

VÍVIAN SCALON PERES

**EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA
DERIVADO DE PEÇONHA DE SERPENTE
ASSOCIADO A CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS**

Botucatu

2014

VÍVIAN SCALON PERES

**EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA
DERIVADO DE PEÇONHA DE SERPENTE
ASSOCIADO A CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu
2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Peres, Vívian Scalón.

Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos / Vívian Scalón Peres. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera

Coorientador: Rui Seabra Ferreira Junior

Capes: 31302017

1. Células-Tronco. 2. Cicatrização de feridas. 3. Adesivo tecidual de fibrina.
4. Serpente peçonhenta - Peçonha.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; Cicatrização; Peçonha de serpente; Pele; Selante de fibrina.

Trabalho desenvolvido no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP, FMB, UNESP, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, UNESP, na Unidade de Pesquisa Experimental - UNIPEX, FMB, UNESP e o Instituto de Biociências – IBB, UNESP.

Nome do Autor: Vívian Scalon Peres

Título: EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DE PEÇONHA DE SERPENTE ASSOCIADO A CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDA CIRÚRGICA EM RATOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera
Presidente e Orientadora
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem -
FMB - UNESP - Botucatu/SP.

Prof. Dr. Joel Carlos Lastoria
Membro
Departamento de Dermatologia e Radioterapia - FMB - UNESP -
Botucatu /SP.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Membro
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Instituto de
Biologia - UNICAMP - Campinas/SP.

Dedico ao meu pai **Luíz Carlos Peres**. Sua tranquilidade, alegria e seu exemplo de luta sempre iluminaram meus caminhos, transformando as dificuldades em desafios a serem vencidos.

À minha mãe **Vilma Scalon Peres**. Sua força, perseverança e firmeza de caráter me ensinaram a não abrir mão de um objetivo e passar por momentos turbulentos com a cabeça erguida e a alma em paz.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos animais, seres fundamentais em nossas pesquisas. Seja como doadores de partes biológicas, como peçonha, soro ou células, ou como modelos experimentais para este estudo, doando suas vidas sem ressentimento, para que pudéssemos aprender mais com esse experimento.

Assumo o risco de parecer cruel aos olhos dos que estão de fora, porém sou consciente de que tudo sempre foi realizado com muito respeito. Obrigada por me ensinarem um pouco mais sobre a força e a fragilidade da vida e serem o maior e melhor motivo para querer crescer profissionalmente.

AGRADECIMENTOS

Os três anos em que fiz essa pesquisa, foram uma árdua jornada de desafio, construção e amadurecimento. Nenhum bom projeto de trabalho é realizado de maneira fácil e sem comprometimento.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e a todos os professores da Faculdade de Medicina de Botucatu por lutarem por uma educação digna e ensino de qualidade, assim como todos os alunos do programa, que fizeram parte do meu convívio e sempre com bons momentos nesse período.

Meu agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Estudos, que permitiram o desenvolvimento e realização deste projeto de pesquisa.

Agradeço em especial minha Orientadora Profa. Dra. Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera e meu Co-orientador Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, pela confiança que depositaram em meu trabalho. Estou grato pelas notas de suas orientações e a cordialidade com que sempre fui recebida, assim como pela liberdade de ação que me foi dada, o qual foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal. Espero sinceramente que possam se orgulhar dele.

Além do Diretor do CEVAP, Prof. Dr. Benedito Barraviera, por ter me acolhido na equipe, disponibilizado parte da estrutura física necessária, bem como o selante de fibrina, fundamental para a realização deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer aos técnicos de laboratório Msc. Airton Lourenço e Msc. Luciana Curtolo de Barros por sempre terem me atendido quando precisei, assim como para com a confecção do selante de fibrina.

Estendo meus agradecimentos à Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga por ter-me acolhido em seu laboratório e disponibilizado a estrutura física para a realização de parte deste projeto, que envolve a colheita de medula óssea e cultivo celular, tão importante neste estudo.

Assim como aos queridos colegas de profissão Dr. João Ferreira de Lima Neto, Dr. Paulo Ricardo de Oliveira Bersano. Muito obrigada por terem aceitado se envolver neste projeto, por toda a paciência que tiveram durante este processo, por sempre acrescentarem com seus conhecimentos extremamente válidos ao estudo. E ao também colega de profissão Msc. Maurício M. Flórez, por me ajudar sempre que

possível e com o necessário, para que este trabalho ficasse cada vez melhor. Tenho muito apreço e respeito por todos.

Agradeço imensamente à Juliana Gadum, por ter realizado as análises estatísticas deste estudo, entendendo minhas dificuldades e elucidando meu caminho, bem como por corrigir parte descrita deste trabalho.

Não poderia me esquecer de agradecer as secretárias do Departamento de Doenças Tropicais, Solange S. Cagliari e Bruna Q. Jorgetto, da secretária do CEVAP, Marli Leão, do secretário do Departamento de Dermatologia, Levi Pascoal, e dos secretários do Departamento de Pós-graduação da FMB, Regina Spadin e Diego Oliveira, pela paciência e imensa ajuda na parte burocrática de todo o processo.

Meu muitíssimo obrigado a toda equipe do CEVAP. Não haveria como descrever o imenso prazer que tive em conhecer todos, desde a pesquisadora Lucilene Delazari dos Santos, sempre disposta a ajudar a todos que a cercam, até os meninos da manutenção.

Aos ex-aprimorandos do CEVAP, Eduardo Saad, Michelle Campagner, Roberta C. Pereira, Thiago H. Vernini, Natália P. Biscola, Priscila M. Silvestre, Renato Souza e Isabel Paiva. Alguns felizmente prosseguiram na pós-graduação ou como funcionários na Universidade, o que possibilitou uma prorrogação nessa caminhada juntos e tenho a certeza de que alguns caminharão ao longo de minha vida, como verdadeiros amigos.

Aos atuais aprimorandos, Dênis A. Caetano, Aristóteles Kawa, Mônica Torres e Tauane Vaccas por realizarem a importante tarefa de manejo e manutenção dos animais do centro, além de realizar as extrações de venenos, tão importantes neste projeto.

Agradeço ainda a todos os estagiários e alunos de iniciação científica que passaram pelo CEVAP neste período, por contribuírem para o crescimento e constante melhoria do centro, assim como tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Estendo meus agradecimentos a todos os pós-graduandos do CEVAP, que direta ou indiretamente participaram da confecção desta dissertação, além dos momentos maravilhosos de risadas e descontração. Carregarei em meu coração a lembrança de muitas dessas pessoas, e sei que firmei grande amizade com alguns. Agradeço principalmente a Patrícia Orsi, que me ajudou imensamente e fez sugestões extremamente válidas para que este trabalho ficasse cada vez melhor.

Outras pessoas a quem quero agradecer nominalmente são meus colegas de profissão e amigos, Vinícius Peron Oliveira Gasparotto, Rodrigo Garcia Pires Machado e Andréia Pereira Vieira, o primeiro por ter-me conduzido e apresentado ao CEVAP e ter

me ensinado muito em nosso período de convivência sempre com humildade e de maneira clara e tranquila, o segundo por ter-me apoiado e ajudado muito e em grande parte deste processo, tanto na parte prática como também quando precisava de um ombro amigo e a terceira por sempre acreditar em meu potencial e sempre me mostrar um novo caminho e novas oportunidades.

Deixo também uma palavra de agradecimento e admiração ao também amigo e colega de pós-graduação Fausto Capuano Neto, que desenvolveu comigo mais de um projeto em parceria, deixando claro que poderia contar com ele sempre que precisasse, tanto para os momentos de glória, quanto os de sufoco. Espero que sempre tenha em mente que sua ajuda foi fundamental para a realização deste projeto e que sempre estarei disposta a ajudá-lo no que for possível.

Nesse período de trabalhos experimentais, tive a oportunidade de conhecer muitos funcionários do Biotério Central da UNESP, da UNIPEX, do IBB, da FMVZ e do Departamento de Patologia da FMB. Estes sempre estiveram dispostos a ajudar e acrescentar no projeto. Dentre eles destaco os que mais fizeram parte do meu convívio: Luizinho, Mário, Diego, Danilão, Danilo, Dú (Edinelson), Arlindo, Bardella, Cecília, Sueli, Paulinho, PC, Zé do gato, Zé da pato e Shelly. Muito obrigada por toda a ajuda que obtive de todos, pois sei que foi mais do que o trabalho de vocês, fizeram mais do que precisariam e o fizeram de coração.

Agradeço a todos que fazem parte da família República Chiquita Banana, sejam moradores, ex-moradores ou agregados, por terem me acolhido, e ajudarem a tornar nossa residência de Botucatu, um lar sempre acolhedor. Um abraço imenso à Eloá Martins, Tatiana María Mira López, Sandra Marchal, Maria Eugênia Lopes Navarro, Jéssica de Oliveira, Gustavo Calsolari de Barros, Fernando Soriano, Marcelo Santos da Silva e Donizeti Nicolete. E um abraço especial ao Carniça, por ter me adotado como sua tutora.

Meu agradecimento ao Guilherme Rodrigues Nascimento, meu companheiro de todas as horas, por provar inúmeras vezes estar ao meu lado independente das circunstâncias, ajudar sempre da maneira como pode e por sempre me apoiar e incentivar.

Gostaria de agradecer em especial minha família. Meu pai, Luíz Carlos Peres, e minha mãe, Vilma Scalon Peres, por todo exemplo de vida e sempre primarem por meu crescimento pessoal, profissional e espiritual. Assim como à minha irmã, que sempre foi um exemplo para mim de disciplina e responsabilidade no trabalho.

Desafio tão grande quanto escrever esta dissertação, foi agradecer a todos que fizeram parte desta minha trajetória sem esquecer-me de ninguém, já que um trabalho como este não se faz sozinho, portanto agradeço de coração a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

*“O caminho para a inteligência passa pelas mãos.
Pensamos para ajudar as mãos.
Das mãos nascem as perguntas.
Da cabeça nascem as respostas.
Se a mão não pergunta, a cabeça não pensa.
Pois laboratório vem de "laborare", trabalhar com as mãos, que é
essa cooperação entre mãos e inteligência”.*

Rubem Alves

*“Aqueles que passam por nós,
não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas	VI
Lista de Abreviaturas e Siglas	VII
Resumo	1
Abstract	2
Introdução	3
Objetivos	12
Material e Métodos	13
1. Amostra	13
1.1. Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Experimentação Animal	13
1.2. Animais de Experimentação	13
2. Selante de Fibrina	14
3. Obtenção das Células-Tronco Mesenquimais	14
3.1. Obtenção das Culturas Celulares Primárias da Medula Óssea de Ratos	14
3.2. Isolamento de Células Mesenquimais	15
3.3. Manutenção dos Cultivos Primários	16
3.4. Expansão dos Cultivos Primários	17
3.5. Caracterização de Células Tronco Mesenquimais	18
3.6. Marcação de Células-Tronco Mesenquimais	18
4. Procedimento Experimental	19
4.1. Procedimento Analgésico e Anestésico	19
4.2. Procedimento Cirúrgico	19
4.3. Estudos Macro e Microscópico da Cicatriz Cirúrgica	22
4.4. Microscopia de Fluorescência	23
4.5. Análise de Dados	24
5. Análise Estatística	25

Resultados	26
1. Isolamento e Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais	26
2. Análise Macroscópica das Cicatrizes Cirúrgicas	27
2.1. P3 – Análise Macroscópica das Cicatrizes Cirúrgicas dos Grupos A e B, no Período 3 Dias Pós-Cirúrgico	27
2.2. P7 – Análise Macroscópica das Cicatrizes Cirúrgicas dos Grupos A e B, no Período 7 Dias Pós-Cirúrgico	28
2.3. P14 – Análise Macroscópica das Cicatrizes Cirúrgicas dos Grupos A e B, no Período 14 Dias Pós-Cirúrgico	29
2.4. P21 – Análise Macroscópica das Cicatrizes Cirúrgicas dos Grupos A e B, no Período 21 Dias Pós-Cirúrgico	29
3. Análise Microscópica de Células Inflamatórias da Cicatriz Cirúrgica ..	30
3.1. Infiltrado Inflamatório	31
3.2. Macrófago	34
3.3. Plasmócito	35
3.4. Eosinófilo	37
3.5. Linfócito	38
3.6. Neutrófilo	40
3.7. Basófilo	41
3.8. Células Multinucleadas	43
3.9. Angiogênese	44
3.10. Fibroplasia	46
4. Microscopia de Fluorescência	47
Discussão	50
Considerações Finais.....	63
Referências Bibliográficas	65
Anexo 1	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - A: Placa de petri contendo ossos dos fêmures e tíbias coletados B: Lavagem de cavidade óssea de fêmur para coleta de medula óssea com solução DMEM de alta glicose.	15
Figura 2 - A: Material obtido adicionado na proporção de 1:1 com Ficoll-Paque; B: Formação de 'pellet' celular após centrifugação.	16
Figura 3 - A: Animal tricotomizado em decúbito ventral; B: Antissepsia do animal; C: Marcação de área a ser incisa (2cm); D: Marcação do animal onde foram realizadas as incisões.	19
Figura 4 - A: Incisão em fuso da área marcada; B e C: Retirada da área incisa; D: Animal com tecido subcutâneo divulsionado.	20
Figura 5 - A: Elevação de ferida cirúrgica para aplicação de selante, já com o fio de sutura posicionado entre as bordas para posterior ponto de fixação; B: Animal em decúbito ventral com as bordas da área incisionada unidas pelo selante e com ponto simples de aproximação.	20
Figura 6 - A: Pontos separados simples fechados posteriormente à aplicação das CTMs com auxílio de pinças oftálmicas; B: Animal em posição ventral após a aplicação das CTMs suturados com pontos separados simples.	21
Figura 7 - A: Fragmento da pele contendo cicatriz cirúrgica; B: Material biológico fixado em formalina tamponada 10%.	22
Figura 8 - A: Cultivo celular no 3º dia após a coleta de medula óssea de ratos, apresentando baixa subconfluência, porém apresentando células com morfologia fibroblástica; B: Cultivo celular no 9º dia após a coleta de medula óssea de ratos, apresentando subconfluência alta e morfologia fibroblástica.	26
Figura 9 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 3 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.	28
Figura 10 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 7 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.	28
Figura 11 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 14 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.	29
Figura 12 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 21 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS', sendo evidenciado no círculo, a posição anatômica da cicatriz cirúrgica.	30

Figura 13 – A: Lâmina de HE em aumento de 10X, com tratamento SFPS no período de análise 3 dias pós-cirúrgico; B: Lâmina de HE em aumento de 10X, com tratamento sutura no períodos de análise 3 dias pós-cirúrgico.	32
Figura 14 – A: Lâmina de HE em aumento de 5X, com tratamento SFPS no período de análise 7 dias pós-cirúrgico; B: Lâmina de HE em aumento de 5X, com tratamento sutura no períodos de análise 7 dias pós-cirúrgico.	33
Figura 15 – Análise de intensidade de infiltrado inflamatório dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	33
Figura 16 – Análise de intensidade de macrófago dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	35
Figura 17 – Análise de intensidade de plasmócito dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	36
Figura 18 – Análise de intensidade de eosinófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	38
Figura 19 – Análise de intensidade de linfócito dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	39
Figura 20 – Análise de intensidade de neutrófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	41
Figura 21 – Análise de intensidade de basófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	42
Figura 22 – Análise de intensidade de células multinucleadas dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	44
Figura 23 – Análise de intensidade de angiogênese dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	45
Figura 24 – Análise de intensidade de fibroplasia dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.	47
Figura 25 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 3 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 3 dias após cirurgia.	48
Figura 26 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 7 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 7 dias após cirurgia.	48
Figura 27 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 14 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 14 dias após cirurgia.	49
Figura 28 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 21 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 21 dias após cirurgia.	49

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Critério de avaliação por escore de intensidade de infiltrado celular.	24
Tabela 2: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' no infiltrado de células inflamatórias nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.	32
Tabela 3: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de macrófago nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	34
Tabela 4: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de plasmócito nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	36
Tabela 5: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de eosinófilo nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	37
Tabela 6: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de linfócito nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	39
Tabela 7: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de neutrófilos nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos. Análise comparativa da intensidade de neutrófilo nos diferentes tratamentos e períodos de análise distintos.	40
Tabela 8: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de basófilo nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	42
Tabela 9: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de células multinucleadas nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.	43
Tabela 10: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de angiogênese nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.	45
Tabela 11: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de fibroplasia nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.	46
Tabela 12: Contagem do número de células-tronco mesenquimais presentes nos dois tratamentos e períodos de análise distintos.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
LANÇA	Laboratório de Fertilização <i>In Vitro</i> e Cultivo Celular
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IBB	Instituto de Biociências
CEEZ	Comissão de Ética na Experimentação Animal
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
h	Hora(s)
min	Minuto(s)
m	Metro(s)
cm	Centímetro(s)
mm	Milímetro(s)
µm	Micrometro(s)
kg	Quilograma(s)
g	Gramas(s)
mg	Milígrama(s)
µg	Micrograma(s)
l	Litro(s)
ml	Mililitro(s)
µl	Microlitro(s)
U	Unidade
N	Normal
mM	Micromolar
SFPS	Selante de fibrina derivado de peçonha de serpente
FSSV	Fibrin sealant derived from snake venom
CTM	Célula-tronco mesenquimal
MSC	Mesenchymal Stem Cell
®	Marca registrada

RPM	Rotações por minuto
G	Força gravitacional
O₂	Oxigênio
CO₂	Gás Carbônico
pH	Potencial de Hidrogênio
D	Direito
E	Esquerdo
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
SFB	Soro Fetal Bovino
PBS	Phosphate buffered saline
HCl	Ácido Clorídrico
BrdU	Bromodesoxiuridina
DAPI	4'6'-diamidino-2-fenilindol
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IgG	Imunoglobulina G
HE	Hematoxilina e Eosina
P3	Período de 3 dias pós-cirúrgico
P7	Período de 7 dias pós-cirúrgico
P14	Período de 14 dias pós-cirúrgico
P21	Período de 21 dias pós-cirúrgico

RESUMO

PERES, V.S. **Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos.** Botucatu, 2013. 74p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB, Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Orientadora: Profa. Dra. Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera. Co-orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior.

A cicatrização de uma ferida consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a re-estruturação original do tecido. Nas últimas décadas, o tratamento de feridas vem ganhando um grande avanço tecnológico e científico, visando à redução no tempo de cicatrização e diminuição dos riscos de infecção. Assim, a bioengenharia de tecidos introduziu novas alternativas no tratamento de doenças e perdas teciduais por meio do uso de células-tronco associadas à biomateriais. Selantes de fibrina convencionais atuam como arcabouço no transplante de células-tronco pela biocompatibilidade, bio-absorção e a capacidade de ligação célula-selante. O presente estudo tem por objetivo avaliar a resposta cicatricial da ferida cirúrgica na pele de ratos com a aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs) extraídas da medula óssea de ratos em associação ao selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFPS), visando avaliar se a aplicação do selante promove uma melhor união dos tecidos dérmicos e melhor cicatrização da ferida cirúrgica, tanto sozinha, quanto em associação com CTMs. Para tanto, foram utilizados 2 grupos de análise comparativa, sendo o grupo A (n=32) formado por dois subgrupos de tratamento, sendo o subgrupo 1 com aplicação de SFPS no antímero direito e subgrupo 2 com realização de sutura no antímero esquerdo dos animais e o grupo B (n=32) também formado por 2 subgrupos de tratamento distintos, sendo o subgrupo 3 tratado com SFPS associado a CTM no antímero direito e subgrupo 4 em que foi realizada sutura associada a CTM no antímero esquerdo dos animais. A metodologia de cultivo e proliferação de CTM foi implantada e padronizada em laboratório. A avaliação das respostas cicatriciais ocorreram em 4 períodos (3, 7, 14 e 21 dias) pós-cirúrgicos. Assim, foi demonstrado que o SFPS além de promover uma melhor união das bordas da ferida cirúrgica e uma melhor cicatrização, também permite cirurgias com a aplicação de células-tronco, por promover a adesão das CTMs na estrutura do selante.

Palavras-chave: pele, cicatrização, selante de fibrina, peçonha de serpente, célula-tronco mesenquimal

ABSTRACT

PERES, V.S. **Effect of the fibrin sealant derived from snake venom associated to mesenchymal stem cells, in the healing process of surgical wound in rats.** Botucatu, 2013. 74p. Thesis (Master's Degree) – Botucatu Medical School – FMB, Departament of Tropical Diseases and Image Diagnosis, São Paulo State University (UNESP). Supervisor: PhD. Silvia Regina Catharino Sartori Barraviera. Co-supervisor: PhD. Rui Seabra Ferreira Junior.

The healing process of a wound is a perfect and coordinated cascade of cellular and molecular events which interacts to occur the restructuring of the tissue. In the past decades, wound care has gained a great technological and scientific advancement, in order to reduce healing time and lowering the risk of infection. Thus, the tissue engineering introduced new alternatives for the treatment of diseases and loss tissue, through the use of stem cells associated with biomaterials. Conventional fibrin sealants operate as a scaffold in the stem cells transplantation, by its biocompatibility, bioabsorption and ability to connect the cells with the sealant. This study aims to evaluate the wound healing response in rats skin, by the application of mesenchymal stem cells (MSCs) extracted from bone marrow of rats, in association with fibrin sealant derived from snake venom (FSSV), in order to evaluate whether if the application of the sealant promotes a better union of the dermal tissues and if improves healing of the surgical wound, either alone or in association with MSCs. For this purpose, 2 groups of comparative analysis were used. The group A (n = 32) was formed by two treatment subgroups, which the subgroup 1 was treated with the application of the FSSV in the right antimere and the subgroup 2 was treated with suture in left antimere. The animals of the group B (n = 32) also comprising two distinct subgroups of treatment, where the subgroup 3 was treated with FSSV associated with MSC in the right antimere and subgroup 4 was performed with suture associated with MSC in the left antimere of the animal. The methodology of the culture and proliferation of MSC was established and standardized in the laboratory. The evaluation of the cicatricial response occurred at 4 periods (3, 7, 14 and 21 days) after surgery. Thus, it was demonstrated that FSSV, besides promoting a better union of the borders of the wound and improved healing, it also allows surgeries with the application of stem cells, by promoting adhesion of the MSCs on the structure of the sealant.

Keywords: skin, healing process, fibrin sealant, snake venom, mesenchymal stem cell

INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo e multifuncional, que abrange toda a superfície do corpo. Ela proporciona uma barreira física de proteção entre o organismo e o meio ambiente e ajuda a reduzir a perda de água e eletrólitos, por meio do estrato córneo, que é impermeável à água. O estrato córneo também inibe a penetração de substâncias químicas irritantes e alérgicas e protege da invasão de micro-organismos patogênicos^{1,2,3}.

Este órgão também é importante para a termorregulação, sendo que o controle de perda de calor se dá através da vasodilatação ou vasoconstrição e também é alcançada pela produção de suor por glândulas sudoríparas. Também contribui para a imunidade inata e adaptativa, pois possui peptídeos antimicrobianos e células de Langherans, que iniciam respostas imunes contra ameaças microbianas^{1,2,3}.

Ela é rica em terminações nervosas livres e receptores sensoriais que detectam os estímulos de toque, vibração, pressão, temperatura, dor e coceira. Possui propriedades biomecânicas, por apresentar elasticidade e é importante para a síntese da vitamina D e, assim, contribui para a formação óssea e metabolismo do cálcio^{1,2,3}.

Para POWELL & SOON (2002)⁴ a pele é subdividida em três camadas, sendo a camada superficial, a epiderme que adere estreitamente à derme, camada mais profunda, por meio da membrana basal e a hipoderme que se localiza subjacentes à derme e é formada de tecido conjuntivo frouxo e gordura. Embriologicamente, a epiderme e seus apêndices se desenvolvem a partir do ectoderma, já a derme e a hipoderme surgem a partir da mesoderma².

A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, que passa por renovação contínua. A principal célula da epiderme é o queratinócito, constituindo 95% das células presentes no local. Os queratinócitos se diferenciam e se movem progressivamente do estrato basal, para a superfície da pele, formando várias camadas epidérmicas morfologicamente distintas, sendo estas a camada basal ou germinativa, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea^{5,2}. Nas palmas das mãos e plantas dos pés,

também é encontrada a camada lúcida, uma camada adicional localizada entre o estrato córneo e o granuloso².

O tempo da divisão celular na camada basal, até o seu desprendimento da camada córnea é de aproximadamente 28 dias³. A epiderme também possui melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, que representam os 5% de células restantes e apêndices essenciais, incluindo folículos pilosos com glândulas sebáceas associadas, glândulas sudoríparas écrinas e glândulas apócrinas^{6,2}.

A derme é limitada externamente por sua junção com a epiderme e, internamente, pela gordura subcutânea. É região subdividida em duas camadas principais: derme papilar, que está em contato com a membrana basal e a derme reticular, que é a parte principal da derme, que está em contato com o subcutâneo^{2,3}. Esta região da pele é composta por uma intrincada rede de macromoléculas que ligam filamentos de queratina intermediária do estrato basal com fibras de colágeno na derme superficial. Ela também contém vasos sanguíneos (plexos superficiais e profundos), canais linfáticos e os nervos sensoriais^{1,2}.

Os componentes celulares da derme incluem fibroblastos dérmicos, dendrócitos, e mastócitos. Os fibroblastos sintetizam as fibras de colágeno, que representa até 30% do volume da derme e fornece a força tensil deste órgão, e elastina, que fornecem certo grau de elasticidade da pele^{1,2,3}.

A hipoderme é a camada mais profunda da pele e fica situada abaixo da derme e acima da musculatura. Feixes de fibras provenientes de derme presentes na hipoderme reforçam a ligação entre estas duas regiões. Sua principal célula é o adipócito, que ficam organizados em lóbulos e separados por septos de tecido conjuntivo. Tais células servem como uma fonte de energia de reserva. A espessura desta camada indica variação anatômica e individual e reflete o estado nutricional do indivíduo^{1,2}.

Quando ocorre uma ferida, há uma interrupção da função e estrutura anatômica normal. Esta pode ser causada acidental ou intencionalmente ou ser o resultado de um processo patológico. O ferimento rompe a homeostasia no interior do tecido, o que resulta em uma complexa e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares (citocinas), que interagem para que ocorra uma re-estruturação original do tecido⁷.

O processo biológico para a cicatrização de feridas é bastante variável e baseada em fatores intrínsecos, que envolvem a saúde geral do paciente e extrínsecos, ou seja, o ambiente. Na pele, assim como em todos os tecidos epiteliais do corpo, exceto o osso, há formação de cicatrizes ao invés de regeneração. Para tanto é importante que se identifique problemas de cicatrização para assim minimizar as cicatrizes⁶.

Estes processos contínuos e inter-relacionados são divididos em cinco fases por HANKS & SPODNICK (2005)⁸ e ROBSON *et. al.* (2001)⁹ e classificados em hemostasia ou coagulação, inflamação, proliferação ou reparação, re-epitelização ou angiogênese e remodelação. Cada fase é regulada por mediadores bioquímicos, e outros componentes celulares que estimulam ou inibem as respostas celulares que facilitam a cura.

A sequência de cicatrização começa imediatamente após a lesão dos tecidos, seja por trauma na pele com subsequente hemorragia ou pela desnaturação das proteínas da pele por danos físicos por calor, ao frio, ou a radiação¹⁰. Hemostasia é a fase inicial, que ocorre dentro de segundos a minutos após a lesão. A hemorragia inicialmente exhibe plaquetas ao subendotélio. As plaquetas são essenciais para esta fase e em todo o processo de cura, pois além de fornecer a hemostasia inicial, também liberam várias citocinas e hormônios que ativam as outras fases do processo de cicatrização⁶.

O primeiro evento envolve a cessação do sangramento e culmina na formação de um tampão de plaquetas primária e coágulo sanguíneo. Dentro de minutos da ferida, ocorre vasoconstrição, devido a liberação de catecolaminas, e consequente redução da hemorragia, o que auxilia na agregação plaquetária. As plaquetas se aderem ao colágeno vascular exposto e estimula a liberação de glicoproteínas adesivas, o que resulta no tampão de plaquetas primárias, e iniciam os processos de cascatas de coagulação intrínsecos e extrínsecos. O coágulo formado serve como arcabouço para as células do processo se infiltrar e assim ocorrer a consequente cicatrização^{5,8}.

Após cerca de 10 a 15 minutos, há uma transição da fase vasoconstritora para um período de vasodilatação. A vasodilatação local facilita o fluxo de sangue para a região e a migração das células inflamatórias, tais como neutrófilos, linfócitos e macrófagos e proteínas do plasma sanguíneo, levando à próxima fase de cicatrização. A migração de fluido para dentro da

área lesada gera edema, o que contribui para a dor que está associada à inflamação¹⁰.

A fase inflamatória é anunciada por este influxo de células inflamatórias para o local da lesão. Os neutrófilos são os primeiros leucócitos encontrados no local do trauma. Estes migram para o espaço da ferida dentro das primeiras 5 horas após a lesão e sua função é prevenir a infecção, pela fagocitose de bactérias e restos necróticos e limpeza e desbridamento da área, pela quebra da matriz extracelular por meio da libertação de elastase e collagenase^{8,10}.

Posteriormente, os macrófagos, que são atraídos pelos subprodutos da apoptose de neutrófilos, invadem o local da ferida para auxiliar na fagocitose, eliminando detritos e bactérias e para dirigir o processo de reparação por meio de quimiotaxia de outras células inflamatórias e secreção de citocinas e fatores de crescimento. As células fagocíticas, tais como macrófagos e outros linfócitos se infiltram em aproximadamente 48 horas após a lesão e permanecem até a conclusão da fase inflamatória^{8,11,12}.

A inflamação é um processo necessário na cicatrização, e a inibição desta fase, por medicamentos anti-inflamatórios, pode resultar em cicatrização inadequada. Esta fase de cura é importante para combater possíveis infecções e se interrompida ou prolongada, isto é, superior a 3 semanas, esta inflamação pode levar a uma ferida crônica, tratamento deficiente e eventualmente, mais cicatrizes. Fatores que podem prolongar esta fase incluem carga bacteriana elevada, repetição traumática e corpo estranho persistente na ferida. Uma vez que a ferida foi desbridada pelas células fagocíticas, a fase proliferativa se inicia^{5,12,13}.

A fase proliferativa da cicatrização se inicia normalmente entre 48 a 72 horas após a lesão e pode durar de 14 a 21 dias. Esta fase envolve a regeneração da epiderme pela proliferação de fibroblastos, o que conduz a síntese de colágeno, formando tecido de granulação (produção de matriz extracelular), nova vascularização e contração da ferida. As células endoteliais migram ao longo e dentro do arcabouço criado pela atividade de fibroblastos para criar um ambiente de granulação bem vascularizado^{10,11,13}.

A re-epitelização é marcada pela proliferação e influxo de queratinócitos perto da borda da ferida, através da diferenciação de células-tronco presentes dentro dos bulbos dos pilosos e glândulas apócrinos. Estes queratinócitos

colonizam o estrato basal e começam a migrar ao longo da borda da ferida estabelecendo assim uma nova membrana basal^{6,8}.

A nova vascularização é necessária para sustentar o tecido de granulação recém-formado. Esse processo é complexo e depende de fatores de crescimento e mediadores químicos, que estimulam angioblastos adjacentes ao local da lesão para crescerem na área afetada. A baixa oxigenação e o nível de ácido láctico elevado no local também ajudam na indução desta nova vascularização.

Durante este processo, uma camada de exsudado encontra-se sobre a ferida, o que fornece importante umidade e contém fatores de crescimento essenciais para a cicatrização. Qualquer curativo impróprio, que destrói esta camada saudável, vai resultar em prejuízos à cicatrização. Este exsudado diminui à medida que ocorre a formação de tecido de granulação^{5,8,10}.

A fase final da cicatrização é a remodelagem, que começa com a formação de tecido de granulação durante a fase proliferativa. É a fase mais longa para a cura, com início de 2 a 3 semanas após a lesão e continua durante meses ou anos, dependendo do tamanho e da gravidade do ferimento^{8,10,12}. Há contração da ferida, proporcionada por fibroblastos que se diferenciam em miofibroblastos que possuem a função contrátil, unindo as bordas da ferida e diminuindo o tamanho da ferida^{5,8}.

Nesta fase, a quantidade de colágeno presente na ferida atingiu o seu nível máximo e a natureza da matriz extracelular da lesão se altera significativamente durante este período¹⁰. O colágeno do local se modifica e se organiza, e a resistência à tração da ferida aumenta dramaticamente, já as células remanescentes das fases anteriores, sofrem apoptose. O tecido de granulação começa a retroceder e os vasos sanguíneos em excesso se retraem¹³.

Inibidores de formação de tecidos mantêm o equilíbrio entre a degradação do colágeno e a síntese continua dos componentes da matriz extracelular. Uma fase de remodelação bem sucedida envolve um equilíbrio delicado que requer maior síntese do que lise celular^{5,6,8}. A síntese é muito dependente de energia, e qualquer esgotamento dos nutrientes vai empurrar a balança para lise e afetar o processo de cicatrização. Assim também, o

excesso de fibrose nesta fase, resulta em cicatrizes hipertróficas ou a formação de queloides⁶.

A dificuldade em se tratar apropriadamente de feridas cutâneas está constantemente associada a altas taxas de mortalidade, devido à perda de fluidos, proteínas, eletrólitos e susceptibilidade à sépsis¹⁴. Feridas de pele resultam em enormes encargos econômicos e sociais, e há uma variedade de diferentes desafios com relação a diferentes patologias¹⁵. Assim, nas últimas décadas houve um grande incentivo para o desenvolvimento de novas alternativas e vem ganhando um grande avanço tecnológico e científico, visando à redução no tempo de reparação tecidual e diminuição dos riscos de infecção¹⁶.

Atualmente, o fechamento definitivo das feridas ocorre por meio de sutura das bordas da lesão, enxertos autógenos ou alógenos e retalhos¹⁷. Porém esses tratamentos apresentam problemas recorrentes, como a rejeição ao novo tecido, ulcerações, formação de vesículas subdérmicas, hiperqueratose, contraturas cicatriciais, dentre outros.^{18,19}

Neste contexto, a engenharia de tecidos apresenta-se como uma alternativa no desenvolvimento de substitutos biológicos ou sintéticos, e tem por objetivos a restauração da função dos tecidos, promovendo assim melhores tratamentos^{20,21}. O princípio geral da engenharia de tecidos envolve a combinação de células vivas com um arcabouço sintético ou natural, para produzir um tecido vivo funcional, estrutural e mecânica idêntica ao tecido ao qual ele foi designado a substituir²².

Assim, a utilização de células-tronco é uma nova modalidade e introduziu novas perspectivas ao tratamento em uma grande variedade de patologias, por apresentar a capacidade de diferenciação em diferentes padrões celulares, imunocompatibilidade das células autólogas, baixo risco de transmissão de agentes patogênicos e reparação tecidual de elevada qualidade, com a cicatrização do tecido lesado, sem a formação de tecido fibroso^{23,24,25}.

As células-tronco estão amplamente distribuídas pelo organismo e sua classificação é dada de acordo com seu tecido de origem, assim como por seu potencial de diferenciação em um ou mais tipos específicos de células maduras²⁶. Havendo como exemplo de células-tronco, a mórula totipotente,

células-tronco embrionárias pluripotentes, células-tronco hematopoéticas e células-tronco mesenquimais multipotentes²⁴.

As células-tronco mesenquimais multipotentes (CTMs), são encontradas na medula óssea, em regiões perivasculares, na pele, gordura, músculo e órgãos parenquimatosos^{27,28}. As CTMs possuem alto potencial proliferativo, além de relativa facilidade de isolamento e cultivo²⁹, além de capacidade de diferenciação em múltiplos padrões celulares de origem mesodermal, quando submetidas a diferentes estímulos. Essas características das CTMs mostram um amplo potencial de aplicações terapêuticas dessas células, sendo uma ferramenta terapêutica atrativa, com amplo espectro de aplicações clínicas³⁰.

Já foi amplamente descrita sua capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica³¹, porém outros estudos mostram sua capacidade de diferenciação em padrão celular miogênico, tenogênico²⁴ neurogênico e cardiogênico³².

Foi descrito por FU *et. al.* (2006)³³ a diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais em padrões celulares de células do endotélio vascular e células epidermais e *in vivo* de células do endotélio vascular, tecido de granulação, células de ducto sebáceo e células epidermais, depois de cultivadas sob diferentes condições específicas de cultivo de padrão celular.

Seu uso em terapias celulares é viável por mostrar grande tropismo para o local lesionado e gerenciar o processo de cicatrização através de interações diretas e indiretas, pela secreção de múltiplos fatores de crescimento e citocinas³⁴, na cinética de enxertia e na recuperação hematopoiética de feridas, devido à grande quantidade de agentes ativos secretados e à sua poderosa atividade imunoreguladora³⁵, além de exibir habilidade intrínseca de migração para locais danificados³⁶.

Com a utilização de um arcabouço apropriado, associado às CTMs, é possível regenerar vários tecidos ou órgãos³⁷, por facilitar a adesão das células no local desejado, seu crescimento, proliferação, diferenciação, formação do tecido e sua reorganização²³. Os materiais utilizados como arcabouços podem ser sintéticos ou biológicos, porém devem biocompatíveis e atóxicos, não devendo apresentar rejeição do organismo receptor em nenhum momento, permitir adesão e crescimento das células transplantadas por sua estrutura, além atender as necessidades biológicas e nutricionais do cultivo celular

associado a ele e ser mecanicamente adequado ao sítio de inclusão, objetivando a re-estruturação do tecido lesado^{21, 38}.

Os selantes de fibrina comerciais atualmente já são utilizados amplamente em aplicações clínicas como adesivo biológico, devido as suas propriedades hemostáticas e adesivas³⁹, bem como por reduzir hemorragias, podendo ser utilizadas tanto sozinhas, quanto em associação com sutura convencional⁴⁰. O selante de fibrina pode servir como um arcabouço apropriado, pois já foi demonstrado que este promove a migração das CTMs sobre sua estrutura altamente reticulada, além de permitir a proliferação celular sem ocorrer a deformação estrutural⁴¹.

Este biomaterial, em associação com CTMs de diferentes fontes, já foram estudadas em aplicações de engenharia de tecidos, incluindo reconstrução óssea, cartilagem, tendão, ligamentos, cirurgias cardíacas, regeneração nervosa e queimaduras de terceiro grau e feridas cutâneas crônicas, com bons resultados²³.

O mecanismo de ação dos selantes de fibrina imitam os últimos passos da cascata de coagulação, com a formação definitiva de um coágulo de fibrina. Quando a trombina é formada, o fibrinogênio é transformado em fibrina, que é o verdadeiro primeiro passo de cura de uma ferida. Várias fórmulas já foram desenvolvidas e suas diferenças vão desde a origem da fonte de fibrinogênio e de trombina até na diferença de concentração de diversos componentes.

Os componentes essenciais a um selante de fibrina envolvem concentrados de fibrinogênio, fibrina e trombina, reconstituído em solução de cloreto de cálcio. Quando é realizada a mistura dos componentes, estes reproduzem os últimos passos da cascata de coagulação por meio da ativação do fator XIII pela trombina na presença de íons cálcio. O fibrinogênio é convertido em fibrina, originando um coágulo estável e reforçado pela ativação do fator XIII, que também participa da síntese de colágeno, estimulando a proliferação de fibroblastos e contribuindo para a cicatrização dos tecidos^{42,43,44}.

O Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) - (UNESP), apresentou em 1989 um selante de fibrina, onde a trombina bovina foi substituída por uma enzima trombina-símile derivada de peçonha de

serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) ao invés de trombina bovina,^{45,46}.

THOMAZINI-SANTOS *et. al.* (1998)⁴⁷ realizaram estudo comparativo entre crioprecipitados bovinos, equinos, ovinos e bubalinos, que indicou que bubalinos apresentam maior nível de fibrinogênio quando comparado aos outros, sendo este utilizado na confecção do produto após essa pesquisa como substituto do fibrinogênio humano.

A aplicabilidade do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFPS) foi amplamente avaliada em animais de experimentação e ensaios clínicos, com aplicações em pele^{42,48,49}, intestino⁵⁰, testículo⁵¹, útero⁵², tendão⁵³, nervo periférico⁵⁴, cirurgia periodontal⁵⁵, úlcera de córnea⁵⁶, úlcera venosa⁵⁷ e outros tecidos.

Os resultados indicam que o selante de fibrina derivado de peçonha de serpente é aplicável por produzir uma maior recuperação tecidual^{42,49,51,52,53} aumentar a sobrevida de enxertos autógenos de pele de espessura parcial⁴⁹, reduzir o acompanhamento pós-operatório^{42,46,50,52,55}, diminuir o edema na fase exudativa^{42,53,54,55,57}, facilitar a evolução da fase proliferativa e de maturação da cicatrização^{42,57} e acelerar o processo de cicatrização^{42,48,49,55,56,57}.

GASPAROTTO (2012)⁵⁸ e GASPAROTTO *et. al.* (2012)⁵⁹ avaliaram o crescimento e a viabilidade celular *in vitro* de CTMs derivadas da medula óssea de ratos, em associação ao biomaterial SFPS e mostrou que as CTMs foram capazes de se diferenciarem para o padrão celular osteogênico, adipogênico e condrogênico, assim o selante mostrou-se neutro em relação à indução de diferenciação espontânea para tais padrões celulares.

O biomaterial promoveu a captura e permitiu o crescimento das CTMs que se aderiram em sua superfície e o SFPS em contato as CTMs sustentou a sobrevivências das mesmas, comprovando assim a viabilidade celular junto ao biomaterial.

Considerando-se que o uso *in vitro* do SFPS possa ser aplicado como arcabouço para as CTMs, é de extrema importância avaliar a viabilidade do SFPS como arcabouço para CTMs derivadas de medula óssea, como promotor da união de bordas na pele de ratos, por haver uma possibilidade de melhor reparação tecidual, tornando-se um grande diferencial na aplicação cirúrgico-terapêutico na área dermatológica.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a capacidade *in vivo* do biomaterial selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFPS), como arcabouço para células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas a partir da medula óssea de ratos na resposta cicatricial em feridas cirúrgicas na pele de ratos.

Objetivos específicos

- Avaliar a ação do SFPS como biomaterial em aplicação experimental *in vivo*;
- Estabelecer protocolo experimental em ratos para o estudo de procedimentos dermatológicos com aplicação de SFPS associado à CTMs extraídas da medula óssea de ratos;
- Avaliar a capacidade de crescimento *in vitro* de CTMs obtidas a partir da medula óssea de ratos;
- Avaliar a proliferação das CTMs *in vivo*;
- Avaliar participação das CTMs na cicatrização tecidual na presença do biomaterial SFPS.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostra

1.1. Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Experimentação Animal

O presente estudo foi aprovado pela CEEA (Comissão de Ética na Experimentação Animal) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, sob protocolo CEEA 836-2010 e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

1.2. Animais de experimentação

Foram utilizados 64 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, adultos, com peso médio de 250g, como modelos na experimentação cirúrgica e 6 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com aproximadamente 14 dias de vida, como doadores de medula óssea, para a obtenção de células-tronco mesenquimais.

Todos os animais da pesquisa foram procedentes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Botucatu. Os ratos utilizados na experimentação cirúrgica foram mantidos na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX), vinculado a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), permanecendo por período adaptativo pré-operatório de sete dias.

O biotério o qual os animais foram mantidos apresentou fotoperíodo com ciclo claro/escuro de 12h, temperatura controlada por meio de ar-condicionado, de 21°C a 24°C, e foram alojados em caixas individuais de polipropileno forradas com maravalha, com ração própria para a espécie e água *ad libitum*.

Os ratos recém-chegados ao biotério de clínica médica da UNIPEX foram vermifugados com Ivermectina 3,15% (Ivomec[®]), na dose de 0,2mg/kg por via subcutânea, juntamente com propilenoglicol, utilizado como solvente.

2. Selante de Fibrina

O selante de fibrina é um selante biológico e tem em sua composição uma fração de crioprecipitado e fibrinogênio de origem animal. O selante de fibrina derivado de peçonha de serpente, utilizado neste estudo, foi produzido e gentilmente fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP/UNESP).

Os componentes do selante de fibrina foram armazenados isoladamente em microtubos de 500µl e mantidos a -80°C. Esses componentes foram reconstituídos em estado líquido em temperatura ambiente, minutos antes da sua utilização. Após a sua aplicação, um coágulo estável formando uma complexa rede de fibrina era formado após poucos segundos de sua homogeneização.

3. Obtenção das células-tronco mesenquimais

3.1. Obtenção das culturas celulares primárias da medula óssea de ratos

Os animais foram retirados do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu e levados ao Laboratório de Fertilização *In Vitro* e Cultivo Celular - LANÇA, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ – UNESP, Botucatu – SP, para coleta, isolamento e expansão das CTMs.

As CTMs foram coletadas da medula óssea de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os animais foram eutanasiados com sobredose de pentobarbital sódico (Hypnol®), por via intraperitoneal. A sobredose foi calculada para três vezes a dose recomendada para a espécie animal (45mg/kg), sendo aplicado, portanto 135mg/kg⁶⁰.

A coleta foi proveniente da medula óssea de fêmures e tíbias pela inserção de uma agulha estéril de 12,7 mm x 0,33 mm na cavidade do osso e posteriormente feita uma lavagem em seringa estéril de 1000U (1ml) com

DMEM alta glicose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco Laboratories - 11995-065) (Figura 1).

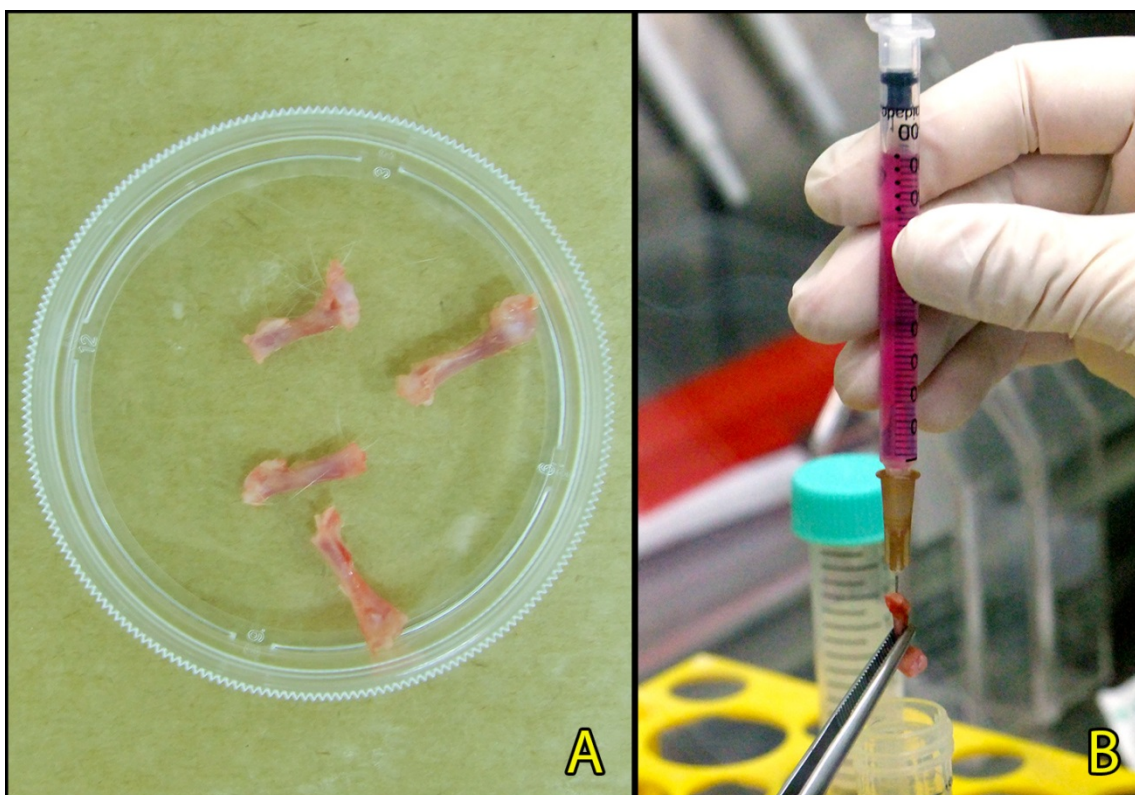


Figura 1 - A: Placa de petri contendo ossos dos fêmures e tíbias coletados B: Lavagem de cavidade óssea de fêmur para coleta de medula óssea com solução DMEM de alta glicose.

3.2. Isolamento de células mesenquimais

Após a coleta da medula dos ossos por lavagem com DMEM alta glicose, o líquido proveniente foi acondicionado em tubo de plástico de 15ml, centrifugados a 1.500 RPM (340 G), por 10 minutos. Este procedimento foi realizado para ressuspender o soro e gordura, que posteriormente foram retirados.

O material obtido foi ressuspendido na proporção de 1:1 em meio DMEM alta glicose. Em seguida foi utilizado volume de 4ml, que foi transferido para um tubo de 15ml, adicionado lentamente sobre 4ml de Ficoll-Paque® (Amershan Biosciences, Peapack, NJ – EUA), na densidade de 1,077g/ml, que foi centrifugado a 1.500 RPM (340G) por 40 minutos, após este processo formou-se um halo celular.

O halo celular foi ressuspendido em 1ml de DMEM alta glicose com L-glutamina sem soro e centrifugado a 1.500 RPM (340G) por 10 minutos. O mesmo procedimento foi realizado duas vezes para a retirada completa do Ficoll-Paque, que é tóxico para as células, formando assim um 'pellet' celular (Figura 2).

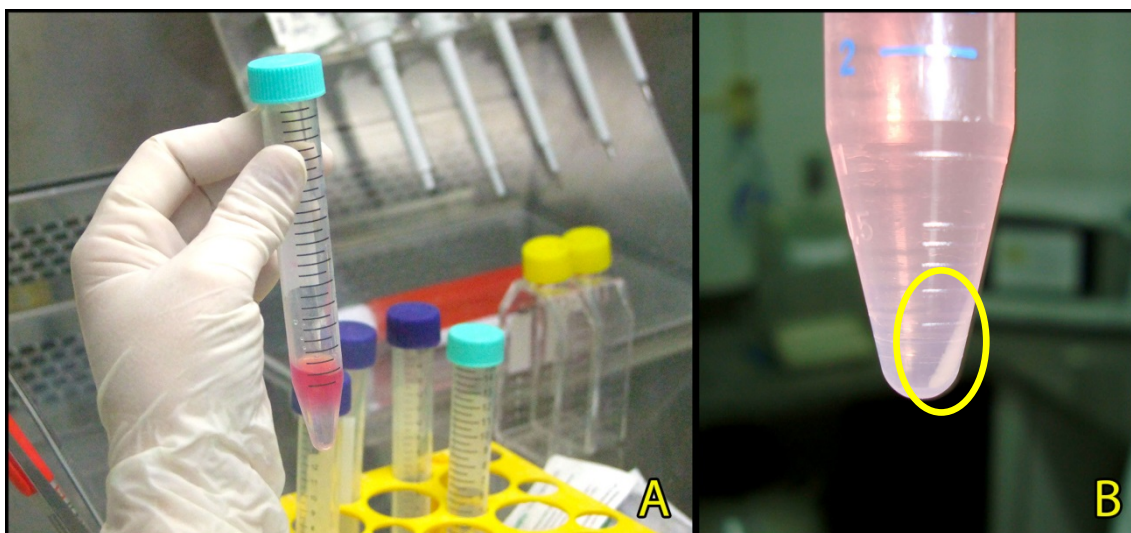


Figura 2 - A: Material obtido adicionado na proporção de 1:1 com Ficoll-Paque; B: Formação de 'pellet' celular após centrifugação.

Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e o 'pellet' foi ressuspendido em 1ml de meio contendo meio DMEM alta glicose completo (20% de Soro Fetal Bovino - SFB) (Gibco Laboratories – 12657).

As células foram semeadas em frascos de cultivo de 25cm² (Sardtedt – 83.1810.300), com 5mL de meio DMEM alta glicose com L-glutamina, 20% de SFB, 10µg/ml de penicilina/estreptomicina (Pen/Strep[®], 10UI/mL) (Gibco Laboratories - 15140) e 3µg/ml de Anfotericina B (Gibco Laboratories - 15290).

3.3. Manutenção dos cultivos primários

Os frascos de cultivo semeados foram mantidos em estufa de atmosfera úmida a 37,5°C a 5% de CO₂. Para manutenção das amostras celulares, foram efetuadas trocas do meio de cultivo a cada 3 dias, contendo DMEM baixa glicose (Gibco Laboratories - 10567), 20% de SFB, 10µg/ml de Pen/Strep[®] a 10UI/mL e 3µg/ml de Anfotericina B. 10µL/mL de penicilina/estreptomicina e 3µg/mL de Anfotericina B. O acompanhamento do crescimento celular foi

realizado por meio de microscópio óptico de luz DM IRB (Leica®), realizando-se posterior expansão do cultivo quando era atingido 80% de subconfluência no frasco de cultivo.

Para o cultivo celular foram obtidas imagens com o auxílio da câmera fotográfica digital Super Steady Shot DSC-T70 com 8 Megapixels e zoom óptico de 3 vezes (Cyber Shot - Sony®), acoplada ao microscópio DM IRB (Leica®).

3.4. Expansão dos cultivos primários

A expansão dos cultivos teve como objetivo obter maior quantidade de células e/ou selecionar um padrão celular de interesse. A subcultura foi realizada quando o frasco de cultivo se encontrava com 80% de subconfluência. Foi necessário realizar duas subculturas para obter o número necessário de células para o transplante de todos os animais do estudo.

Para realizar a passagem, o meio de cultivo do frasco foi descartado e em seguida foram lavadas com 1ml de solução tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2. Posteriormente foi adicionado 1ml de TrypLE Select® (Invitrogen – 12563-029), em seguida o frasco de cultivo foi transferido e mantido em estufa de atmosfera úmida a 37,5°C a 5% de CO₂, por 5 minutos. Neste período ocorre a atividade enzimática e soltam as células aderidas ao fundo do frasco de cultivo.

Após esse período, foi realizada a contagem das células com auxílio da Câmara de Neubauer® e transferidas cerca de 1×10^5 células para cada frasco de cultivo de 25cm².

As células em suspensão foram inseridas em tubo de plástico de 15ml, com 1ml de meio de cultivo contendo DMEM alta glicose e centrifugado a 1.500 RPM (340G) por 10 minutos, formando um 'pellet' celular. O sobrenadante foi descartado e o 'pellet' foi ressuspensionado em 1ml de meio completo, contendo DMEM de alta glicose, SFB, Pen/Strep e anfotericina B.

Posteriormente foram transferidos 1×10^5 células para cada frasco de cultivo de 25cm², contendo 5mL de meio DMEM alta glicose, 20% de SFB, 100µg/mL de Pen/Estrep e 3µg/mL de Anfotericina B.

3.5. Caracterização de células tronco mesenquimais

As CTMs provenientes do cultivo de primeira passagem foram caracterizadas com marcadores de superfícies, a fim de avaliar durante o cultivo a proporção entre CTMs e células-tronco hematopoiéticas. A leitura dos resultados foi feita através de citometria de fluxo (FACS Calibur – BD) – Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os marcadores utilizados foram os marcadores positivos: CD44+ (HCAM (OX50) FITC - Santa Cruz Biotechnology, EUA) e CD90+ (Mouse Anti-Rat FITC - Gibco Laboratories, EUA), e o marcador negativo: CD34- (Mouse Anti-Human FITC - BD Pharmingen, EUA).

A caracterização das CTMs produzidas neste estudo através do protocolo anteriormente descrito foi realizada anteriormente por GASPAROTTO (2012)⁵⁸. Os resultados provenientes da citometria de fluxo revelaram-se com baixa marcação para o marcador CD34, pois apenas 1,36% do total de células presentes na amostra foram marcadas. Foi observada alta marcação para os marcadores CD44, com 81,93% de células marcadas, e CD90, com 89,06% de células marcadas. Após a sua caracterização, GASPAROTTO (2012)⁵⁸ realizou ainda a diferenciação e marcação das células para padrões osteogênico, condrogênico e adipogênico, obtendo assim a confirmação de que se tratava realmente de CTMs.

3.6. Marcação de células-tronco mesenquimais

As células foram marcadas para estudo de proliferação celular *in vivo* com solução de Bromodeoxyuridine (BrdU) um análogo da Timidina, que incorpora ao DNA durante a fase S do ciclo celular. Como tal, BrdU foi utilizado para atestar o crescimento e proliferação celular *in vivo*, e foi utilizado em concentração de 10 µL de uma solução de 1mM BrdU/mL de meio de cultura, e adicionado ao frasco de cultivo celular com concentração final de 10µM/mL e permaneceu 'overnight'⁶¹.

4. Procedimento Experimental

4.1. Procedimento analgésico e anestésico

Os animais foram pesados para estabelecer a dosagem analgésica e anestésica. A anestesia geral foi realizada por injeção intraperitoneal, com uma associação na mesma seringa de cloridrato de ketamina (5%) na dose de 90mg/kg e cloridrato de xilazina (2%) a 5mg/kg. Em conjunto essas drogas apresentam um tempo de latência de 2 a 5 minutos e possuem efeito máximo de 30 minutos⁶⁰.

A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de reflexos palmar e plantar e alterações da frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR).

A analgesia pré e pós-cirúrgica dos animais foi realizada a partir do uso de cloridrato de tramadol, por via oral, na água de beber, na dose de 30mg/kg por 3 dias pós-cirúrgico⁶⁰. Por este ser um fármaco que perde sua ação quando em contato com a luz, os bebedouros dos animais foram envolvidos com papel alumínio durante o período de tratamento.

4.2. Procedimento cirúrgico

Após a anestesia e analgesia pré-operatória, foi realizada a tricotomia da região dorso-caudal do animal, primeiramente com tricótomo elétrico, seguido do uso de tricótomo manual e então posicionado em decúbito ventral. A antisepsia teve a utilização de iodo povidine tópico (Iodopovidona) e álcool etílico 70% e posteriormente a área a ser incisada foi marcada (Figura 3).

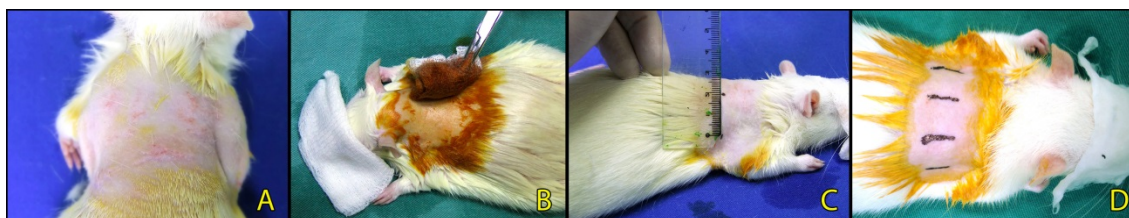


Figura 3 - A: Animal tricotomizado em decúbito ventral; B: Antissepsia do animal; C: Marcação de área a ser incisada (2cm); D: Marcação do animal onde foram realizadas as incisões.

Foram realizadas duas incisões fusiformes, de 2cm de comprimento por 1cm de largura, com lâmina de bisturi 21, sendo uma caudal ao membro torácico direito e uma caudal ao membro torácico esquerdo. Após este procedimento, o tecido subcutâneo de ambos os antímeros foi divulsionado com auxílio de tesoura cirúrgica reta romba- romba (Figura 4).

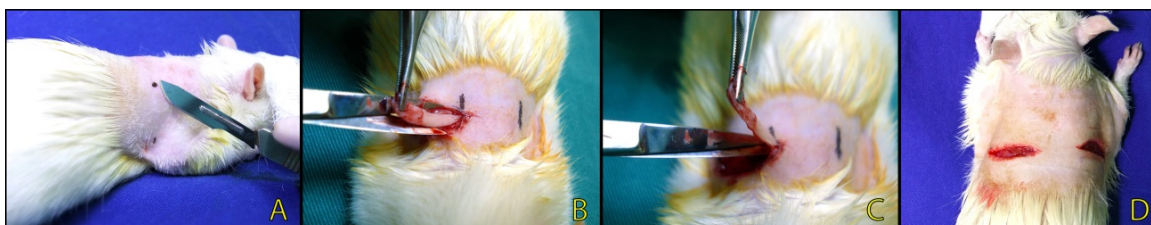


Figura 4 - A: Incisão em fusão da área marcada; B e C: Retirada da área incisa; D: Animal com tecido subcutâneo divulsionado.

Para os ensaios experimentais, os animais foram divididos em dois grupos distintos de 32 animais cada: Grupo A – SFPS versus sutura e Grupo; B – SFPS associada à CTMs versus sutura associada à CTMs. Para o seu acompanhamento, foram avaliados 8 animais para cada grupo nos dias 3, 7, 14 e 21.

Foram utilizados dois tratamentos em cada animal, para avaliação da resposta cicatricial, sendo que no grupo A no antímero direito dos animais foi aplicado o protocolo SFPS e o antímero esquerdo foi suturado com fio de poliamida (Mononylon® - Ethicon) 6-0 (Figura 5).

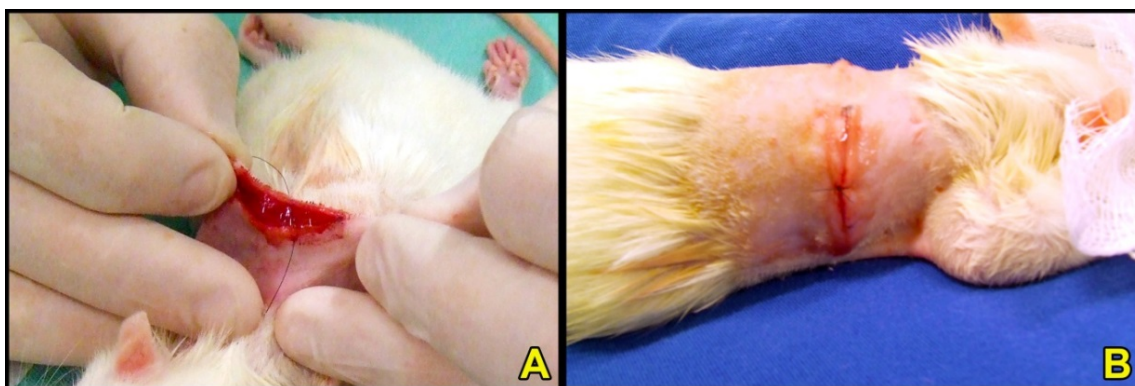


Figura 5 - A: Elevação de ferida cirúrgica para aplicação de selante, já com o fio de sutura posicionado entre as bordas para posterior ponto de fixação; B: Animal em decúbito ventral com as bordas da área incisionada unidas pelo selante e com ponto simples de aproximação.

Já no grupo B no antímero direito dos animais foi aplicado SFPS associado à CTMs e no antímero esquerdo, o tratamento estipulado foi sutura associada à CTMs, sendo a sutura realizada com fio de poliamida (Mononylon® - Ethicon) 6-0. Para diminuir a probabilidade de perda de material no tratamento 'sutura + CTM', foram dados os pontos anteriormente à aplicação do tratamento, porém eram deixados semiabertos e posteriormente à aplicação das CTMs, eram dados os pontos com auxílio de pinça oftálmica. A concentração de CTMs foi 1×10^5 em ambos os tratamentos (Figura 6).

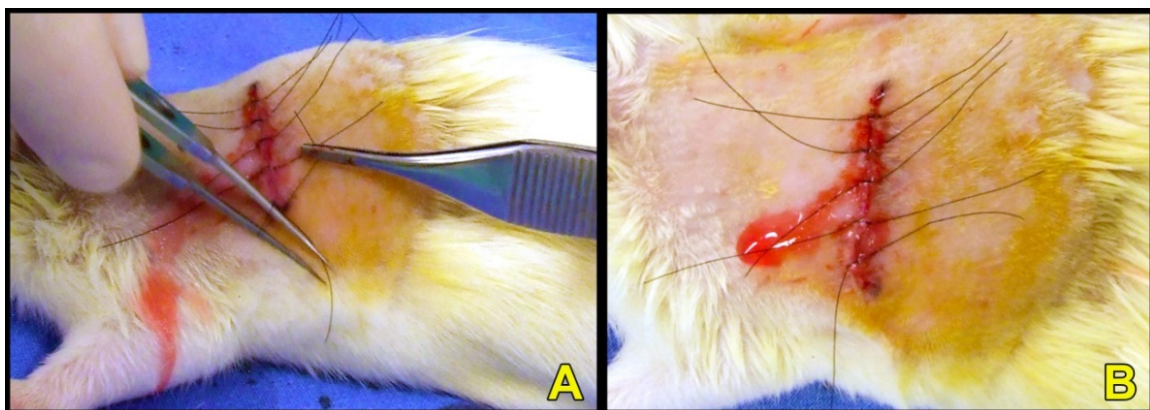


Figura 6 - A: Pontos separados simples fechados posteriormente à aplicação das CTMs com auxílio de pinças oftálmicas; B: Animal em posição ventral após a aplicação das CTMs suturados com pontos separados simples.

Tanto no grupo A, quanto no B, os antímeros esquerdos foram suturados com cinco pontos separados simples, nos antímeros direitos foi dado ponto de aproximação na região central da ferida cirúrgica. Os animais foram escolhidos de maneira aleatória para análise aos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgicos.

Nos três primeiros dias de pós-operatório, os animais foram mantidos em repouso, com água contendo analgésico e ração *ad libitum*. Os indivíduos foram separados individualmente em caixas de polipropileno forradas com maravalha em sala com temperatura controlada entre 21 e 24°C e iluminação com período claro/escuro de 12 horas.

4.3. Estudos macro e microscópico da cicatriz cirúrgica

A ferida cirúrgica foi monitorada diariamente para observação de deiscência, infecção, edema e inflamação, até o momento da eutanásia do animal. As cicatrizes cirúrgicas foram fotografadas com o modelo de câmera fotográfica semiprofissional Coolpix P520, 8,1MP, Zoom óptico de 42X (Nikon®) momentos antes da retirada a amostra para confecção das lâminas para estudo microscópico.

Os animais foram eutanasiados com uma sobredose do anestésico barbitúrico pentobarbital sódico (Hypnol®), por via intraperitoneal. A sobredose foi calculada para três vezes a dose recomendada para a espécie animal (45mg/kg), sendo aplicado, portanto 135mg/kg⁶⁰. Após o óbito dos animais, foi retirado o fragmento da pele contendo a cicatriz cirúrgica, colocados sobre um pedaço de papel cartão, para manter o tecido estendido e imediatamente fixados em formalina tamponada 10% por 24 horas (Figura 7).

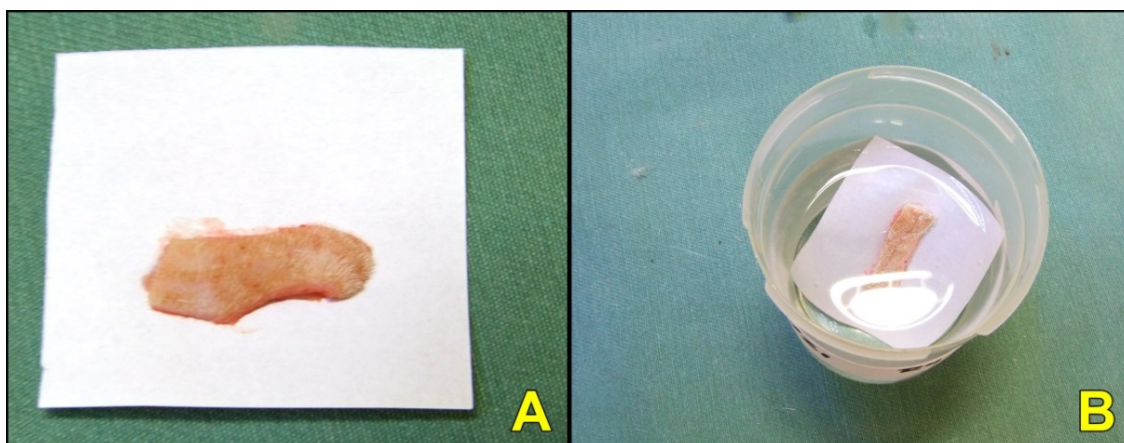


Figura 7 - A: Fragmento da pele contendo cicatriz cirúrgica; B: Material biológico fixado em formalina tamponada 10%.

As amostras fixadas foram encaminhadas para o Departamento de Patologia – FMB, UNESP, Botucatu- SP, onde foram processados pelas técnicas histológicas usuais, de desidratação, diafanização e inclusão em parafina.

Foram preparados blocos de parafina com dois segmentos obtidos de cada animal (Grupo A e B) e posteriormente foram cortados com micrótomo rotativo ajustado para 5µm de espessura, em sentido transversal, para que

assim todos os cortes apresentassem a região de ferida cirúrgica e em seguida estendidos em lâminas de vidro.

Todos os cortes foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) recobertas com resina sintética. A análise histológica avaliou a presença de células inflamatórias e de tecido proliferativo na região cicatricial. Porém para o Grupo B, que foi realizado tratamento com o uso de CTMs foi confeccionada uma lâmina a mais para posterior análise por microscopia de luz em microscópio confocal, para detecção de proliferação celular *in vivo*.

4.4. Microscopia de Fluorescência

As CTMs aplicadas no momento da cirurgia (Grupo B) foram avaliadas quanto a sua presença no local de aplicação e proliferação. O tecido fixado em formal 10% tamponado, foi desparafinado em Xilol por 5 minutos por 3 vezes, posteriormente mergulhado por 10 minutos em álcool absoluto por 2 vezes e mais 10 minuto em álcool 95%. Após este processo a lâmina foi imersa em HCl 2N por 20 minutos para abrir a fita de DNA para incorporar o BrdU e posteriormente imersa em solução de borato de sódio por 10 minutos.

Em seguida o tecido foi lavado em solução Tris (tris(hidroximetil)aminometano) pH 7,4 e adicionado o anticorpo anti-bromodeoxyuridine (anti-BrdU) (mouse IgG -A21300, Invitrogen) em uma diluição de 1:200, 'overnight'. Posteriormente as laminas foram lavadas em água Milli-Q, adicionado o anticorpo secundário Anti-Mouse IgG por 1 hora. Após este processo, foi adicionado solução de 5µg/ml de DAPI (4'-6-diamidino-2-phenilindole - D1306, Invitrogen) por 20 minutos.

As amostras foram então lavadas em água Milli-Q, colocadas lamínulas e em seguida a leitura foi realizada com auxílio do Microscópio Confocal TCS SP5 (Leica Microsystems®), do Centro de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biologia - IBB – UNESP, Botucatu - SP. Foram capturadas imagens de 3 diferentes campos por amostra.

4.5. Análise de dados

Após a finalização do preparo das lâminas de HE, foi realizada análise descritiva. As lâminas foram encaminhadas ao Departamento de Patologia – FMVZ – UNESP, e analisadas em microscópio binocular AxioVision (Zeiss®) e a partir disso criou-se um padrão qualitativo e quantitativo para o conjunto de células inflamatórias do tecido epitelial lesado.

Foi realizada a análise microscópica em HE do infiltrado inflamatório e células inflamatórias como macrófagos, plasmócitos, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos, basófilos, células multinucleadas, bem como angiogênese e fibroplasia da lesão, para avaliar o processo inflamatório na pele após cicatriz cirúrgica.

Para tanto, utilizou-se uma escala de intensidade (escore) da presença de células no local, modificada de GEBOES (2000)⁶², variando de zero a cinco, descritas em tabela abaixo (Tabela 1). Os dados foram comparados dentre os grupos, como também entre os 4 períodos de tratamento.

Tabela 1: Critério de avaliação por escore de intensidade de infiltrado celular.

0	Ausência celular, ou arquitetura normal do tecido
1	Grau leve de presença celular
2	Grau leve a moderado de presença celular
3	Grau moderado de presença celular
4	Grau moderado a intenso de presença celular
5	Grau intenso de presença celular

Para a análise de microscopia de luz foram escolhidos aleatoriamente lâminas de ambos os antímeros de quatro animais do grupo B, para cada período pós-cirúrgico. As amostras foram observadas em microscópio confocal TCS SP5 (Leika Microsystems®) e obtidas imagens de três campos por amostra biológica, no aumento de 20X. As células das imagens foram contadas com software Image J.

5. Análise estatística

Para os dados obtidos com a leitura das lâminas de HE, foi realizada análise de variância usando o delineamento fatorial 4x4, onde se avaliou os quatro grupos nos 4 tempos ($P < 0,05$). Para comparação das médias mediante significância do teste foi realizado o Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para os dados obtidos com a contagem celular das imagens de fluorescência das CTMs, foi feita análise de variância em esquema fatorial considerando a contagem de células-tronco para cada grupo no decorrer de 21 dias ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais

A fração de células-tronco mesenquimais CTMs obtidas da medula óssea dos ratos, provenientes do halo celular no cultivo primário apresentaram morfologia fibroblastóide heterogênea (Figura 8A). Os cultivos realizados levaram aproximadamente 10 dias para atingirem a subconfluência de 80% (Figura 8B), podendo assim ser possível a replicação dos frascos de cultivo celular.

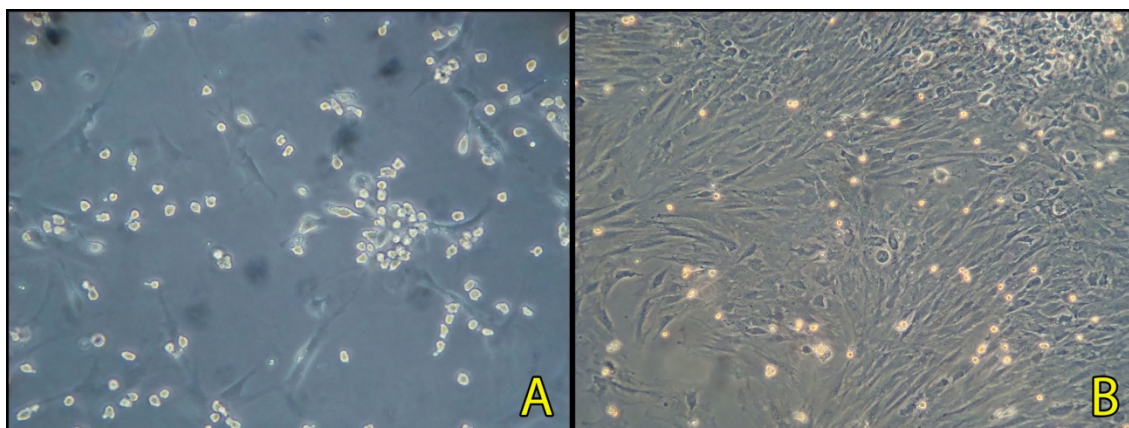


Figura 8 - A: Cultivo celular no 3º dia após a coleta de medula óssea de ratos, apresentando baixa subconfluência, porém apresentando células com morfologia fibroblastóide; B: Cultivo celular no 9º dia após a coleta de medula óssea de ratos, apresentando subconfluência alta e morfologia fibroblastóide.

Devido à utilização para a produção das CTMs, do mesmo protocolo já utilizado por GASPAROTTO (2012)⁵⁸, onde este autor realizou a sua caracterização, como descrito anteriormente, e mostrou a diferenciação destas células nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, não houve a necessidade de sua repetição. Este protocolo está padronizado por nosso Laboratório, o qual vem sendo utilizado em diversos estudos.

2. Análise Macroscópica das cicatrizes cirúrgicas

A ferida cirúrgica foi monitorada para observação de deiscência, infecção, edema e inflamação. Foram digitalizadas imagens das cicatrizes cirúrgicas momentos antes da retirada da amostra para confecção das lâminas para estudo microscópico e para observação do aspecto macroscópico da cicatriz. Não ocorreu óbito de nenhum animal durante o experimento. Os resultados do exame macroscópico foram divididos em 4 grupos, considerando-se os períodos de análise, 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirúrgico.

2.1. P3 – Análise macroscópica das cicatrizes cirúrgicas dos grupos A e B, no período 3 dias pós-cirúrgico.

No grupo A, composto pelos tratamentos selante de fibrina derivado de peçonha de serpente (SFPS) e sutura, o período de análise de 3 dias pós-cirúrgico, indicou que 37,5% dos animais (n=3) do grupo SFPS, apresentaram formação de tecido de aspecto fibroso no local incisado, e no grupo sutura 37,5% (n=3) apresentaram formação de crostas, não havendo assim abertura da ferida cirúrgica.

No grupo B, composto por selante de fibrina associado a células-tronco mesenquimais (SFPS + CTM) e sutura associado a CTM (sutura + CTM), foram obtidos os mesmos dados percentuais, tanto para o lado 'SFPS + CTM', quanto para o lado 'sutura + CTM'.

Assim sendo, 62,5% dos animais, em ambos os grupos analisados (A e B) as bordas permaneceram completamente unidas, sem a formação de tecido de aspecto fibroso ou formação de crosta (Figura 9).



Figura 9 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 3 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.

2.2. P7 – Análise macroscópica das cicatrizes cirúrgicas dos grupos A e B, no período 7 dias pós-cirúrgico.

Para a análise do período de 7 dias pós-cirúrgico, o grupo A (SFPS e sutura), o tratamento SFPS apresentou 25% (n=2) com formação de tecido de consistência firme no local e 50% (n=4) dos animais do tratamento sutura, apresentaram intensa formação de crostas nas amostras biológicas. Portanto, para o grupo A, 75% dos animais (n=6) do grupo SFPS e 50% (n=4) do grupo sutura, as bordas permaneceram unidas, sem a formação de tecido de aspecto fibroso.

No grupo B ('SFPS + CTM' e 'sutura + CTM'), no tratamento 'SFPS + CTM' foram obtidos dados de 12,5% (n=1) apresentando formação tecidual de aspecto fibroso no local e 37,5% (n=3) dos animais do grupo 'sutura + CTM' apesar de não apresentavam todos os pontos de sutura no local da ferida cirúrgica, não apresentou abertura da ferida cirúrgica (Figura 10).



Figura 10 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 7 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.

2.3. P14 – Análise macroscópica das cicatrizes cirúrgicas dos grupos A e B, no período 14 dias pós-cirúrgico.

Para o grupo A (SFPS e sutura), 87,5% do 'n' total (n=7) do grupo SFPS e 100% (n=8) do grupo sutura, as bordas permaneceram unidas, sem a formação de tecido de aspecto fibroso e no grupo B, 100% dos animais analisados (n=8), tanto para o grupo 'SFPS + CTM', quanto para o grupo 'sutura + CTM', não apresentaram abertura de cicatriz ou deiscência de pontos no local.

Para este período, já não eram mais notadas a presença de crostas cicatriciais intensas nos animais nos grupos contendo sutura (sutura e 'sutura + CTM'). Em ambos os grupos (A e B), os antímeros tratados com selante de fibrina, a cicatriz cirúrgica se apresentou visualmente com melhor aparência, por se apresentar mais retraída e linear, quando comparada as cicatrizes tratadas com sutura (sutura e 'sutura + CTM') (Figura 11).



Figura 11 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 14 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS'.

2.4. P21 – Análise macroscópica das cicatrizes cirúrgicas dos grupos A e B, no período 21 dias pós-cirúrgico.

No período de 21 dias pós-cirúrgico, 100% dos animais do grupo A, tanto do tratamento SFPS, quanto no tratamento sutura, apresentou bordas unidas e sem formação de tecido de consistência firme no local da incisão. Já no grupo B, 87,5% dos animais do grupo 'SFPS + CTM', e 100% dos animais do grupo 'sutura + CTM', não apresentaram formação de tecido de aspecto

fibroso no local ou deiscência de pontos no local. Neste período, já não eram mais notada presença de crostas cicatriciais nos tratamentos sutura e 'sutura +CTM'.

Em ambos os grupos, os antímeros tratados com SFPS (SFPS e SFPS + CTM), a cicatriz cirúrgica se apresentou com aparência visual muito semelhante a de um tecido integro, sendo que aos 21 dias pós-cirúrgico, só foi possível encontrar a lesão cirúrgica destes tratamentos, através do posicionamento anatômico utilizado para a técnica cirúrgica e presença de ponto de fixação no local (Figura 12).

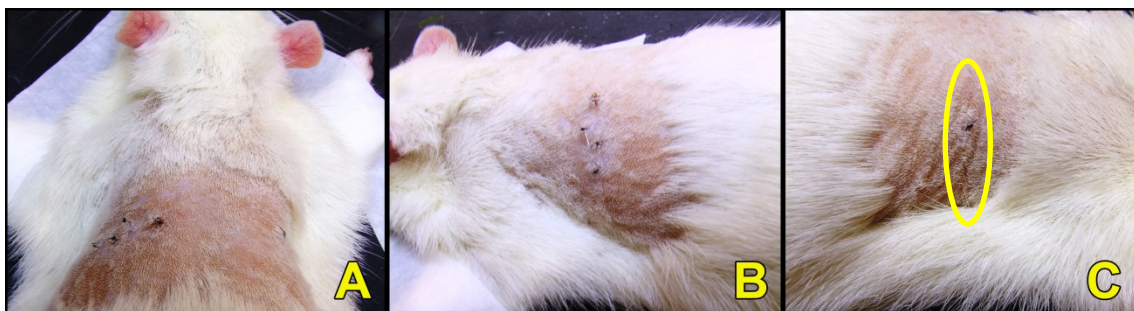


Figura 12 - A: Animal em posição ventral evidenciando os dois tratamentos utilizados, 21 dias após procedimento cirúrgico; B: Animal em posição lateral esquerda com tratamento 'sutura convencional' C: Animal em posição lateral direita com tratamento 'SFPS', sendo evidenciado no círculo, a posição anatômica da cicatriz cirúrgica.

3. Análise microscópica de células inflamatórias da cicatriz cirúrgica.

Foi realizada a análise microscópica em HE para avaliar o processo inflamatório e leucocitário na pele após cicatriz cirúrgica. Para tanto, utilizou-se uma escala de intensidade (escore) da presença de células no local, através de técnica modificada de GEBOES *et. al.* (2000)⁶².

3.1. Infiltrado Inflamatório

Analisando-se a média geral dos tratamentos, observou-se que o grupo 'SFPS' apresentou maior intensidade inflamatória quando comparado aos procedimentos de sutura e 'sutura + CTM', porém sem diferença estatística do tratamento 'SFPS +CTM'. Este também não foi estatisticamente diferente em intensidade inflamatória dos demais grupos.

Em relação aos períodos de avaliação, todos os grupos mostraram maior intensidade nos primeiros dias, sendo que após 14 dias, houve uma queda significativa nesse valor (Tabela 2).

Considerando o período de 3 dias pós-cirúrgico, o tratamento SFPS apresentou diferença estatística em relação aos demais grupos, obtendo-se um infiltrado inflamatório mais intenso, porém os outros tratamentos não diferiram estatisticamente (Figura 13).

No 7º dia de análise, o tratamento SFPS mostrou-se estatisticamente superior ao tratamento sutura e apresentando maior intensidade de infiltrado inflamatório, porém ambos não diferiram dos tratamentos do grupo B ('SFPS + CTM' e 'sutura + CTM') (Figura 14).

Ao final de 14 dias, não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, porém com 21 dias pós-cirúrgico, o tratamento sutura apresentou maior intensidade de infiltrado inflamatório e estatisticamente superior ao grupo 'sutura + CTM', que apresentou menor intensidade para inflamação, porém ambos os tratamentos não mostraram diferença estatística quando comparados aos tratamentos envolvendo o selante (SFPS e 'SFPS + CTM') (Figura 15).

Tabela 2: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' no infiltrado de células inflamatórias nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.

Infiltrado Inflamatório					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	2,75bAB	2,88bA	1,75aBC	1,50aC	2,22b
SFPS	4,25aA	4,00aA	2,00aB	1,38abB	2,91a
Sutura+CTM	2,88bAB	3,38abA	1,88aB	0,38bC	2,12b
SFPS+CTM	3,12bAB	3,88abA	2,62aB	0,50abC	2,53ab
Média	3,25A	3,53A	2,06B	0,94C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo=0,001; p período<0,001; p interação=0,007.

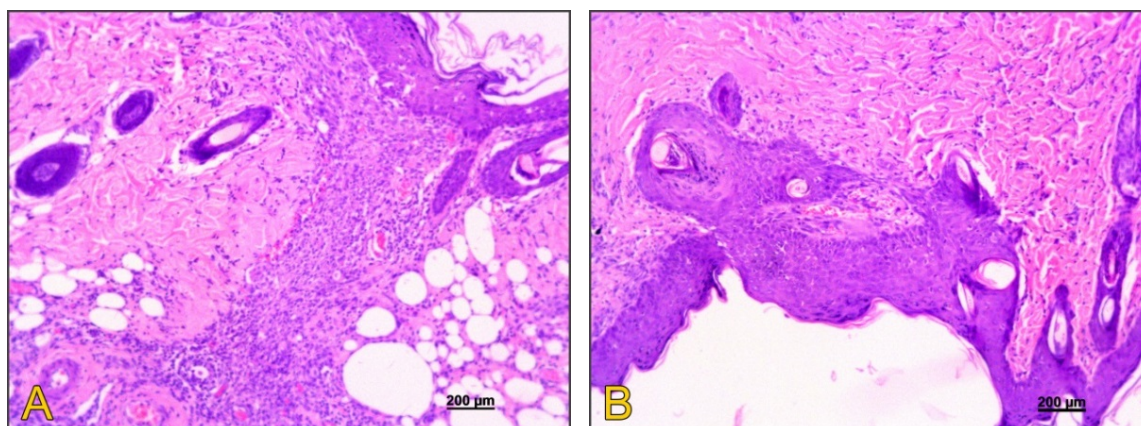


Figura 13 – A: Lâmina de HE em aumento de 10X, com tratamento SFPS no período de análise 3 dias pós-cirúrgico; B: Lâmina de HE em aumento de 10X, com tratamento sutura no períodos de análise 3 dias pós-cirúrgico.

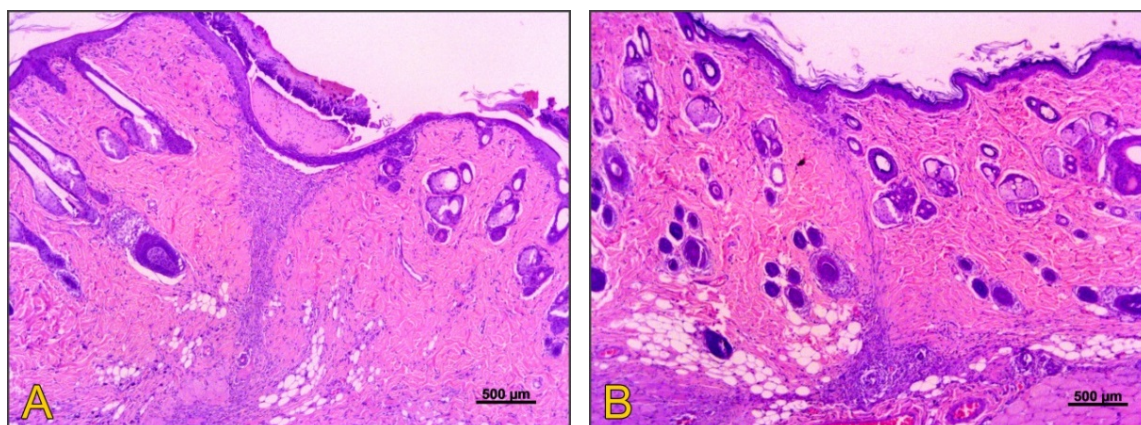


Figura 14 – A: Lâmina de HE em aumento de 5X, com tratamento SFPS no período de análise 7 dias pós-cirúrgico; B: Lâmina de HE em aumento de 5X, com tratamento sutura no períodos de análise 7 dias pós-cirúrgico.

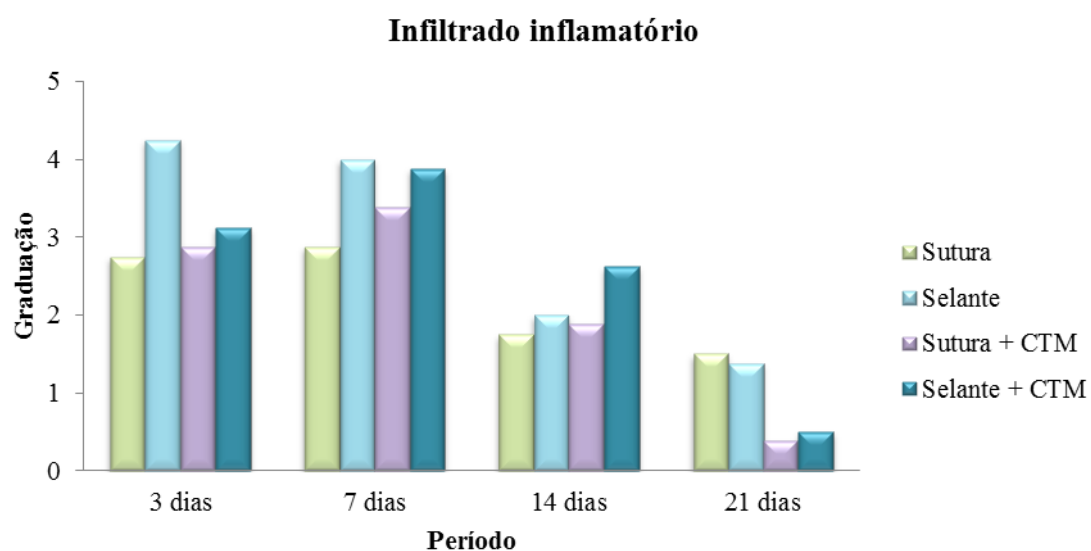


Figura 15 – Análise de intensidade de infiltrado inflamatório dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.2. Macrófago

O grupo SFPS em média apresentou uma maior intensidade de macrófagos comparados aos procedimentos do grupo B, que incluem o tratamento 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM', porém foi estatisticamente diferente ao tratamento sutura.

Considerando os períodos de tratamento, observou-se que nos primeiros dias, a intensidade de macrófagos foi maior que aos 14 dias e diferente estatisticamente de 21 dias pós-cirúrgico.

O grupo sutura por sua vez se diferiu estatisticamente apenas do grupo 'sutura + CTM', não diferindo dos demais (Tabela 3) (Figura 16).

Tabela 3: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de macrófago nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Macrófago					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	3,38	3,62	2,12	1,38	2,62ab
SFPS	3,88	4,12	2,25	1,62	2,97a
Sutura+CTM	2,50	2,88	1,88	0,50	1,94c
SFPS+CTM	2,75	3,12	2,25	0,50	2,16bc
Média	3,12A	3,44A	2,12B	1,00C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo $< 0,001$; p período $< 0,001$; p interação $= 0,577$.

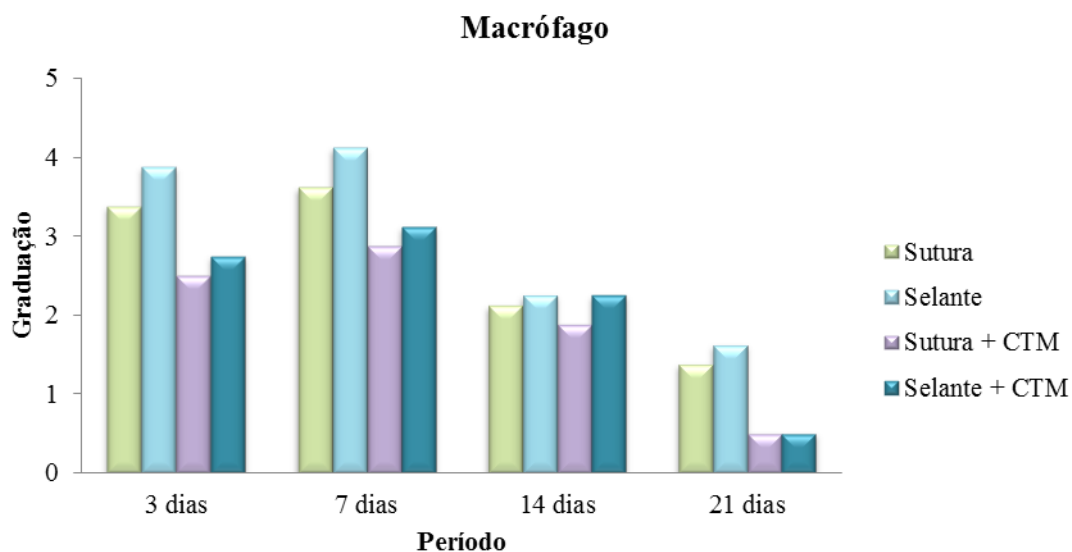


Figura 16 – Análise de intensidade de macrófago dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.3. Plasmócito

Em média, observa-se que no período de 7 dias pós-cirúrgico, houve uma resposta mais intensa para plasmócitos, mostrando diferença estatística entre os outros períodos analisados. Porém os períodos de 3 e 14 dias, não divergiram entre si.

Já no período de 21 após a cirurgia é evidenciado um importante decréscimo da intensidade de plasmócitos, mostrando diferença estatística quando comparados aos demais períodos de análise.

Em média os tratamentos dentro dos grupos A (sutura e SFPS) e B (sutura + CTM e SFPS + CTM) não mostraram diferença estatística significativa quando comparados entre si, porém o grupo A apresentou uma maior intensidade de plasmócitos, quando comparado ao grupo B (Tabela 4) (Figura 17).

Tabela 4: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de plasmócito nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Plasmócito					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	2,12	2,62	2,00	1,38	2,03a
SFPS	2,62	2,75	1,62	1,38	2,09a
Sutura+CTM	1,50	2,25	1,38	0,38	1,38b
SFPS+CTM	1,62	2,38	1,75	0,50	1,56b
Média	1,97B	2,50A	1,69B	0,91C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). $p_{\text{grupo}} < 0,001$; $p_{\text{período}} < 0,001$; $p_{\text{interação}} = 0,331$.

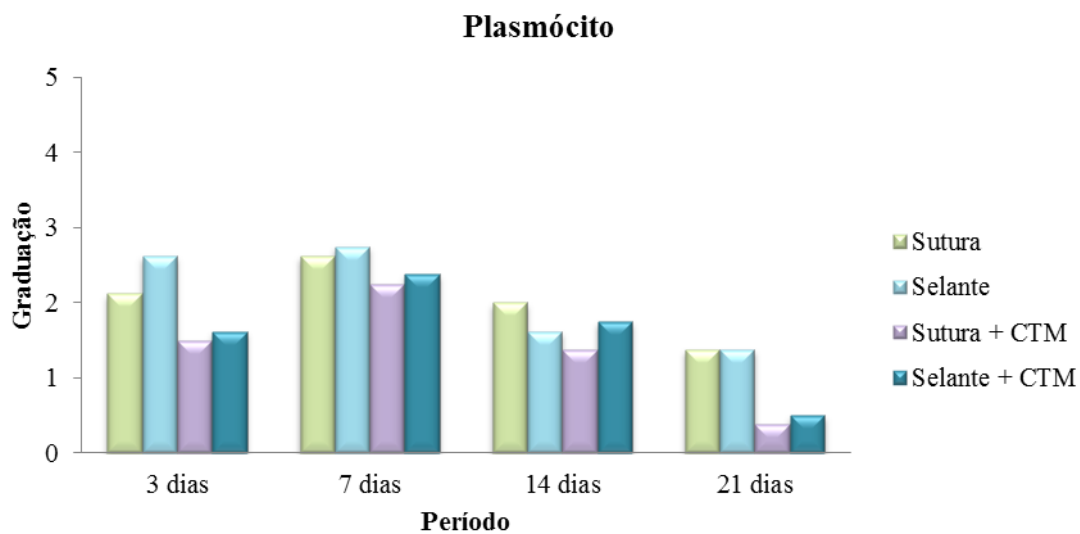


Figura 17 – Análise de intensidade de plasmócito dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.4. Eosinófilo

Quando analisada a intensidade de eosinófilos para os tratamentos sutura, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' os períodos de 3, 7 e 14 não apresentaram diferença significativa entre si e apresentaram maior intensidade que aos 21 dias. Em média, os procedimentos realizados não apresentaram diferença estatística significativa entre si.

Para o grupo SFPS houve uma queda gradativa na intensidade de eosinófilo a partir do 7º dia de análise.

Quando analisados as médias dos períodos, constatamos que os resultados obtidos ao final de 3, 7 e 14 dias de análise não apresentam diferença estatística significativa entre si, somente aos 21 dias pós-cirúrgico houve um decréscimo significativo no escore de eosinófilo das lâminas analisadas (Tabela 5) (Figura 18).

Tabela 5: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de eosinófilo nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Eosinófilo					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,00abA	1,00aA	0,88aA	0,25aB	0,78a
SFPS	1,38aA	1,12aA	0,62aB	0,12aC	0,81a
Sutura+CTM	0,88bA	1,00aA	1,00aA	0,00aB	0,72a
SFPS+CTM	1,00abA	1,00aA	1,00aA	0,00aB	0,75a
Média	1,06A	1,03A	0,88A	0,09B	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo=0,654; p período<0,001; p interação=0,012.

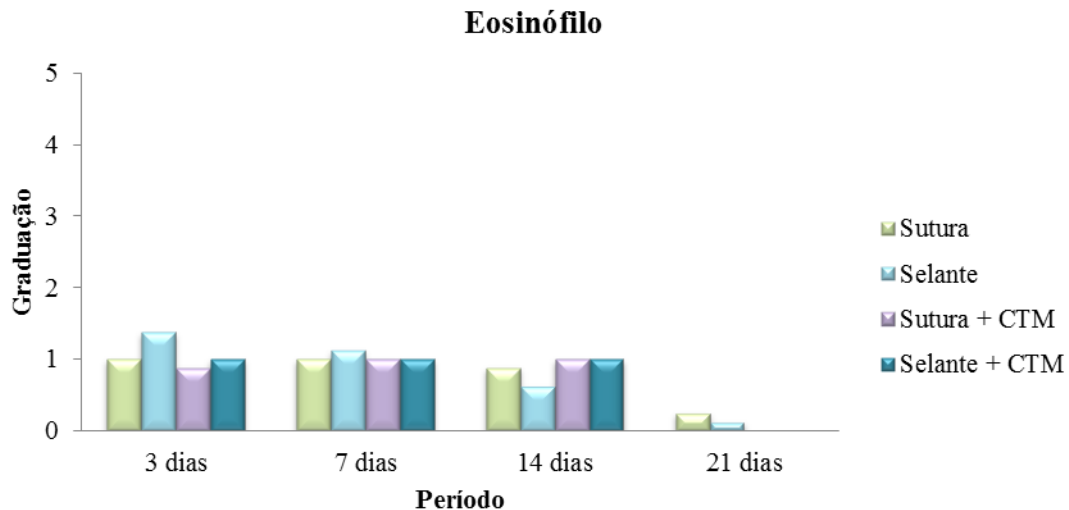


Figura 18 – Análise de intensidade de eosinófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.5. Linfócito

Para linfócitos os resultados mostraram não haver diferença estatística significativa entre os tratamentos analisados nos períodos de 3, 7 e 14 dias. No 21º pós-cirúrgico, no entanto, o grupo A que é composto pelos tratamentos sutura e SFPS mostraram diferença estatística significativa dos tratamentos do grupo B ('sutura + CTM' e 'SFPS + CTM'), sendo que este último apresenta intensidade de linfócitos menor quando comparados a do grupo A.

Em média, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Aos 7 dias pós-cirurgia, o grupo sutura apresentou maior intensidade de linfócitos que o 21º dia, porém ambos períodos não diferiram dos demais. Não houve diferença significativa entre os períodos considerando o grupo SFPS entre os três primeiros períodos, porém aos 21 pós-cirúrgico houve um decréscimo significativo.

Os resultados obtidos para os tratamentos do grupo B indicaram um decréscimo significativo na intensidade de linfócitos após 21 dias de cirurgia, porém sem diferença estatística entre os 3 primeiros períodos. Quando analisada a média dos períodos, não houve diferença estatística (Tabela 6) (Figura 19).

Tabela 6: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de linfócito nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Linfócito					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,50aAB	2,12aA	1,88aAB	1,25aB	1,69a
SFPS	1,62aA	1,88aA	1,50aA	1,25aA	1,56a
Sutura+CTM	1,62aA	2,25aA	1,62aA	0,38bB	1,47a
SFPS+CTM	2,00aA	1,62aA	2,00aA	0,38bB	1,50a
Média	1,69A	1,97A	1,75A	0,81B	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). $p_{\text{grupo}} = 0,433$; $p_{\text{período}} < 0,001$; $p_{\text{interação}} = 0,002$.

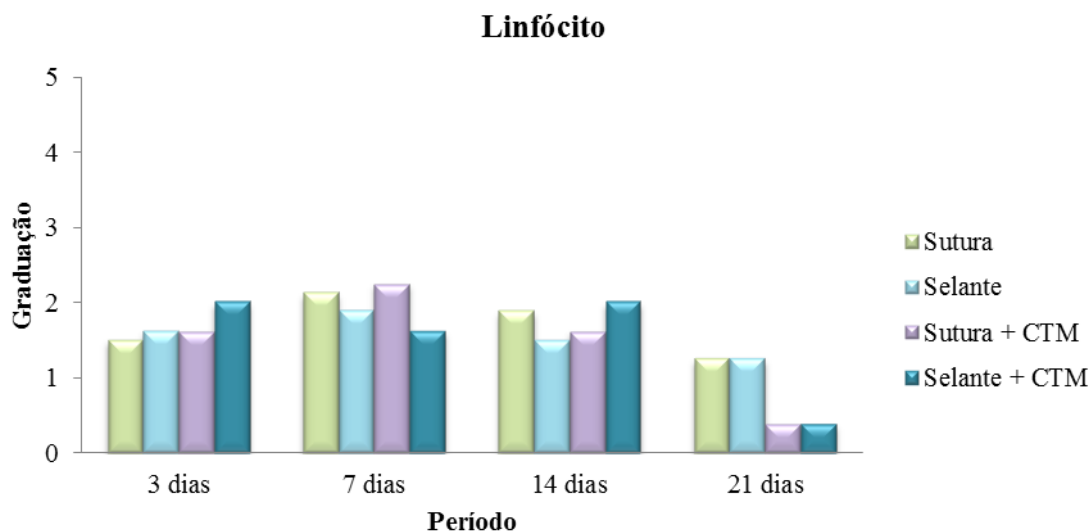


Figura 19 – Análise de intensidade de linfócito dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.6. Neutrófilo

Em média os períodos de 3 e 7 dias não diferiram estatisticamente entre si. Já aos 14 dias, houve uma redução significativa média de 107,8% e aos 21 dias de 165,8%.

Observando-se os tratamentos realizados, o procedimento sutura não apresentou diferença estatística para intensidade de neutrófilos no decorrer dos períodos. Já o tratamento contendo SFPS apresentou diferença significativa dos períodos 3 e 7 quando comparados com os períodos 14 e 21.

O grupo B ('sutura + CTM' e 'SFPS + CTM') apresentou resposta estatística semelhante, onde o período de 3 dias de análise se difere estatisticamente dos períodos de 14 e 21 dias, porém são semelhantes ao período de 7 dias, porém o período de 7 dias não mostra diferença estatística quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico (Tabela 7) (Figura 20).

Tabela 7: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de neutrófilos nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos. Análise comparativa da intensidade de neutrófilo nos diferentes tratamentos e períodos de análise distintos.

Neutrófilo					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,88aA	1,75aA	1,00aA	1,38aA	1,50a
SFPS	2,75aA	2,62aA	1,12aB	0,25bB	1,69a
Sutura+CTM	2,62aA	1,62aAB	1,00aBC	0,00bC	1,31a
SFPS+CTM	2,62aA	2,25aAB	1,25aB	0,00bC	1,53a
Média	2,47A	2,06A	1,09B	0,41C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo=0,349; p período<0,001; p interação=0,005.

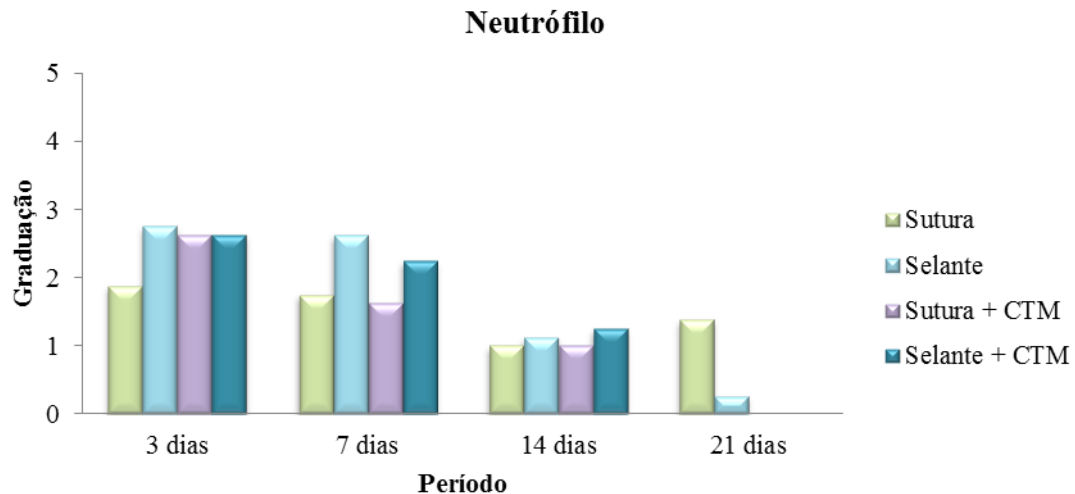


Figura 20 – Análise de intensidade de neutrófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.7. Basófilo

Quando comparadas as médias dos períodos de análise, aos 21 dias de cirurgia, a intensidade de basófilos encontrou-se estatisticamente menor quando comparados aos outros 3 períodos analisados.

Já as médias dos procedimentos realizados indicam que o tratamento ‘sutura + CTM’ se mostrou com intensidade menor quando comparado aos tratamentos do grupo A (SFPS e sutura), porém estatisticamente semelhante ao tratamento ‘SFPS + CTM’ (Tabela 8) (Figura 21).

Tabela 8: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de basófilo nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Basófilo					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,12	1,25	1,25	0,50	1,03a
SFPS	1,12	1,50	1,25	0,25	1,03a
Sutura+CTM	0,88	1,00	0,75	0,00	0,66b
SFPS+CTM	1,12	1,12	1,00	0,00	0,81ab
Média	1,06A	1,22A	1,06A	0,19B	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). $p_{\text{grupo}} < 0,001$; $p_{\text{período}} < 0,001$; $p_{\text{interação}} = 0,706$.

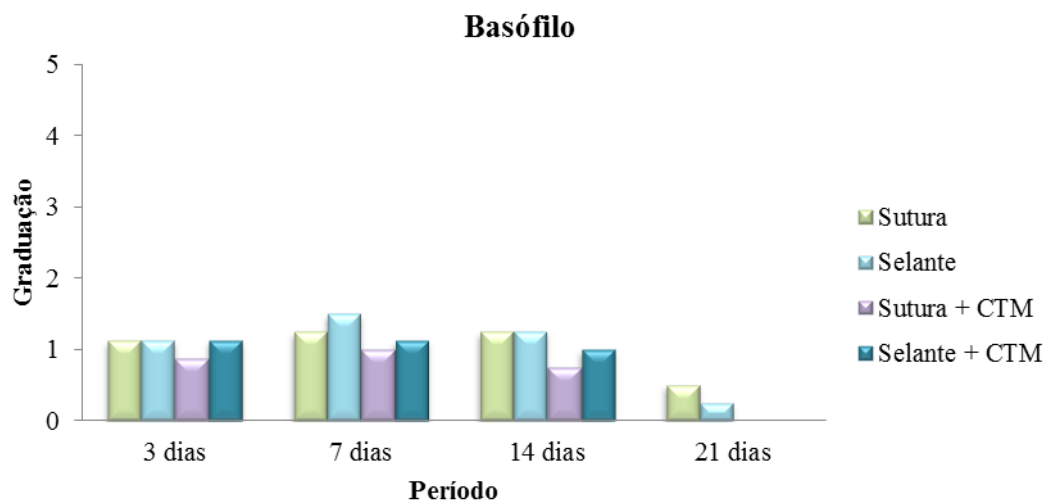


Figura 21 – Análise de intensidade de basófilo dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.8. Células Multinucleadas

Os dados obtidos para intensidade de células multinucleadas indicaram só haver diferença estatística entre os tratamentos no 3º dia de cirurgia em relação ao tratamento SFPS e 'SFPS + CTM', não diferindo do tratamento sutura.

Analisando-se a média geral dos tratamentos, obtivemos dados que reforçam essa diferença do procedimento 'sutura + CTM', quando comparada aos tratamentos do grupo A (SFPS e sutura), porém não se mostrou diferente estatisticamente do grupo 'SFPS + CTM'.

Em todos os tratamentos analisados, houve uma redução significativa da intensidade de células multinucleadas aos 21 dias. Este dado é confirmado pela média geral dos períodos (Tabela 9) (Figura 22).

Tabela 9: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de células multinucleadas nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.

Células multinucleadas					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,50abAB	1,75aA	1,25aAB	0,88aB	1,34a
SFPS	1,88aA	1,38aAB	1,25aAB	0,75aB	1,31a
Sutura+CTM	0,75bAB	1,25aA	1,38aA	0,25aB	0,91b
SFPS+CTM	1,62aA	1,75aA	1,62aA	0,12aB	1,28ab
Média	1,44A	1,53A	1,38A	0,50B	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo=0,013; p período<0,001; p interação=0,025.

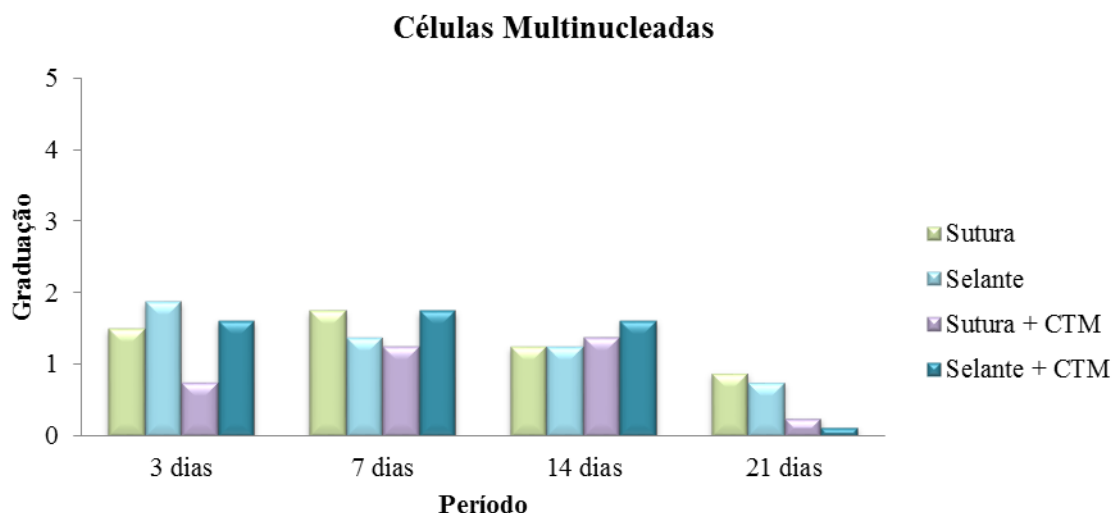


Figura 22 – Análise de intensidade de células multinucleadas dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.9. Angiogênese

Em média os tratamentos não mostraram diferença estatística entre si. A média analisada aos períodos, não mostra diferença estatística aos períodos 3 e 7 pós-cirúrgicos, porém há diferença estatística destes aos períodos 14 e 21, sendo que o período de 21 dias apresentou menos nível de intensidade comparado aos outros períodos.

Após 3 dias de cirurgia, os tratamentos contendo selante de fibrina (SFPS e 'SFPS + CTM') apresentaram diferença estatística do tratamento sutura.

O tratamento sutura não apresentou diferença estatística da intensidade de angiogênese dentre os períodos. O grupo SFPS apresentou diferença estatística dos períodos 3 e 7 quando comparados aos períodos 14 e 21 dias. O procedimento envolvendo 'sutura + CTM' apresentou ao 7º dia pós-cirúrgico diferença estatística ao 21º dia de cirurgia. O tratamento com 'SFPS + CTM' mostrou uma menor intensidade de angiogênese ao final de 21 dias de cirurgia, sendo estatisticamente significativo dos demais períodos (Tabela 10) (Figura 23).

Tabela 10: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de angiogênese nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós-cirurgia na pele de ratos.

Angiogênese					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,25bA	1,75aA	1,25aA	1,12aA	1,34a
SFPS	2,25aA	2,25aA	1,25aB	1,12aB	1,72a
Sutura+CTM	1,88abAB	2,25aA	1,12aBC	0,50aC	1,44a
SFPS+CTM	2,25aA	2,12aA	1,62aA	0,38aB	1,59a
Média	1,91A	2,09A	1,31B	0,78C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). $p_{\text{grupo}} = 0,056$; $p_{\text{período}} < 0,001$; $p_{\text{interação}} = 0,004$.

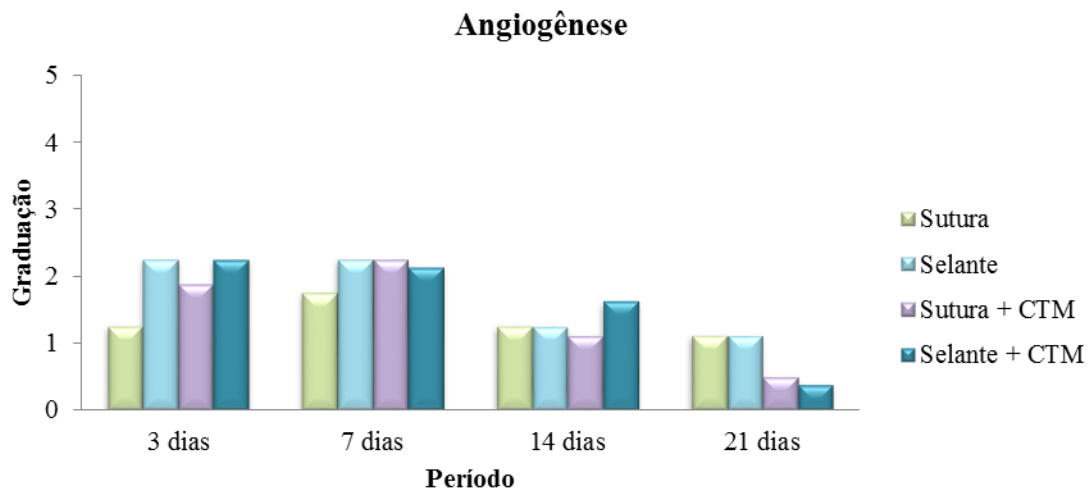


Figura 23 – Análise de intensidade de angiogênese dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

3.10. Fibroplasia

Em média, o tratamento SFPS mostrou maior intensidade de fibroplasia, com diferença estatística ao tratamento 'sutura + CTM'. A média dos períodos mostrou que após 7 dias de cirurgia, ocorreu o maior aumento de intensidade de fibroplasia, diferente estatisticamente dos demais períodos, porém entre os períodos 3 e 14, não houve diferença estatística.

Quando observados os dados obtidos para a fibroplasia das amostras biológicas notou-se não haver diferença estatística entre os tratamentos nos períodos 3, 7 e 14, porém o período 21 indicou diferença entre os grupos A (SFPS e sutura) e B ('SFPS + CTM' e 'sutura + CTM'), sendo que o grupo contendo células-tronco apresentou menor nível de intensidade de fibroplasia quando comparado ao grupo com tratamentos sem CTM.

As amostras do grupo A (sutura e SFPS) não apresentaram diferença estatística entre os períodos, já o grupo B apresentou uma redução significativa na intensidade de fibroplasia ao período 21 dias pós-cirurgia, sendo que a menor intensidade de fibroplasia encontrada foi do tratamento 'SFPS + CTM', diferindo dos demais tratamentos (Tabela 11) (Figura 24).

Tabela 11: Efeito dos tratamentos sutura, SFPS, 'sutura + CTM' e 'SFPS + CTM' na intensidade de fibroplasia nos períodos 3, 7, 14 e 21 dias pós- cirurgia na pele de ratos.

Fibroplasia					
Grupo	Período				Média
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias	
Sutura	1,75aA	2,25aA	1,88aA	1,75aA	1,91ab
SFPS	2,12aA	2,50aA	2,25aA	1,88aA	2,19a
Sutura+CTM	1,88aA	2,62aA	1,88aA	0,50bB	1,72b
SFPS+CTM	1,75aB	2,75aA	2,25aAB	0,50bC	1,81ab
Média	1,88B	2,53A	2,06B	1,16C	

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferiram estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$). p grupo=0,038; p período<0,001; p interação=0,002.

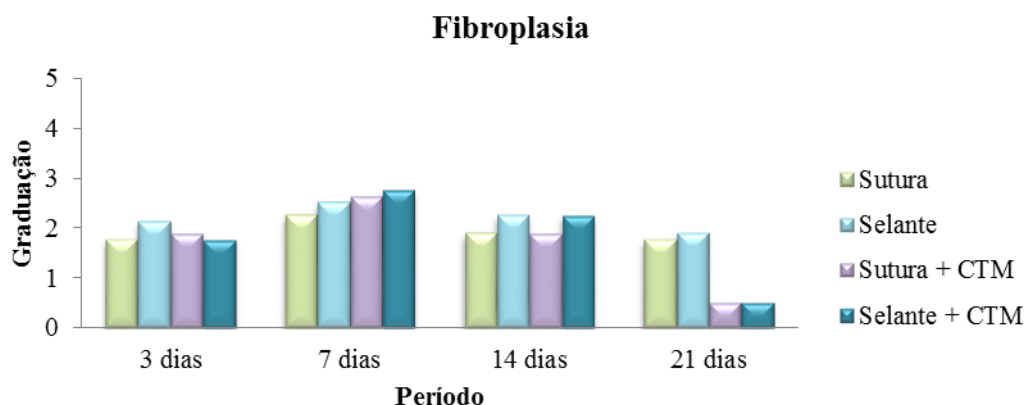


Figura 24 – Análise de intensidade de fibroplasia dos diferentes tratamentos nos períodos 3, 7, 14 e 21 pós-cirúrgico.

4. Microscopia de Fluorescência

Foram escolhidos aleatoriamente lâminas de 4 animais do grupo B para cada período pós-cirúrgico analisado. A leitura foi realizada com auxílio do Microscópio Confocal TCS SP5 (Leica Microsystems®). Foram capturadas imagens de 3 diferentes campos por amostra, ao aumento de 20X.

Foi realizada análise de variância em esquema fatorial considerando a contagem de células-tronco para cada grupo no decorrer de 21 dias ($p < 0,05$). Não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados e no decorrer dos períodos de análise, onde se estudou a proliferação celular (Tabela 12). Com a marcação das células com BrdU, foi possível detectar a presença das CTM, porém não houve proliferação celular (figuras 25, 26, 27 e 28).

Tabela 12: Contagem do número de células-tronco mesenquimais presentes nos dois tratamentos e períodos de análise distintos.

Grupo	Dias				Média
	3	7	14	21	
SUT + CTM	578 ± 310	439 ± 114	465 ± 225	431 ± 266	528
SFPS + CTM	522 ± 249	571 ± 430	527 ± 324	492 ± 368	478
Média	550	505	496	461	

Média e desvio-padrão da contagem de células-tronco (20x). p grupo=0,438; p dias=0,812; p interação=0,746.

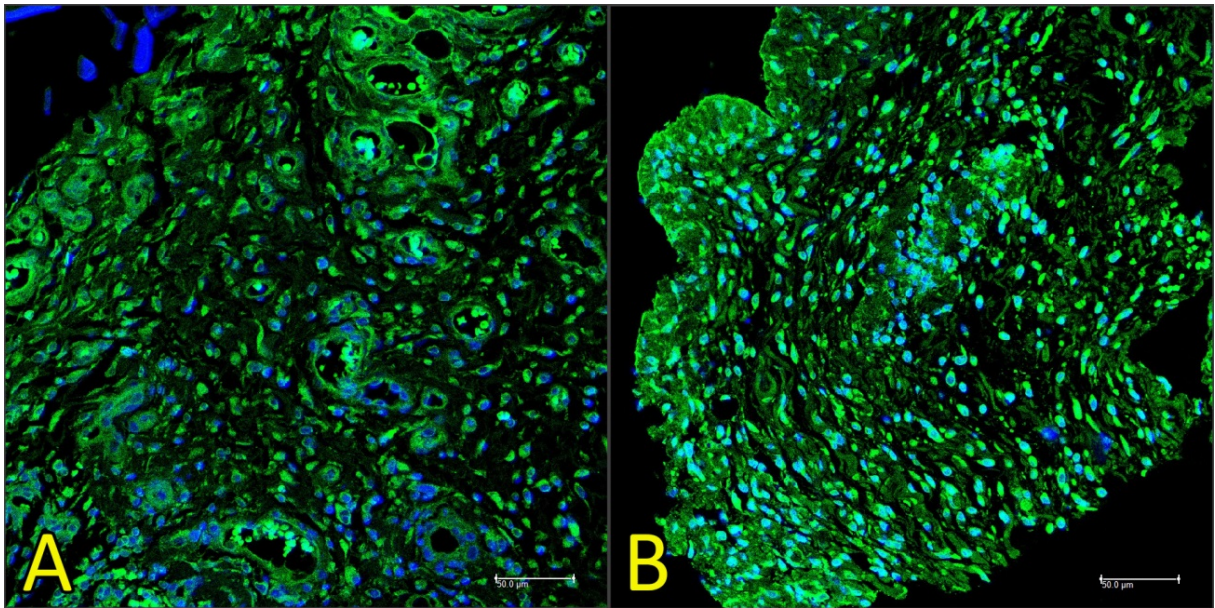


Figura 25 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 3 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 3 dias após cirurgia.

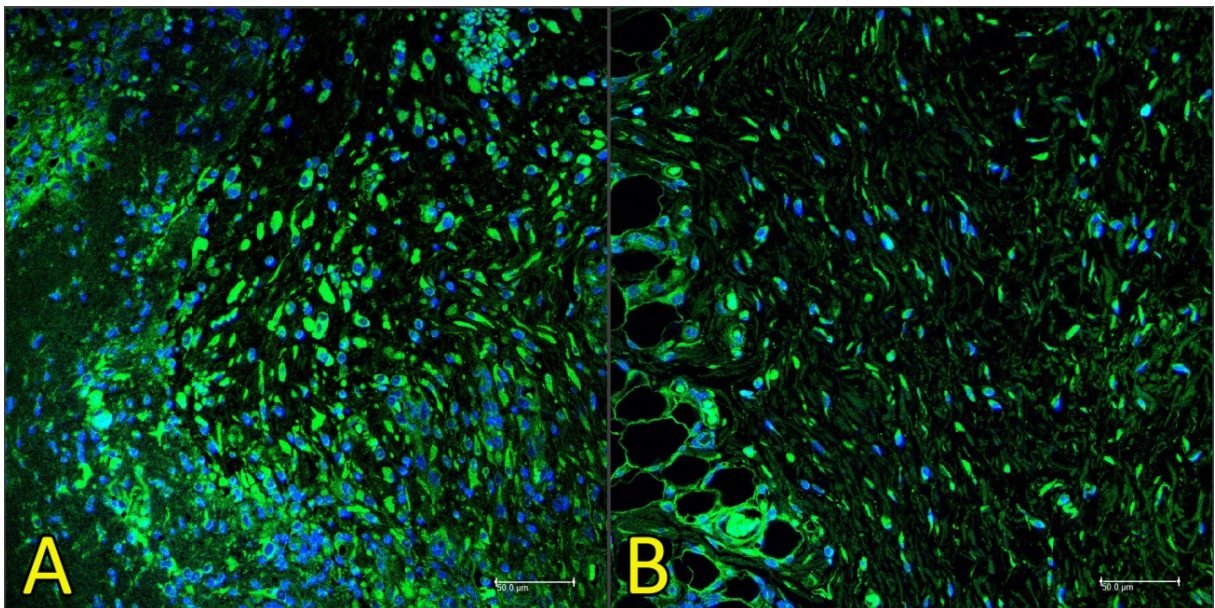


Figura 26 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 7 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 7 dias após cirurgia.

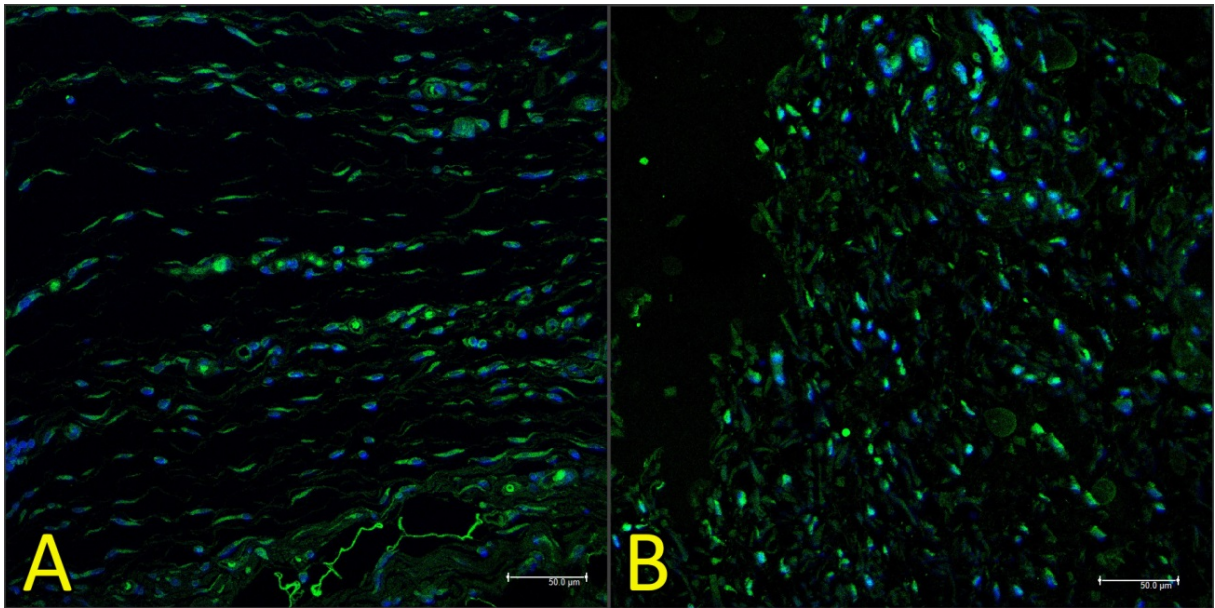


Figura 27 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 14 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 14 dias após cirurgia.

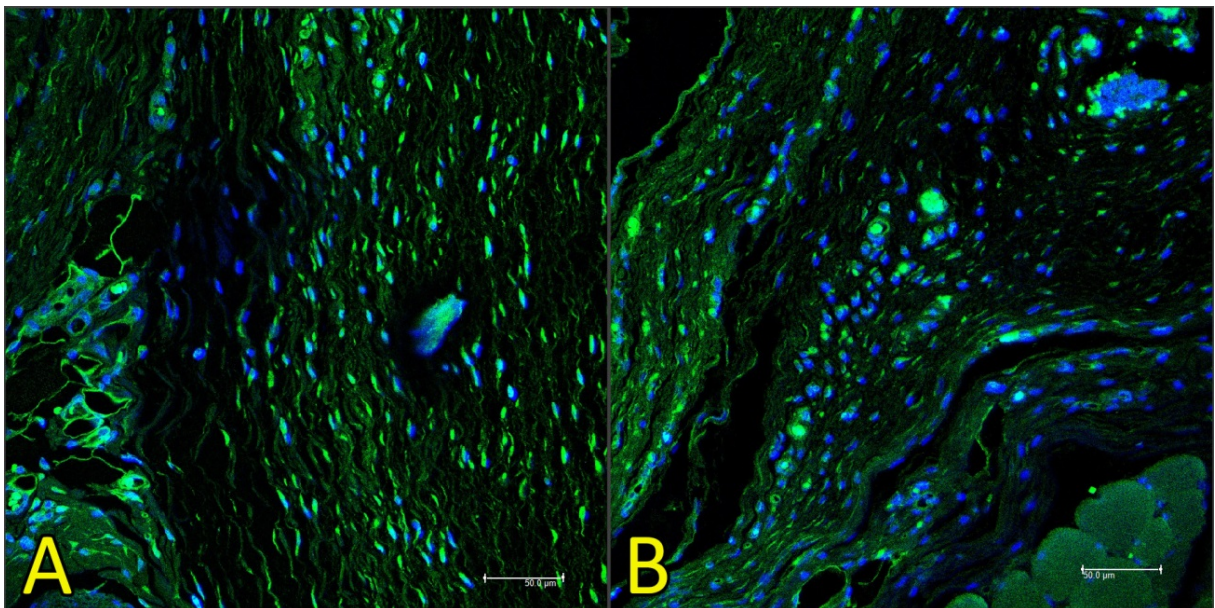


Figura 28 - Imagem analisada em microscópio confocal ao aumento de 40X. A: Lâmina com tratamento 'SFPS + CTM' ao período de 21 dias após cirurgia; B: Lâmina com tratamento 'sutura + CTM' ao período de 21 dias após cirurgia.

Em 1989, o Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) - (UNESP), apresentou um selante de fibrina, onde a trombina bovina foi substituída por uma enzima trombina-símile derivada de peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) e no lugar de fibrinogênio humano, foi utilizado crioprecipitado de bubalinos⁴⁵.

BARROS *et. al.* (2009)⁴⁶ afirmaram que este selante é uma ferramenta útil na prática médica, devido ao seu processo de produção rápida e facilidade de aplicação, bem como a flexibilidade de suas aplicações, podendo haver adequação de concentração dos compostos, de acordo com o tecido a ser utilizado. Este estudo também relatou o fato do produto não produzir reações adversas ou riscos toxicológicos durante usos internos.

Como utilizações mais promissoras documentadas dos selantes de fibrina, encontra-se a capacidade de proporcionar linhagens celulares específicas e medicações à um local alvo⁶³, servindo como excelentes arcabouços para as células-tronco, atuando na regeneração de tecidos²³. Assim estudos sobre a utilização de selantes de fibrina associado a células-tronco, visando seu posterior uso clínico em engenharia de tecidos, estão em franca expansão⁶⁴.

Apesar de inúmeros estudos recentes, demonstrarem que o tratamento de feridas cutâneas com CTMs derivadas da medula óssea acelera a cicatrização da lesão, aumenta a epitelização e nova vascularização^{65,66,67,68}, pouco se sabe sobre a cinética e funcionalidade da associação das CTMs com selantes de fibrina utilizadas para terapias de regeneração de tecido cutâneo.

Neste estudo foram delineados quatro tratamentos distintos para avaliação da melhor resposta cicatricial na pele de ratos (*Rattus norvegicus*) com a finalidade de promover alternativas terapêuticas mais promissoras e eficientes. Os tratamentos utilizados foram: sutura, como grupo controle; SFPS utilizado como terapia única; CTM utilizado em associação com sutura, caracterizando tratamento único; e o biomaterial SFPS associado à CTMs.

Modelos de cicatrização de feridas em animais são ferramentas biológicas importantes para desenvolver e validar estratégias para o tratamento

clínico em cicatrização de feridas em humanos. A seleção do modelo animal para estudos de cicatrização de feridas depende essencialmente da semelhança na arquitetura do tecido, resposta imune e fisiologia, além de questões práticas, como disponibilidade do animal, custo da criação, facilidade de manejo e familiaridade do investigador com a espécie utilizada⁶⁹.

De acordo com DAVIDSON (2001)⁶⁹, apesar de uma investigação com suínos domésticos adultos como um modelo de cicatrização, ser o mais indicado por corresponder melhor cronológica e fisiologicamente com humanos, poucos investigadores iniciaram uma terapêutica de pesquisa com o uso desses animais, sendo muitas vezes necessária a validação dos resultados em animais menores e com custo de produção reduzido. Portanto, os roedores são frequentemente utilizados em estudos de cicatrização de feridas e eficácia de diferentes modalidades de tratamento. Em especial o rato, que é muitas vezes escolhido pela sua disponibilidade, baixo custo e pequeno tamanho⁷⁰.

Optamos neste estudo utilizar ratos (*Rattus norvegicus*) como modelo experimental por ser a primeira vez em que utilizamos o biomaterial SFPS associado à CTMs em modelos *in vivo*, considerando assim a necessidade de coleta de dados em animais menores, porém similares à anatomia e fisiologia humana, antes do estudo ser transferido a animais maiores e posteriormente a terapia ser utilizada para tratamentos em humanos.

DORSETT-MARTIN *et. al.* (2008)⁷¹ afirmam que ratos fornecem um excelente modelo para estudo de cicatrização de feridas da pele, permitindo a padronização do tipo, tamanho, forma e profundidade da lesão da ferida, o que facilita comparação de dados entre os estudos de cicatrização em todas as espécies de mamíferos. Este estudo ainda afirma que a maioria das pesquisas de feridas de pele realizadas com ratos ocorre no dorso do animal (78,2%), sendo em sua maioria utilizado indivíduos machos da linhagem Sprague-Dawley® e no intervalo de peso de 250-300 gramas. Tais dados corroboram com os utilizados por esta pesquisa, exceto a linhagem do animal, que optamos utilizar a Wistar, devido fator de disponibilidade.

Optou-se pelo uso das CTMs provenientes da medula óssea dos ratos devido seu caráter multipotente, facilidade de isolamento e cultivo, não apresentar problemas éticos e já ter sido testado em diferentes modelos animais, mostrando não haver indução na formação de tumores^{72,73}.

Os animais utilizados como doadores de medula óssea, tinham 14 dias de vida, o que concorda com inúmeros autores que relatam que com o avanço da idade, ocorre um declínio de CTMs na medula óssea^{72,73,74,75,76}.

A medula óssea, não apresenta somente células-tronco mesenquimais, portanto, foi realizado o isolamento celular para obter um cultivo purificado. Há mais de 40 anos, FRIEDENSTEIN *et. al.* (1970)⁷⁷, foram os primeiros a estudar e a identificar CTMs e em seu estudo descreveram a característica destas células em aderirem-se ao plástico. O método de isolamento das CTMs deste estudo foi realizado através da separação da fração de células mononucleares por meio de gradiente de densidade conforme relatado por BYDLOWSKI *et. al.* (2009)⁷⁸.

No presente estudo, os cultivos realizados levaram aproximadamente 10 dias para atingirem a subconfluência de 80%. Este dado confirma resultados obtidos por GASPAROTTO (2012)⁵⁸ e GASPAROTTO *et.al.* (2012)⁵⁹ que avaliou a viabilidade do selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço biológico *in vitro* para CTMs de medula óssea de ratos, os cultivos realizados levaram aproximadamente 12 dias para atingirem a confluência média de 80 a 90%, seguindo a mesma técnica de coleta, cultivo, manutenção e expansão celular, de nosso estudo. Os resultados obtidos foram semelhantes, tanto para o cultivo associado com o SFPS, como para o cultivo sem o biomaterial.

Este dado também corrobora com OSHIMA *et. al.* (2005)⁷⁹, que constataram em pesquisa que o tempo médio de isolamento de células provenientes de medula óssea dos fêmures e tíbias de ratos foi de 10 a 14 dias para atingirem a confluência média de 80%. Portanto, as metodologias empregadas nesta pesquisa, para a coleta, isolamento e cultivo das CTMs derivadas da medula óssea de ratos foram eficientes.

Outra característica constatada em nosso estudo é a característica fibroblastóide das células cultivadas. Este dado é validado por estudo de OSHIMA *et. al.* (2005)⁷⁹ e PHINNEY *et. al.* (2007)⁸⁰ no qual apresentam que o fenótipo da população celular deve ser fibroblastóide e apresentar características morfológicas fusiformes.

Em estudo de IUAN *et. al.* (1995)⁸¹ em que avaliaram pela primeira vez os efeitos do SFPS na cicatrização de nervos periféricos, indicou a

necessidade de firme compressão da área onde foi aplicado o produto por pelo menos três minutos, a fim de se obter uma firme aderência dos tecidos.

Porém em nosso estudo este tempo de compressão se mostrou desnecessário, pois logo após alguns segundos posteriores a aplicação do produto e manipulação da ferida para união total das bordas cirúrgicas, o produto já apresentava alta adesão ao local aplicado, com região completamente coaptada.

Esta característica também foi observada em estudo de HOTZ (1991)⁸² onde afirmou que o selante de fibrina apresentou capacidade de modelagem, além de conferir adesão ao leito receptor, gerando assim uma melhor estabilidade dimensional do produto ao local aplicado.

BUCKLEY *et. al.* (2010)⁸³ afirma em seu estudo que um selante, seja ele biológico ou sintético, deve apresentar certas características ideais, dentre elas destaca-se a necessidade de curto tempo para preparo e manipulação, além de adequado tempo de aplicação e polimerização além de não liberar calor em sua polimerização. E em nosso estudo, pudemos observar durante os procedimentos cirúrgicos, que o SFPS apresenta as características ideais citadas acima.

BLÄTTLER *et. al.* (2007)⁸⁴ e RAHAL *et. al.* (2003)⁴⁹ relataram uma maior facilidade de execução do tratamento, além de menor tempo necessário no procedimento cirúrgico, quando este era realizado com selante de fibrina, quando comparado ao tratamento com sutura convencional. Essa característica também foi notada no presente estudo, onde os tratamentos envolvendo SFPS, além de apresentarem uma técnica mais simples de ser executada e com menor tempo necessário para realização do procedimento, também se mostrou menos invasiva do que o método convencional.

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos deste estudo, foi analisado o aspecto macroscópico das áreas incisadas, para estudo de capacidade adesiva do SFPS. A análise mostrou que após 7 dias de cirurgia, nos grupos contendo SFPS, 75% dos animais permaneceram com as bordas da ferida cirúrgica totalmente unidas e sem formação de tecido de aspecto fibroso no local. Já nos grupos onde foram realizadas sutura, 50% dos animais apresentaram formação de crosta na incisão cirúrgica e não houve abertura da ferida cirúrgica em nenhum indivíduo.

A formação de tecido de aspecto fibroso em 25% dos animais do tratamento SFPS, pode ter ocorrido devido à intensa movimentação dos animais e região anatômica a qual foi realizada as incisões, visto que a região da pele utilizada, apesar de ser a mais indicada por impedir o acesso fácil do animal por membros anteriores, posteriores e mandíbula, o que dificulta a automutilação dos animais após a cirurgia, apresenta intensa movimentação cutânea de extensão e retração quando o animal caminha.

Dados semelhantes foram obtidos em estudo de THOMAZINI-SANTOS (2000)⁴², que comparou o SFPS e sutura convencional como técnica utilizada para união de bordas cirúrgicas de pele em ratos. A pesquisadora comparou os dados macroscópicos das incisões, 7 dias após procedimento cirúrgico.

Seus resultados mostraram que 80% dos animais tratados com SFPS permaneceram com as bordas cirúrgicas totalmente coaptadas e nenhum animal tratado com sutura convencional apresentou deiscência total da área incisada. Dados também demonstrados por STOLF (1999)⁸⁵ que estudou a cicatrização da pele nasolabial em humanos, e observou que o SFPS apresentou capacidade adesiva total em 71,4% dos pacientes e capacidade parcial em 28,6%.

RAHAL *et. al.* (2003)⁴⁹ avaliou em seu estudo o efeito do SFPS sobre a viabilidade de enxertos autógenos de espessura total na pele de cães e relatou que o SFPS não possui potência adesiva suficiente para fixar o enxerto por si só, principalmente no local em que a ferida foi induzida. Em seu estudo, houve a necessidade de utilização de pontos de sutura para auxiliar na fixação do enxerto, devido baixa aderência do produto quando utilizado em áreas anatômicas com grande movimentação.

Tais resultados obtidos para o SFPS não corroboram com dados obtidos por BRANSK *et. al.* (2011)⁸⁶ para selante de fibrina com composição distinta (Artiss®). Em seu estudo foi avaliada a cicatrização de ferida cirúrgica em enxertos na pele de suínos após queimadura. Usando a escala clínica para avaliação da ferida de deslocamento do enxerto e aderência do enxerto, verificou-se que a adesão do enxerto foi significativamente maior no grupo selante de fibrina nos dias 2 e 5, quando comparado ao grupo controle envolvendo a enxertia de pele sem aplicação do biomaterial.

Porém, em estudo de BLÄTTLER *et. al.* (2007)⁸⁴ que avaliou a eficácia de um selante de fibrina de origem humana, para tratamento de otohematoma em cães, registrou resultados com baixa potência adesiva do produto. Os autores alegaram que o colar elisabetano foi retirado antes do necessário para que a cicatrização ocorresse, facilitando a manipulação do local pelo animal e diminuindo assim a eficácia do tratamento.

Para, o selante de fibrina possui baixa adesividade, porém é um excelente agente hemostático, além de totalmente bioabsorvível e biocompatível, o que o tornaria superior à selantes a base de cianoacrilatos, que apresentam característica adesiva forte, porém a presença de água reduz sua capacidade adesiva, além de não serem bioabsorvíveis, instáveis, podem levar a quadros de toxicidade, além da possibilidade de causar reação inflamatória exacerbada por ter característica hidrofóbica, o que gera consequente formação de tecido de granulação, necroses e extensas fibroses. Assim, estes compostos atualmente só são utilizados em situações excepcionais^{87,42}.

Em nossa pesquisa, foi realizada a análise microscópica em HE do infiltrado inflamatório e células inflamatórias como macrófagos, plasmócitos, eosinófilos, linfócitos, neutrófilos, basófilos, células multinucleadas, bem como angiogênese e fibroplasia da lesão, para avaliar o processo inflamatório na pele após cicatriz cirúrgica.

Nesta pesquisa foi observado maior intensidade de infiltrado inflamatório no período 3 dias pós-cirúrgico, porém este ainda se mantinha elevado no 7º dia após a cirurgia, não havendo diferença estatística entre ambos os períodos amostras.

HANKS *et. al.* (2005)⁸ e HONRADO *et. al.* (2005)¹⁰ confirmam este dado indicando que a fase inflamatória de uma cicatrização se inicia dentro das primeiras 5 horas após a lesão e sua função é prevenir a infecção, pela fagocitose de bactérias e restos necróticos e limpeza e desbridamento da área, sendo os neutrófilos são os primeiros leucócitos encontrados no local do trauma.

Sendo este dado atestado em nosso estudo, que indicou para neutrófilos, uma intensidade maior aos períodos de 3 e 7 dias, porém estes não

diferiram estatisticamente entre si. Já aos 14 dias, houve uma redução significativa média de 107,8% e aos 21 dias de 165,8%.

Em estudo realizado por THOMAZINI-SANTOS (2000)⁴² que comparou dados de intensidade inflamatória na pele de ratos no 7º dia após procedimento cirúrgico, afirmando que neste período houve maior intensidade. Onde 60% de suas amostras testadas com SFPS e 60% das testadas com aproximação com pontos de sutura convencionais, apresentaram intensidade de células inflamatórias moderada, com a presença de linfócitos, neutrófilos e macrófagos.

Neste estudo, os dados analisados mostram que para o período de 3 dias, observou-se que o grupo SFPS apresentou maior intensidade inflamatória quando comparado aos procedimentos de sutura e sutura associado a CTM, porém sem diferença estatística do tratamento SFPS associado a CTM.

Este dado é explicado por YÜCEL *et. al.* (2003)⁸⁸ e LEGUEHENNEC (2005)⁸⁹ como produtos de degradação da fibrina. Como o selante de fibrina mimetiza os últimos passos da cascata de coagulação, este estimularia processos proteolíticos e fibrinolíticos em maior quantidade, marcando o início da lise do selante de fibrina injetado, gerando assim uma migração e adesão de neutrófilos ao endotélio dos vasos e ao fibrinogênio mais intenso.

SATRUP (1978)⁹⁰ afirma ainda que esse sistema fibrinolítico não apresenta somente função de limpeza do leito vascular com a remoção da fibrina, mas também contribui no reparo tecidual. Havendo um 'feedback' positivo da fibrina nos eventos inflamatórios, assim a matriz de fibrina guiaria a recuperação do tecido afetando as células envolvidas⁸⁸.

Isso pôde ser comprovado em nosso estudo, onde observamos que a intensidade de neutrófilos apresentou diferença estatística no decorrer dos períodos para o tratamento sutura, porém o tratamento com SFPS apresentou diferença significativa dos períodos 3 e 7 quando comparados com os períodos 14 e 21. Como o selante de fibrina normalmente é totalmente absorvido pelo organismo em 2 semanas, isso explica o decréscimo significativo na intensidade infiltrado inflamatório e neutrófilos nesse tratamento, após este período.

Dados de nossa pesquisa mostram que ao final de 14 dias, não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, porém com 21 dias

pós-cirúrgico, o tratamento sutura apresentou maior intensidade de infiltrado inflamatório e estatisticamente superior ao grupo 'sutura + CTM', porém ambos os tratamentos não mostraram diferença estatística quando comparados aos tratamentos envolvendo o SFPS. Baseados nessas considerações, é possível concluir que o aumento inicial de intensidade de infiltrado inflamatório observado nos tratamentos com SFPS, não influenciou em uma resposta inflamatória em longo prazo.

Com a ocorrência da fase inflamatória as células fagocíticas, tais como macrófagos e linfócitos se infiltram aproximadamente 48 horas após a lesão e permanecem até a conclusão da fase inflamatória^{11,12}.

Isso se confirma em nossa pesquisa, que apresentou intensidade de macrófagos, plasmócitos e células multinucleadas maior nos primeiros dias, havendo uma redução significativa após 14 dias e diferente estatisticamente de 21 dias pós-cirúrgico. Nossos dados mostram que apesar dos valores estatísticos não mostrarem diferença significativa dentro dos períodos analisados, o grupo A (sutura vs. SFPS) apresentou dados de intensidade superiores aos encontrados para o grupo B (sutura + CTM vs. SFPS + CTM).

Para linfócitos obtivemos dados que mostraram não haver diferença estatística significativa entre os tratamentos analisados nos períodos de 3, 7 e 14 dias. No 21º dia pós-cirúrgico, no entanto, o grupo A que é composto pelos tratamentos sutura e SFPS mostraram diferença estatística significativa dos tratamentos do grupo B ('sutura + CTM' e 'SFPS + CTM'), sendo que este último apresenta intensidade de linfócitos menor quando comparados a do grupo A.

BARTHOLOMEW *et. al.* (2002)⁹¹ avaliou a atividade imunomoduladora de CTMs sobre linfócitos e mostrou que CTMs falharam em gerar uma resposta proliferativa de linfócitos alogênicos. Assim, CTMs adicionados a uma reação linfocítica, conduziu a uma redução de mais de 50% da atividade proliferativa destas células. Com isso, podemos afirmar que a presença de CTMs, tanto no tratamento com SFPS, quanto no tratamento com sutura convencional, reduziu significativamente a atividade proliferativa de macrófagos e linfócitos no local de aplicação.

Estes dados são semelhantes aos relatados por KLYUSHNENKOVA *et. al.* (1998)⁹², em células-tronco mesenquimais de origem humana suprimiram a

proliferação de linfócitos de sangue periférico em uma dose-dependente. Esta supressão também foi mostrada por TSE *et. al.* (2000)⁹³, quando expos os linfócitos de sangue periférico em contato com o sobrenadante de CTMs localizado nos frascos de cultivo celular, indicando que tal supressão poderia ser mediada por uma molécula solúvel.

Outro dado obtido em pesquisa de BARTHOLOMEW *et. al.* (2002)⁹¹ e colaboradores foi a sobrevivência prolongada do enxerto de pele com administração *in vivo* de CTMs, quando comparado com animais controle. Porém com a rejeição final dos enxertos, foi sugerido que o efeito supressor pode ser suficiente para reduzir a resposta de linfócitos, mas não suficiente para afetar o recrutamento de células inflamatórias adicionais para o enxerto, já que biopsias realizadas neste experimento indicaram um elevado numero de neutrófilos na região dos enxertos.

Foi sugerido no estudo referido, que para se obtivesse um maior efeito imussupressivo, talvez fosse necessária outra forma de administração das CTMs, já que a administração venosa poderia dispersar estas células, não obtendo assim o contato celular necessário para resposta supressiva máxima⁹¹.

Porém dados semelhantes foram obtidos em nosso estudo, onde a intensidade de neutrófilos das amostras não indicou diferença significativa entre os tratamentos, tanto do grupo A (sutura vs. SFPS), quanto do grupo B (sutura + CTMs vs. SFPS + CTMs). Sendo independente assim, da forma de aplicação das CTMs, seja com aplicação direta no local, seja com aplicação em associação com o biomaterial SFPS.

SUDEEPTA *et. al.* (2005)⁹⁴ afirma em seu estudo, que as CTM reduzem a incidência e severidade da doença enxerto vs. hospedeiro, por essa capacidade imunossupressora, mostrando uma alteração no perfil de citocinas liberadas. Estes dados oferecem uma visão sobre as interações entre MSCs e células do sistema imunológico além de mostrar uma redução dessa função supressora das CTMs quando adicionadas em presença de interleucina 2 (IL-2).

Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de se compreender melhor os mecanismos de ação para as induções mediadas *in vitro* e *in vivo* das citocinas liberadas e suprimidas pelas CTMs, que estão envolvidas na

modulação da inflamação, bem como a interação estas e as citocinas liberadas na presença do SFPS.

A ação de combate de processos alérgicos de basófilos e eosinófilos já foram largamente descritos. A alergia é frequentemente considerada um processo de reação inflamatória mediada por um produto alérgeno. A apresentação dos alérgenos resulta na produção de interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13), atraindo e ativando eosinófilos e basófilos circulantes⁹⁵.

Em nossa pesquisa, obtivemos dados que mostram não haver diferença significativa de basófilos e eosinófilos entre os 4 tratamentos aplicados, reafirmando assim a biocompatibilidade do produto, com a ausência de reações adversas e respostas alérgicas dos indivíduos quando tratados com SFPS, tanto utilizado isoladamente, quanto em associação com CTMs.

Em estudo de GABLING *et. al.* (2009)⁹⁶ foi demonstrado que a fibrina produz uma matriz para aderir outras células, como células endoteliais e fibroblastos, que levam a angiogênese e a remodelação tecidual. Os fibroblastos então remodelam a estrutura de fibrina e sintetizam colágeno, dando forma e estabilidade aos capilares *in vitro*. O selante 'plasma rico em plaqueta' (PRP) que foi avaliado apresentou todas as citocinas e fatores de necrose tumoral, estimulando assim fatores de defesa do organismo, possivelmente dificultando infecções teciduais.

Outros autores também defendem que com a aplicação de finas camadas de selante de fibrina, além de gerar o contato completo entre o leito da ferida e do enxerto, fornece uma matriz para nova vascularização, atua também como um andaime para produção de colágeno com consequente reparação do tecido, e cria uma barreira contra a infecção^{86,87}.

Quando analisadas a intensidade de angiogênese de nossas amostras, observamos que o tratamento sutura não apresentou diferença estatística da intensidade dentre os períodos, já o grupo SFPS apresentou diferença estatística dos períodos 3 e 7 quando comparados aos períodos 14 e 21 dias.

O procedimento envolvendo 'sutura + CTM' apresentou ao 7º dia pós-cirúrgico diferença estatística ao 21º dia de cirurgia. O tratamento com 'SFPS + CTM' mostrou uma maior intensidade da nova vascularização nos 3 primeiros períodos, sendo estatisticamente significativo quando comparado com o período de 21 dias pós-cirúrgico. Porém nossos dados mostram não haver

diferença estatística entre os tratamentos analisados, apesar dos valores serem ligeiramente menores para os tratamentos com sutura convencional (sutura e sutura + CTM).

Estes dados não corroboram com os descritos por THOMAZINI-SANTOS (2000)⁴² que analisou a resposta cicatricial na pele de ratos com o tratamento SFPS comparados com um grupo controle com tratamento sutura convencional e com RAHAL *et. al.* (2003)⁴⁹ que avaliou a resposta cicatricial de enxertos de pele em cães com a utilização de SFPS comparados com grupo controle tratado com sutura convencional. Em ambos os estudos, foi reportado que ao sétimo dia pós-cirúrgico havia maior intensidade de angiogênese das amostras analisadas para o tratamento SFPS.

GROSSMAN *et. al.* (2001)⁹⁷ e colaboradores relataram em 2001, necrose e formação de seroma após o uso de selantes de fibrina durante procedimentos de enxerto de pele faciais. No estudo concluíram que o insucesso foi devido à falta de homogeneidade do fibrinogenio e trombina, bem como aplicação de camada excessivamente grossa de selante de fibrina, que passa a atuar como uma barreira mecânica, evitando a revascularização capilar sob a pele, levando a uma isquemia.

Apesar de nosso estudo não apresentar casos de necrose e formação de seroma, além de obter dados semelhantes para todos os grupos, indicando assim não ter ocorrido isquemia tecidual nos tratamentos envolvendo o SFPS, a aplicação de uma camada possivelmente grossa de selante de fibrina explica o fato de termos obtidos um resultado sem diferença estatística dentre os grupos, diferindo assim de outros estudos com o mesmo produto.

WU *et. al.* (2012)²³ afirma que nos últimos anos, a combinação de CTMs e selante de fibrina tem sido demonstrada em feridas crônicas e em pacientes com diabetes apresentando feridas, por gerar um aumento da nova vascularização, indicando ser uma atividade importante deste biomaterial.

Os resultados da pesquisa realizada por este autor confirmam teoria acima, onde foi observada uma nova vascularização significativa para as amostras tratadas com selante de fibrina associadas com CTMs derivadas da medula óssea de ratos²³.

Quando avaliamos a fibroplasia das amostras, foi indicado que o tratamento SFPS mostrou maior intensidade de fibroplasia dentre os

tratamentos, com diferença estatística ao tratamento 'sutura + CTM', sendo que após 21 dias pós-cirúrgico, as amostras analisadas já apresentavam um aspecto semelhante ao da pele normal.

Este resultado é semelhante ao reportado em estudo de RAHAL *et. al.* (2003)⁴⁹ e THOMAZINI-SANTOS (2000)⁴², onde as amostras de pele tratadas com SFPS apresentaram características histológicas semelhantes ao enxerto suturado, porém com reparação tecidual mais acentuada.

RAHAL *et. al.* (2003)⁴⁹ e colaboradores ainda afirmam que a epiderme do enxerto com SFPS, se encontrava menos espessa, aos 15 dias pós-operatório, do que após 7 dias e histologicamente este tratamento apresentava um maior número de fibras de colágenas na camada da derme papilar e a camada reticular indicou um tecido condutor denso, com um elevado grau de organização mais elevado do que o enxerto suturado.

Nossos dados mostram que o grupo B, com tratamentos contendo CTMs apresentou menor nível de intensidade de fibroplasia quando comparado ao grupo com tratamentos sem CTM, sendo o grupo SFPS superior a todos os outros. Este dado difere dos obtidos por FU *et. al.* (2006)³³, onde resultados indicam que entregue CTMs aplicadas localmente na ferida cirúrgica melhoram a qualidade de cicatrização de feridas, resultando em uma regeneração da pele perfeita após uma lesão de espessura total.

Para avaliar a presença das CTMs nos tratamentos do grupo B, foi realizada leitura das amostras com auxílio de Microscópio Confocal, e obtivemos dados que confirmam adesão e presença de células viáveis nas lâminas, porém não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados e no decorrer dos períodos de análise, indicando não ter ocorrido proliferação celular.

Este presente estudo corrobora com dados obtidos *in vitro* por GASPAROTTO *et. al.* (2012)⁵⁹, e por PUENTE *et. al.* (2013)⁹⁸ e com revisão de aplicações clínicas com a utilização de selantes de fibrina associadas à CTM, realizada por WU *et. al.* (2012)²³. Tais estudos indicaram que o biomaterial selante de fibrina é uma boa alternativa de arcabouço para CTMs, por haver adesão de tais células sobre a estrutura do selante de fibrina e manter a viabilidade celular, por não apresentar ação tóxica sobre as células.

Porém, foi relatado por GABLING *et. al.* (2009)⁹⁶ que células-tronco conseguem se aderir e proliferar em contato com selantes de fibrina, porém estes devem apresentar uma concentração máxima de trombina de 18mg/ml, sendo que acima disso, o selante de fibrina atrapalharia a proliferação celular.

Dados semelhantes foram observados por NIHOYANNEN *et. al.* (2006)⁹⁹ e colaboradores, que mostraram em estudos *in vitro*, que em concentrações maiores de trombina, o selante apresenta característica de rede mais densa e com menos espaços entre as fibras, sendo este o local onde as CTMs se aderem, influenciando diretamente na colonização celular sobre sua estrutura.

Mostrando assim, que futuros estudos devem ser realizados, com uma diminuição na concentração de trombina-like, derivada do veneno de C.d.t. (cascavel) do SFPS. Podendo com isso, haver a formação de redes de fibrina com mais espaços entre suas fibras, possibilitando assim a proliferação das CTMs na estrutura do biomaterial, gerando assim diferentes respostas terapêuticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A metodologia utilizada para coleta medula óssea de ratos e consequente cultivo das células-tronco mesenquimais demonstrou-se eficiente;
- O SFPS apresentou curto tempo para preparo, além de adequado tempo de aplicação durante os procedimentos cirúrgicos, indicando uma maior facilidade na execução do tratamento;
- A análise macroscópica das incisões cirúrgicas mostrou um aspecto cicatricial melhor nas amostras tratadas com SFPS, tanto utilizado isoladamente, quanto em associação com CTM;
- A análise microscópica das incisões cirúrgicas indicou que o SFPS apresentou uma resposta de infiltrado inflamatório e neutrófilos mais intenso nos 2 primeiros dias de análise (3 e 7), possivelmente devido a liberação de fatores de degradação da fibrina, não influenciando assim em uma resposta inflamatória crônica;
- Essa análise histológica também mostrou que na presença de CTMs, tanto no tratamento com SFPS, quanto com sutura convencional, houve uma redução significativa da atividade proliferativa de macrófagos e linfócitos no local de aplicação;
- Dados mostram biocompatibilidade do produto SFPS, diante ausência de reações alérgicas dos indivíduos, tanto utilizado isoladamente, quanto em associação com CTMs;
- O tratamento SFPS mostrou maior intensidade de fibroplasia e organização de fibras colágenas, dentre os outros tratamentos analisados.
- O SFPS realizou a captura e permitiu a viabilidade das CTMs que se aderiram em sua superfície, no qual foi confirmado através das técnicas microscópicas realizadas.

Assim, o SFPS se apresenta como uma alternativa à suturas convencionais em uso cirúrgico dermatológico, tanto isoladamente, quanto em associação com CTMs.

Porém estudos futuros devem ser realizados a fim de se compreender melhor os mecanismos de ação para as induções das citocinas liberadas e suprimidas pelas CTMs que estão envolvidas na modulação da inflamação e a interação destas e as citocinas liberadas, na presença do SFPS, bem como estudar em modelos *in vitro* e *in vivo*, a adesão, viabilidade e proliferação de CTMs ao SFPS em diferentes concentrações de 'trombina-like'.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lai-Cheong J, McGrath J. Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine*. 2013; 41(6): 317-20.
2. Khavkin J, Ellis D. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plastic Surg Clin of North America*. 2011; 19(2): 229-34.
3. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Oxford)*. 2010; 28(10): 469-72.
4. Powell J, Soon C. Physiology of the Skin. *Surgery*. 2002; 2-6.
5. Gantwerker E, Hom D. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surg Clin of North America*. 2011; 19(3): 441-53.
6. Gantwerker E, Hom D. Skin: histology and physiology of wound healing. *Clin in Plastic Surgery*. 2012; 39(1): 85-97.
7. Mandelbaum SH, Santis ÉP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol*. 2003; 78: 393-408.
8. Hanks J, Spodnick G. Wound healing in the veterinary rehabilitation patient. *Vet Clin of North America. Small animal practice*. 2005; 35(6): 1453-71.
9. Robson MC, Steed DL, Franz MG. Wound Healing: Biologic Features and Approaches to Maximize Healing Trajectories. *Curr Probl Surg, Current*. 2001; 38(2): 71-141.
10. Honrado CP, Murakami CS. Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plastic Surg Clin of North America*. 2005; 13(2): 203-14.
11. Elias, PM. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol*. 2005; 125: 183-200.
12. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *The Surgl Clin of North America*. 2003; 83(3): 483-507.
13. Bryant AR. Acute and chronic wounds nursing management. In: Wysocki BA, Bryant AR, editors. *Skin*. St. Louis: Mosby Yearbook. 1992; 1-30.
14. Nakagawa H, Akita S, Fukui M, Fujii T, Akino K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *British J of Derm*. 2005; 153: 29-36.

15. Evans ND, Oreffo ROC, Healy E, Thurner PJ, Man YH. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *J Mec Behavior of Biom. Mat.* 2013; 1-3.
16. Gatti MAN. Tratamento de úlceras venosas com adesivo cirúrgico derivado do veneno da serpente [tese de doutorado]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista. 2009; 109p.
17. Kulinna-Cosentini C, Bankier AA. Solid organ transplantation: past, present and future challenges. *Imag in Transp.* 2007: 1-9.
18. Dubernard JM, Lengele B, Morelon E, Testelin S, Badet L, Moure C, Beziat J, Dakpé S, Kanitakis J, D'Hauthuille C, Jaafari AEI, Petruzzo P, Lefrancois N, Taha F, Sirigu A, Marco GD, Carmi E, Bachmann D, Cremades S, Giraux P, Burloux G, Hequet O, Parquet N, Francès C, Michallet M, Martin X, Devauchelle B. Outcomes 18 months after the first human partial face transplantation. *The New Eng J of Med.* 2007; 357(24): 2451-60.
19. Gomez DS, Mariani U, Ferreira MC. The problem of subepidermal blisters in neofomed integuments. *Burns.* 2005; 31: 811-3.
20. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng.* 2006; 12(11): 3007-19.
21. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005; 11(7-8): 1198-211.
22. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med.* 2001; 52: 443-51.
23. Wu X, Ren J, Li J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy.* 2012; 14: 555-62.
24. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury.* 2007; 38(4): 23-33.
25. Jones NC, Trainor PA. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. *Expert Opin Biol Ther.* 2004; 4(5): 645-57.
26. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16(5): 498-502.
27. Caplan AI. Principles of regenerative medicine. 2th ed. Elsevier Saunders. 2011: 253-62.

28. Meirelles LS, Caplan AL, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26: 2287-99.
29. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003; 34: 565-71.
30. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: the past, the present, the future. *Cartilage*. 2010; 1(1): 6-9.
31. Freedman MS, Uccelli A. Neurorepair with mesenchymal stem cells: hope or hype? *Lancet neurology*. 2012; 11(2): 123-5.
32. Kumar BM, Maeng G, Lee Y, Kim T, Lee J, Jeon B, Ock S, Yoo J, Rho G. Neurogenic and cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from minipig bone marrow. *Res in Vet Sci*. 2012; 93(2): 749-57.
33. Fu X, Fang L, Li X, Cheng B, Sheng Z. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen*. 2006; 14(3): 325-35.
34. Pourrajab F, Forouzannia SK, Khalil T, Tabatabaee SA. Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. *Intern JI of Cardiol*. 2013; 163(2): 125-31.
35. Iyer SS, Rojas M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2008; 8: 569-81.
36. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287:2670-6.
37. Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissueengineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2002; 13(2): 231-9.
38. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*. 2001; 52: 443-51.
39. Lerner R, Binur NS. Current status of surgical adhesives. *J Surg Res*. 1990; 48: 165 -81.
40. Albala, DM. Fibrin sealants in clinical practice. *Cardiov Surg*. 2003; 11(1): 05-11.
41. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2003; 31: 27-33.

42. Thomazini-Santos IA. Adesivo de fibrina derivado de veneno de serpente: efeito da adição do ácido epsilon-aminocapróico, do ácido tranexâmico e da aprotinina na coaptação das bordas cirúrgicas em incisões de pele de ratos [Tese de Doutorado]. Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. 2000; 125p.
43. Valbonesi M. Fibrin glues of human origin. Best practice & research. Clin Haemat. 2006; 19(1): 191-203.
44. Kasai S, Kunimoto T, Nitta K. Cross-linking of fibrin by activated factor XIII stimulates attachment, morphological changes and proliferation of fibroblasts. Biomed. 1983; 4:155-60.
45. Thomazini-Santos IA, Barraviera SRCS, Gianinni MJS, Barraviera B. Surgical adhesives. J Venom Anim Toxins. 2001; 7: 159-71.
46. Barros LC, Ferreira Jr. RS, Barraviera SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos IA, Mendes-Giannini MJS, Toscano E. A New Fibrin Sealant from *Crotalus durissus terrificus* Venom: Applications in Medicine. J Toxicol Environ Health. 2009; 12(8): 553-71.
47. Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Toscano E, Machado PEA, Lima CRG, Barraviera B. The evaluation of clotting time in bovine thrombin, Reptilase®, and thrombin-like fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom using bovine, equine, ovine, bubaline and human cryoprecipitates. J Venom Anim Toxins. 1998; 4: 120-36.
48. Stolf HO, Barraviera SRCS, Thomazini IA. Cola de fibrina derivada de veneno de cobra. Uso experimental em cirurgia dermatológica. In: Anais do 48º Congresso Brasileiro de Dermatologia; 1993; Curitiba. Curitiba: Soc Bras de Dermat; 1993: 168.
49. Rahal SC, Amaral MSP, Pai VD, Barraviera SRCS, Caporal EHG, Crocci AJ. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2003; 10(2): 161-72.
50. Leite CVS, Naresse LE, Arantes HL, Lopes AF, Thomazini-Santos IA, Giannini MJSM, Mercadante MC, Barraviera B, Kobayasi S. An evaluation by rat colon anastomosis of the efficacy of fibrin glue derived from snake venom. J Venom Anim Toxins. 2000; 6: 180-93.
51. Sartori R, Prestes NC, Canavessi AMO, Curi PR, Bergfelt DR. Testicular biopsy with tru-cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. Small Rum Res. 2002; 45: 25-31.

52. Moraes JRE, Correia PHA, Camplesi AC, Moraes FR. Experimental use of fibrin glue derived from snake venom in non-pregnant canine uterus. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2004; 10(2): 133-43.
53. Ferraro GC, Moraes JRE, Pereira GT, Moraes FR, Camargo MHB. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. *J Anim Toxins incl Trop Dis*. 2005; 11(4): 433-46.
54. Viterbo F, Iuan FC, Thomazini-Santos IA, Mendes-giannini MJS, Ferrari N, Palhares A, Barraviera B, Rosa G. Reparação de nervo periférico com cola de fibrina feita com veneno de cobra e fibrinogênio de búfalo, cavalo, boi e humano. Trabalho experimental em ratos. In: Congresso sobre cirurgia experimental relacionado a cirurgia plástica. Botucatu. 1994; 30.
55. Barbosa MDS, Gregh SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J Periodontol*. 2007; 78(10): 2026-31.
56. Sampaio RL, Ranzani JJT, Brandão CVS, Thomazini-Santos IA, Barraviera B, Barraviera SRCS, Giannini MJSM. Use of fibrin glue derived from snake venom in the repair of deep corneal ulcers – experimental study in dogs. *J Anim Toxins incl Trop Dis*. 2007; 13(4): 857-73.
57. Gatti MAN, Vieira LM, Barraviera B, Barraviera SRCS. Treatment of venous ulcers with fibrin sealant derived from snake venom. *J Anim Toxins incl Trop Dis*. 2011; 17(2): 226-9.
58. Gasparotto VPO. Avaliação da viabilidade do selante de fibrina derivada de veneno de serpente como arcabouço biológico para células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos. Botucatu [Tese de Mestrado]. Botucatu (SP). Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. 2012. 62p.
59. Gasparotto VPO, Alvarenga FCL, Oliveira ALR, Lima-Neto JF, Guastali MD, Maia L, Simoes GF, Barraviera B, Ferreira-Junior RS. Viability of Fibrin Sealant from Snake Venom as Scaffold to Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Toxicon*. 2012; 60(2): 108.
60. Pollock C, Carpenter JW, Antinoff N. Exotic Animal Formulary. 3rd ed. Elsevier Saunders. 2005: 377- 408.
61. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000; 287(5457): 1433-8.
62. Geboes K, Riddell R, Öst A, Jensfelt B, Persson T, Löfberg R. A reproducible grading scale for histological assessment of inflammation in ulcerative colitis. *Gut*. 2000; 47: 404-9.

63. Fattahi T, Mohan M, Caldwell GT. Clinical applications of fibrin sealants. *J of Oral and Maxil Surg.* 2004; 62(2): 218-24.
64. Rehder J, Bosnardo CAF, Leite MBP, Frade MAC, Guillaumon AT, Batista FRX, Puzzi MB. A comparative study of cell therapy and fibrin glue applied to chronic venous ulcers. *Procedia Engin.* 2013; 59: 85-91.
65. McFarlin K, Gao X, Liu YB, Dulchavsky DS, Kwon D, Arbab AS, Bansal M, Li Y, Chopp M, Dulchavsky SA, Gautam SC. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells accelerate wound healing in the rat. *Wound Repair Regen.* 2006; 14: 471-8.
66. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells.* 2007; 25: 2648-59.
67. Sasaki M, Abe R, Fuita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008; 180: 2581-7.
68. Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, Gibran NS, Hocking AM. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res.* 2010; 316(1): 48-54.
69. Davidson JM. Experimental Animal Wound Models. *Wounds.* 2001; 13(1): 1-6.
70. Dorsett-Martin WA. Rat models of skin wound healing: a review. *Wound Repair Regen.* 2004; 12(6): 591-9.
71. Dorsett-Martin WA, Wysocki AB. Rat Models of Skin Wound Healing. *Sourcebook of Models for Biom Res.* 2008; 631-8.
72. Karussis D, Kassis I, Kurkalli BGS, Slavin S. Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases. *J. Neurol. Sci.* 2008; 265: 131-5.
73. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999; 14(7): 1115-22.
74. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells. A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes.* 2008; 57: 1759-67.

75. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007; 447(7145): 725-9.
76. Sharpless NE, DePinho R. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature rev. Mol cell biol*. 2007; 8(9): 703-13.
77. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3: 393-403.
78. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009; 31(1): 25-35.
79. Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantations. *J of Histochemistry & Cytochemistry*. 2005; 53(2): 207-16.
80. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem cells*. 2007; 25(11): 2896-902.
81. Iuan FC, Thomazini I, Gianini MJ, Viterbo F, Toscano E, Moraes R, Barravieira B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. Preliminary results. 1995; 113(5):1000-2.
82. Hotz, G. Alveolar ridge augmentation with hydroxylapatite using fibrin sealant for fixation. Part I: An experimental study. *Intern J Oral and Maxil Surg*. 1991; 20(4): 204-7.
83. Buckley MJ, Beckman EJ. Adhesive Use in Oral and Maxillofacial Surgery. *Oral and Maxil Surg Clin of NA*. 2010; 22(1):195-9.
84. Blättler U, Harlin O, Mattison RG, Rampelberg F. Fibrin sealant as a treatment for canine aural haematoma: a case history. *Vet J*. 2007; 173(3):697-700.
85. Stolf HO. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin grafting using skin from the patient's nasolabial fold. *J. Venom. Anim. Toxins*. 1999; 5:227.
86. Branski LK, Mittermayr R, Herndon DN, Jeschke MG, Hofmann M, Masters OE, Norbury WB, Traber DL, Tangl S, Redl H. Fibrin sealant improves graft adherence in a porcine full-thickness burn wound model. *Burns: J Intern Soc for Burn Inj*. 2011; 37(8):1360-6.

87. Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin Sealant: Scientific Rationale, Production Methods , Properties , and Current Clinical Use. *Vox Sang*. 1997; 72:133-43.
88. Yücel E, Oral O, Olguç V, Oral C K. Effects of fibrin glue on wound healing in oral cavity. *J of Dentistry*. 2003; 31(8): 569-75.
89. Le Guehennec L, Goyenvallée E, Aguado E, Houchmand-Cuny M, Enkel B, Pilet P, Daculsi G, Layrolle P. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 72:69-78.
90. Astrup T. Fibrinolysis: an overview. *Progr Chem Fibrinolysis Thrombolysis*. 1978; 3:1-57.
91. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30(1):42-8.
92. Klyushnenkova EN, Mosca J, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell responses in vitro: Implications for allogeneic transplantation. *Blood*. 1998; 92:642a.
93. Tse WT, Beyer W, Pendleton JD, D'Andrea A, Guinan EC. Bone marrow derived mesenchymal stem cells suppress T cell activation without inducing allogeneic anergy. *Blood*. 2000; 96:1034a.
94. Sudeeptha A, Mark FP. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *J of Am Soc of Hematol*. 2005; 105(4):1815-22.
95. Wilson DR, Irani A-M, Walker SM, Jacobson MR, Mackay IS, Schwartz LB. Grass pollen immunotherapy increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium. *Clin Exp Allergy*. 2001; 31: 1705-13.
96. GaBling VLW, Açıllı Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *OOROE*. 2009; 108(1):48-55.
97. Grossman JA, Capraro PA, Burneikis V. Minimizing complications in the use of fibrin sealant in aesthetic facial procedures. *Anesth Surg. J*. 2001; 21:32-39.
98. Puente P, Ludeña D, López M, Ramos J, Iglesias J. Differentiation within autologous fibrin scaffolds of porcine dermal cells with the mesenchymal stem cell phenotype. *Exp Cell Res*. 2013; 319(3):144-52.

99. Nihouannen DL, Guehennec LL, Rouillon T, Pilet P, Bilban M, Layrolle P, Daculsi G. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomater*. 2006; 27(13):2716-22.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
RUA DO GUARATINGUÁ, 130
13.084-900 - BOTUCATU - SP



FMB
1903

Comissão da Ética em Experimentação Animal



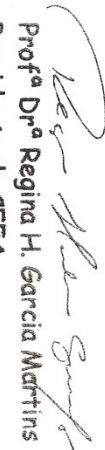
CEEa

Criada através da Portaria DPM nº 30 de 25/04/99

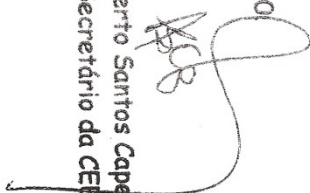
Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 836-2010) "Efeito do selante de fibrina derivado de pegonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos", a ser conduzido por Vivian Scaloni Peres, orientada pela Profª. Drª. Sílvia Regina Catharino Sartori Baraviera, Co-orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "serpentes e ratos" são provenientes de Biotério e Serpentário convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 30/09/2010



Profª Drª Regina H. Garcia Martins
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Comissão Ética em Exp. Animal

Fls. nº 26

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capelluppi@fmb.unesp.br