros itens avaliados também foram necrose e infecção, nos quais foram atribuídos escores de 0 a 1 (0 – ausência; 1 – presença).

2.7 Colheita de material biológico

O décimo dia de tratamento (D10) foi selecionado para compor o dia de colheita de material, pois neste momento as feridas ainda se encontravam na fase proliferativa e início de remodelamento, período favorável para avaliação da atividade molecular via citocinas e fatores de crescimento; além de compor área residual suficiente para processamento de amostras. No D10, os animais foram submetidos à anestesia com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (13 mg/kg), e analgesia com morfina (3 mg/kg). Após remoção da crosta, quando presente, a área residual da ferida de cada rato foi colhida cirurgicamente e armazenada a -196°C. Ato contínuo, cada animal foi submetido à eutanásia via aprofundamento do plano anestésico com máscara de isofluorano e injeção intracardíaca de KCl na dose de 150 mg/kg.

2.8 Avaliação molecular

Visando a otimização de insumos laboratoriais, vinte e cinco amostras de pele (cinco de cada grupo) foram selecionadas aleatoriamente, descongeladas, pesadas e homogeneizadas na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de solução composta por 99% de solução tampão fosfato-salina (PBS) e 1% de coquetel inibidor de protease. Após centrifugação, o sobrenadante obtido foi então submetido à dosagem de proteínas totais por meio de ensaio de Bradford (Bio-Rad®, 5000006). Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) foram performados a partir dos sobrenadantes para mensuração de TNF-α (R&D Systems® DY510), IL-1β (R&D Systems® DY501), IL-6 (R&D Systems® DY506), IL-10 (Elabscience®, E-EL-R0016), TGF-β1 (FineTest®, ER1378) e CD68 (FineTest®, ER0818), de acordo com as recomendações do kit de cada fabricante. Todas as amostras foram

processadas em duplicatas. As concentrações obtidas foram então corrigidas com o valor de proteínas totais de cada amostra, e expressas em pg/mg.

2.9 Análise estatística

A contração relativa em cada momento de avaliação, bem como análises quantitativas moleculares, foram submetidos à técnica de análise de variância (ANOVA) paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni [20]. Os escores de avaliação clínica atribuídos nos respectivos momentos para as variáveis exsudação, edema, hemorragia, granulação, crosta, necrose e infecção foram submetidos à análise ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn [21].

As variáveis clínicas foram submetidas a análise estatística em duas perspectivas: 1) comparação entre grupos em cada momento de avaliação, com objetivo de identificar diferenças entre tratamentos nos determinados dias; e 2) comparação entre momentos dentro de cada grupo, com objetivo de estudar o perfil de evolução das feridas de um determinado tratamento. Todas as análises consideraram o nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

3.1 Análise clínica

3.1.1 Contração relativa

A contração relativa percentual das feridas não apresentou diferença estatística na comparação entre grupos, em nenhum momento de avaliação ($p > 0,05$). Na análise do comportamento evolutivo das feridas, os grupos tratados com MC-CTM em todas as concentrações obtiveram redução significativa da área das feridas entre o D3 e D7, e entre o D7 e D10. O grupo HA demonstrou evolução mais homogênea, com diferença estatística somente no D10, em relação ao D1 e D3. O GC (sem tratamento) foi o único que obteve piora significativa das feridas no D3 em relação ao D1; porém se recuperou no D7, e manteve bom desempenho até D10.

3.1.2 Escores clínicos

enhum efeito adverso foi observado com o tratamento tópico empregado, até o décimo dia de acompanhamento.

Quanto à variável crosta, verificou-se diferença estatística entre grupos ($p < 0,05$) no último momento de avaliação: os grupos HA e MC20 apresentaram menor formação de crosta em comparação ao GC no décimo dia. Nas variáveis exsudação, edema e hemorragia não houve diferença entre os grupos em nenhum momento de avaliação. Nenhum animal apresentou necrose ou infecção.

Na análise do comportamento evolutivo das feridas, em todos os grupos de tratamento foi observada maior exsudação no D0 e maior edema no D1, em relação aos demais dias ($p < 0,05$). Nenhum grupo apresentou diferença estatística para hemorragia. Em todos os grupos foi observado aumento significativo de crosta no D7 (vs. D0 e D1).

Todas as feridas produziram tecido de granulação ao decorrer do tratamento, sem diferença estatística entre grupos. Entretanto, diferenças de comportamento temporal foram notadas. Grupos tratados com maiores concentrações de MC-CTM (MC10 e MC20) logo no D3 já apresentaram granulação semelhante à do D10 ($p > 0,05$); enquanto no GC essa semelhança só foi observada no D7. Os tratamentos MC5 e HA demonstraram evolução mais homogênea, somente apresentando diferença estatística de escore de granulação no D10, em relação aos D0 e D1.

3.2 Análise molecular

3.2.1 Interleucinas TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10

Não foi observada diferença estatística entre grupos na análise quantitativa de interleucinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-6 e IL-1β no décimo dia de tratamento. O grupo HA atingiu maiores índices de interleucina anti-inflamatória IL-10 em relação ao GC ($p < 0,05$).

3.2.2 TGF-β1 e CD68

Não houve diferença estatística entre grupos de tratamento ($p > 0,05$).

Apesar de não significativo, nota-se elevação gradual da concentração de CD68 de acordo com o aumento da dose do MC-CTM; seguido de maior valor numérico no grupo HA, e menor no GC. Tal correlação não foi observada em TGF-β1.

4 DISCUSSÃO

4.1 Análises clínicas

4.1.1 Velocidade de contração

O estudo de Joseph et al. (2020) [9] demonstrou diferença na velocidade de contração de feridas experimentais em porquinhos da índia tratados com MC-CTM a partir do 14º dia [9]. Em outro trabalho com ratos, foi relatado que o grupo tratado com MC-CTM obteve cicatrização completa em menor tempo (média de 20 dias no grupo MC-CTM x 25 dias no grupo controle) [14]. Sabzevari *et al.* (2020), similar ao presente estudo, avaliaram a eficácia de hidrogel com alginato enriquecido com MC-CTM no tratamento de feridas em ratos, e reportaram menor área de lesão no grupo tratado com MC-CTM desde o 7º até o 21º dia de tratamento [15]. Portanto, a ausência de diferença na contração das feridas entre os grupos experimentais distingue-se da literatura neste estudo.

Ratos são descritos como uma espécie de “pele solta” [22]. Em feridas experimentais, independentemente do formato pretendido, seu formato final e tamanho serão diretamente influenciados pelas forças elásticas da pele remanescente, que contraem de acordo com as linhas de tensão do tecido [23]. Este fenômeno explica a diferença de tamanhos das feridas observado entre os animais, inclusive a ocorrência de aumento da área de algumas feridas nos primeiros dias. Entretanto, como esse aumento no D3 em relação ao D1 só foi significativo no grupo sem tratamento, o presente estudo sugere que os tratamentos instituídos podem ter influenciado positivamente no processo cicatricial inicial, sobretudo por meio da hidratação do leito que o hidrogel promove, bem como um microambiente favorável à migração celular [24].

4.1.2 Formação de crosta

O fato dos grupos HA e MC20 apresentarem menor formação de crosta

em comparação ao grupo que não recebeu tratamento tópico (exceto limpeza diária) no 10º dia foi considerado vantagem clínica para estes tratamentos. Sabe-se que a formação exacerbada de crosta é indesejada por atrapalhar a cicatrização [25], sendo um fenômeno comumente observado em feridas desidratadas e não tratadas topicamente [25,26], o que corrobora aos resultados observados.

No presente estudo, o grupo tratado com HA obteve resultado clínico similar ao grupo de mesma formulação acrescida de MC-CTM a 20%. Não foram identificados outros estudos que avaliaram o papel de MC-CTM na formação de crosta em feridas.

4.1.3 Granulação

É descrito que o tratamento tópico com MC-CTM aumentou a densidade de vasos sanguíneos no tecido de granulação de feridas em ratos [13], porém não foram identificados estudos com MC-CTM que atribuíram escores clínicos para a qualidade de granulação de feridas experimentais. No presente estudo, todos os grupos de tratamento demonstraram aspecto de granulação similar. A ocorrência de maiores escores de granulação a partir do terceiro dia, observado em todos os grupos, é compatível com o esperado da fase proliferativa [3].

Apesar de não representar diferença entre grupos, na análise de comportamento evolutivo intragrupo nota-se que feridas tratadas com maiores concentrações de MC-CTM (MC10 e MC20) granularam precocemente (D3 = D10), enquanto o grupo controle o fez mais de forma mais tardia (D7 = D10). Este resultado sugere um mecanismo do MC-CTM a favor da granulação nas fases iniciais da cicatrização (inflamatória/proliferativa). Levanta-se ainda a hipótese de que, devido ao rato saudável possuir excelente potencial de cicatrização em função de suas características anatômicas e fisiológicas [22], o controle empregado por não ter sido eficiente em demonstrar as diferenças entre tratamentos.

4.1.4 Exsudação e Edema

A ocorrência de exsudação e edema são comuns às fases inicias de

cicatrização, devido ao aumento da permeabilidade vascular durante o processo inflamatório [2]. Até o momento, não há relatos de estudos que avaliaram o papel de MC-CTM em reduzir clinicamente a exsudação e o edema de feridas tratadas topicamente, embora Sabzevari et al. (2020) sugiram que a associação de MC-CTM com hidrogel e alginato seja eficaz em absorver o exsudato de feridas [15]. No presente estudo, o emprego tópico de MC-CTM não interferiu nestas variáveis clínicas.

A ocorrência de aumento do edema dos bordos da lesão observado no D1 em todos os grupos, com redução no D3; bem como a maior exsudação no dia da criação da ferida (D0) em relação ao D1, correspondem à evolução esperada do processo fisiológico de cicatrização [3]. Edema em grandes proporções está relacionado a um pior prognóstico [2], o que não foi observado em nenhum grupo de tratamento.

4.2 Análises moleculares

4.2.1. Citocinas: mediadoras da inflamação

4.2.1.1 TNF-α

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) é uma citocina produzida por macrófagos [27] que exerce papel imunológico fundamental em feridas agudas ao favorecer o processo inflamatório inicial, auxiliar na limpeza de *debris* e promover cicatrização tecidual [28]. Entretanto, exposição prolongada a altos níveis de TNF-α contribui para o atraso e estagnação da cicatrização, como é observado em feridas crônicas de pacientes diabéticos [29].

Em feridas agudas, a redução da expressão de TNF-α na fase proliferativa e de remodelamento (7-14 dias) é considerada vantajosa, pois implica em atividade anti-inflamatória do tratamento empregado e está correlacionada com melhor desempenho clínico em ratos [30]. É descrito que o MC-CTM derivado de cordão umbilical humano possui potencial de suprimir TNF-α, e consequentemente, acelerar a cicatrização de feridas agudas em ratos [19]. Microvesículas derivadas de CTM também atuam na prevenção da superexpressão de citocinas pro-inflamatórias, como TNF-α, IL-1B e IL-6 [31]. Contrariamente, no presente estudo, o tratamento com MC-CTM derivadas de

células adiposas viscerais caninas a 5, 10 e 20% não atuou na regulação dos níveis de TNF-α das feridas em ratos no décimo dia.

4.2.1.2 IL-6

A interleucina-6 (IL-6) é integrante da família de citocinas pró-inflamatórias, e tem papel de induzir a expressão de diversas proteínas responsáveis pela inflamação aguda [32]. Durante a fase inflamatória da cicatrização de feridas, essa interleucina é secretada por macrófagos, queratinócitos e neutrófilos; e atua na quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos para o leito da ferida, bem como na proliferação de fibroblastos [33].

A presença de IL-6 no MC-CTM utilizado no presente estudo foi confirmada por meio de espectrometria de massa, o que corrobora a outros autores que também demonstraram sua presença no MC-CTM obtido de diversas origens celulares, incluindo tecido adiposo humano [9,34,35]. Os níveis de expressão relativa destas citocinas na cicatrização de feridas ainda não está claro [18], embora autores apontem para a hipótese de que o IL-6 secretado por CTMs esteja envolvido em processos imunorregulatórios via linfócitos T [36].

Para investigar o papel da IL-6 derivada de MC-CTM na cicatrização, Yew et al. (2011) [34] compararam a evolução de grupos tratados com MC puro x MC acrescido de IL-6 x MC pré-tratado com anticorpos anti-IL-6. Concluiu-se que a adição de IL-6 aumentou a contração das feridas comparado com os grupos com MC puro [34]. Em contraste, o pré-tratamento com anticorpos anti-IL-6 reduziram a taxa de contração das feridas, piorando a cicatrização e a densidade capilar comparados ao grupo com MC puro [34]. Este estudo concluiu que IL-6 exerce importante papel no efeito estimulatório do MC-CTM na cicatrização in vivo e angiogênese [34].

Um nível apropriado de inflamação é essencial para a cicatrização, enquanto níveis elevados persistentes de citocinas pró-inflamatórias resultam em uma ferida que não cicatriza [37]. Em pacientes diabéticos, citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 participam da formação da inflamação tecidual que resulta em resposta imune desregulada, prolongando a cicatrização [38].

Tratamentos que reduzam a expressão de IL-6 foram correlacionados à atividade anti-inflamatória e melhora da cicatrização, em ratos saudáveis e diabéticos, em feridas com 3 a 14 dias de evolução [30,39]. Em cultura celular de queratinócitos e fibroblastos dermais, o MC-CTM derivado de tecido adiposo humano foi capaz de inibir a expressão de IL-6, de modo dose-dependente [40].

No presente estudo, embora a presença de IL-6 tenha sido constatada no MC-CTM obtido, o tratamento *in vivo* nas três concentrações testadas não foi capaz de interferir na atividade inflamatória via IL-6 em relação aos grupos tratados com HA e feridas sem tratamento.

4.2.1.3 IL-1β

A interleucina pró-inflamatória IL-1β desempenha papel na sustentação do estado inflamatório persistente e estagnação da cicatrização [41]. Elevados índices de IL-1β inibem a proliferação e migração celular, e são identificados em feridas crônicas de pacientes diabéticos [42]. A redução da expressão de IL-1β em feridas com 14 dias de evolução foi associada à melhor desempenho clínico de cicatrização [43].

A utilização tópica de MC-CTM oriundo de cordão umbilical humano reduziu a expressão da interleucina IL-1 em feridas experimentais em ratos, além de demonstrar cicatrização mais acelerada [19]. No presente estudo, entretanto, o tratamento tópico com MC-CTM nas concentrações de 5, 10 e 20% não atuou na modulação da inflamação via IL-1β nas feridas após 10 dias de evolução.

4.2.1.4 IL-10

A interleucina 10 (IL-10) é um mediador anti-inflamatório chave na proteção do organismo contra respostas exacerbadas diante de um patógeno, possuindo importante papel na cicatrização [44,45]. Em feridas, a IL-10 é produzida por linfócitos T, macrófagos e queratinócitos; e possui papel de inibir macrófagos e neutrófilos, bem como reduzir a atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β e IL-6 [33].

A IL-10 também possui função específica de recrutamento de células

progenitoras endoteliais para o leito da ferida durante a fase proliferativa, associado ao aumento de densidade capilar e epitelização acelerada em feridas em ratos tanto diabéticos quanto saudáveis [46]. Superexpressão de IL-10 entre o 7º e 14º dia foi relacionada à maior eficiência de cicatrização em ratos [30,47].

A presença de IL-10 foi demonstrada em MC derivado de CTM cultivadas sob hipóxia [45]. O MC-CTM oriundo de tecido adiposo humano demonstrou aumento na secreção de IL-10 em cultura celular de linfócitos T [36]. Não foram identificados trabalhos que avaliaram *in vivo* a atividade do MC-CTM em regular IL-10 na cicatrização de feridas. No presente estudo o MC-CTM não demonstrou mecanismo via IL-10 nas feridas em relação ao tratamento padrão (HA) e GC, embora o tratamento com HA puro tenha sido capaz de promover atividade anti-inflamatória em relação ao GC, no décimo dia.

4.2.2 TGFβ-1: sinalizador de reparo tecidual

O fator de crescimento transformador beta-1 (TGFβ-1) é considerado um mediador chave para a cicatrização de feridas, com participação ativa em todas suas etapas [30,48]. Células presentes no leito da ferida, como macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos secretam TGFβ-1, que atua diretamente em processos como angiogênese, produção de matriz extracelular e diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, os principais responsáveis pela contração da ferida [14,30,33].

É descrita a presença de TGFβ-1 no MC-CTM oriundo de tecido adiposo humano [49], o que corrobora ao presente estudo com a identificação deste fator no MC-CTM obtido de células de gordura visceral canina, analisado por meio de espectrometria de massa.

Altos índices de TGFβ-1 na fase proliferativa da cicatrização estão relacionados clinicamente à melhor formação de tecido de granulação e maior neovascularização local [30], bem como aumento da deposição de colágeno [9]. O tratamento de feridas com hidrogel enriquecido com exossomas de CTM aumentou a expressão de TGFβ-1 em feridas crônicas de ratos diabéticos, além de demonstrar melhor desempenho clínico de cicatrização [17]. Outro

estudo demonstrou que o tratamento de feridas agudas experimentais em ratos utilizando MC-CTM oriundas de galhadas de veados também provocou aumento dos índices de TGFβ-1, bem como cicatrização significativamente mais acelerada [14]. Em contrapartida, o MC-CTM oriundo de tecido adiposo visceral canino não demonstrou atividade pró-cicatrização via TGFβ-1 em nenhuma das três concentrações testadas, no décimo dia de avaliação.

4.2.3 CD68: atividade de macrófagos

CD68 é uma glicoproteína fortemente glicosilada altamente expressa em macrófagos [50], um tipo celular que atua em todas as fases da cicatrização [51]. Este marcador é geralmente empregado na análise de tecidos inflamados [50]. Elevados índices de CD68 também estão relacionados a um aumento do infiltrado de células imunológicas em feridas [52,53].

A depender do estímulo do microambiente, macrófagos podem ser polarizados em dois subtipos diferentes em fenótipo e função, a saber, M1 e M2 [54]. Ambos estão relacionados à resposta inflamatória, porém, enquanto macrófagos M1 regem processos pró-inflamatórios, macrófagos M2 geralmente exercem atividade anti-inflamatória [55]. O fenótipo dos macrófagos naturalmente sofrem alterações durante a cicatrização, de um estado pró-inflamatório M1 nas fases iniciais, para um estágio menos inflamatório pró-cicatrização M2 nas etapas mais tardias da cicatrização [54,56]. Feridas em pacientes diabéticos são caracterizadas pelo aumento de macrófagos M1 e redução de fatores anti-inflamatórios secretados por macrófagos M2 [51]. O marcador CD68 permite identificar macrófagos nos tecidos, porém não é capaz de caracterizar seus subtipos [56–58].

Em humanos, é descrito aumento de células CD68 em feridas crônicas, como ocorre em úlceras venosas profundas em comparação com a pele íntegra [59]. Tratamentos que reduziram os níveis de macrófagos CD68 em feridas em ratos diabéticos foram correlacionados com melhor resultado clínico [60].

Já no contexto de feridas agudas, um estudo com ratos saudáveis demonstrou que o aumento na expressão de CD68 ao terceiro dia foi atribuída

como vantagem ao tratamento empregado, por acelerar a fase inflamatória do processo de cicatrização [61]. Sabe-se que macrófagos exercem um importante papel na cicatrização ao expressar mediadores inflamatórios como TNF-α, IL-6 e IL-1β [1]. Além disso, macrófagos desempenham função na angiogênese [61]. Em neoplasias, por exemplo, é descrita correlação positiva direta entre expressão de CD68 e microdensidade vascular [62].

É descrito que o tratamento com MC-CTM atua no recrutamento de macrófagos para o leito da ferida [18]. Terapia com MC-CTM oriunda de medula óssea em modelos de feridas em camundongos demonstrou aumento de células CD68 nas feridas no sétimo dia de tratamento [18]. No presente estudo, entretanto, o tratamento com MC-CTM proveniente de células adiposas de cão não atuou significativamente no recrutamento de macrófagos $CD68^{+}$ no leito das feridas em ratos saudáveis ao décimo dia.

4.3 Fatores potencialmente associados aos resultados obtidos

O método de cultura empregado na obtenção do MC-CTM parece influenciar no tipo de secretoma obtido [6,63–65]. Tanto a qualidade de expansão celular [63] quanto as habilidades secretórias de CTM oriundas de tecido adiposo são ampliadas em meio hipóxia [64]. O MC-CTM proveniente de cultura celular sob hipóxia promoveu maior síntese de colágeno, migração de fibroblastos e liberação de VEGF; bem como melhor desempenho na redução da área de feridas experimentais, em comparação ao MC-CTM obtido em cultura de normóxia [6,64]. No presente estudo, CTM foram cultivadas em meio de normóxia, porém com com restrição de nutrientes, técnica esta que possui potencial de alterar a expressão gênica de CTM [65], embora a metodologia de seu emprego como melhoradora de secretoma para o uso terapêutico de MC-CTM ainda necessite maior elucidação.

Poucas informações sobre a dose necessária de MC-CTM para tratamento de feridas está disponível. Ao conhecimento dos autores, o presente estudo foi o primeiro a utilizar baixas concentrações (5%, 10% e 20%) topicamente em feridas, que podem não ter sido suficientes para observação de atividade biológica significativa. Na modalidade *in vitro*, um estudo avaliou

MC-CTM a 50% e 100% em cultura celular de fibroblastos dermais e queratinócitos, e observou que a redução do nível de espécies reativas de oxigênio, a secreção de metaloproteinases e a diminuição de interleucinas inflamatórias ocorreram de modo dose-dependente; o que sugere mecanismo de ação conforme a concentração proteica empregada [40]. Este achado corrobora a outros autores que descrevem que o tratamento tópico de feridas com fatores de crescimento isolados também atua de modo tempo e dose-dependentes [66].

Fatores de crescimento são moléculas sensíveis, passíveis de hidrólise [66]. Para seu emprego terapêutico, faz-se necessário um sistema carreador resistente a proteólise e que permita estabilização e liberação controlada destes bioativos no leito de uma ferida [67]. Diversos estudos apontam para o hidrogel como boa opção de carreador de biomoléculas, inclusive como promotor de liberação lenta de MC em feridas [68,69]. Entretanto, outros fatores como método de armazenamento e tempo de validade do produto devem ser considerados; e estudos de viabilidade que padronizem estas variáveis se fazem necessários.

5 CONCLUSÃO

Feridas sem tratamento, tratadas com hidrogel-alginato puro ou enriquecido com MC-CTM nas concentrações de 5, 10 e 20% obtiveram desempenho de cicatrização similar. Embora não reflita diferença estatística entre grupos, foi observado que feridas tratadas com maiores concentrações de MC-CTM (10% e 20%) tenderam a granular mais precocemente. As formulações de hidrogel-alginato puro e acrescido de MC-CTM a 20% foram eficazes na redução da formação de crosta em relação ao grupo não tratado. O MC-CTM nas doses estudadas não demonstrou atividade anti-inflamatória via TNF-α, IL-6, IL-1β e IL-10, nem mecanismo pró-regenerativo via TGFβ-1 e CD68, no décimo dia de avaliação. As baixas concentrações de MC-CTM associada às condições do presente estudo podem ter sido insuficientes para acelerar a cicatrização, promover melhor desempenho clínico e demonstrar alterações das vias de sinalização molecular.

CONFLITO DE INTERESSES

O produto tópico final utilizado na realização deste trabalho foi desenvolvido e fornecido pela empresa OMICS Biotecnologia Animal.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

[1] Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. Physiol Rev 2019;99:665–706. https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017.

[2] Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. J Int Med Res 2009;37:1528–42. https://doi.org/10.1177/147323000903700531.

[3] Balsa IM, Culp WTN. Wound Care. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2015;45:1049–65. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009.

[4] Diegelmann R F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Front Biosci 2004;9:283. https://doi.org/10.2741/1184.

[5] Okano H, Sipp D. New trends in cellular therapy. Development 2020;147:dev192567. https://doi.org/10.1242/dev.192567.

[6] Lee EY, Xia Y, Kim W-S, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, et al. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. Wound Repair Regen 2009;17:540–7. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x.

[7] Watt FM, Hogan and BLM. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. Science 2000;287:1427–30. https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1427.

[8] Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. Int J Mol Sci 2017;18:1852. https://doi.org/10.3390/ijms18091852.

[9] Joseph A, Baiju I, Bhat IA, Pandey S, Bharti M, Verma M, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. J Cell Physiol 2020;235:5555–69. https://doi.org/10.1002/jcp.29486.

[10] Im G-B, Kim YH, Kim Y-J, Kim S-W, Jung E, Jeong G-J, et al. Enhancing

the Wound Healing Effect of Conditioned Medium Collected from Mesenchymal Stem Cells with High Passage Number Using Bioreducible Nanoparticles. Int J Mol Sci 2019;20:4835. https://doi.org/10.3390/ijms20194835.

[11] Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. Cells 2019;8:467. https://doi.org/10.3390/cells8050467.

[12] Ansari MM. Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing. J Stem Cell Res Ther 2013;3. https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000141.

[13] Payushina OV, Butorina NN, Sheveleva ON, Domaratskaya EI. Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound. Bull Exp Biol Med 2018;165:572–5. https://doi.org/10.1007/s10517-018-4215-6.

[14] Rong X, Chu W, Zhang H, Wang Y, Qi X, Zhang G, et al. Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats. Stem Cell Res Ther 2019;10:326. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1457-9.

[15] Sabzevari R, Roushandeh AM, Mehdipour A, Alini M, Roudkenar MH. SA/G hydrogel containing hCAP-18/LL-37-engineered WJ-MSCs-derived conditioned medium promoted wound healing in rat model of excision injury. Life Sci 2020;261:118381. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118381.

[16] Gao M, Zhang J, Wang JZ, Liu Y, Zhang X, Shi Y. [Effects of hypoxia-pretreated rat adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium on wound healing of rats with full-thickness defects]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin J Burns 2020;36:803–12. https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501120-20200508-00258.

[17] Yang J, Chen Z, Pan D, Li H, Shen J. Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. Int J Nanomedicine 2020;Volume 15:5911–26. https://doi.org/10.2147/IJN.S249129.

[18] Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. PLoS ONE 2008;3:e1886. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001886.

[19] Sun J, Zhang Y, Song X, Zhu J, Zhu Q. The Healing Effects of Conditioned Medium Derived from Mesenchymal Stem Cells on Radiation-Induced Skin Wounds in Rats. Cell Transplant 2019;28:105–15. https://doi.org/10.1177/0963689718807410.

[20] Johnson RA, Wichern DW. Applied multivariate statistical analysis. 6th

ed. Upper Saddle River, N.J: Pearson Prentice Hall; 2007.

[21] Norman GR, Streiner DL. Biostatistics: the bare essentials. 3rd ed. Shelton, Conn.: People's Medical Pub. House; 2008.

[22] Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: A review. Wound Repair Regen 2004;12:591–9. https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x.

[23] Montandon D, D'andiran G, Gabbiani G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. Clin Plast Surg 1977;4:325–46.

[24] Francesko A, Petkova P, Tzanov T. Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management. Curr Med Chem 2019;25:5782–97. https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246.

[25] Knudsen EA, Snitker G. Wound healing under plastic-coated pads. Acta Derm Venereol 1969;49:438–41.

[26] Kweon D-K, Song S-B, Park Y-Y. Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. Biomaterials 2003;24:1595–601. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00566-5.

[27] Yamazaki M. [TNF-alpha]. Gan To Kagaku Ryoho 1994;21:2679–87.

[28] Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. Biomolecules 2021;11:700. https://doi.org/10.3390/biom11050700.

[29] Xu F, Zhang C, Graves DT. Abnormal Cell Responses and Role of TNF-α in Impaired Diabetic Wound Healing. BioMed Res Int 2013;2013:1–9. https://doi.org/10.1155/2013/754802.

[30] Pereira Beserra F, Sérgio Gushiken LF, Vieira AJ, Augusto Bérgamo D, Luísa Bérgamo P, Oliveira de Souza M, et al. From Inflammation to Cutaneous Repair: Topical Application of Lupeol Improves Skin Wound Healing in Rats by Modulating the Cytokine Levels, NF-κB, Ki-67, Growth Factor Expression, and Distribution of Collagen Fibers. Int J Mol Sci 2020;21:4952. https://doi.org/10.3390/ijms21144952.

[31] Jaimes Y, Naaldijk Y, Wenk K, Leovsky C, Emmrich F. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Modulate Lipopolysaccharides-Induced Inflammatory Responses to Microglia Cells. Stem Cells 2017;35:812–23. https://doi.org/10.1002/stem.2541.

[32] Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. Oncology 2020;98:131–7. https://doi.org/10.1159/000505099.

[33] Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. Life 2021;11:665. https://doi.org/10.3390/life11070665.

[34] Yew T-L, Hung Y-T, Li H-Y, Chen H-W, Chen L-L, Tsai K-S, et al. Enhancement of Wound Healing by Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium: The Paracrine Factors and p38 MAPK Activation. Cell Transplant 2011;20:693–706. https://doi.org/10.3727/096368910X550198.

[35] Laksmitawati DR, Widowati W, Noverina R, Ayuningtyas W, Kurniawan D, Kusuma HSW, et al. Production of Inflammatory Mediators in Conditioned Medium of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (ATMSC)-Treated Fresh Frozen Plasma. Med Sci Monit Basic Res 2022;28. https://doi.org/10.12659/MSMBR.933726.

[36] Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, et al. Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion. J Biomed Biotechnol 2012;2012:1–8. https://doi.org/10.1155/2012/295167.

[37] Qi L, Zhang C, Wang B, Yin J, Yan S. Progress in Hydrogels for Skin Wound Repair. Macromol Biosci 2022;22:2100475. https://doi.org/10.1002/mabi.202100475.

[38] Tu C, Lu H, Zhou T, Zhang W, Deng L, Cao W, et al. Promoting the healing of infected diabetic wound by an anti-bacterial and nano-enzyme-containing hydrogel with inflammation-suppressing, ROS-scavenging, oxygen and nitric oxide-generating properties. Biomaterials 2022;286:121597. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121597.

[39] Ban E, Jeong S, Park M, Kwon H, Park J, Song EJ, et al. Accelerated wound healing in diabetic mice by miRNA-497 and its anti-inflammatory activity. Biomed Pharmacother 2020;121:109613. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109613.

[40] Li L, Ngo HTT, Hwang E, Wei X, Liu Y, Liu J, et al. Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts. Int J Mol Sci 2019;21:49. https://doi.org/10.3390/ijms21010049.

[41] Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ. Blocking Interleukin-1β Induces a Healing-Associated Wound Macrophage Phenotype and Improves Healing in Type 2 Diabetes. Diabetes 2013;62:2579–87. https://doi.org/10.2337/db12-1450.

[42] Dai J, Shen J, Chai Y, Chen H. IL-1β Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. Mediators Inflamm 2021;2021:1–10. https://doi.org/10.1155/2021/6645766.

[43] Mohammed HA, Mohammed SAA, Khan O, Ali HM. Topical Eucalyptol Ointment Accelerates Wound Healing and Exerts Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in Rats' Skin Burn Model. J Oleo Sci 2022;71:1777–88. https://doi.org/10.5650/jos.ess22214.

[44] Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. J Exp Med 2020;217:e20190418. https://doi.org/10.1084/jem.20190418.

[45] Du L, Lv R, Yang X, Cheng S, Ma T, Xu J. Hypoxic conditioned medium of placenta-derived mesenchymal stem cells protects against scar formation. Life Sci 2016;149:51–7. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.050.

[46] Short WD, Steen E, Kaul A, Wang X, Olutoye OO, Vangapandu HV, et al. IL-10 promotes endothelial progenitor cell infiltration and wound healing via STAT3. FASEB J 2022;36. https://doi.org/10.1096/fj.201901024RR.

[47] Kim BE, Goleva E, Hall CF, Park SH, Lee UH, Brauweiler AM, et al. Skin Wound Healing Is Accelerated by a Lipid Mixture Representing Major Lipid Components of Chamaecyparis obtusa Plant Extract. J Invest Dermatol 2018;138:1176–86. https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.039.

[48] Li J, Chou H, Li L, Li H, Cui Z. Wound healing activity of neferine in experimental diabetic rats through the inhibition of inflammatory cytokines and nrf-2 pathway. Artif Cells Nanomedicine Biotechnol 2020;48:96–106. https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1699814.

[49] Zhou B-R, Xu Y, Guo S-L, Xu Y, Wang Y, Zhu F, et al. The Effect of Conditioned Media of Adipose-Derived Stem Cells on Wound Healing after Ablative Fractional Carbon Dioxide Laser Resurfacing. BioMed Res Int 2013;2013:1–9. https://doi.org/10.1155/2013/519126.

[50] Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. Lab Invest 2017;97:4–13. https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116.

[51] Feng J, Dong C, Long Y, Mai L, Ren M, Li L, et al. Elevated Kallikrein-binding protein in diabetes impairs wound healing through inducing macrophage M1 polarization. Cell Commun Signal 2019;17:60. https://doi.org/10.1186/s12964-019-0376-9.

[52] Holzer-Geissler JCJ, Schwingenschuh S, Zacharias M, Einsiedler J, Kainz S, Reisenegger P, et al. The Impact of Prolonged Inflammation on Wound Healing. Biomedicines 2022;10:856. https://doi.org/10.3390/biomedicines10040856.

[53] Kwon YW, Heo SC, Jang IH, Jeong GO, Yoon JW, Mun J-H, et al. Stimulation of cutaneous wound healing by an FPR2-specific peptide agonist WKYMVm: WKYMVm-stimulated wound repair. Wound Repair Regen 2015;23:575–82. https://doi.org/10.1111/wrr.12315.

[54] Gao X, Lu C, Miao Y, Ren J, Cai X. Role of macrophage polarisation in skin wound healing. Int Wound J 2023:iwj.14119. https://doi.org/10.1111/iwj.14119.

[55] Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Eur J Pharmacol 2020;877:173090. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090.

[56] Klar AS, Michalak-Mićka K, Biedermann T, Simmen-Meuli C, Reichmann E, Meuli M. Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. Pediatr Surg Int 2018;34:129–35. https://doi.org/10.1007/s00383-017-4179-z.

[57] Barros MHM, Hauck F, Dreyer JH, Kempkes B, Niedobitek G. Macrophage Polarisation: an Immunohistochemical Approach for Identifying M1 and M2 Macrophages. PLoS ONE 2013;8:e80908. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080908.

[58] Brochhausen C, Schmitt VH, Mamilos A, Schmitt C, Planck CNE, Rajab TK, et al. Expression of CD68 positive macrophages in the use of different barrier materials to prevent peritoneal adhesions—an animal study. J Mater Sci Mater Med 2017;28:15. https://doi.org/10.1007/s10856-016-5821-3.

[59] Sutcliffe JES, Thrasivoulou C, Serena TE, Madden L, Richards T, Phillips ARJ, et al. Changes in the extracellular matrix surrounding human chronic wounds revealed by 2-photon imaging: second harmonic imaging of chronic wound extracellular matrix. Int Wound J 2017;14:1225–36. https://doi.org/10.1111/iwj.12789.

[60] Song H, Xu Y, Chang W, Zhuang J, Wu X. Negative pressure wound therapy promotes wound healing by suppressing macrophage inflammation in diabetic ulcers. Regen Med 2020;15:2341–9. https://doi.org/10.2217/rme-2020-0050.

[61] Salim MN, Masyitha D, Harris A, Balqis U, Iskandar CD, Hambal M, et al. Anti-inflammatory activity of Jatropha curcas Linn. latex in cream formulation on CD68 expression in mice skin wound. Vet World 2018;11:99–103. https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.99-103.

[62] El-Rouby DH. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas: Macrophages and angiogenesis in oral cancer. J Oral Pathol Med 2010;39:559–64. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00879.x.

[63] Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, Da Silva CL, Cabral JMS. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. J Cell Physiol 2009:n/a-n/a. https://doi.org/10.1002/jcp.21987.

[64] Wiśniewska J, Słyszewska M, Stałanowska K, Walendzik K, Kopcewicz

M, Machcińska S, et al. Effect of Pig-Adipose-Derived Stem Cells' Conditioned Media on Skin Wound-Healing Characteristics In Vitro. Int J Mol Sci 2021;22:5469. https://doi.org/10.3390/ijms22115469.

[65] Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, Chudickova M, Koci Z, Turnovcova K, et al. A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. Sci Rep 2020;10:4290. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z.

[66] Liu T, Li HH, Sheng JJ, Zhu SH. [Advances in the research of delivery system of growth factor and the gene for promoting wound healing]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin J Burns 2018;34:566–9. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.08.018.

[67] Shakhakarmi K, Seo J-E, Lamichhane S, Thapa C, Lee S. EGF, a veteran of wound healing: highlights on its mode of action, clinical applications with focus on wound treatment, and recent drug delivery strategies. Arch Pharm Res 2023. https://doi.org/10.1007/s12272-023-01444-3.

[68] Zhang Y, Zheng Y, Shu F, Zhou R, Bao B, Xiao S, et al. In situ-formed adhesive hyaluronic acid hydrogel with prolonged amnion-derived conditioned medium release for diabetic wound repair. Carbohydr Polym 2022;276:118752. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118752.

[69] Brumberg V, Astrelina T, Malivanova T, Samoilov A. Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings. Biomedicines 2021;9:1235. https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235.

CAPÍTULO III

Trabalho a ser enviado para a revista “Topics in Companion Animal Medicine”, seguindo as seguintes normas: https://www.elsevier.com/journals/topics-in-companion-animal-medicine/1938-9736/guide-for-authors.

Uso de meio condicionado de células-tronco mesenquimais em hidrogel com alginato para cicatrização de feridas em cães

Sofia Saggioro REZK, Cláudia Valéria Seullner BRANDÃO

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu, São Paulo 18616-681, Brasil

Corresponding author: Cláudia Valéria Seullner Brandão

Email:valeria.brandao@unesp.br

USE OF STEM CELL CONDITIONED MEDIUM IN ALGINATE-BASED HYDROGEL FOR WOUND HEALING IN DOGS

ABSTRACT

Mesenchymal stem cell conditioned medium (MSC-CM) contains growth factors and cytokines obtained in cell culture, and constitute a promising approach in many diseases, including wound healing. Although there is extensive evidence of clinical benefit in studies with experimental wounds in rodents; to date, no clinical trials with wounds in dogs that aimed at veterinary use have been identified. Under the hypothesis of healing improvement, the present study evaluated the performance of an alginate-based hydrogel (AH) enriched with MSC-CM at 10%, compared with standard AH treatment in 14 dogs that presented to the Veterinary Hospital with open wounds. The owners were instructed to perform daily wound dressing changes with given topic product. No adverse drug reactions were observed. Wound contractions were similar in MSC-CM and AH groups, at 4º, 14º and 30º days. Clinical evaluations did not demonstrate differences between groups in terms of granulation tissue, epithelization, exudation, oedema, bleeding, crust formation, necrosis, and infection scores. To the knowledge of the authors, this is the first clinical trial with topical MSC-CM in dog wounds. We hypothesize that 10% concentration was insufficient to enhance wound healing. Further studies standardizing protein dose, frequency of use and improvement of drug delivery system may contribute to the knowledge of benefits and limitations of this therapeutic approach in veterinary medicine.

Key words: secretome, wound dressing, contraction, crust, granulation.

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de feridas é um processo complexo que requer atuação sincronizada de uma série de eventos moleculares [1]. Com a evolução da medicina, a cada ano novos mediadores são descobertos e o entendimento sobre esse processo aumenta [2]. Diversos fatores atuam contra ou a favor da evolução fisiológica do processo de cicatrização [3], como presença de corpo estranho, infecção, isquemia, edema, aumento da pressão tecidual, anormalidade de fatores de crescimento [2]; bem como condições sistêmicas como doenças endócrinas, idade avançada [2], níveis séricos de proteína baixos [4], tratamentos com corticoides [3], quimioterapia e radioterapia [5]. Nestes casos, a seleção de terapia que promova completa cicatrização de maneira rápida e com mínima formação de tecido cicatricial ainda consiste em um desafio [6].

A terapia celular vem sendo cada vez mais utilizada em diversas comorbidades, e a cicatrização de feridas é um dos alvos de estudo [7]. A princípio, o mecanismo de ação da aplicação de células-tronco mesenquimais foi atribuído à sua capacidade de migração e diferenciação, entretanto, posteriormente foi observado que seu maior benefício clínico se dá por meio dos fatores bioativos que as células secretam em seu microambiente [8,9].

A utilização do meio condicionado de células tronco mesenquimais (MC-CTM), rico em diversos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, tem se mostrado vantajosa em relação à terapia celular tradicional devido ao efeito terapêutico similar, porém com vantagens de armazenamento e manuseio do produto tópico [10].

A associação de hidrogel com alginato é amplamente utilizada no manejo de feridas há décadas devido a sua alta biocompatibilidade e boa capacidade de hidratação do leito juntamente com absorção de fluidos [11]. A utilização de bandagens com hidrogel é indicada desde o início da fase inflamatória, e o alginato provê benefícios clínicos até a fase de reparação tecidual [3].

Além disso, a associação hidrogel-alginato compõe uma boa opção

para o carreamento de medicações para o leito da ferida [11]. É descrita a utilização de hidrogel como sistema carreador de MC-CTM para cicatrização de feridas em pés diabéticos em humanos, onde além de suas boas propriedades biomecânicas, foi demonstrado efeito de liberação prolongada do MC-CTM para o leito da ferida [11].

Diversos estudos comprovaram a eficácia da utilização tópica de MC-CTM em feridas em ratos [12–18], porém até o momento não foi identificado nenhum ensaio clínico com feridas em cães. A hipótese do presente estudo é que o tratamento tópico com hidrogel-alginato enriquecido com MC-CTM a 10% promoverá cicatrização precoce e evolução clínica favorável nas feridas em cães, objetivando seu emprego na medicina veterinária.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

O presente estudo possui caráter prospectivo, randomizado e duplo-cego; contendo feridas de ocorrência natural em cães levados à atendimento médico veterinário.

2.2 Manipulação do produto tópico

O MC-CTM foi obtido em cultura celular de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo visceral canino (depósito de patente código BR 10 2022 016233-6) com concentração proteica total de 2 mg/ml. O concentrado proteico foi submetido a espectrometria de massa e identificados o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF-β), interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e proteínas ligantes do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFPB).

O MC-CTM foi manipulado na concentração de 10% em hidrogel acrescido de alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1%. A concentração proteica do produto final é de 200 µg/ml.

2.3 Seleção das feridas

O projeto obteve aprovação do comitê de ética local (protocolo CEUA 0232/2021). Foram selecionados cães levados para atendimento no Hospital

Veterinário que apresentavam feridas traumáticas em fase inflamatória ou proliferativa, candidatas à cicatrização por segunda intenção, sem suspeita de malignidade, em topografia distante de mucosas, sem exposição óssea ou visceral, após devido debridamento e retirada de corpos estranhos (ex.: larvas de miíase) quando necessário.

Não foram incluídos no estudo pacientes com dermatopatias e/ou endocrinopatias previamente diagnosticadas, e feridas cuja causa base não podia ser tratada plenamente, como úlceras de pressão decorrentes de locomoção prejudicada. Oito feridas foram removidas do estudo, de acordo com os seguintes fatores de exclusão: tratamento não realizado da forma proposta ou alteração da terapia tópica pelo tutor, contrariando orientações recebidas; emprego de corticoides orais durante o tratamento, ou quando o acompanhamento da evolução clínica foi interrompido.

2.4 Orientação aos tutores

Tutores de cães apresentando feridas com critérios de inclusão no projeto, após assinar termo de ciência, foram instruídos com demonstração e também por escrito em relação ao manejo diário da ferida, a ser realizado a cada 24 horas (Apêndice A). Este consistiu em limpeza com solução fisiológica e auxílio de gaze para remoção de sujidades, secagem e aplicação de fina camada do produto fornecido; seguida de curativo do tipo semioclusivo com a primeira camada de contato constituída por atadura antiaderente tipo Rayon©, compressas de gaze como camada absorvente e finalização com atadura crepe e esparadrapo.

Os proprietários também foram instruídos em relação ao armazenamento do produto em geladeira, emprego do colar elizabetano o tempo todo no animal, bem como a manter o cão em local limpo, seco, e isolado de outros animais durante o período de tratamento.

2.5 Grupos experimentais

Dois grupos experimentais foram estabelecidos. Sete cães foram distribuídos aleatoriamente em cada grupo; e cada animal continha apenas uma ferida sob avaliação. O grupo MC recebeu tratamento tópico diário com

formulação de MC-CTM a 10% em meio hidrogel acrescido de alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1% (concentração proteica total de 200 µg/ml). O grupo HA foi tratado da mesma forma, porém com formulação contendo apenas hidrogel acrescido de alginato de sódio a 2% e ácido ascórbico a 0,1%. O tratamento foi empregado na modalidade duplo-cega (ao proprietário do animal e médico veterinário avaliador).

2.6 Momentos de avaliação e variáveis estudadas

Foram estabelecidos momentos estratégicos para avaliação clínica das feridas, a saber: dia do início do tratamento (D0), quarto (D4), décimo quarto (D14) e trigésimo (D30) dia de evolução.

Dos animais com critérios de inclusão no estudo foram coletadas informações sobre raça, idade, peso do animal, localização da ferida (região dorsal, ventral, membro ou cervical) e tempo decorrido desde o trauma. Cada ferida recebeu também uma classificação de acordo com sua origem, categorizada em quatro possibilidades, a saber: por mordedura, trauma corto-contuso, miíase ou desconhecida. Feridas alocadas na categoria “miíase” corresponderam a lesões de etiologia traumática que evoluíram com infestação de larvas histiófagas de dípteros, de forma a alterar a apresentação clínica da ferida.

A área da ferida (cm^2) em cada momento foi obtida por meio da análise de fotografia digital pelo *software* ImageJ®. Após definição da escala de cada fotografia, fazendo uso da imagem da régua ao mesmo nível da pele, as ferramentas *freehand selection* e *ROI (region of interest) manager* foram empregadas para contornar os bordos da ferida e determinar a área da região desenhada. A contração relativa *(% contração* = 1 – (área no dia de interesse [cm^2] / área no D0 [cm^2]) * 100) demonstra o grau de contração de cada ferida em cada momento de avaliação, de acordo com seu tamanho inicial.

A avaliação em todos os momentos também foi realizada pela atribuição de escores para as variáveis: exsudação, edema, hemorragia, granulação e crosta, com escores de 0 a 3 (0 – ausência; 1 – presença discreta; 2 – moderada; 3 – intensa); além de necrose e infecção, nos quais

foram atribuídos escores de 0 a 1 (0 – ausência; 1 – presença).

2.7 Análise estatística

Dados de descrição de casuística do estudo foram submetidos a análise estatística para verificação de homogeneidade entre grupos de tratamento. O peso dos cães foi submetido a teste t de Student para amostras independentes; enquanto idade e tempo desde o trauma foram submetidos a teste não-paramétrico de Mann-Whitney [19].

Os dados de avaliação clínica foram submetidos à técnica de análise de variância (ANOVA) não-paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn [20]. As análises foram realizadas sob duas perspectivas: 1) comparação entre grupos em cada momento de avaliação, com objetivo de identificar diferenças entre tratamentos nos determinados dias; e 2) comparação entre momentos dentro de cada grupo, visando estudar o perfil de evolução das feridas de um determinado tratamento. Para todas as análises, foi considerado um nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

3.1 Análise de casuística

Catorze cães seguiram os critérios de inclusão e foram selecionados para compor o *n* amostral. Os cães pesavam em média 14,3 kg (± 5,1 kg) e apresentavam idade de 6,2 (± 4,2) anos. O tempo desde o dia do trauma até início do tratamento variou de 1 dia a 45 dias (mediana de 2 dias), visto que apenas três animais (feridas F, L e M) foram levados à atendimento veterinário tardiamente (com mais de cinco dias desde o trauma). Nas categorias idade e tempo decorrente desde o trauma, a distribuição entre grupos foi homogênea ($p > 0,05$); no entanto, o grupo HA apresentou animais de maior peso (17,1 kg [± 3,8]) em relação ao grupo MC (11, 6 kg [± 5,1]).

Três raças foram descritas: sem raça definida (12; 85,7%), Yorkshire (1; 7,1%) e Blue Heeler (1; 7,1%); as duas últimas pertencentes ao grupo MC. As feridas foram classificadas em quatro categorias: por mordedura (5; 35,7%), trauma por objeto corto-contuso (5; 35,7%), miíase (3; 21,4%), e desconhecida

(1; 7,1%). Das três feridas alocadas na categoria miíase, uma era de etiologia por mordedura (grupo MC), e as demais de causa desconhecida (grupo HA).

Em se tratando da área absoluta das feridas no momento de inclusão no estudo, a média foi de 10,0 cm² (± 19,4), com mediana de 5,6 cm² (1,6; 77,2). Na distribuição dos cães entre os grupos, que ocorreu de maneira aleatória, o grupo HA constituiu-se por feridas significativamente maiores em seu tamanho inicial (mediana de 6,6 cm² [3,9; 77,2]), em relação ao grupo MC (mediana de 3,4 cm² [1,6; 6,6]) ($p < 0,05$).

3.2 Contração das feridas

Não foi observada diferença estatística na contração relativa das feridas entre os tratamentos, em nenhum momento de avaliação ($p > 0,05$). Em ambos os grupos, a contração das feridas foi significativa entre o D4 e o D30.

3.3 Avaliação clínica por escores

Não foi observada diferença estatística entre tratamentos para nenhum critério clínico, em nenhum dia de avaliação ($p > 0,05$). Analisando o comportamento evolutivo, no D30 em ambos os grupos, as feridas apresentaram regressão do tecido de granulação em relação ao D14, e também ao D4 no grupo HA. No D30 também houve em ambos os grupos aumento da epitelização em relação aos D0 e D4. O grupo MC evoluiu com redução significativa da exsudação no D14 e D30 em relação ao D4. O grupo MC apresentou menor edema no D30, em relação ao D0.

4 DISCUSSÃO

O presente estudo compõe de forma inovadora o primeiro ensaio clínico com uso tópico de MC-CTM voltado para cicatrização de feridas em cães, ao conhecimento dos autores.

4.1 Contração relativa das feridas

Diversos estudos com ratos demonstraram melhores índices de contração de feridas tratadas com MC-CTM quando comparadas ao grupo controle [13,15–18]. Em porquinhos da índia, a maior contração em feridas experimentais foi observada a partir do 14º dia [10]. No entanto, essa diferença

não foi observada no presente estudo em cães, visto que as feridas dos grupos MC e HA apresentaram contração similar nos diferentes momentos de avaliação (D4, D14 e D30).

Nota-se que as feridas B, D e N apresentaram aumento de suas áreas entre o D0 e D4. As feridas B e D eram caracterizadas por maior profundidade; e embora apresentassem melhora clínica do aspecto de granulação durante esse período, a mensuração de sua área refletiu em aumento numérico. A ferida N demonstrou necrose tardia da pele ao redor da ferida, provavelmente devido à natureza da sua etiologia (trauma por atropelamento com esfolamento), o que culminou em aumento de sua área.

A diferença no tamanho inicial das feridas ocorreu devido à aleatoriedade da distribuição entre grupos. Entretanto, como a porcentagem de contração considerou a área inicial, foi possível comparar o desempenho de cicatrização, que se mostrou similar entre os grupos.

4.2 Avaliação de variáveis clínicas

4.2.1 Granulação e epitelização

A formação de abundante tecido de granulação ocorre de forma fisiológica na fase proliferativa da cicatrização, que se inicia no terceiro dia e pode perdurar até semanas, de acordo com o tipo de ferida [21]; o que corrobora ao presente estudo, no qual o pico de granulação foi observado no D14 em ambos os grupos. O aumento da formação de tecido de granulação nessa fase é considerado benéfico por estar relacionado à mais eficiente cicatrização [15,22]. É neste tecido que ocorre a ativação de células mesenquimais endógenas e síntese de matriz extracelular; e por fim, onde as células epiteliais migram para fechar o defeito e restaurar a barreira cutânea [23]. Neste trabalho, observou-se em ambos os grupos aumento significativo da cobertura epitelial no D30, em relação aos dias D0 e D4.

Foi descrito que o tratamento tópico de feridas em ratos com MC-CTM promoveu aumento da vascularização no tecido granulação via contagem de vasos sanguíneos em lâmina histológica [15], porém não foi identificado nenhum trabalho que investigasse a qualidade do tecido de granulação por

meio de atribuição de escore clínico visual. No presente estudo, os grupos HA e MC não diferiram para granulação e epitelização.

4.2.2 Exsudação e edema

A observação de maiores índices de exsudação e edema nas fases iniciais de cicatrização corrobora ao descrito em literatura, devido ao aumento da permeabilidade vascular durante o processo inflamatório [21]. Uma boa cobertura deve ser capaz de absorver o excesso de exsudato, porém mantendo ambiente úmido o suficiente para otimizar o processo de cicatrização [24]. No presente estudo, foram utilizadas compressas de gaze hidrofílicas para absorção do excesso de líquido, além da própria ação do alginato de sódio que possui capacidade de absorção de fluidos [11] para controle de exsudato. A manutenção do ambiente úmido foi promovida pelo uso do hidrogel [25] e da bandagem do tipo semioclusiva.

Os autores não identificaram trabalhos que abordem a ocorrência de exsudação e edema em feridas tratadas topicamente com MC-CTM. Neste estudo, o tratamento com MC não influenciou estas variáveis clínicas, em comparação ao HA puro.

4.2.3 Hemorragia e crosta

A ocorrência de hemorragia inicial é esperada após um trauma, e a hemostasia compõe uma das primeiras etapas da fase inflamatória da cicatrização [2]. A utilização inadequada de bandagens aderentes, sobretudo quando a camada de contato é seca, pode cursar com lesão de tecido viável durante as trocas e, por consequência, nova hemorragia [26]. Neste estudo, bandagem do tipo não aderente foi empregada com objetivo de minimizar a lesão tecidual, bem como prevenir ocorrência de novos sangramentos durante as trocas diárias.

A formação exacerbada de crosta interfere negativamente na cicatrização [27], e é descrita em feridas sem tratamento tópico [28]. O hidrogel foi empregado também com objetivo de minimizar a evaporação de fluidos e consequente formação de crosta. Ao conhecimento dos autores, o MC-CTM ainda não havia sido investigado como agente hemostático e inibidor da

formação de crosta. No presente estudo, a adição de MC não interferiu na ocorrência de crosta e hemorragia em comparação ao HA isolado.

4.2.4 Necrose e infecção

Sabe-se que o hidrogel, apesar de não possuir atividade antimicrobiana intrínseca, tem o potencial de promoção de ambiente úmido pela retenção do exsudato, o que favorece a entrega de antibióticos no leito da ferida quando há tratamento sistêmico concomitante [3]. Este, que foi utilizado como tratamento no presente estudo, também favoreceu o debridamento autolítico, ao promover fagocitose de tecidos mortos e limpeza do microambiente lesional [26].

É descrito que o MC-CTM em feridas possui ação direta no recrutamento de macrófagos [13], tipo celular que atua tanto na fagocitose de patógenos quanto debridamento de tecido necrótico [29]. No presente estudo, entretanto, o número de feridas que apresentaram necrose ou infecção não foi suficiente para demonstrar a eficácia do tratamento de hidrogel associado a MC-CTM no combate a estas disfunções. Os grupos MC e HA não diferiram para as variáveis necrose e infecção nos momentos de avaliação.

4.3 Limitações do estudo

Os autores optaram pela realização de um ensaio clínico com feridas de ocorrência causal de cães levados à atendimento, visando avaliar o produto em contexto de rotina hospitalar veterinária. A diversidade de etiologias e de características naturais das feridas e dos pacientes implica naturalmente em dificuldade de padronização das amostras.

Outra característica intrínseca ao tipo de estudo reside no tratamento ser realizado pelo tutor do animal, fora de um ambiente controlado. Por meio da atenção demandada pelo médico veterinário e disponibilização diária para orientação dos tutores sobre o manejo das feridas e esclarecimento de eventuais dúvidas, além de acompanhamento periódico, esta limitação foi atenuada.

4.4 Variáveis potencialmente associadas aos resultados obtidos

Devido à discrepância dos resultados obtidos no presente estudo com a hipótese inicial, os autores apontam para fatores que podem estar relacionados ao desfecho observado.

Na literatura atual, informações referentes à dose mínima de MC necessária para tratamento de feridas ainda é escassa. Um estudo recente utilizou MC-CTM a 50 e 100% em cultura celular de fibroblastos dermais, e demonstrou mecanismo de ação dose-dependente [30]. O presente trabalho compõe o primeiro ensaio clínico em cães a utilizar uma baixa concentração de MC-CTM (10%) em feridas, por via tópica. A dose empregada pode não ter sido suficiente para promover eficiência de cicatrização superior ao hidrogel-alginato, tratamento padrão bem fundamentado [11].

Neste trabalho, as CTM foram cultivadas em meio de restrição de nutrientes, uma abordagem que possui potencial de alterar a expressão gênica das CTM [31], com objetivo de melhorar a qualidade do secretoma obtido. Sabe-se que estas proteínas obtidas são moléculas sensíveis e passíveis de hidrólise; necessitando um sistema carreador eficiente [32]. O hidrogel-alginato compõe uma alternativa para tal fim, pois promove estabilização e liberação lenta destes componentes no leito de uma ferida [11,33], embora outros fatores como tempo de validade e método de armazenamento ainda não são bem estabelecidos e podem influenciar na eficácia do produto final.

Novos ensaios clínicos em cães que promovam padronização de dose e frequência de tratamento, aperfeiçoamento do método de obtenção e excipiente carreador de MC-CTM, bem como avaliação de viabilidade em diferentes períodos e métodos de armazenamento fazem-se necessários para otimização desta promissora abordagem terapêutica em feridas.

5 CONCLUSÃO

O tratamento tópico com hidrogel-alginato enriquecido com MC-CTM foi similar ao hidrogel-alginato na cicatrização de feridas cutâneas em cães. A baixa concentração (10%), associada às condições do presente estudo, pode ter sido insuficiente para acelerar a cicatrização e promover melhor

desempenho clínico.

CONFLITO DE INTERESSES

O produto tópico final utilizado na realização deste trabalho foi desenvolvido e fornecido pela empresa OMICS Biotecnologia Animal.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

[1] M. Rodrigues, N. Kosaric, C.A. Bonham, G.C. Gurtner, Wound Healing: A Cellular Perspective, Physiol. Rev. 99 (2019) 665–706. https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017.

[2] G. Broughton, J.E. Janis, C.E. Attinger, Wound Healing: An Overview:, Plast. Reconstr. Surg. 117 (2006) 1e-S-32e-S. https://doi.org/10.1097/01.prs.0000222562.60260.f9.

[3] I.M. Balsa, W.T.N. Culp, Wound Care, Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 45 (2015) 1049–1065. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009.

[4] R. Perez-Tamayo, M. Ihnen, The effect of methionine in experimental wound healing; a morphologic study, Am. J. Pathol. 29 (1953) 233–249.

[5] E.J. Laing, Problems in wound healing associated with chemotherapy and radiation therapy, Probl. Vet. Med. 2 (1990) 433–441.

[6] W.M. Jackson, L.J. Nesti, R.S. Tuan, Concise Review: Clinical Translation of Wound Healing Therapies Based on Mesenchymal Stem Cells, STEM CELLS Transl. Med. 1 (2012) 44–50. https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0024.

[7] E.Y. Lee, Y. Xia, W.-S. Kim, M.H. Kim, T.H. Kim, K.J. Kim, B.-S. Park, J.-H. Sung, Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: Increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF, Wound Repair Regen. 17 (2009) 540–547. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x.

[8] L.W. Fui, M.P.W. Lok, V. Govindasamy, T.K. Yong, T.K. Lek, A.K. Das, Understanding the multifaceted mechanisms of diabetic wound healing and therapeutic application of stem cells conditioned medium in the healing process, J. Tissue Eng. Regen. Med. 13 (2019) 2218–2233.

https://doi.org/10.1002/term.2966.

[9] F. Vizoso, N. Eiro, S. Cid, J. Schneider, R. Perez-Fernandez, Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine, Int. J. Mol. Sci. 18 (2017) 1852. https://doi.org/10.3390/ijms18091852.

[10] A. Joseph, I. Baiju, I.A. Bhat, S. Pandey, M. Bharti, M. Verma, A. Pratap Singh, M.M. Ansari, V. Chandra, G. Saikumar, Amarpal, G. Taru Sharma, Mesenchymal stem cell-conditioned media: A novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing, J. Cell. Physiol. 235 (2020) 5555–5569. https://doi.org/10.1002/jcp.29486.

[11] M. Zhang, X. Zhao, Alginate hydrogel dressings for advanced wound management, Int. J. Biol. Macromol. 162 (2020) 1414–1428. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311.

[12] M.M. Ansari, Therapeutic Potential of Canine Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells and its Conditioned Media in Diabetic Rat Wound Healing, J. Stem Cell Res. Ther. 3 (2013). https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000141.

[13] L. Chen, E.E. Tredget, P.Y.G. Wu, Y. Wu, Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing, PLoS ONE. 3 (2008) e1886. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001886.

[14] M. Gao, J. Zhang, J.Z. Wang, Y. Liu, X. Zhang, Y. Shi, [Effects of hypoxia-pretreated rat adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium on wound healing of rats with full-thickness defects], Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin. J. Burns. 36 (2020) 803–812. https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501120-20200508-00258.

[15] O.V. Payushina, N.N. Butorina, O.N. Sheveleva, E.I. Domaratskaya, Effect of Mesenchymal Stromal Cells and Conditioned Media on Healing of Skin Wound, Bull. Exp. Biol. Med. 165 (2018) 572–575. https://doi.org/10.1007/s10517-018-4215-6.

[16] X. Rong, W. Chu, H. Zhang, Y. Wang, X. Qi, G. Zhang, Y. Wang, C. Li, Antler stem cell-conditioned medium stimulates regenerative wound healing in rats, Stem Cell Res. Ther. 10 (2019) 326. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1457-9.

[17] R. Sabzevari, A.M. Roushandeh, A. Mehdipour, M. Alini, M.H. Roudkenar, SA/G hydrogel containing hCAP-18/LL-37-engineered WJ-MSCs-derived conditioned medium promoted wound healing in rat model of excision injury, Life Sci. 261 (2020) 118381. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118381.

[18] J. Yang, Z. Chen, D. Pan, H. Li, J. Shen, Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Combined Pluronic F127 Hydrogel

Promote Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration, Int. J. Nanomedicine. Volume 15 (2020) 5911–5926. https://doi.org/10.2147/IJN.S249129.

[19] J.H. Zar, Biostatistical analysis, 5th ed, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, N.J, 2010.

[20] G.R. Norman, D.L. Streiner, Biostatistics: the bare essentials, 3rd ed, People's Medical Pub. House, Shelton, Conn, 2008.

[21] T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms, J. Int. Med. Res. 37 (2009) 1528–1542. https://doi.org/10.1177/147323000903700531.

[22] F. Pereira Beserra, L.F. Sérgio Gushiken, A.J. Vieira, D. Augusto Bérgamo, P. Luísa Bérgamo, M. Oliveira de Souza, C. Alberto Hussni, R. Kiomi Takahira, R. Henrique Nóbrega, E.R. Monteiro Martinez, C. John Jackson, G. Lemos de Azevedo Maia, A. Leite Rozza, C. Helena Pellizzon, From Inflammation to Cutaneous Repair: Topical Application of Lupeol Improves Skin Wound Healing in Rats by Modulating the Cytokine Levels, NF-κB, Ki-67, Growth Factor Expression, and Distribution of Collagen Fibers, Int. J. Mol. Sci. 21 (2020) 4952. https://doi.org/10.3390/ijms21144952.

[23] S. Werner, T. Krieg, H. Smola, Keratinocyte–Fibroblast Interactions in Wound Healing, J. Invest. Dermatol. 127 (2007) 998–1008. https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700786.

[24] K. Ousey, K.F. Cutting, A.A. Rogers, M.G. Rippon, The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective, J. Wound Care. 25 (2016) 122–130. https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.3.122.

[25] A. Francesko, P. Petkova, T. Tzanov, Hydrogel Dressings for Advanced Wound Management, Curr. Med. Chem. 25 (2019) 5782–5797. https://doi.org/10.2174/0929867324666170920161246.

[26] J.R. Davidson, Current Concepts in Wound Management and Wound Healing Products, Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 45 (2015) 537–564. https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.01.009.

[27] E.A. Knudsen, G. Snitker, Wound healing under plastic-coated pads, Acta Derm. Venereol. 49 (1969) 438–441.

[28] D.-K. Kweon, S.-B. Song, Y.-Y. Park, Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator, Biomaterials. 24 (2003) 1595–1601. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00566-5.

[29] A.J. Singer, R.A.F. Clark, Cutaneous Wound Healing, N. Engl. J. Med. 341 (1999) 738–746. https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006.

[30] L. Li, H.T.T. Ngo, E. Hwang, X. Wei, Y. Liu, J. Liu, T.-H. Yi, Conditioned Medium from Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Culture Prevents UVB-Induced Skin Aging in Human Keratinocytes and Dermal Fibroblasts, Int. J. Mol. Sci. 21 (2019) 49. https://doi.org/10.3390/ijms21010049.

[31] Y. Petrenko, I. Vackova, K. Kekulova, M. Chudickova, Z. Koci, K. Turnovcova, H. Kupcova Skalnikova, P. Vodicka, S. Kubinova, A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential, Sci. Rep. 10 (2020) 4290. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z.

[32] K. Shakhakarmi, J.-E. Seo, S. Lamichhane, C. Thapa, S. Lee, EGF, a veteran of wound healing: highlights on its mode of action, clinical applications with focus on wound treatment, and recent drug delivery strategies, Arch. Pharm. Res. (2023). https://doi.org/10.1007/s12272-023-01444-3.

[33] V. Brumberg, T. Astrelina, T. Malivanova, A. Samoilov, Modern Wound Dressings: Hydrogel Dressings, Biomedicines. 9 (2021) 1235. https://doi.org/10.3390/biomedicines9091235.

APÊNDICE A – Material informativo entregue ao tutor

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

Como tratar a ferida?

Realizar o seguinte tratamento 1x ao dia (a cada 24 horas):

- Lave a ferida com solução fisiológica e auxílio de gaze, em movimentos suaves, removendo toda sujidade;
- Seque o excesso de líquido com a gaze;
- Aplique o produto fornecido sobre a ferida e espalhe com espátula, até formar uma camada fina que cubra toda a ferida;
- Realize curativo com atadura tipo Rayon e auxílio de faixa e esparadrapo.

Observações:



- Mantenha o animal de colar protetor (elizabetano) o tempo **todo**.
- Mantenha-o em ambiente limpo, seco e separado de outros animais.
- Não utilize nenhum outro produto tópico de qualquer natureza além da solução fisiológica e do gel fornecido.
- Armazene o produto em geladeira.

DECLARAÇÃO

Me comprometo a seguir assiduamente todas as orientações acima, a informar o médico veterinário imediatamente no caso de não cumprimento de qualquer uma delas, e a retornar ao Hospital Veterinário com meu animal em todas as datas previstas (listadas abaixo), sob pena de cobrança retroativa de todos os procedimentos realizados.

Declaro ciência de que será realizado, em dois momentos, procedimento cirúrgico do tipo biópsia na ferida do meu animal, sob anestesia local e sedação.

- 1º retorno: 4 dias (____/_____/_____) - biópsia
- 2º retorno: 14 dias (____/_____/_____) - biópsia
- 3º retorno: 30 dias (____/_____/_____)

Autorizo também a obtenção de registros fotográficos do meu animal e utilização de todas as informações obtidas, me eximindo de qualquer direito autoral desse material.

Botucatu, ____/_____/_____ _____

Tutor(a) responsável

Figura 1. Folha entregue aos tutores contendo instruções de manejo diário das feridas e declaração de comprometimento com estudo.