

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/08/2025.

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

Prof^a. Dr^a. 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 compartilhados 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 às aquelas tratadas com hidrogel-alginato e às aquelas submetidas somente a limpeza diária. Nenhuma atividade anti-inflamatória via $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL1-1 β e IL-10; ou regenerativa, via TGF- β 1 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, IL1-1 β and IL-10; or regenerative, via TGF- β 1 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-1 β : 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- β 1: fator de crescimento transformador-beta1
TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa
UNESP: Universidade Estadual Paulista
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular
 μ L: 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