

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TRANSPLANTE DE FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES OU FRAÇÃO VASCULAR
ESTROMAL ASSOCIADA À MEMBRANA
CELULÓSICA EM FERIDAS CUTÂNEAS
EXPERIMENTAIS DE COELHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tiago Luis Eilers Treichel

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**TRANSPLANTE DE FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES OU FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL
ASSOCIADA À MEMBRANA CELULÓSICA EM FERIDAS
CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS DE COELHOS**

por

Tiago Luis Eilers Treichel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Treichel, Tiago Luis Eilers, 1984-

T787t

Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos / Tiago Luis Eilers Treichel. - 2010.

66 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.

“Orientador: Prof. Ney Luis Pippi”

1. Medicina veterinária 2. Coelhos 3. Fração de células 4. Reparos 5. Feridas 6. Pele I. Pippi, Ney Luis II. Título

CDU: 619:636.92

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**TRANSPLANTE DE FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS
MONONUCLEARES OU FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL
ASSOCIADA À MEMBRANA CELULÓSICA EM FERIDAS
CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS DE COELHOS**

elaborada por
Tiago Luis Eilers Treichel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Ney Luis Pippi, Dr.
(Presidente/Orientador)

Alexandre Mazzanti, Dr. (UFSM)

Josaine da Silva Rappeti Pedrozo, Dr^a. (UFPEL)

Santa Maria, 03 de Março de 2010.

DEDICATÓRIA

*Esta dissertação é dedicada
à minha mãe, Beth,
e à minha noiva, Andry,
as duas mulheres da minha vida.*

Amo muito vocês!!!

*Dedico também ao cão Xico,
meu primeiro amigo de quatro patas,
razão pela qual sou veterinário.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Alfredo e Elisabeth, que me presentaram com a oportunidade de poder existir. À minha mãe, o alicerce da minha vida, minha companheira constante nesta longa jornada, sempre ao meu lado, para apoiar, ajudar e dar força. Ao meu vô Honório, que faz meus dias mais felizes com as suas histórias. Através deles agradeço a Deus.

À minha futura esposa Andriéli, pessoa maravilhosa e brilhante pedagoga, que tive a felicidade de conhecer ao longo desta existência, meu muito obrigado, pela paciência, pelo carinho, por me ouvir e por me dar força. Serei eternamente grato!

Um agradecimento muito especial ao meu orientador, Dr. Ney Luis Pippi, que fez despertar em mim o gosto pela docência e também pela pesquisa. Agradeço pela oportunidade que me foi confiada, pelos ensinamentos oferecidos e por toda a atenção dispensada. Um exemplo, tanto na sua vida profissional, quanto pessoal, que sempre irei procurar seguir.

Aos demais professores do LACE, pelos conhecimentos transmitidos. Mestres detentores de grande conhecimento, sempre dispostos a ensinar e ajudar: Dr. Adriano Carregaro, Dr. Alceu Raiser, Dr. Alexandre Mazzanti e Dr. João Eduardo Schossler.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade. É um orgulho muito grande fazer parte desta escola! Agradeço também ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e a Maria da Rosa, secretária do Programa.

Um agradecimento especial à Marina Gabriela e ao João Paulo, pelo apoio incondicional, pela paciência que tiveram na realização deste experimento e pela persistência nos momentos de dificuldade.

Aos colegas e amigos do mestrado: Camila Cartana, Érika Garcia, Giancarlo de Souza, Maicon Pinheiro e Virgínia Pohl, amigadas que conquistei nestes dois anos. Muito obrigado pelos ensinamentos compartilhados e pelos momentos de descontração que me proporcionaram.

Aos demais amigos da pós-graduação: André Sturion, André Vasconcelos, Bianca Bertoletti, Carlize Lopes, Cristiano Gomes, Daniel Müller, Débora Olsson, Diego Beckmann, Eduardo Santos Jr., Fabiano Salbego, Fernanda Barbosa, Francieli Marconato, Gabrielle Freitas, Kléber Gomes, Laetícia Trindade, Larissa Berté, Paula Basso, Paulo de Tarso, Rafael Festugatto e Rosmarini dos Santos. Por todos os momentos que passamos juntos.

Às professoras Sônia Lopes e Cinthia Mazzanti, bem como toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas, em especial ao pós-graduando Márcio Costa.

Ao professor Rafael Figuera, do Laboratório de Patologia Veterinária.

Aos residentes do HVU: Flávia Howes, Renan Krüger e Rafael Lukarsewisk.

Aos funcionários do HVU, em especial: Hilo, Isabel, Lorena e Nelci. E ao Vágner por cuidar dos nossos animais.

Ao estagiário Maurício da Rosa, a quem eu pude confiar o trato dos coelhos, meu muito obrigado por todos os curativos e medicações, inclusive nos finais de semana e feriados. Sucesso!

Aos amigos e companheiros: Aline Müller, Anderson Ribeiro, Carlos Dotto de Moraes, Gustavo Nunes, Joel Schmitt, Laimar Pedroso, Ronaldo Decker e Sérgio Barcelos, que contribuíram enormemente para a minha formação profissional.

À amiga Núria, por toda a ajuda que recebi em Santa Maria. À família da 'tia' Conceição e aos amigos-irmãos de Cachoeira do Sul: Dieison Lazzaretti, Guilherme Oliveira e Rafael Rochembach., família que eu pude escolher. Obrigado por colaborarem na minha formação pessoal.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental, pela estrutura e equipamentos oferecidos.

À CAPES, pela viabilização da bolsa, para que eu pudesse me dedicar exclusivamente as atividades do mestrado.

Aos meus queridos coelhos, o meu mais profundo agradecimento e as minhas mais sinceras desculpas. Àqueles que deram a vida por este trabalho, minha eterna lembrança. Fica a esperança de que nada disso tenha sido em vão!

“ Na origem de todas as grandes obras
houve fermentação de sonhos, projetos e aspirações.
Houve uma dedicação apaixonada àquilo que não existia
para que chegasse a existir.
Houve uma intuição de possibilidades inéditas
e um lançar-se furiosamente para o futuro.
Não basta ter grandes desejos para realizá-los.
Mas ninguém realiza grandes obras
sem ter tido grandes desejos”.

José Comblin

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

TRANSPLANTE DE FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES OU FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL ASSOCIADA À MEMBRANA CELULÓSICA EM FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS DE COELHOS

AUTOR: TIAGO LUIS EILERS TREICHEL
ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI

Data e local da defesa: Santa Maria, 03 de Março de 2010

A pele, tegumento que reveste o corpo dos animais, apresenta diversas funções importantes para o organismo. A manutenção de sua integridade é fundamental para impedir a penetração de microorganismos e a perda de líquidos essenciais à manutenção da vida. Por estar constantemente exposta ao meio, a pele é altamente susceptível a traumas que podem acarretar em soluções de continuidade. Excisão de massas tumorais ou lesões infecciosas, lesões iatrogênicas, complicações de cirurgias extensas, queimaduras, acidentes automobilísticos, picadas de cobras ou insetos, injeção de medicamentos irritantes e até mesmo tiros ou armadilhas são causas que podem ocasionar feridas em qualquer região da pele do animal. A cicatrização da pele ferida deve ser rápida, para garantir o retorno de sua integridade, entretanto algumas complicações podem ocorrer como em lesões nos membros ou pacientes com grandes áreas de queimadura. Diversas alternativas são buscadas, visando a redução do tempo de reparo e para garantir uma cicatriz funcional e esteticamente aceitável. Uma opção cada vez mais viável para reparar tecidos danificados é a terapia celular com células-tronco adultas. Para realização deste experimento, 20 coelhos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com cinco animais cada. O grupo A, não recebeu nenhum tratamento, o grupo B, recebeu apenas uma membrana celulósica e os grupos C e D, além de receberem a membrana, foram submetidos a transplante autólogo da fração total de células mononucleares (FTCM) da medula óssea ou a fração vascular estromal (FVE) do tecido adiposo, respectivamente. Os objetivos deste trabalho consistiram em avaliar o transplante destas frações, associado ao uso da membrana celulósica. Para tanto, após a indução da ferida cutânea experimental em todos os animais, seguiu-se a aplicação da membrana nos grupos tratados e o transplante autólogo da FTCM, com valor total de células entre $6,92 \times 10^6$ a $4,91 \times 10^7$ e uma viabilidade de 82 a 97%, ou da FVE, com valor total de células entre $9,6 \times 10^5$ e $6,5 \times 10^6$ e uma viabilidade de 66 a 87%. Os animais foram submetidos à avaliação fotográfica, mensuração de suas feridas e biópsia aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Ao final do período de avaliação, os três grupos tratados apresentaram diferença estatística significativa da área da ferida em relação ao grupo controle e o grupo que recebeu a FVE do tecido adiposo apresentou o menor tempo de cicatrização da ferida.
Palavras-chave: fração de células, reparo, ferida, pele, coelho

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

TOTAL FRACTION OF MONONUCLEAR CELL OR STROMAL VASCULAR FRACTION TRANSPLANT ASSOCIATED WITH CELLULOSIC MEMBRANE IN EXPERIMENTAL CUTANEOUS WOUNDS IN RABBITS

AUTHOR: TIAGO LUIS EILERS TREICHEL
ADVISOR: NEY LUIS PIPPI

Date and place of defense: Santa Maria, March 3th, 2010

The skin, tegument which covers the body of animals, presents various important functions to the organism. The maintenance of its integrity is fundamental to prevent penetration of microorganisms and exit of liquids essential to life maintenance. Due to its constant environment exposure, the skin is highly susceptible to trauma which can result in solutions of continuity. Excision of tumoral masses or infectious lesions, iatrogenic lesions, extensive surgical complications, burns, automobile accidents, snake bites or insect stings, injection of irritant drugs or even gunshots or traps are causes that can result in lesions in any area of the animal's skin. The healing of wounded skin should be fast, in order to assure the return of its integrity, however, some complications can occur as in limb lesions or patients with extensively burned areas. Many alternatives are searched for, aiming to reduce repair time and to guarantee a functional and esthetically acceptable scar. One option to repair injured tissues which is ever more viable is cellular therapy with adult stem cells. To carry out this experiment, 20 rabbits were randomly divided in four groups with five animals each. Group A did not receive any treatment; group B received only one cellulose membrane; and groups C and D, in addition to receiving the membrane, were submitted to autologous transplant of total mononuclear cell fraction (TMCF) from bone marrow or stromal vascular fraction (SVF) from adipose tissue, respectively. The aims of this study consisted in evaluating the transplant of these fractions, associated with the use of cellulose membrane. Therefore, after induction of the experimental cutaneous wound in all the animals, this was followed by application of the membrane and autogenous TMCF transplant, with total cell value between $6,92 \times 10^6$ and $4,91 \times 10^7$ and a viability of 82 to 97%, or SVF, with total cell value between $9,6 \times 10^5$ and $6,5 \times 10^6$ and a viability of 66 a 87%. The animals were submitted to photographic evaluation, measurement of wounds and biopsy at 7, 14 and 21 postoperative days. At the end of the evaluation period, the three treated groups presented significant statistical difference of wound area in relation to the control group, and the group which received SVF from adipose tissue presented the shortest wound healing time.

Key words: fraction of cells, repair, wound, skin, rabbit

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de células mononucleares (mL) e viabilidade celular (%) obtidas no botão celular após o processamento da medula óssea dos coelhos do grupo C.....	42
TABELA 2 – Número de células mononucleares (mL) e viabilidade celular (%) obtidas no botão celular após o processamento do tecido adiposo dos coelhos do grupo D.....	42
TABELA 3 – Valores obtidos na mensuração das feridas (altura e largura em cm e área em cm ²) dos quatro grupos, nos dias 0, 7, 14 e 21.....	43
TABELA 4 – Desvio padrão e médias de cada grupo para altura, largura e área, nos quatro tempos de avaliação.....	44
TABELA 5 – Análise de regressão da área dos grupos nos quatro tempos de avaliação.....	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Organograma demonstrando a separação dos vinte animais nos quatro grupos experimentais deste trabalho.....	28
FIGURA 2 – Tubo Falcon contendo sangue da MO de coelho centrifugado com gradiente de densidade. Em destaque, visualização do halo celular formado pela sedimentação das hemácias e granulócitos.....	31
FIGURA 3 – A) Tubo Falcon contendo fragmentos do tecido adiposo e colagenase antes da digestão em banho-maria. B) Aspecto apresentado pelo tecido adiposo (leitoso), após a digestão pela colagenase em banho-maria.....	34
FIGURA 4 – Criação da ferida cirúrgica medindo 2 cm ² , na parede torácica direita, sobre a região da última costela dos coelhos.....	36
FIGURA 5 – Aplicação da membrana celulósica sobre a ferida cirúrgica, imediatamente após a criação do defeito, nos coelhos dos grupos B, C e D.....	37
FIGURA 6 – Aplicação da FVE no espaço subcutâneo, na borda caudal da ferida cirúrgica, nos coelhos do grupo D.....	38
FIGURA 7 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 7 dias de pós-operatório.....	45
FIGURA 8 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 14 dias de pós-operatório.....	46
FIGURA 9 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 21 dias de pós-operatório.....	47
FIGURA 10 – Gráfico representativo, demonstrando a redução da área das feridas cutâneas dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, em relação aos dias de pós-operatório.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ADSC: adipose-derived stem cell
BMSC: bone marrow-derived stem cell
CM: células mononucleares
CT: células-tronco
CTH: célula-tronco hematopoética
CTM: célula-tronco mesenquimal
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FTCM: fração total de células mononucleares
FVE: fração vascular estromal
HVU: Hospital Veterinário Universitário
LACE: Laboratório de Cirurgia Experimental
LACVET: Laboratório de Análises Clínicas
MSC: mesenquimal stem cell
mg.kg⁻¹: miligramas por quilograma
mL.kg.h⁻¹: mililitros por quilograma por hora
MO: medula óssea
RPM: rotações por minuto
SFB: soro fetal bovino
TA: tecido adiposo
UFSM: Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Pele.....	17
2.2 Feridas.....	18
2.3 Terapia Celular Regenerativa	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Comitê de Ética e Experimentação Animal.....	26
3.2 Animais	26
3.3 Separação dos animais	27
3.4 Fase pré-operatória e protocolo anestésico.....	28
3.5 Fração total de células mononucleares (FTCM) da medula óssea (MO).....	29
3.5.1 Colheita do sangue da MO.....	29
3.5.2 Isolamento da FTCM.....	30
3.6 Fração vascular estromal (FVE) do tecido adiposo (TA)	32
3.6.1 Colheita do TA	32
3.6.2 Isolamento da FVE.....	33
3.7 Procedimento cirúrgico para criação do defeito cutâneo e tratamentos	35
3.8 Cuidados pós-operatórios.....	38
3.9 Avaliações	39
3.9.1 Avaliação clínica.....	39
3.9.2 Avaliação fotográfica e planimetria.....	39
3.9.3 Avaliação histológica.....	39
3.9.4 Análise estatística	40
3.10 Doação dos animais	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Modelo de lesão cutânea e protocolo anestésico	41
4.2 Colheita e isolamento da FTCM e da FVE.....	41
4.3 Avaliação fotográfica e planimetria	43

4.4 Avaliação histopatológica	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	58
7. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

A pele é o tegumento que reveste os animais e junto com os seus anexos é caracterizada como o maior órgão do corpo (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; REHEN; PAULSEN, 2007). Este órgão é formado principalmente pela epiderme e a derme, além de uma terceira camada variável, a hipoderme (STEVENS; LOWE, 1995; HEDLUND, 2005). A epiderme é composta por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, já a derme é composta pela camada papilar, mais superficial, delgada e frouxa, e a camada reticular, mais profunda, espessa e densa (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Como funções principais a pele protege: o corpo contra atritos, lesões e a penetração de agentes injuriantes, evita a perda de água, auxilia na termorregulação, proporciona excreção através das glândulas sudoríparas, transmite as sensações recebidas do ambiente para o sistema nervoso central e realiza a proteção contra os raios ultravioletas, absorvendo-os e sintetizando vitamina D (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Quando um trauma causa uma solução de continuidade na pele, deixando expostos os tecidos subjacentes, temos uma ferida (ROSA et al., 1983). As feridas podem estar presentes em qualquer região corporal do animal e as suas causas mais comuns são a excisão de massas tumorais ou lesões infecciosas, as lesões iatrogênicas, as complicações de cirurgias extensas, as queimaduras pela mastigação de cabos elétricos ou contato com substâncias cáusticas, as queimaduras térmicas ou químicas, os acidentes automobilísticos, as picadas de cobras ou insetos, a injeção de medicamentos irritantes e até mesmo tiros ou armadilhas (FOWLER, 2006; HEDLUND, 2006; POPE, 2006).

A pele, por apresentar estruturas de várias camadas germinativas, não apresenta capacidade regenerativa, com exceção da epiderme (POPE, 1996). A cicatrização, processo biológico preferencial, tem como objetivo reparar o tecido ferido ou substituí-lo por colágeno (HEDLUND, 2005).

Entretanto, algumas complicações podem ocorrer no reparo da pele, como em situações nas quais a cicatrização de feridas localizadas nos membros é inviabilizada pela pouca elasticidade da pele, escassez de tecidos locais ou a associação freqüente de lesões ortopédicas com perda cutânea (ROSA et al. 1983; FOWLER, 2006). O tratamento de pacientes queimados também é bastante problemático, muitas vezes associado à grande sofrimento, acompanhado de resultados insatisfatórios e até mesmo óbitos causados pela perda de fluídos, pela ocorrência sepse ou insuficiência respiratória (TOMITA, 2005).

Características das células-tronco mesenquimais, como auto-renovação e diferenciação em diversos tipos celulares, têm recebido uma atenção significativa na atualidade (FORTIER, 2005; MEIRELLES, et al., 2006; MOSELEY et al., 2006; GIMBLE et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008; WILLIAMS et al., 2008). Em vista disso, a terapia celular com células-tronco mesenquimais para reparar tecidos danificados, passa a ser considerada uma alternativa viável (PARK et al., 2008).

Para aplicação clínica, estas células são isoladas do sangue da medula óssea ou do tecido adiposo (MOSELEY et al., 2006). No entanto, tem sido sugerido que as células-tronco, quando injetadas sozinhas, não reparam os tecidos de maneira satisfatória, mas a combinação destas células com alguns componentes, conhecidos como matriz ou *scaffold*, podem resultar em um processo bem sucedido (MOSELEY et al., 2006).

Neste trabalho, será discutida a viabilidade clínica e a eficácia da terapia celular, por meio de transplante autógeno da fração total de células mononucleares da medula óssea ou da fração vascular estromal do tecido adiposo, para o tratamento de lesões cutâneas induzidas experimentalmente em coelhos. Desta maneira, tem-se como objetivos:

- 1) avaliar o modelo de lesão proposto e as técnicas de colheita de medula óssea e tecido adiposo em coelhos,
- 2) comparar a influência e a eficácia do *scaffold* proposto com a lesão sem o biomaterial,
- 3) comparar a reparação cutânea com e sem o transplante das frações celulares, avaliando o tempo de cicatrização e a qualidade cicatricial das feridas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

O tegumento que reveste a superfície do corpo dos animais é composto pela pele e seus anexos: glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, pêlos e unhas, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal e caracterizando-se como o maior órgão do corpo (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; REHEN; PAULSEN, 2007). Duas camadas principais estão presentes na composição da pele: a epiderme e a derme, além do subcutâneo (hipoderme), uma terceira camada variável, geralmente composto por tecido adiposo (STEVENS; LOWE, 1995; HEDLUND, 2005)

A epiderme é composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, no qual é possível encontrar quatro tipos celulares distintos: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os queratinócitos são as células presentes em maior número, formando cinco zonas morfologicamente distintas: estrato basal (germinativo), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido e estrato córneo, sendo que os outros três tipos celulares permanecem dispostos entre os queratinócitos (GARTNER; HIATT, 2003).

A derme é um tecido conjuntivo, responsável pela sustentação da epiderme e por promover a união da pele à hipoderme ou tecido celular subcutâneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Duas camadas compõem a derme: a camada papilar, mais superficial, delgada, frouxa e formando cristas (papilas) dérmicas na face de contato com a epiderme; e a camada reticular, mais profunda, espessa e densa, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, com grossas fibras de colágeno do tipo I (GARTNER; HIATT, 2003).

Em seres humanos e suínos, a pele é suprida pelos vasos musculocutâneos, enquanto que cães e outros animais de pele não aderida, não possuem estes vasos,

mas sim vasos cutâneos diretos, que dividem-se em três níveis interconectados, sendo eles o plexo profundo, subdérmico ou subcutâneo, o plexo médio ou cutâneo e o plexo superficial ou subpapilar (HEDLUND, 2005; PAVLETIC, 2005).

A pele apresenta diversas funções, como proteger o corpo contra atritos, lesões e a penetração de agentes injuriantes, evitar a perda de água; auxiliar na termorregulação; proporcionar excreção através das glândulas sudoríparas; receber as sensações do ambiente e transmitir para o sistema nervoso central; proteger contra os raios ultravioletas, absorvendo-os com o intuito de sintetizar vitamina D (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.2 Feridas

Feridas são traumas em que ocorre solução de continuidade da pele deixando expostos os tecidos subjacentes (ROSA et al., 1983). Pope (2006) citou que existem inúmeras causas que originam feridas na cabeça e no pescoço dos animais, como traumas, feridas deixadas por excisão de massas, lesões iatrogênicas, complicações de cirurgias extensas e queimaduras pela mastigação de cabos elétricos ou contato com substâncias cáusticas.

Com relação às feridas em membros, Fowler (2006) citou que podem ser causadas por traumas automobilísticos, remoção de tumor, picadas de cobras ou insetos, injeção de medicamentos irritantes, queimaduras e até mesmo tiros ou armadilhas. Por sua vez, feridas no tronco podem ocorrer como resultado de trauma ou excisão de tumores ou lesões infecciosas, ou ainda estarem associadas com queimaduras térmicas ou químicas (HEDLUND, 2006).

Pope (1996) explicou que a cura de tecidos lesados se dá por regeneração, reparo, ou a combinação destes. Quando um tecido lesionado ou perdido é substituído por outro, estrutural e funcionalmente similar, temos a regeneração, enquanto que, quando esta substituição é realizada por um tecido cicatricial não funcional, devemos classificar como reparo. Este autor afirmou ainda que a pele, por apresentar estruturas

de várias camadas germinativas, não tem uma capacidade regenerativa, sendo que a regeneração é possível somente na epiderme.

Peacock; Van Winkle (1976) esclarecem que a pele não é um simples tecido. Trata-se de um órgão altamente complexo, com estruturas derivadas de múltiplas camadas germinativas, no qual não é possível ocorrer a regeneração e que injúrias geralmente produzem tecido fibroso cicatricial.

Segundo Hedlund (2005), as fases da cicatrização de ferimentos são a inflamação, o debridamento, o reparo e a maturação, sendo que essas fases ocorrem de maneira dinâmica e muitas vezes simultaneamente. Na primeira fase ocorre uma breve vasoconstrição, seguida de vasodilatação, permitindo a passagem de fibrinogênio e elementos de coagulação para o interior dos ferimentos, além de liberar células polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, que na segunda fase irão debridar microorganismos e resíduos, por fagocitose, evitando infecções. Na fase de reparo, a presença dos macrófagos, o teor de oxigênio tecidual baixo (20 mmHg) e uma ligeira acidez, estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno. Por fim, na última fase, quando o colágeno já está devidamente depositado nos ferimentos, ocorre a maturação tecidual.

Rosa et al. (1983) citaram que, em alguns momentos podem ocorrer complicações no reparo da pele, como em situações nas quais, a pouca elasticidade da pele em determinados locais e o movimento inviabilizam a cicatrização de feridas localizadas nos membros, por exemplo. Fowler (2006) também comentou sobre a complicada reconstrução distal do membro, devido à escassez de tecidos locais e a associação freqüente de lesões ortopédicas com perda cutânea. Este autor citou ainda que o tratamento por segunda intenção ou técnicas de alongamento da pele são utilizados para feridas que envolvam menos de 30% do membro.

Outra situação bastante problemática diz respeito aos pacientes, humanos ou animais, que sofrem queimaduras. Welsh; Male (1992) enfatizaram que a maioria dos agentes infecciosos são incapazes de penetrar a pele, quando esta apresenta-se íntegra. Por este motivo, segundo estes autores, quando um indivíduo é acometido por graves queimaduras, a prevenção de infecções através da pele deve ser uma das maiores preocupações. Tomita (2005) ressaltou que o tratamento de pacientes

humanos queimados, por muito tempo, foi associado a um grande sofrimento e a resultados insatisfatórios. Acrescentou ainda que muitos pacientes não sobrevivem ao choque causado pela perda de fluídos, a sepse e à insuficiência respiratória.

As cicatrizes hipertróficas e os quelóides são graves problemas para alguns pacientes, gerando desde preocupações cosméticas até a presença de prurido, dor e pressão no local. Estas anormalidades ocorrem em indivíduos predispostos e representam uma resposta do tecido conjunto ao trauma, inflamação, cirurgia ou queimaduras (WOLFRAM et al., 2009).

Como um método prático para fechamento de feridas, tem-se os flapes cutâneos ou enxertos pediculares, quando transfere-se uma porção da pele e do tecido subcutâneo de uma área corporal para outra (PAVLETIC, 2005). Pavletic (2005) citou uma série desses enxertos, desde flapes de padrão axial, que mantém uma artéria e uma veia cutânea direta até flapes do plexo subdérmico, sem a inclusão desses vasos, assim como flapes locais e a distância. Seitz et al. (2009) utilizaram até mesmo o omento, como um retalho livre para a cobertura de defeitos em membros superiores de humanos. No entanto, algumas técnicas de enxerto pedicular são inviáveis em cães e gatos, por não possuírem vasos musculocutâneos (HEDLUND, 2005).

Bao et al. (2008) citaram que o ágar, um polímero altamente hidrofílico, é um gel que apresenta propriedades especiais e biocompatibilidade favorável como curativo, entretanto, a força de tensão moderada e a baixa taxa de degradação tornam seu uso dificultado, podendo ser melhorado com a adição de colágeno tipo I. Lee et al. (2009) testaram de maneira eficiente, o alginato, um polímero de ácido gulurônico e manurônico, utilizado como *scaffold* em aplicações biomédicas, em defeitos de pele em ratos.

Kim et al. (2008) demonstraram que a aplicação tópica de azeite de oliva com ozônio, em feridas cutâneas de porquinhos-da-índia, acelerou a cicatrização. Martin et al. (2009) utilizaram até mesmo a nicotina, uma das milhares de substâncias presentes no cigarro, devido os seus efeitos pró-angiogênicos estimulados pelas células endoteliais. Contudo, os efeitos benéficos ainda estão sob investigação e, portanto, deve-se limitar a aplicação local de nicotina.

Mogford et al. (2009) demonstraram que o progresso da reparação do defeito cutâneo em coelhos, pode ser reforçado com o uso de um selante de fibrina com fibroblastos dérmicos. Altomare et al. (2009) estudaram a influência do ultra-som (US) terapêutico no reparo de lesões cutâneas e lesões isquêmicas em ratos. Houve aceleração na contração da ferida, aumento da densidade de colágenos e nova formação na epiderme nos animais que receberam o tratamento com US, mas ocorreu atraso na cicatrização em feridas isquêmicas.

DeRossi et al. (2009) utilizaram um gel de plasma rico em plaquetas (PRP), no qual foi adicionado gluconato de cálcio e trombina autógena, para o tratamento de feridas em cavalos, submetidos a incisões cirúrgicas experimentais. Segundo esses autores, as feridas tratadas com PRP apresentaram diferenciação epitelial mais rápida e organização do colágeno da derme mais acelerada, quando comparado ao grupo controle.

2.3 Terapia Celular Regenerativa

Segundo Rehen; Paulsen (2007), quando se utiliza a engenharia tecidual com o objetivo de reconstruir o corpo com tecidos produzidos em laboratório, trabalha-se com um novo ramo das ciências biomédicas, conhecido como medicina regenerativa. A medicina regenerativa, usando células-tronco do próprio corpo e fatores de crescimento é uma alternativa terapêutica estratégica para reparar tecidos danificados, os maiores candidatos à terapia celular (PARK et al., 2008).

A terapia com células-tronco tem recebido uma atenção significativa na atualidade, devido à idéia de capacidade regenerativa das células, por causa das suas habilidades para auto-renovação e diferenciação em múltiplas linhagens celulares quando removidas de seu nicho (FORTIER, 2005; MEIRELLES, et al., 2006; MOSELEY et al., 2006; GIMBLE et al., 2007; WILLIAMS et al., 2007; ALMEIDA et al., 2008). Para Nakage; Santana (2006), esse súbito interesse se dá, principalmente, devido a uma das principais características das células-tronco, a plasticidade, que permite a diferenciação

destas em células de diversos tecidos, tais como, fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrintestinal, coração e músculo esquelético.

Segundo Williams et al. (2007), dada toda a controvérsia que existe sobre o uso de células-tronco embrionárias, novas pesquisas com células-tronco alternativas têm sido estimuladas. Outros fatores contribuem para o surgimento de inúmeras pesquisas com células-tronco adultas, como a facilidade de obtenção destas células, serem fontes de transplantes autólogos e não apresentarem barreiras éticas ou religiosas (JI et al., 2009). Rehen; Paulsen (2007) salientaram que o termo adulto, no caso da classificação da célula-tronco, se refere à capacidade de diferenciação reduzida destas células, e não a presença apenas em indivíduos adultos.

Meirelles et al. (2006) afirma que, virtualmente, todos os órgãos e tecidos após o nascimento, tem o seu compartimento de células-tronco mesenquimais e que elas podem ser isoladas da medula óssea, do tecido adiposo, rim, fígado, tendões, membrana sinovial, fluído amniótico, placenta, cordão umbilical e polpa dentária. Porém, células-tronco representam uma pequena fração da população total de células nucleadas da medula óssea, cerca de 0,001 a 0,01% (FORTIER, 2005).

Numerosos estudos têm indicado que as células-tronco adultas presentes no próprio tecido são um reservatório de células reparativas, sendo mobilizadas e diferenciadas em resposta a sinais de feridas ou doenças, contribuindo, portanto, para o processo de reparo ou regeneração de diversos destes tecidos, como no caso da pele (KATAOKA, et al., 2003; BARRY et al, 2004; WU et al, 2007; VERSTAPPEN et al., 2009).

Assim como em outros órgãos, também é possível encontrar células-tronco adultas na pele. Rehen; Paulsen (2007) citaram que as células-tronco são formadas e estão presentes na camada mais profunda da pele, a hipoderme, onde ocorre o amadurecimento destas células com posterior migração para as demais camadas, dando origem as células da epiderme e anexos cutâneos.

Para Fuchs (2008), no entanto, a localização das células-tronco na pele é outra, na camada basal da epiderme, uma membrana rica em matriz extra-celular e fatores de crescimento. Periodicamente estas células interrompem seu ciclo, se diferenciando em células terminais e migrando para a superfície. Este mecanismo cria

uma barreira que se perpetua, protegendo o organismo contra a invasão de micróbios e a perda de líquidos essenciais ao corpo.

Verstappen et al. (2009) afirmaram, por sua vez, que duas populações de células-tronco estão presentes na epiderme. Uma estaria na camada basal, distribuídas entre unidades proliferativas epidermais (EPUs), que compõem a epiderme e a segunda população estaria presente na região do bulbo dos folículos pilosos. Fathke et al. (2004) citaram que, em diversos estudos, células-tronco derivadas da medula óssea (BMSCs) foram encontradas na epiderme, principalmente na região dos folículos pilosos. Alonso; Fuchs (2003) esclareceram que, geralmente, a proliferação e diferenciação de células-tronco adultas epidermais podem reparar pequenas lesões de pele, entretanto, o baixo número destas células, não permite o reparo de lesões maiores, podendo acarretar na formação de cicatrizes.

Verstappen et al. (2009) citaram, com relação à funcionalidade das diferentes populações de células-tronco, que a manutenção da integridade da pele ocorre por intermédio das células-tronco epidermais, mais rápidas, mas menos potentes. Pequenos reparos podem ser realizados pelas células-tronco do bulbo, que podem se diferenciar em diversos tipos de tecido. No caso de injúrias extensas, células-tronco adultas, como as presentes na medula óssea, poderiam ser recrutadas, no entanto, é necessário um tempo maior para que possam ser recrutadas do sítio de origem para a ferida, através da circulação. Tempo esse que pode ser reduzido com o emprego da terapia celular, que tem como objetivo isolar um grande número de células de sítios doadores, cultivando se necessário, e devolver ao paciente.

A medula óssea dos mamíferos é composta por diversos elementos que incluem uma população heterogênea de células composta por macrófagos, fibroblastos, adipócitos, osteoprogenitores, células endoteliais e células reticulares (GIORDANO, 2007). A fração originária do tecido adiposo também apresenta uma população de células heterogêneas, incluindo células sangüíneas circulantes, mastócitos, fibroblastos, perícitos e células endoteliais, bem como “pré-adipócitos” ou adipócitos progenitores (ZUK, et al., 2001; GIMBLE et al., 2007)

Células-tronco autólogas, derivadas da medula óssea ou do tecido adiposo, podem ser usadas clinicamente para terapia celular regenerativa, quando são obtidas

em quantidades suficientes (MOSELEY et al., 2006). O uso das BMSCs é limitado pela pequena quantidade de células colhidas do paciente, além da ocorrência de dor e morbidade, enquanto que, células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) são mais facilmente processadas a partir da gordura lipoaspirada (ZUK et al., 2002).

Gimble et al. (2007) também citaram as vantagens do uso de ADSCs, visto que, com o aumento da incidência de obesidade em vários países do mundo, o tecido adiposo subcutâneo passa a ser mais abundante e de mais fácil acesso. Ainda segundo estes autores, estas células-tronco são multipotentes e seguramente uma promessa para aplicações terapêuticas. Almeida et al. (2008) afirmaram que a colheita de tecido adiposo será um novo e promissor mercado de trabalho para cirurgiões plásticos. Moseley et al. (2006) comentaram o estimulante interesse em um possível papel terapêutico das ADSCs oriundas de processos de lipoaspiração para muitas aplicações, incluindo seu uso para preenchimento de tecidos moles na cirurgia plástica e reconstrutiva.

Existe um grande número de teorias sobre de que maneira as células-tronco contribuem para o sucesso da cicatrização. Gimble et al., (2007) levantaram uma série delas, sendo que o mais aceito atualmente é que elas poderiam secretar citocinas e fatores de crescimento que estimulam a recuperação através de um mecanismo parácrino no tecido doente ou injuriado. Outra hipótese diz que elas poderiam fornecer agentes antioxidantes ou remover radicais livres e proteínas do choque no local isquêmico, fornecer novas mitocôndrias para células danificadas, recuperando o metabolismo aeróbico ou uma possível diferenciação das células-tronco em uma linhagem celular específica. Park et al. (2008) citaram que, durante o processo de cura das feridas, as células-tronco derivadas do tecido adiposo estimulam a síntese de colágeno e a migração de fibroblastos.

Moseley et al. (2006) sugeriram que as células-tronco injetadas sozinhas junto ao defeito, não produzem tecidos de maneira satisfatória. Uma estratégia para o uso adequado da engenharia tecidual seria a combinação de células com alguns componentes, conhecidos como matriz ou *scaffold*, para produzir um implante bem sucedido (MOSELEY et al., 2006).

Segundo Burke et al. (1981), o substituto cutâneo ideal deve apresentar as seguintes características: aderência ao leito receptor do implante, controle da perda de fluídos, elasticidade, durabilidade, atuação como barreira mecânica, ser atóxico e não antigênico, anti-séptico, hemostático, ter fácil aplicação e possuir baixo custo.

Tamai et al. (2002) citaram que cinco fatores devem ser observados para utilização bem sucedida do *scaffold*: não devem ocorrer reações inflamatórias ou tóxicas ocasionadas pela composição do biomaterial ou o subproduto de sua degradação; sua apresentação deve ser tridimensional; deve ser poroso, para proporcionar uma elevada área superficial; sua superfície deve permitir adesão e crescimento celular e deve haver espaço para regeneração da matriz extra-celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética e Experimentação Animal

Este estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, seguindo os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Julgado e aprovado no processo número: 23081.011545/2009-31.

Somou-se ainda, à preocupação de bem estar dos animais, a Lei nº 5.517 de 23 de outubro de 1968, artigo 5º; Lei nº 6.638 de 08 de maio de 1979; à resolução nº 592 de 26 de junho de 1992 e Projeto de Lei nº 9.605/1998 e nº 1. 691/2003.

3.2 Animais

Para a realização deste experimento, foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, de ambos os sexos, com idade aproximada de seis meses e massa corporal média de 4,5 kg, provenientes do Biotério Central da UFSM. Os animais foram submetidos ao exame clínico completo e exames laboratoriais como análise de hemograma e perfil bioquímico. Foram colhidos 3 mL de sangue via intracardíaca de cada animal, para análise do hemograma e mensuração da proteína plasmática total. Os exames foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas do HVU da UFSM.

Todos os animais foram alojados em gaiolas individuais, por um período mínimo de 15 dias para sua adaptação às condições ambientais e ao convívio humano. Durante todo o período do experimento, os animais permaneceram em boxes individuais, recebendo ração e água *ad libitum*.

3.3 Separação dos animais

Após a constatação de que os animais estavam hígidos, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais (A, B, C e D) com cinco animais em cada, correspondendo a cada um dos tipos de tratamento que receberam, posteriormente a criação do defeito cutâneo (FIGURA 01).

Os grupos foram denominados conforme o seguinte delineamento:

Grupo A (controle negativo): os animais deste grupo não receberam nenhum tipo de tratamento, permanecendo com a ferida cirúrgica aberta, sobre a qual realizava-se apenas a troca diária de curativo, utilizando-se um gel lubrificante composto a base de água¹ diretamente sobre a lesão, seguida de gaze.

Grupo B (controle positivo): animais com o defeito cutâneo que, ao término do procedimento cirúrgico, recebiam sobre a mesma, uma membrana celulósica².

Grupo C (FTCM): animais com o defeito cutâneo que foram tratados com a fração total de células mononucleares autógenas, colhidas da medula óssea, associada à membrana celulósica.

Grupo D (FVE) – animais com o defeito cutâneo que foram tratados com a fração vascular estromal autógena, isolada a partir do tecido adiposo, associada à membrana celulósica.

¹ K-Y Gel[®]. Johnson & Johnson do Brasil. São José dos Campos, SP.

² Bioprat[®]. Bionext Produtos Biotecnológicos Ltda. São Paulo, SP.

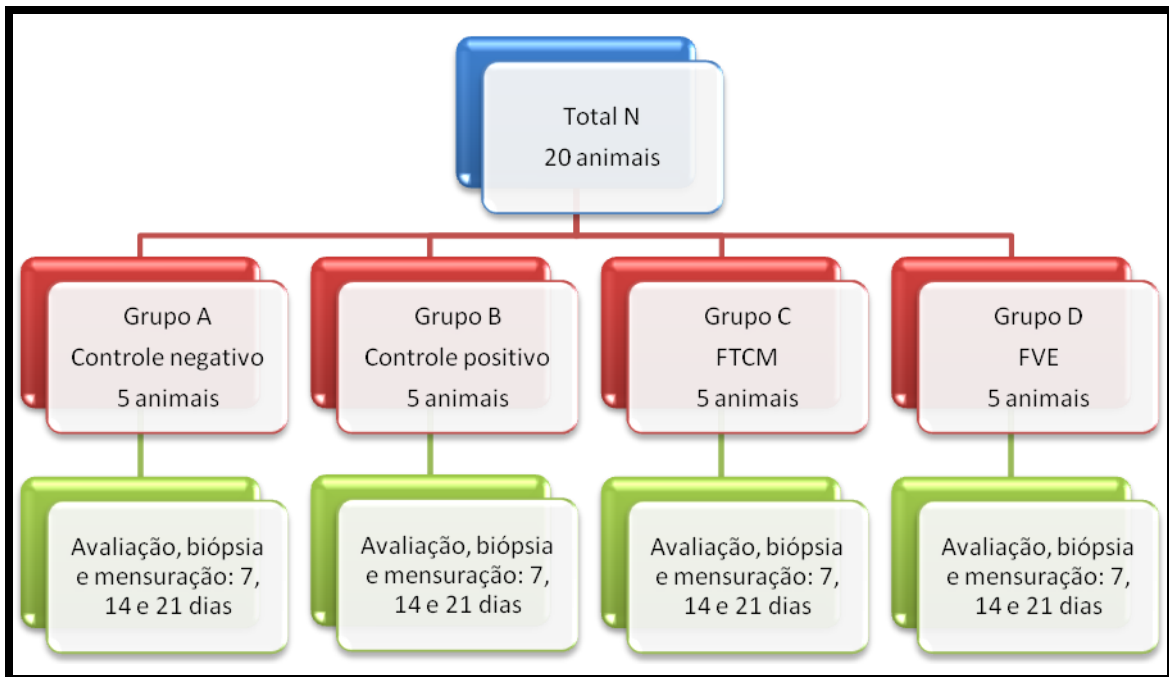


FIGURA 1 – Organograma demonstrando a separação dos vinte animais nos quatro grupos experimentais deste trabalho.

3.4 Fase pré-operatória e protocolo anestésico

No período que antecedia ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla, da parede torácica direita, para criação do defeito cutâneo, e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal. Os animais, nos quais foram colhidos material para isolamento das frações, tiveram os membros pélvicos, desde a linha média da coluna vertebral até a tíbia (Grupo C), ou a face dorsal cervical (Grupo D) tricotomizados, dependendo do material a ser colhido, se sangue da medula óssea (MO) ou tecido adiposo (TA), respectivamente. Para a realização do procedimento cirúrgico os animais permaneceram em jejum alimentar e hídrico de duas horas previamente à intervenção.

A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina³ (20 mg kg⁻¹), maleato de midazolam⁴ (2 mg kg⁻¹) e sulfato de morfina⁵ (5 mg kg⁻¹) por via intramuscular (IM). Os animais foram encaminhados para o bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE) da UFSM. Após administrou-se sulfato de atropina⁶ (0,05 mg kg⁻¹), visando diminuir a secreção salivar e brônquica e posterior indução anestésica com propofol⁷ (10 mg kg⁻¹), ambos pela via intravenosa (IV). A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano⁸ ao efeito, através do uso de máscara, com sistema inalatório aberto, vaporizado em 100% de oxigênio, com respiração espontânea.

Para manutenção do acesso venoso, foi realizada fluidoterapia com solução de Ringer com Lactato⁹, por meio de canulação da veia auricular caudal com cateter 24 G¹⁰, durante todo o procedimento cirúrgico, em gotejamento venoso de 10 mL kg⁻¹ h⁻¹. Com o auxílio de um oxímetro de pulso foi monitorada a frequência cardíaca e saturação de oxigênio.

3.5 Fração total de células mononucleares (FTCM) da medula óssea (MO)

3.5.1 Colheita do sangue da MO

Com o animal devidamente tricotomizado, o mesmo era posicionado em decúbito lateral na mesa cirúrgica e submetido à realização da anti-sepsia, utilizando-se o protocolo álcool-iodo-álcool. Os panos de campo foram posicionados e fixados de maneira asséptica para colheita do sangue da MO.

³ Cetamina[®]. Univet S.A. São Paulo, SP

⁴ Dormonid Injetável[®]. Roche Brasil. Jacarepaguá, RJ

⁵ Dimorf Injetável[®]. Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP

⁶ Hytropin Injetável[®]. Hipolabor Farmacêutica Ltda. Sabará, MG.

⁷ Diprivan[®]. AstraZeneca. Cotia, SP.

⁸ Isoflurane[®]. Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP.

⁹ Ringer com Lactato de Sódio[®]. Aster Produtos Médicos Ltda. Sorocaba, SP.

¹⁰ Cateter Intravenoso Angiocath 24 G[®]. BD Brasil. São Paulo, SP.

Para penetrar no espaço medular dos fêmures, foi utilizado um pino intramedular, acoplado ao introdutor, no qual foi aplicada uma pressão manual moderada, girando-o e alternando os movimentos para direita e esquerda. A criação de um túnel na fossa trocantérica em direção ao canal medular permitia a introdução de uma agulha hipodérmica 40 x 16, para a realização da punção do sangue da MO. A colheita era realizada eqüitativamente nos dois fêmures, com uma seringa de 10 mL, previamente heparinizada¹¹, para obtenção de um volume total de 5 mL kg⁻¹. A incisão de pele ocasionada pela introdução do pino intramedular e da agulha hipodérmica era ocluída com uma gota de cola de secagem instantânea¹².

A MO, assim que colhida, era depositada em uma bolsa de transfusão sangüínea, contendo 0,01 mL de heparina e 1 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% para cada 10 mL de sangue da MO. Ao término da colheita, a bolsa de transfusão contendo o sangue da MO era encaminhado, de maneira estéril, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa, onde ocorria o processamento.

3.5.2 Isolamento da FTCM

No interior de uma capela de fluxo laminar, desinfetada com álcool 70% e estéril por radiação ultravioleta, a bolsa de transfusão contendo o sangue da MO colhido (5 mL kg⁻¹) era conectado a um filtro de 500 µm. Esta filtragem do sangue tinha por objetivo reter as espículas ósseas e os êmbolos gordurosos, sendo o sangue depositado num frasco de Becker. O sangue da MO era separado em tubos Falcon de 50 mL, contendo solução de Hanks¹³, na quantidade de 1:1, e centrifugado a 440 G, durante cinco minutos. Após esta primeira centrifugação, o sobrenadante era retirado e o sangue da MO era transferido para um novo tubo Falcon, contendo um gradiente de densidade, Ficoll-hypaque¹⁴ 1.077, na proporção 1:1 de sangue:gradiente, de acordo com a técnica de *Boyum* modificada por Olsson (2009).

¹¹ Liquevine® (10.000 UI). Roche Brasil. Jacarepaguá, RJ

¹² Super Bonder Precisão®. Loctite. Itapeví, SP.

¹³ Hanks' Balanced Salts H1387-1L®. Sigma-Aldrich. Sant Louis, EUA

¹⁴ Histopaque 1077®. Sigma-Aldrich. Sant Louis, EUA

O tubo contendo a FTCM e o gradiente era centrifugado a 440 G, em temperatura ambiente, durante 25 minutos, proporcionando a sedimentação das hemácias e granulócitos e a visualização de um halo contendo as células mononucleares (FIGURA 02). Este halo contendo a fração era aspirado com pipeta automática e depositado em outro tubo Falcon. Após, era lavado com 10 mL de DMEM¹⁵ associado ao SFB¹⁶, para ser centrifugado a 440 G por cinco minutos, com intuito de remover o gradiente de densidade. O sobrenadante era removido e o halo de células era novamente lavado com 10 mL de DMEM associado ao SFB e centrifugado a 440 G por mais cinco minutos. Após a remoção do sobrenadante, era obtido na base do tubo como produto final, um botão celular (*pellet*).

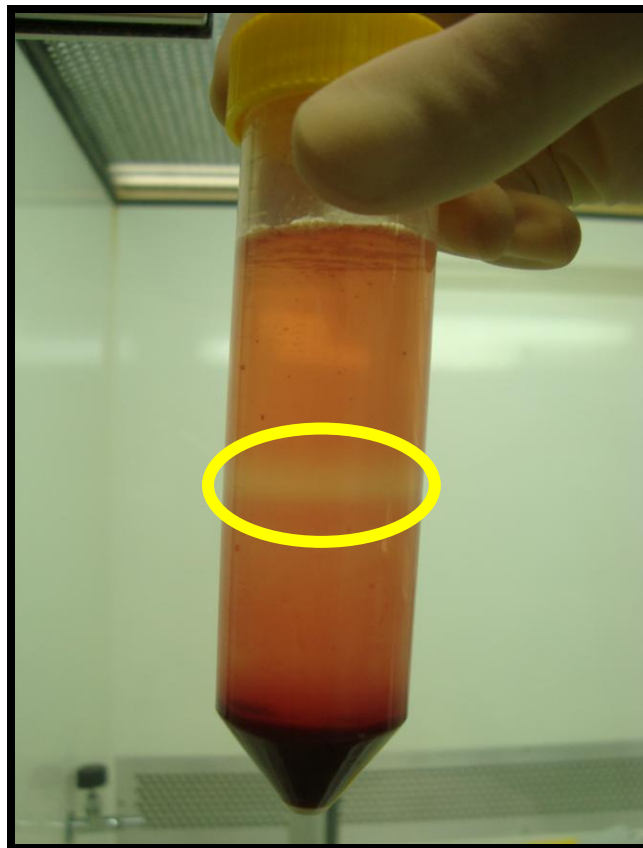


FIGURA 2 – Tubo Falcon contendo sangue da MO de coelho centrifugado com gradiente de densidade. Em destaque, visualização do halo celular formado pela sedimentação das hemácias e granulócitos.

¹⁵ Gibco 11885®. Invitrogen. São Paulo, SP

¹⁶ Foetal Bovine Serum, F9665®. Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA

Uma pequena alíquota (70 µl) da FTCM suspensas foi colhida com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem de células mononucleares e teste de viabilidade celular com o corante azul de *Trypan* 1%¹⁷, em lâmina de Neubauer. O restante do botão celular contendo a FTCM, era imediatamente aplicado nos animais do Grupo C, no local da lesão.

3.6 Fração vascular estromal (FVE) do tecido adiposo (TA)

3.6.1 Colheita do TA

Após a tricotomia e a anti-sepsia ampla da região dorsal cervical do animal, próximo às escápulas, o mesmo era anestesiado e posicionado em decúbito ventral, protegido da contaminação por panos de campo, para colheita de um fragmento de tecido adiposo. O fragmento de tecido adiposo, pesando dez gramas, era obtido por meio de incisão na linha média dorsal do animal, na região interescapular.

O tecido adiposo era identificado, divulsionado com pinças de Halsted e seccionado com tesoura de Metzemaum. Eventuais vasos sangrantes eram pinçados e ligados com fio absorvível sintético 3-0 (poliglactina 910)¹⁸. O espaço morto era reduzido com este mesmo fio de sutura, em padrão contínuo simples e a dermorrafia era realizada com fio inabsorvível sintético 4-0 (mononáilon)¹⁹, com pontos isolados de Wolff. Os pontos de pele eram removidos sete dias após o procedimento cirúrgico.

O fragmento de TA colhido era imediatamente depositado em um recipiente de vidro, estéril, contendo 150 mL de solução de Hanks. O frasco com o tecido era pesado ainda no interior da sala cirúrgica, identificado e encaminhado, de modo estéril, para o Laboratório de Terapia Celular Regenerativa.

¹⁷ Trypan Blue®. Acros Organic. Geel, Bélgica.

¹⁸ Vicryl®. Ethicon-Johnson. São José dos Campos, SP.

¹⁹ Mononylon®. Ethicon-Johnson. São José dos Campos, SP.

3.6.2 Isolamento da FVE

Todo o procedimento era realizado de forma asséptica, com os materiais esterilizados por autoclavagem, radiação ou filtração. No interior da capela de fluxo laminar, o recipiente contendo o fragmento de TA era aberto e, com uma pinça de dissecação, o tecido era transferido para uma placa de Petri. Com o auxílio de uma tesoura, a gordura era seccionada várias vezes, em diversos fragmentos menores, até não ser mais possível sustentá-la com a pinça de dissecação.

Os pequenos fragmentos de TA eram lavados com solução de Hanks e com o auxílio de uma peneira que não permitia a passagem da gordura. A lavagem ocorria cerca de três vezes, até que o tecido e a solução de Hanks adquirissem uma aparência mais clara, sendo que o objetivo destas lavagens era diminuir a contaminação com sangue presente nos fragmentos.

Concluída esta etapa, a gordura era transferida para tubos Falcon, de 50 mL e era adicionado ao TA, uma solução de 1 mg/mL de collagenase tipo I²⁰ (0,5 mg/mL) e tipo II²¹ (0,5 mg/mL), na proporção 1:3 (volume:volume), ou seja, para os dez gramas de gordura eram necessários 30 mL de collagenase. Os tubos eram tampados e lacrados com uma película semi-transparente, resistente a água²², para diminuir o risco de uma possível contaminação e encaminhados para o banho-maria.

Os tubos contendo o TA com a collagenase permaneciam no banho-maria a uma temperatura de 37 °C e eram agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, a collagenase promovia a digestão do colágeno, permitindo que diversos tipos celulares fossem liberados do tecido. Durante o momento em que os tubos estavam no banho-maria, os mesmos eram inspecionados freqüentemente, visto que a obtenção de um aspecto leitoso era o indicativo de que a digestão estava completada (FIGURA 3). Este aspecto visual bastante característico se dava aproximadamente aos 25 minutos de incubação no banho-maria.

²⁰ Collagenase Type I, C0130[®]. Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA

²¹ Collagenase Type II, C6885[®]. Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA

²² Parafilm “M”[®]. Pechinery Plastic Packaging. Chicago, EUA.

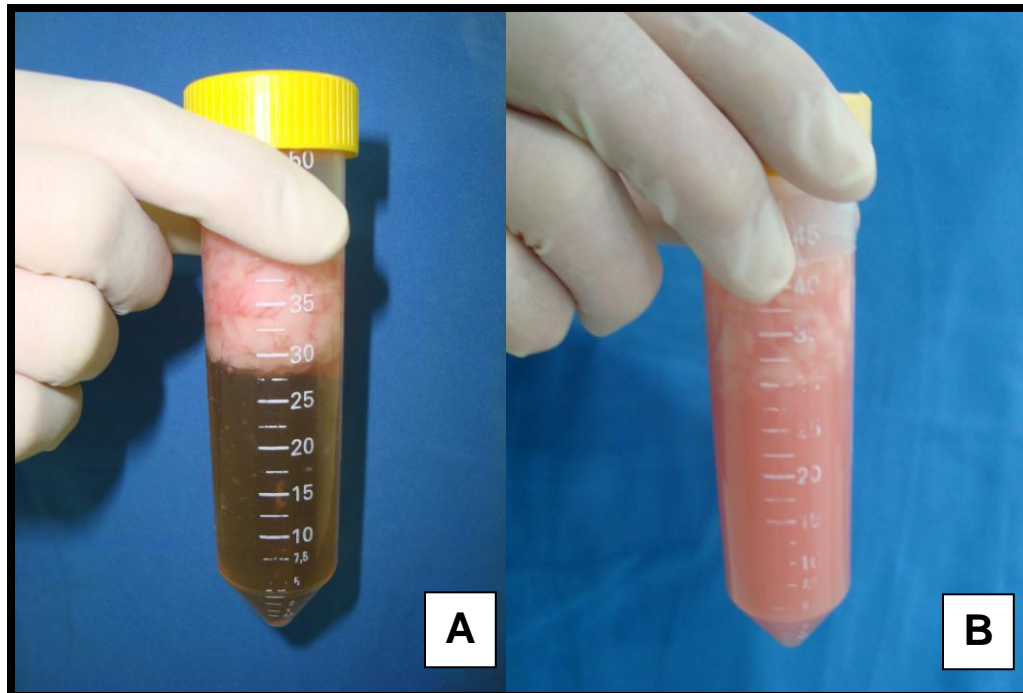


FIGURA 3 – A) Tubo Falcon contendo fragmentos do tecido adiposo e colagenase antes da digestão em banho-maria. B) Aspecto apresentado pelo tecido adiposo (leitoso), após a digestão pela colagenase em banho-maria.

Ao ser observado o aspecto leitoso, os tubos eram retirados do banho-maria e encaminhados novamente para a capela de fluxo laminar. Dada a citotoxicidade da colagenase, a mesma era neutralizada através da adição de meio completo, em um volume de 1:1. Portanto, como havia 10 mL de gordura mais 30 mL de colagenase, era acrescentado 40 mL de DMEN com 10% de SFB, sendo que o total era distribuído de maneira equivalente, em dois novos tubos Falcon.

Os tubos de TA com o meio completo adicionado eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Realizava-se uma agitação manual vigorosa dos tubos, objetivando romper os adipócitos e promover a liberação de mais células mononucleares. Após, os tubos eram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação. Desta maneira ocorria a deposição da FVE na base do tubo.

O sobrenadante era descartado e a fração era lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 440 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. O procedimento de lavagem era repetido novamente e ao término da nova centrifugação o sobrenadante era descartado e a FVE ressuspensa em 1 mL de meio completo. Uma pequena fração (70 µl) da FVE suspensa foi colhida com pipeta automática para quantificação manual da porcentagem de células mononucleares e teste de viabilidade celular com azul de *Trypan* 1% em lâmina de Neubauer. O restante do botão contendo a FVE era imediatamente aplicado nos animais do Grupo D, no local da lesão.

3.7 Procedimento cirúrgico para criação do defeito cutâneo e tratamentos

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico para criação do defeito cutâneo, sendo que nos grupos C e D, esse procedimento era realizado após a separação da FTSM e FVE, respectivamente. Com o animal devidamente tricotomizado na parede torácica direita e posicionado em decúbito esternal, com os membros pélvicos direcionados caudalmente, era realizada anti-sepsia com álcool-iodo-álcool e colocação de panos de campo. O protocolo anestésico era o mesmo utilizado para a colheita do sangue de MO ou do TA, conforme descrito anteriormente, no item 3.4.

Utilizando-se um molde de plástico quadrado, vazado em seu interior, numa dimensão de 2 x 2 cm, foi demarcado na pele a área que seria excisada na parede torácica direita, sobre a última costela, com o auxílio de um lápis dermatográfico. Realizou-se a incisão cutânea e a divulsão do tecido subcutâneo foi executada com o auxílio de uma tesoura de Metzemaum (FIGURA 4). De maneira atraumática, com pinças de dissecação, as bordas cutâneas foram manipuladas e os vasos sangrantes identificados, pinçados e a hemostasia realizada somente por compressão ou por forcitorção. A gordura subcutânea foi divulsionada e excisada completamente.

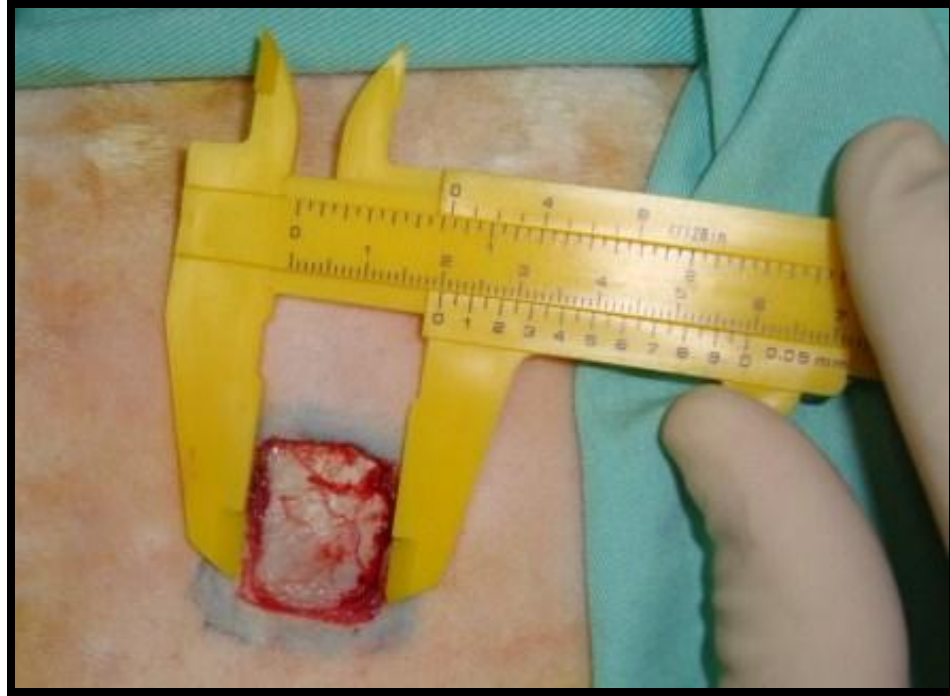


FIGURA 4 – Criação da ferida cirúrgica medindo 2 cm², na parede torácica direita, sobre a região da última costela dos coelhos.

No local em que houve a criação do defeito cirúrgico experimental, houve o preenchimento da lesão de acordo com o grupo que o animal pertencia. O Grupo A, controle negativo, não recebeu nenhum tratamento para fechamento do defeito criado, apenas curativo com gaze e atadura, trocados diariamente. No momento da realização do curativo, preconizou-se pelo uso de pomada lubrificante à base de água, para evitar a aderência da gaze no leito da ferida, o que poderia estimular uma nova lesão na próxima troca de curativo.

Os animais do Grupo B, controle positivo (apenas *scaffold*), tiveram sua lesão lavada com solução fisiológica e gaze estéril. O *scaffold*, uma membrana celulósica com 5 cm², foi posicionado sobre a lesão e as bolhas de ar porventura formadas foram retiradas (FIGURA 5). A borda dessas membranas era fixada na pele dos animais com cola de secagem instantânea.

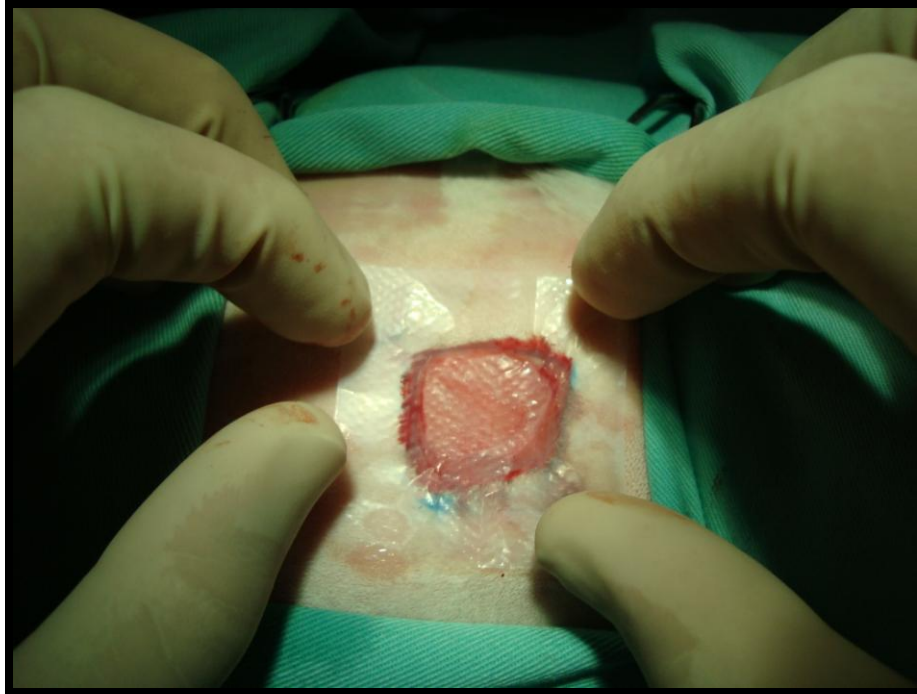


FIGURA 5 – Aplicação da membrana celulósica sobre a ferida cirúrgica, imediatamente após a criação do defeito, nos coelhos dos grupos B, C e D.

Os animais do Grupo C (*scaffold* + FTCM da MO) receberam, além da mesma membrana utilizada no grupo controle positivo, o botão celular (*pellet*) contendo a FTCM isolada da MO, imediatamente após a colheita e processamento em laboratório. O botão era recebido no interior do bloco cirúrgico, de maneira estéril, em um tubo Eppendorf. O *pellet* era aspirado com uma seringa hipodérmica de 3 mL e agulha 40 x 12 e a aplicação da FTCM ocorria no espaço subcutâneo, nas quatro bordas do defeito criado, próximo ao leito da ferida cirúrgica.

Por fim, os animais do Grupo D (*scaffold* + FVE do TA), além da membrana, receberam a FVE isolada do TA, imediatamente após a colheita do tecido e processamento desta fração em laboratório. Assim como para os animais do grupo anterior, a aplicação do botão se dava no espaço subcutâneo, nas quatro margens do defeito criado (FIGURA 6). Os animais dos grupos B, C e D receberam ainda um curativo secundário, realizado com gaze e atadura, sobre a membrana celulósica e trocado diariamente, para mimetizar a situação do grupo A.



FIGURA 6 – Aplicação da FVE no espaço subcutâneo, na borda caudal da ferida cirúrgica, nos coelhos do grupo D.

3.8 Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório imediato os animais foram monitorados até o restabelecimento completo de sua consciência, quando eram então encaminhados novamente para os seus boxes individuais. Foi administrado meloxicam²³ ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$) como anti-inflamatório, via subcutânea, uma vez ao dia, durante três dias. Para analgesia dos animais foi administrado sulfato de morfina (5 mg kg^{-1}), via intramuscular IM, quatro vezes ao dia, durante três dias. Os animais do grupo A foram submetidos à limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica uma vez ao dia. A troca do curativo foi realizada nos animais de todos os grupos, diariamente.

²³ Maxican 2%®. Ouro Fino. Ribeirão Preto, SP

3.9 Avaliações

3.9.1 Avaliação clínica

No pós-operatório imediato, os animais foram avaliados clinicamente quanto aos parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, defecação e micção) e quanto ao seu comportamento e retorno da alimentação. A viabilidade cutânea também foi avaliada clinicamente, por meio de percepção visual quanto à coloração, aquecimento, sensação de dor e sangramento.

3.9.2 Avaliação fotográfica e planimetria

Os coelhos foram submetidos à mensuração de suas feridas no momento da criação da lesão (dia 0) e aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório. Os animais eram anestesiados e posicionados sempre em decúbito ventral, com os membros pélvicos voltados em direção caudal, para evitar mudança de conformação da ferida. As medidas (altura e largura) foram obtidas com a utilização de um paquímetro e desenhadas em papel manteiga para posterior conferência. As novas feridas, ocasionadas pelas biópsias, não eram levadas em consideração nas mensurações seguintes.

3.9.3 Avaliação histológica

Para a realização da biópsia tecidual, os animais foram anestesiados conforme o protocolo descrito anteriormente no item 3.4 e submetidos ao procedimento

cirúrgico asséptico, nos dias sete, 14 e 21 após a criação do defeito. Com a utilização de um *punch* de biópsia cutânea de 6 mm, foi retirado um fragmento cutâneo, na interface da lesão criada e do tecido não lesado. A biópsia de sete dias foi realizada na margem dorsal da ferida, enquanto que a segunda biópsia realizou-se na borda caudal e por fim, a biópsia de 21 dias foi realizada na margem ventral da ferida.

O fragmento colhido era fixado em formol tamponado e embocado em parafina para a realização dos cortes de microscopia com auxílio de um micrótomo. As lâminas de microscopia, contendo os cortes histológicos das amostras, foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliação histopatológica. A leitura das lâminas foi executada no Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM, por um único avaliador, dispondo de um microscópio óptico conectado a um sistema de captura de imagens.

3.9.4 Análise estatística

Foi realizada análise estatística das medidas de planimetria das feridas e das variáveis analisadas na histopatologia. A análise estatística da planimetria foi conduzida a partir da média dos grupos, utilizando-se o teste de Tukey para correção das médias, com posterior teste de análise de regressão, através do software computacional estatístico SAS[®]. Considerou-se diferença estatística significativa quando o nível de significância foi igual ou menor que 1% ($p < .0001$).

3.10 Doação dos animais

Após o término do experimento e período de avaliação pós-cirúrgica de 21 dias, todos os foram encaminhados para doação.

4. RESULTADOS

4.1 Modelo de lesão cutânea e protocolo anestésico

O modelo de lesão cutânea proposto mostrou-se eficiente, de rápida e fácil execução e seu tamanho mostrou-se adequado às necessidades deste estudo. A ausência de linhas de tensão na região escolhida para o defeito colaborou com a manutenção das medidas da ferida durante o procedimento cirúrgico para criação do defeito. Após a ocorrência de óbito em alguns animais pilotos, o protocolo anestésico quando estabelecido mostrou-se satisfatório, não havendo a necessidade de intubação dos coelhos. A recuperação pós-cirúrgica era rápida e transcorria sem alterações clínicas, sendo que os animais eram monitorados até seu pleno restabelecimento. Não foi necessária a utilização de colares elisabetanos, pois a localização do defeito cirúrgico, na parede torácica sobre a região da última costela, impediu que os animais se auto-mutilassem ou retirassem a membrana celulósica.

4.2 Colheita e isolamento da FTCM e da FVE

Por meio de protocolos já estabelecidos para colheita e isolamento das frações em outras espécies animais, houve adaptação de diferentes técnicas, até o estabelecimento do protocolo utilizado, sendo considerado satisfatório. A metodologia utilizada para o processamento da medula óssea permitiu a obtenção de botões celulares, para aplicação no animal, com um valor total de células entre $6,92 \times 10^6$ a $4,91 \times 10^7$ (média de $2,49 \times 10^7$) e uma viabilidade de 82 a 97% (média de 90,75%) na amostra de quatro botões, pois um apresentou agregação celular. Os valores estão na tabela a seguir.

TABELA 1 – Número de células mononucleares (mL) e viabilidade celular (%) obtidas no botão celular após o processamento da medula óssea dos coelhos do grupo C.

Grupo	Animal	Amostra		Pellet de células aplicado	
		Número de células mononucleares totais por mililitro	Viabilidade (%)	Volume total do pellet (mL)	Total de células mononucleares
C	1	$2,77 \times 10^4$	88%	0,25 mL	$6,92 \times 10^6$
C	2	$2,05 \times 10^5$	97%	0,15 mL	$3,07 \times 10^7$
C	3	$1,78 \times 10^5$	Agregada	0,145 mL	$2,58 \times 10^7$
C	4	$5,05 \times 10^4$	82%	0,24 mL	$1,21 \times 10^7$
C	5	$9,82 \times 10^4$	96%	0,50 mL	$4,91 \times 10^7$

Com relação ao processamento do tecido adiposo, foi possível obter botões celulares, com um valor total de células entre $9,6 \times 10^5$ e $6,5 \times 10^6$ (média de $2,7 \times 10^6$) e uma viabilidade de 66 a 87% (média de 79,6%). Os valores estão na tabela abaixo.

TABELA 2 – Número de células mononucleares (mL) e viabilidade celular (%) obtidas no botão celular após o processamento do tecido adiposo dos coelhos do grupo D.

Grupo	Animal	Amostra		Pellet de células aplicado	
		Número de células mononucleares totais por mililitro	Viabilidade (%)	Volume total do pellet (mL)	Total de células mononucleares
D	1	$4,1 \times 10^3$	66%	0,5 mL	$2,05 \times 10^6$
D	2	$6,5 \times 10^3$	87%	1 mL	$6,5 \times 10^6$
D	3	$2,2 \times 10^3$	87%	1 mL	$2,2 \times 10^6$
D	4	$1,2 \times 10^3$	76%	0,8 mL	$9,6 \times 10^5$
D	5	$8,9 \times 10^2$	82%	2 mL	$1,78 \times 10^6$

4.3 Avaliação fotográfica e planimetria

As medidas das feridas (altura e largura) obtidas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0), e aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, estão agrupadas na tabela abaixo. Para o cálculo da área da ferida, foi utilizada a fórmula da área do quadrado: área = altura x largura, por representar a conformação aproximada da mesma.

TABELA 3 – Valores obtidos na mensuração das feridas (altura e largura em cm e área em cm²) dos quatro grupos, nos dias 0, 7, 14 e 21.

Grupo	Coelho	DIA 0			DIA 7			DIA 14			DIA 21		
		Altura	Largura	Área	Altura	Largura	Área	Altura	Largura	Área	Altura	Largura	Área
A	1	2,4	2,0	4,80	2,3	2,2	5,06	2,1	1,6	3,36	1,1	1,0	1,10
A	2	2,5	2,2	5,50	2,3	2,1	4,83	1,4	1,4	1,96	1,2	1,0	1,20
A	3	2,6	1,9	4,94	2,5	1,6	4,00	1,7	1,5	2,55	1,1	1,2	1,32
A	4	2,8	2,5	7,00	2,4	2,7	6,48	1,9	1,7	3,23	0,9	0,8	0,72
A	5	2,5	2,0	5,00	1,8	2,1	3,78	0,9	0,7	0,63	0,5	0,5	0,25
B	1	2,4	2,4	5,76	2,2	2,3	5,06	1,4	1,1	1,54	0,4	0,3	0,12
B	2	2,2	2,0	4,40	2,1	1,7	3,57	0,7	1,0	0,70	0,5	0,7	0,35
B	3	2,4	2,5	6,00	2,0	1,7	3,40	1,3	1,3	1,69	0,5	0,5	0,25
B	4	2,0	2,5	5,00	1,3	1,6	2,08	0,9	0,8	0,72	0,6	0,5	0,30
B	5	2,1	1,8	3,78	1,4	1,1	1,54	0,8	0,5	0,40	0,5	0,5	0,25
C	1	2,0	2,1	4,20	1,7	1,9	3,23	0,9	1,0	0,90	0,0	0,0	0,00
C	2	2,6	2,0	5,20	2,2	1,5	3,30	1,1	0,7	0,77	0,0	0,0	0,00
C	3	3,0	2,0	6,00	1,7	1,8	3,06	0,8	0,7	0,56	0,0	0,0	0,00
C	4	2,1	2,4	5,04	2,0	2,0	4,00	0,9	0,8	0,72	0,0	0,0	0,00
C	5	2,7	2,0	5,40	2,7	1,9	5,13	1,0	0,6	0,60	0,0	0,0	0,00
D	1	2,5	1,6	4,00	0,8	0,7	0,56	0,6	0,5	0,30	0,0	0,0	0,00
D	2	2,0	2,2	4,40	1,8	1,5	2,70	0,4	0,4	0,16	0,0	0,0	0,00
D	3	2,4	2,2	5,28	1,4	1,3	1,82	0,6	0,7	0,42	0,0	0,0	0,00
D	4	2,5	2,4	6,00	1,8	1,8	3,24	0,9	0,9	0,81	0,0	0,0	0,00
D	5	2,0	2,4	4,80	1,5	1,5	2,25	0,9	1,1	0,99	0,0	0,0	0,00

A análise estatística foi conduzida a partir da média dos grupos, através dos resultados obtidos na mensuração das feridas de todos os animais, nos quatro tempos de avaliação. Para correção das médias obtidas de cada grupo, foi utilizado o Teste de Tukey, através do software computacional estatístico SAS[®]. As médias corrigidas estatisticamente e os desvios padrão estão na tabela a seguir.

TABELA 4 – Desvio padrão e médias de cada grupo para altura, largura e área, nos quatro tempos de avaliação.

DIA	GRUPO	Altura (cm)	Largura (cm)	Área (cm ²)
0	A	2,56 ^a	2,12 ^a	5,448 ^a
0	B	2,22 ^a	2,24 ^a	4,988 ^a
0	C	2,48 ^a	2,10 ^a	5,168 ^a
0	D	2,28 ^a	2,16 ^a	4,896 ^a
0	Desvio Padrão	± 0,273404	± 0,272947	± 0,823110
7	A	2,26 ^a	2,14 ^a	4,830 ^a
7	B	1,80 ^{ab}	1,68 ^{ab}	3,130 ^{ab}
7	C	2,06 ^{ab}	1,82 ^{ab}	3,744 ^{ab}
7	D	1,46 ^b	1,36 ^b	2,114 ^b
7	Desvio Padrão	± 0,383732	± 0,367423	± 1,096461
14	A	1,60 ^a	1,38 ^a	2,346 ^a
14	B	1,02 ^b	0,94 ^b	1,010 ^b
14	C	0,94 ^b	0,76 ^b	0,710 ^b
14	D	0,68 ^b	0,72 ^b	0,536 ^b
14	Desvio Padrão	± 0,307002	± 0,297909	± 0,652238
21	A	0,96 ^a	0,90 ^a	0,918 ^a
21	B	0,50 ^b	0,50 ^b	0,254 ^b
21	C	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^b
21	D	0,0 ^c	0,0 ^c	0,0 ^b
21	Desvio Padrão	± 0,144049	± 0,150000	± 0,222064

* Letras diferentes correspondem à diferença estatística significativa.

Analisando a tabela anterior, com as médias corrigidas, pode-se perceber que no momento da criação do defeito cirúrgico não há diferença estatística significativa entre os grupos. Aos 7 dias de pós-operatório (FIGURA 7), os animais dos grupos que receberam a membrana celulóica (grupo B), a FTCM (grupo C) e a FVE (grupo D), não diferiram estatisticamente entre si, no entanto, é possível perceber diferença estatística significativa ($p < .0001$) quando compara-se o grupo D, que recebeu a FVE do tecido adiposo, com o grupo controle (A).

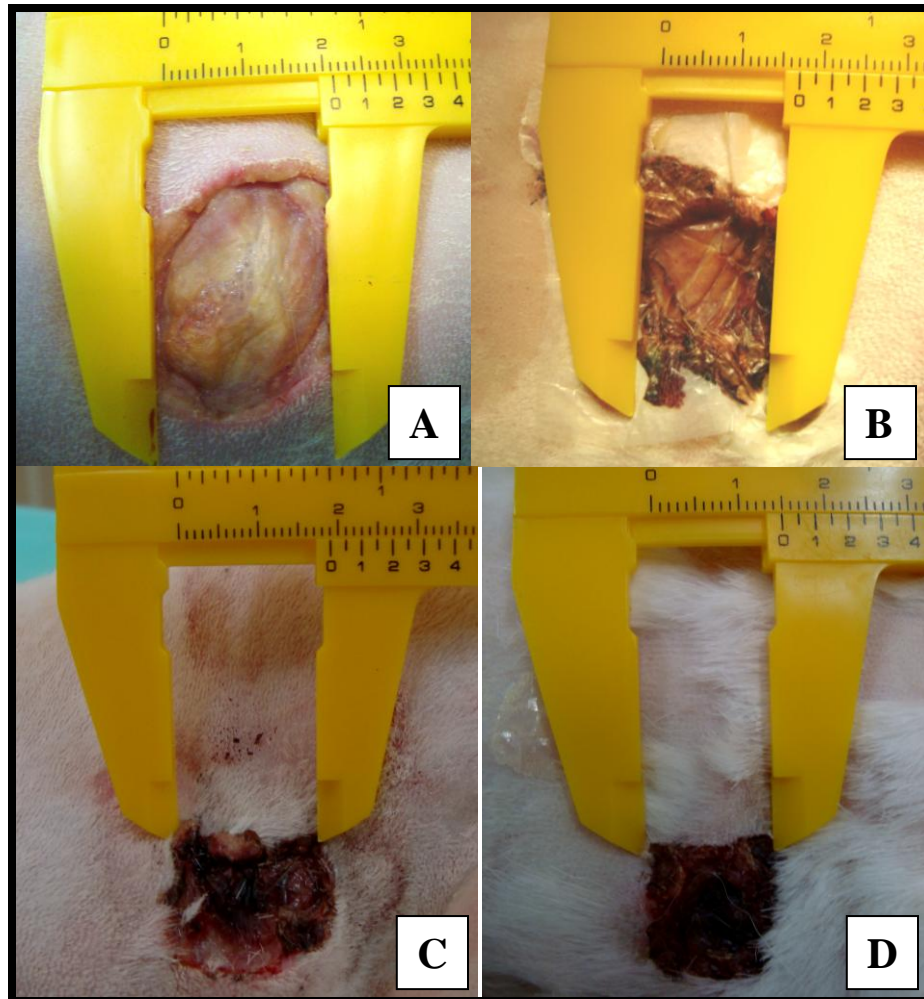


FIGURA 7 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 7 dias de pós-operatório. A letra em destaque corresponde o grupo ao qual pertence o animal.

No 14^o dia de avaliação (FIGURA 8), os três grupos que receberam algum tipo de tratamento (B, C e D), também não diferiram entre si, porém todos diferiram significativamente ($p < .0001$) quando comparados com o grupo controle (A).

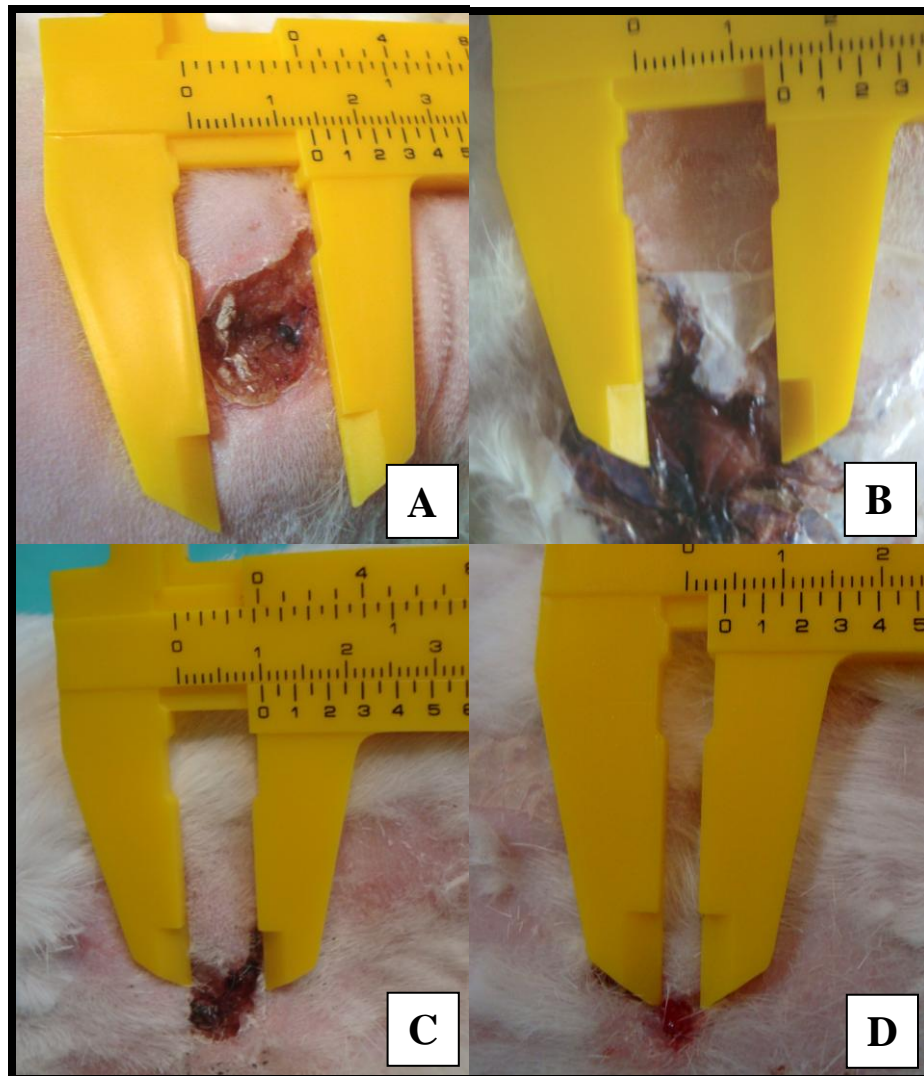


FIGURA 8 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 14 dias de pós-operatório. A letra em destaque corresponde o grupo ao qual pertence o animal.

No final do período de avaliação, aos 21 dias de pós-operatório (FIGURA 9), os grupos tratados (B, C e D) se mantêm sem diferença estatística significativa entre si, mas diferem significativamente ($p < .0001$) do grupo controle (A).

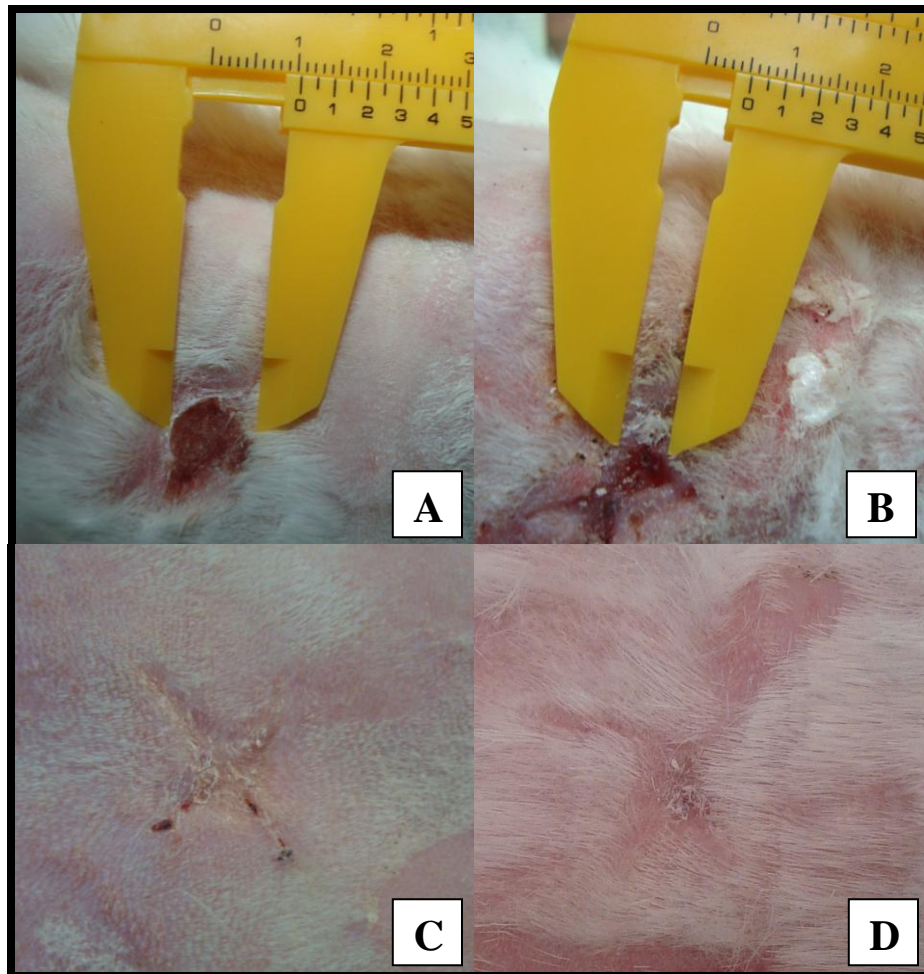


FIGURA 9 – Aspecto da ferida cutânea dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, aos 21 dias de pós-operatório. A letra em destaque corresponde o grupo ao qual pertence o animal.

Após a correção das médias de cada grupo pelo Teste de Tukey, foi realizada a análise estatística de regressão, também através do software computacional estatístico SAS[®], com posterior aplicação da fórmula $Y_i = b_0 + b_1 \times \text{dia}_1$, para regressão linear. Os dados de regressão são apresentados na tabela a seguir.

TABELA 5 – Análise de regressão da área dos grupos nos quatro tempos de avaliação.

Grupo	Períodos de Avaliação (Dias)				Rsquare	Nível de Significância
	0	7	14	21		
A	5,7966	4,189	2,581	0,974	79,64%	<.0001
B	4,794	3,162	1,529	-0,103	82,07%	<.0001
C	5,186	3,332	1,478	-0,375	90,33%	<.0001
D	4,326	2,7	1,073	-0,553	83,20%	<.0001

A análise de regressão permitiu avaliar quanto de área das feridas era reduzida a cada dia e em que momento do período de pós-operatório ocorreu, em média, a cicatrização completa das feridas de cada grupo, conforme apresentado no gráfico abaixo.

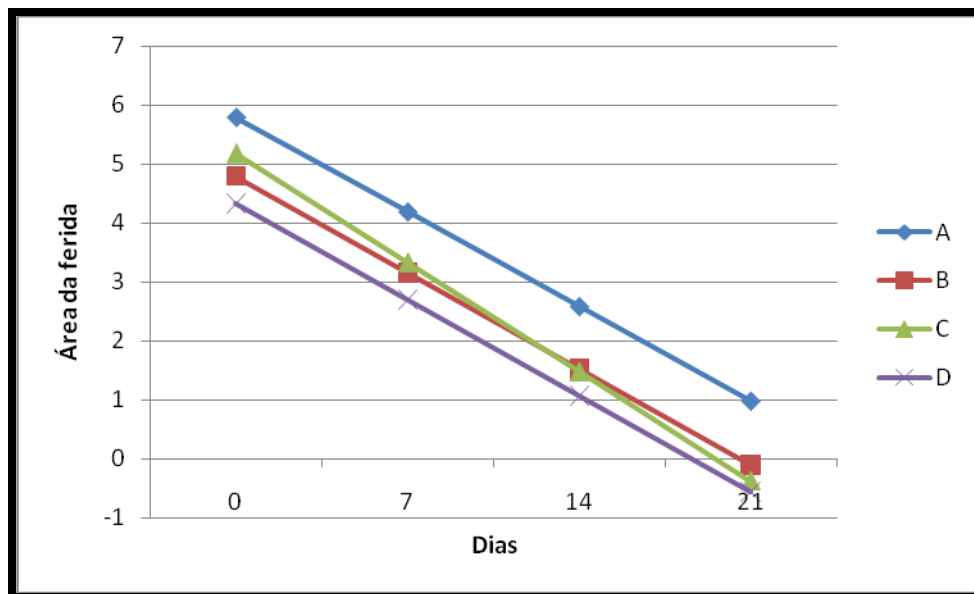


FIGURA 10 – Gráfico representativo, demonstrando a redução da área das feridas cutâneas dos coelhos, nos quatro grupos experimentais, em relação aos dias de pós-operatório. A letra em destaque corresponde o grupo ao qual pertence o animal.

A análise estatística de regressão demonstrou diferença estatística significativa ($p < .0001$). Este teste demonstrou que o grupo controle (A) apresentou cicatrização completa das feridas, em média, somente aos 25 dias de pós-operatório, tempo superior ao período de avaliação determinado para este trabalho. O grupo tratado somente com a membrana celulósica (B) apresentou redução completa das feridas no 20º dia de pós-operatório, em média. Por sua vez, os grupos tratados com a FTCM (C) e a FVE (D), apresentaram cicatrização completa de suas feridas, em média, nos dias 19 e 18 de pós-operatório, respectivamente.

4.4 Avaliação histopatológica

As biópsias para avaliação histopatológica foram realizadas nos dias 7, 14 e 21 de pós-operatório. Para comparar os quatro grupos deste trabalho, foi criada uma tabela (QUADRO 1) para avaliação das alterações observadas na histopatologia.

	Úlcera	Crosta	TFID	TFMD	Fibrose dérmica	DPPH	DPSLP	DIG	Calcif.	Acantose
A1 07 d	+++	+++	+++	-	-	+	-	+++	+	-
A1 14 d	-	-	-	++	-	-	+	+	+	+++
A1 21 d	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+++	+++
A2 07 d	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
A2 14 d	-	-	+++	-	-	+	-	+	+	+++
A2 21 d	-	-	-	+++	-	-	-	+	+	+++
A3 07 d	+++	+++	+++	-	-	+	-	-	-	-
A3 14 d	-	-	+++	-	-	+	-	+	+	+++
A3 21 d	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	+++
A4 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A4 14 d	-	-	++	-	-	+	-	+	-	+++
A4 21 d	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+	-	-
A5 07 d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A5 14 d	-	-	+	++	-	-	-	+	+	++
A5 21 d	-	-	+	+++	+	+	-	++	++	+++
B1 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B1 14 d	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	+++
B1 21 d	-	+	+++	-	-	+	+	-	-	++
B2 07 d	++	-	+	-	-	-	-	+	-	+
B2 14 d	-	-	+++	-	-	+	-	-	-	+++
B2 21 d	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	+++

B3 07 d	+	+	++	-	-	-	-	-	-	++
B3 14 d	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++
B3 21 d	+	+	+++	-	-	-	-	-	-	++
B4 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B4 14 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B4 21 d	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+++
B5 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B5 14 d	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++
B5 21 d	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++
C1 07 d	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
C1 14 d	+	+	++	-	-	-	-	-	-	++
C1 21 d	-	-	-	++	-	-	-	-	-	++
C2 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C2 14 d	+	+++	-	++	-	++	-	-	-	++
C2 21 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C3 07 d	+	++	-	-	-	+++	+	-	-	-
C3 14 d	-	++	++	-	+	-	-	-	-	++
C3 21 d	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+
C4 07 d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4 14 d	-	-	-	-	+++	+	++	-	-	-
C4 21 d	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	++
C5 07 d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5 14 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C5 21 d	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D1 07 d	+	+++	++	+	-	++	-	-	-	++
D1 14 d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++
D1 21 d	-	-	-	++	-	-	-	-	-	+
D2 07 d	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+
D2 14 d	-	-	++	-	-	+	+	-	-	++
D2 21 d	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	++
D3 07 d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
D3 14 d	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D3 21 d	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	+
D4 07 d	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	++
D4 14 d	-	-	++	+	+	+++	+	-	-	+++
D4 21 d	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+++
D5 07 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D5 14 d	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
D5 21 d	-	-	++	-	+	-	-	-	-	+++

Quadro 1 - Agrupamento dos resultados obtidos na avaliação histopatológica. A, B, C e D = grupos; 1, 2, 3, 4 e 5 = coelhos; 07 d = 7 dias; 14 d = 14 dias; 21 d = 21 dias; - = negativo; + = leve intensidade; ++ = moderada intensidade; +++ = acentuada intensidade; TFID = Tecido fibrovascular imaturo dérmico; TFMD = Tecido fibrovascular maduro dérmico; DPPH = Dermatite perivascular profunda heterofílica; DPSL = Dermatite perivascular superficial linfoplasmocitária; DIG = Dermatite intersticial granulomatosa; NR = amostra não representativa.

Não houve diferença estatística significativa para as variáveis avaliadas pela histopatologia, com exceção da dermatite intersticial granulomatosa (DIG) e da calcificação, que não foram observadas em nenhum dos animais que receberam a FCTM ou a FVE.

5. DISCUSSÃO

As descrições realizadas por Colomé (2007) sobre as características da espécie, a facilidade de manipulação, bem como o baixo custo para manutenção em biotérios, influenciaram na opção pela utilização de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo experimental neste experimento. Algumas dificuldades relacionadas ao uso desta espécie, quanto à colheita dos materiais, processamento das frações e uso da membrana celulósica foram encontradas, porém, testes realizados em animais pilotos possibilitaram adaptações.

A membrana celulósica utilizada como *scaffold* neste trabalho, mostrou-se eficiente quando aplicada isoladamente, apresentando diferença estatística significativa ($p < .0001$) em relação ao grupo controle, aos 14 dias de pós-operatório. Ela provavelmente atuou como uma barreira mecânica contra a invasão de microorganismos e controlando a perda de fluídos, que devem ser as maiores preocupações no tratamento de ferimentos na pele (WELSH; MALE, 1992).

Não houve necessidade de remoção da membrana ao término da cicatrização, pois a mesma era biodegradada, liberando pequenos fragmentos à medida que ocorria o avanço da epitelização. Pope (1996), explica que isto ocorre porque na fase de epitelização, as células epiteliais secretam enzimas proteolíticas que dissolvem a base de estruturas de obstáculos que possam ser encontrados no leito da ferida.

Um problema encontrado foi a dificuldade para fixar a membrana, uma fina lâmina, sobre a ferida, o que vai contra o preconizado por Burke et al (1981), que afirmaram que o substituto cutâneo ideal deve ser de fácil aplicação e deve aderir ao leito receptor. Por este motivo, após testes realizados previamente a este estudo, optou-se pela utilização da cola de secagem rápida para evitar a queda do curativo biológico. Dificuldade semelhante foi encontrada por Tomita (2005) que relatou o descolamento da matriz que utilizou como uma das complicações mais freqüentes.

Com relação aos sítios de colheita do material para o isolamento das frações, Meirelles et al. (2006), citaram que as células-tronco mesenquimais (MSCs) estão presentes em virtualmente todos os órgãos e tecidos após o nascimento. Neste trabalho optou-se pelo isolamento das frações da medula óssea e do tecido adiposo, que são os sítios mais utilizados rotineiramente para colheita.

A agulha de Steis, usada rotineiramente para colheita de sangue da MO em cães (TOGNOLI, 2008; OLSSON, 2009) provocou fratura de fêmur em um coelho, pois o diâmetro de seu canhão era maior que o do osso. Foi realizada a eutanásia do animal e posterior substituição por outro. Por este motivo, optou-se pelo uso da agulha hipodérmica 40 x 16, conforme preconizado por Gomes (2008). Foram necessárias várias agulhas em cada procedimento, pois a presença de osso esponjoso causava a obstrução das agulhas.

Quando comparada com a colheita de sangue da MO, a do tecido adiposo mostrou-se mais fácil de ser executada, necessitando de menos tempo para ser realizada e proporcionando uma recuperação pós-operatória mais rápida para o animal. Sugere-se que este método de colheita cause menos dor para o animal, conforme observaram Housman et al. (2002), que ressaltaram também a facilidade de colheita, a possibilidade de se obter grandes quantidades de células e os baixos riscos para o paciente. Outra grande vantagem do tecido adiposo é sua maior disponibilidade. Somente nos Estados Unidos, há cerca de uma década atrás, eram realizadas aproximadamente 400.000 cirurgias de lipoaspiração a cada ano e, em cada procedimento, eram retirados de 100 mL a 3 litros de tecido lipoaspirado, material rotineiramente descartado (KATZ et al., 1999).

Algumas dificuldades puderam ser observadas durante as etapas de processamento da FTCM e da FVE. O halo celular formado após a centrifugação do sangue da MO com o gradiente de densidade, mostrou-se muito mais discreto do que quando utiliza-se sangue da MO de outras espécies, como cães e gatos, e isto exigiu uma maior atenção e experiência por parte do laboratorista. Os tubos contendo a FVE e a collagenase eram constantemente observados enquanto estavam no banho-maria, pois um tempo maior que o necessário poderia acarretar numa superdigestão e ocasionar morte celular.

A colheita de 5 mL kg^{-1} de sangue da MO (SALBEGO, 2010) foi suficiente e permitiu a obtenção de botões celulares, para aplicação no animal, com um valor total de células entre $6,92 \times 10^6$ a $4,91 \times 10^7$ (média de $2,49 \times 10^7$) e uma viabilidade de 82 a 97% (média de 90,75%), no isolamento da FTCM. A colheita de dez gramas de tecido adiposo foi determinada por estudos prévios e também demonstrou ser suficiente para obtenção de botões celulares, com um valor total de células entre $9,6 \times 10^5$ e $6,5 \times 10^6$ (média de $2,7 \times 10^6$) e uma viabilidade de 66 a 87% (média de 79,6%), no isolamento da FVE. Os valores obtidos no processamento do sangue da MO e do tecido adiposo foram considerados satisfatórios, superando inclusive o preconizado como ideal por Gengozian (2000) para a implantação (“pega”) do enxerto (2×10^6).

O grupo tratado com a FVE foi o único a apresentar diferença estatística significativa na planimetria ($p < .0001$), logo na primeira semana do período de avaliação, mesmo com uma quantidade total de células mononucleares aplicadas e uma viabilidade mais baixa quando comparada com a FTCM. Além disso, o grupo tratado com a FVE apresentou cicatrização completa de suas feridas aos 18 dias de pós-operatório em média, enquanto que a cicatrização das feridas do grupo que recebeu FTCM ocorreu em média, aos 19 dias. Isto pode ser explicado, segundo Strem et al. (2005) pelo fato do tecido adiposo conter de 100 a 1000 vezes mais células pluripotentes em um centímetro cúbico do que a medula.

A medula óssea apresenta duas populações de células-tronco, as hematopoéticas (HSCs), que dão origem a toda a linhagem de células do sangue e as mesenquimais (MSCs), precursoras das células da linhagem não hematopoética, originando tecidos compostos por diferentes tipos celulares, como a pele (REHEN; PAULSEN, 2007). As MSCs, porém, são uma população celular rara na medula óssea, representando entre 0,001 a 0,01% das células nucleadas (WU et al., 2007).

Ainda assim, neste trabalho percebeu-se que os animais que receberam a FTCM em suas feridas, tiveram desempenho bastante próximo dos animais do grupo da FVE, no que diz respeito à velocidade de reepitelização e a qualidade do tecido cicatricial da pele, um tecido de origem mesenquimal. A explicação para isto é dada por alguns estudos que sugerem que as células-tronco hematopoéticas poderiam também dar origem a células da linhagem não sangüínea (ORLIC et al., 2001).

A escolha da via local para administração das frações foi determinada pelo fato de que em alguns casos, a aplicação sistêmica de MSCs promoveu a deposição destas células no pulmão, causando fibrose e dificuldade respiratória em alguns animais (NARDI; MEIRELLES, 2006). Gao et al (2001) observaram através da infusão sistêmica de MSCs em ratos, que o diâmetro destas células era maior que o dos capilares do pulmão, 20-24 μm e 10-15 μm , respectivamente, por este motivo, o trânsito das células era interrompido quando estas estavam passando pelo pulmão.

Na avaliação histopatológica pode-se perceber que os coelhos tratados com a FTCM e a FVE não apresentaram dermatite intersticial granulomatosa (DIG), o que é benéfico para a cicatrização da ferida cirúrgica. Da mesma maneira, os animais tratados com as frações, não apresentaram calcificação. A calcificação patológica é caracterizada pela deposição de sais de cálcio nos tecidos, sendo que a calcificação patológica distrófica ocorre em tecidos previamente lesados em que há liberação de radicais ácidos, geralmente em lesões crônicas que causam destruição tecidual, podendo apresentar conseqüências desastrosas quando ocorrem em sistemas como o cardiovascular, por exemplo (COELHO, 2002).

Nota-se a presença de um número expressivo de amostras não representativas na avaliação histopatológica. Sugere-se que os fragmentos de pele colhidos nas biópsias tenham sido comprometidos devido às condições de armazenagem das amostras, enquanto aguardavam encaminhamento para preparo das lâminas, principalmente devido ao forte calor presente na região, na época do ano em que o experimento foi realizado.

Os grupos tratados com a FTCM ou a FVE foram eficientes com relação à cicatrização da pele, no entanto, os mecanismos pelos quais as MSCs presentes nestas frações poderiam contribuir para o reparo ou a regeneração de um tecido lesado não são ainda totalmente esclarecidos, conforme relataram Templin et al. (2009). Nardi (2008) citou a transdiferenciação, a fusão com outras células ou a liberação de fatores através de um mecanismo parácrino como possíveis mecanismos. MSCs da medula óssea exibem um efeito parácrino em conjunto com citocinas no reparo da pele, tornando este mecanismo mais provável (WU et al., 2007).

A distribuição exata das MSCs também gera incertezas. Poderia haver reservas independentes de células-tronco em diversos órgãos ou tecidos adultos, a existência de apenas um reservatório em local específico; ou ainda poderiam ser populações celulares aderidas aos vasos sanguíneos e presentes, portanto, em todo o organismo (NARDI; MEIRELLES, 2006).

Zannettino et al. (2008) também sugeriram que as MSCs, incluindo as ADSCs, residam em nichos perivascularres, pois um número muito grande de ADSCs pode ser isolado da FVE do tecido adiposo, que mantém uma relação muito próxima com os vasos sanguíneos. Lin et al. (2008) corroboraram ao afirmar que, devido a vasculatura do tecido adiposo, as ADSCs representariam ser células-tronco vasculares em vários estágios de diferenciação, não excluindo a possibilidade das ADSCs serem, na verdade, os perícitos. Portanto, o fato do tecido adiposo conter uma grande quantidade de vasos sanguíneos e por consequência um maior número de MSCs, pode justificar o melhor desempenho do grupo tratado com a FVE.

O processo de cicatrização da pele ocorre em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (CLARK, 1996). Durante a fase inflamatória, o extravasamento sanguíneo libera, entre outros elementos, plasma e plaquetas, formando um tampão rico em fibrina (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). As plaquetas secretam diversos mediadores, incluindo o fator de crescimento de células endoteliais (VEFG), importante constituinte da matriz extracelular provisória (ARNOLD; WEST, 1991).

A expressão de VEGF na pele sadia é restrita a células endoteliais, mas fibroblastos e alguns poucos macrófagos expressam VEGF na cicatrização de uma ferida (KUMAR et al., 2009). Esta fase é iniciada imediatamente após o trauma e se estende por até 5 dias (HEDLUND, 2005). Neste momento poderia ocorrer a primeira contribuição efetiva da terapia celular, pois as células-tronco adultas não participariam de maneira benéfica do processo regulatório, somente como uma célula inflamatória no tratamento de feridas, mas também poderiam originar fibroblastos na pele, que aumentam a expressão da VEGF (WU et al., 2007).

Neste trabalho, o grupo D, tratado com a FVE, obteve melhor desempenho já aos 7 dias de pós-operatório, na fase proliferativa do processo de cicatrização, que geralmente se inicia 3 a 5 dias após o trauma (HEDLUND, 2005), apresentando diferença estatística significativa ($p < .0001$) na planimetria, em relação aos três outros grupos. De acordo com Singer; Clark (1999), nesta fase ocorrem eventos de extrema importância para o fechamento da lesão, a reepitelização, a fibroplasia e a angiogênese. A estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos pelo TGF- α e EGF promove o início da fase de proliferação epitelial e a formação do tecido de granulação (FRADE, 2003). Em seu trabalho, Fuchs (2008) comentou sobre estudos recentes que sugerem que as células-tronco adultas epiteliais poderiam se diferenciar em queratinócitos. Da mesma maneira, MSCs de outros sítios, como as presentes na FVE, também poderiam contribuir para a regeneração da epiderme, se diferenciando em queratinócitos (SASAKI et al., 2008).

Ainda na fase proliferativa, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos preexistentes, conhecido como angiogênese, representando uma importante etapa na cicatrização (FOLKMAN et al., 1992). No tecido que necessita ser reparado, ocorre estimulação da angiogênese através do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e outros fatores produzidos na ferida (BROWN et al, 2002). Os efeitos endoteliais do VEGF são mediados por dois receptores, VEGF-R1 e VEGF-R2, expressos nas células endoteliais (KUMAR et al., 2009). Orlic et al. (2001) citaram que as células-tronco adultas poderiam dar origem a células endoteliais, que expressam VEGF-R1 e VEGF-R2 contribuindo para a angiogênese.

A maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparece durante a maturação da ferida, na fase de remodelagem, entretanto, caso persistam, poderá ocorrer a formação de cicatrizes hipertróficas ou quelóides (ARNOLD; WEST, 1991). As citocinas envolvidas nessa fase, como fator de necrose tumoral, interleucina, entre outras, são produzidas pelos fibroblastos e auxiliam na limpeza do leito da ferida (KARUKONDA et al., 2000).

A fase de remodelagem, iniciada 17 a 21 dias após a lesão (HEDLUND, 2005), apresentou diferença estatística significativa ($p < .0001$) na planimetria dos grupos tratados B, C e D quando comparados com o grupo A. Nesta última fase ocorreu

a cicatrização completa das feridas tratadas com a membrana, aos 20 dias, com a FTCM aos 19 dias e com a FVE aos 18 dias, enquanto que o grupo controle apresentou cicatrização somente aos 25 dias. Segundo relataram Karukonda et al. (2000), células-tronco adultas juntas com outros tipos celulares poderiam contribuir com a produção de fibroblastos na pele, elevando a produção de citocinas e desta maneira permitindo que o reparo cutâneo apresente uma cicatriz mais estética, em menor tempo.

No tratamento de feridas, Mendonça; Coutinho-Netto (2009) citaram que os objetivos principais consistem no rápido fechamento da lesão e a obtenção de uma cicatriz funcional e esteticamente satisfatória, além da redução nos custos dos tratamentos. Portanto, o uso da terapia celular com células-tronco adultas poderia contribuir com estes objetivos sendo que, um dos mais interessantes tipos de células-tronco adultas para se trabalhar com terapia celular são as células-tronco mesenquimais (MSCs), presentes na FTCM e na FVE. Essas células são mais facilmente isoladas, com a vantagem de poderem ser cultivadas e manipuladas, além de exibirem uma grande plasticidade (NARDI; MEIRELLES, 2006).

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o experimento e com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- 1 – o modelo de lesão proposto apresentou-se eficiente, de rápida e fácil execução.
- 2 – as técnicas de colheita da medula óssea ou do tecido adiposo foram eficazes e proporcionaram a obtenção de botões celulares com quantidade de células e viabilidade aceitáveis.
- 3 – a membrana celulósica utilizada como *scaffold* sobre a lesão acelerou o processo de cicatrização, apresentando diferença estatística ($p < .0001$) na avaliação da planimetria aos 21 dias de pós-operatório, quando comparado com o grupo controle.
- 4 – tanto a aplicação local da FTGM autógena da medula óssea quanto a da FVE autógena do tecido adiposo aceleraram o tempo de reparação cutânea, com destaque para esta última, que apresentou diferença estatística significativa ($p < .0001$) na planimetria, já aos 7 dias de pós-operatório, com cicatrização completa das feridas, em média, aos 18 dias de pós-operatório.
- 5 – sugerem-se novos estudos, especialmente com cultivo celular, sobre o reparo da pele.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, K.A. et al. Fração vascular estromal de tecido adiposo: como obter células-tronco e seu rendimento de acordo com a topografia das áreas doadoras: nota prévia. **Cirurgia plástica iberolatinoamericana**, Madrid, v. 34, n. 1, 2008.

ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, p. 11830-11835, 2003.

ALTOMARE, M. et al. Ultrasound accelerates healing of normal wounds but not of ischemic ones. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 17, p. 825-831, July 2009.

ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Therapy**, v. 52, p. 407-422, 1991.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 568-584, 2004.

BAO, L. et al. Agar/collagen membrane as skin dressing for wounds. **Biomedical Materials**, Guangzhou, 2008.

BROWN, N.J. et al. Angiogenesis induction and regression in human surgical wounds. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 10, p. 245-251, 2002.

BURKE, J.F. et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of Surgery**, Madison, v. 194, n. 4, p. 413-428, 1981.

CLARK, R.A. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996.

COELHO, H.E. Patologia geral: alterações regressivas. In: _____. **Patologia Veterinária**. 1. ed. Barueri: Manole, 2002. cap. 4, p. 13-33.

COLOMÉ, L.M. **Avaliação do envolvimento das células-tronco autólogas de medula óssea em associação com a técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração de nervo tibial de coelhos.** 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

DEROSSI, R. et al. Effects of platelet-rich plasma gel on skin healing in surgical wound in horses. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 276-281, July/Aug. 2009.

FATHKE, C. et al. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. **Stem Cells**, Malden, v. 22, p. 812-822, 2004.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. et al. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, Davis, v. 34, p. 415-423, 2005.

FOWLER, D. Distal limb and paw injuries. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Maryland, v. 36, p. 819-845, July 2006.

FRADE, M.A. **Úlcera de perna: caracterização clínica e perfil imunohistopatológico do reparo tecidual na presença da biomembrana de látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*.** Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2003.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 180, n. 2, p. 273-284, Jan. 2008.

GAO, J. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, Atlanta, v. 169, p. 12-20, 2001.

GARTNER, L.; HIATT, J. Tegumento. In: _____. **Tratado de histologia em cores.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 14, p. 265-279.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hematopoietic progenitors. In: FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 16, p. 91-96.

GIMBLE, J.M.; KATZ, A.J.; BUNNELL, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Journal of the American Heart Association**, Dallas, v. 100, p. 1249-1260, 2007.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I.R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, p. 27-35, 2007.

GOMES, C. **Avaliação da cicatrização óssea em falha mandibular com auto-enxerto ósseo associado a suspensão celular de medula óssea autógena: estudo experimental**. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GOWDAK, L.H.W. et al. Análise crítica da utilização de células-tronco no tratamento da insuficiência cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 179-185, 2004.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T.W. (Org.). **Cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 135-230.

_____. Large trunk wounds. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 36, p. 847-872, July 2006.

HOUSMAN, T.S. et al. The safety of liposuction: results of a national survey. **Dermatologic Surgery**, Metairie, v. 28, p. 971-978, 2002.

JI, K.H. et al. Rat marrow-derived multipotent adult progenitor cells differentiate into skin epidermal cells *in vivo*. **The Journal of Dermatology**, Tokyo, v. 36, p. 403-409, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 6, p. 360-370.

KARUKONDA, S.R. et al. The effects of drugs on wound healing – part II. Specific classes of drugs and their effect on healing wounds. **International journal of dermatology**, Rochester, v. 39, p. 321-333, 2000.

KATAOKA, K. et al. Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. **The American Journal Pathology**, Rockville Pike, v. 163, p. 1227-1231, 2003.

KATZ, A.J. et al. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. **Clinical Plastic Surgery**, v. 26, p. 587-603, 1999.

KIM, H.S. et al. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. **Journal Korean Medical Sciences**, Seoul, v. 24, p. 368-374, July 2008.

KUMAR, I. et al. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and its receptors in human surgical wounds. **British Journal of Surgery**, Edinburgh, v. 96, p. 1484-1491, 2009.

LEE, W.R. et al. The biological effects of topical alginate treatment in an animal model of skin wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 17, p. 505-510, Feb. 2009.

LIN, G. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. **Stem Cells and Development**, Detroit, v. 17, p. 1053-1064, 2008.

MARTIN, J.W. The multiple faces of nicotine and its implications in tissue and wound repair. **Experimental Dermatology**, Münster, v. 18, p. 497-505, Jan. 2009.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213.

MENDOÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MOGFORD, J.E. et al. Fibrin sealant combined with fibroblasts and platelet-derived growth factor enhance wound healing in excisional wounds. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 17, p. 405-410, Jan. 2009.

MOSELEY, T.A.; ZHU, M.; HEDRICK, M.H. et al. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Dallas, v. 118, p. 121-128, 2006. Suppl.

NARDI, N.B. **Células-tronco mesenquimais**: aplicações terapêuticas. In: CURSO DE CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 1 CD-ROM.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, Berlin, v. 174, p. 249-282, 2006.

NAKAGE, A.P.; SANTANA, A.E. Células-tronco hematopoéticas em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

OLSSON, D.C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na lesão iatrogênica aguda de tendão calcâneo de cães**. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-705, 2001.

PARK, B.S. et al. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. **American Society for Dermatologic Surgery**, Rolling Meadows, v. 34, n. 10, p. 1323-1326, 2008.

PAVLETIC, M.M. Técnicas de enxertadura cutânea. In: BOJRAB, M.J. **Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. p. 431-447.

PEACOCK, E.E.; VAN WINKLE, W. Repair of skin wounds. In: _____. **Wound Repair**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1976. p. 204-270.

POPE, E.R. Cicatrização da pele. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. p. 178-183.

_____. Head and facial wounds in dogs and cats. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Maryland, v. 36, p. 793-817, July 2006.

REHEN, S.; PAULSEN, B. **Células-tronco: o que são? Para que servem?** Rio de Janeiro: Vieira e Lent, 2007. 90 p.

ROSA, M.G.S.; PIPPI, N.L.; CASTRO, M.A.S. Transplante de pele pela técnica de sementeira em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 13, n. 2-3, p. 203-209, 1983.

SALBEGO, F.Z. **Enxerto ou implante homólogo na correção de defeito ósseo segmentar em cães associado à inoculação da fração de células mononucleares da medula óssea.** 2010. 211 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **The Journal of Immunology**, Rockville Pike, v. 180, p. 2581-2587, 2008.

SEITZ, I.A. et al. Omental free-tissue transfer for coverage of complex upper extremity and hand defects – the forgotten flap. **American Association for Hand Surgery**, New York, v. 4, p. 397-405, Mar. 2009.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 341, p. 738-746, 1999.

STEVENS, A.; LOWE, J. Pele e glândula mamária. In: _____. **Histologia**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1995. cap. 19, p. 348-363.

STREM, B.M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio Journal Medicine**, Tokyo, v. 54, p. 132, 2005.

TAMAI, T. et al. Novel hidroxyapatite cerâmicas with in interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction in vivo. **Journal Biomedical Materials Research**, Hoboken, n. 59, p. 110-117, 2002.

TEMPLIN, C. et al. Ex vivo expanded haematopoietic progenitor cells improve dermal wound healing by paracrine mechanisms. **Experimental Dermatology**, Münster, v. 18, p. 445-453, 2009.

TOGNOLI, G.K. et al. **Autotransplante da fração mononuclear da medula óssea em úlcera corneana por hidróxido de sódio experimental em cães**. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

TOMITA, L.A. Uso da matriz de regeneração dérmica no tratamento cirúrgico de queimaduras em crianças. 2005. 49 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

VERSTAPPEN, J. et al. A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 17, p. 296-305, 2009.

VILAS-BOAS, F. et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chaga's disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Salvador, v. 82, n. 2, p. 185-187, 2004.

WELSH, K.; MALE, D. Transplante e rejeição. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 24.1-10.

WILLIAMS, K.J. et al. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. **Cells Tissues Organs**, Atlanta, v. 188, p. 251-258, 2008.

WOLFRAM, D. et al. Hypertrophic scars and keloids – a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management. **Dermatologic Surgery**, Metairie, n. 35, p. 171-181, 2009.

WU, Y. et al. Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. **Wound Repair and Regeneration**, Pittsburgh, v. 15, p. s18-s26, 2007.

ZANNETTINO, A.C. et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **Journal Cell Physiology**, Hoboken, v. 214, p. 413-421, 2008.

ZUK, P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, 2001.

_____. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Berkeley, v. 13, p. 4279-4295, 2002.