

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

**CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS
INDIFERENCIADAS ALOGÊNICAS, ULTRASSOM
TERAPÊUTICO OU LASER, NO TRATAMENTO DE
FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Maurício Borges da Rosa

Santa Maria, RS, Brasil

2012

CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS ALOGÊNICAS, ULTRASSOM TERAPÊUTICO OU LASER NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS

Por

Maurício Borges da Rosa

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
2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Borges da Rosa, Maurício

Células Estromais Mesemquimais Indiferenciadas
Alogênicas, Ultrassom terapêutico ou Laser, no
Tratamento de Feridas Cutâneas de Coelhos / Maurício
Borges da Rosa.-2012.

59 p.; 30cm

Orientador: Ney Luis Pippi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2012

1. Células-tronco 2. Cicatrização 3. Pele 4.
Planimetria 5. Reparo I. Pippi, Ney Luis II. Título.

**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

**CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS
ALOGÊNICAS, ULTRASSOM TERAPÊUTICO OU LASER NO
TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS**

elaborada por
Maurício Borges da Rosa
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Ney Luis Pippi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Alexandre Krause (UFSM)

Josaine Rappeti Pedrozo (UFPeI)

Santa Maria, 08 de Outubro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me apoiou na minha escolha profissional, em especial aos meus pais que muitas vezes abdicaram de suas necessidades em prol das minhas e de meus irmãos, sempre nos estimulando a seguir em frente nos nossos estudos. À Raquel, que há sete anos, também é minha família, sem ela isso certamente não seria possível.

Ao meu orientador professor Ney Luis Pippi que me deu a oportunidade de ingressar no Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE), como bolsista de iniciação científica, onde descobri o gosto pela cirurgia. E aqui estou, hoje, terminando o mestrado.

A todos os demais professores do programa, em especial os do LACE, com os quais sempre pude contar para sanar minhas dúvidas, todos exemplos de Médicos Veterinários para mim. Obrigado ao professor Alexandre Mazzanti, que enquanto vice-diretor do Hospital Veterinário me permitiu participar da rotina clínica-cirúrgica do hospital, o que foi fundamental para minha formação como cirurgião.

Ao Joel Henrique, histologista da UNISC pela execução das lâminas histológicas, e a professora Dominguita pela interpretação delas.

Aos meus amigos, pelas descontrações nas horas de folga, ao Diego também pela ajuda na estatística e à Ana pela ajuda no Inglês. Também a todos os colegas de pós-graduação e funcionários do LACE, à Nelci que sempre ajudou e colocou ordem na casa dentro bloco cirúrgico e ao Vagner que em muitas vezes ajudou no tratamento e limpeza dos animais.

Agradeço também à equipe envolvida neste trabalho, um agradecimento especial aos estagiários, à Larissa pela ajuda com o laser e ultrassom e aos amigos Tiago, Saulo e Jaime, que junto comigo formaram o quarteto fantástico (Batizado pelo Tiago). Amigos que trabalharam tanto, ou mais do que eu para a execução deste trabalho.

Por fim, agradeço aos animais deste estudo. Tenho a certeza de que seu uso não foi em vão. Tenham todos meu eterno respeito e gratidão.

RESUMO

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

CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS INDIFERENCIADAS ALOGÊNICAS, ULTRASSOM TERAPÊUTICO OU LASER NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE COELHOS

AUTOR: MAURÍCIO BORGES DA ROSA

ORIENTADOR: NEY LUIS PIPPI

Data e local da defesa: Santa Maria, 08 de Outubro de 2012

A pele faz a proteção, termorregulação e controle da perda de água do corpo. Quando há lesão de continuidade neste tecido qualquer que seja o tipo de trauma pode alterar suas funções. O processo de cicatrização depende de alguns fatores como: local e tamanho da lesão, idade e condições sistêmicas do paciente bem como da técnica cirúrgica empregada para sua correção. As tentativas de intervir na cicatrização remontam à antiguidade, quando já se reconhecia a importância de proteger as feridas para evitar complicações neste processo. Alguns recursos são usados como adjuvantes no processo cicatricial a fim de se obter melhor resultado. Os objetivos foram avaliar a cicatrização das feridas temporal e histologicamente. Para a realização deste experimento, foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de cinco animais cada, nos quais foi realizada uma ferida cutânea de 4cm² de área. No grupo A os animais não receberam nenhum tipo de tratamento, o grupo B foi tratado com transplante autógeno de células-tronco mesenquimais, o grupo C foi tratado com aplicação local de ultrassom terapêutico; e o grupo D foi aplicado laser no local. As feridas foram avaliadas aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório pela medida da área e biópsia. Ao final do estudo foi possível observar diferença estatística do grupo tratado com células no processo de cicatrização entre os grupos.

Palavras-chave: células tronco, cicatrização, pele, planimetria, reparo.

ABSTRACT

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

UNDIFFERENTIATED ALLOGENEIC MESENCHYMAL STROMAL CELLS, ULTRASOUND THERAPEUTIC OR LASER IN WOUND CARE SKIN OF RABBITS

AUTHOR: MAURÍCIO BORGES DA ROSA
ADVISOR: NEY LUIS PIPPI

Date and place of defense: Santa Maria, 08 October 2012

The skin is the protection, thermoregulation, and control of water loss from the body. When there is continuity injury in this tissue, any kind of trauma can alter its functions. The healing process depends on factors such as location and size of the lesion, age and systemic conditions of the patient and the surgical technique used to repair it. Attempts to intervene in healing dates back to antiquity, when it was already recognized the importance of protecting the wounds to avoid complications in the process. Some resources are used as adjuvants in the healing process in order to obtain better results. For this experiment, we used 20 New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The animals were randomly divided into four groups of five animals each, in which we performed a skin wound 4cm². In group A, animals received no treatment, group B was treated with transplantation of autologous mesenchymal stem cells, group C was treated with local application of therapeutic ultrasound, and group D laser was applied on site. The wounds were assessed at 7, 14 and 21 days postoperatively by measuring the area and biopsy. At the end of the study it was observed a statistical difference the group treated with cells in the healing process between groups.

Keywords: stem cells, wound healing, skin, planimetry, repair.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Planimetria de feridas induzidas em coelhos, submetidos a diferentes tratamentos e avaliados em quatro momentos. A – controle não tratado; B – tratado com células estromais mesenquimais indiferenciadas; C – tratado com ultrassom terapêutico; D – tratado com laser.....	40
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Organograma demonstrando a separação dos vinte animais nos quatro grupos experimentais deste trabalho.....	28
FIGURA 2 – A – coleta do tecido adiposo; B – sutura em pontos de Wolf; C – pesagem e armazenamento em recipiente contendo solução de Hanks.....	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.....	32
FIGURA 4 – A – demarcação da área com auxílio do molde plástico; B – visualização da área, caudal à última costela direita (seta vermelha); C – incisão da pele demarcada; D – ferida pronta.....	34
FIGURA 5 – A – aplicação das CMI's no tecido subcutâneo; B – aplicação de ultrassom no leito da ferida; C – aplicação de laser no leito da ferida.....	35
FIGURA 6 – A – medida da altura da ferida (dorso-ventral); B – medida da largura da ferida (crânio- caudal).....	37

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Alterações observadas na histopatologia.....	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS:

ADSC: adipose-derived stem cell

cm: centímetros

CM: células mononucleares

CT: células-tronco

CTM: célula-tronco mesenquimal

CEMI: célula estromal mesenquimal indiferenciada

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FVE: fração vascular estromal

HVU: Hospital Veterinário Universitário

LACE: Laboratório de Cirurgia Experimental

MSC: mesenquimal stem cell

mg.kg-1: miligramas por quilograma

mL.kg.h-1: mililitros por quilograma por hora

nm: nanômetros

RPM: rotações por minuto

SFB: soro fetal bovino

TA: tecido adiposo

TLBI: terapia a laser de baixa intensidade

UFSM: Universidade Federal de Santa Maria

UST: Ultrassom Terapêutico

US: Ultrassom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Pele.....	17
2.2 Feridas.....	18
2.3 Cicatrização.....	20
2.4 Células tronco mesenquimais.....	22
2.5 Ultrassom terapêutico.....	24
2.6 Laser.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais.....	27
3.2 Animais.....	27
3.3 Separação dos animais.....	27
3.4 Fase pré-cirúrgica e protocolo anestésico.....	29
3.5 Células tronco mesenquimais (CTM).....	30
3.5.1 Coleta do tecido adiposo (TA).....	30
3.5.2 Processamento do TA para obtenção de Células-tronco Mesenquimais (CTM).....	21
3.6 Procedimento cirúrgico para criação do defeito.....	33
3.7 Tratamentos.....	34
3.8 Cuidados pós-cirúrgicos.....	36
3.9 Avaliações.....	36
3.9.1 Avaliação clínica.....	36
3.9.2 Avaliação fotográfica e planimetria.....	36
3.9.3 Avaliação histológica.....	37
3.9.4 Avaliação estatística.....	38
4. RESULTADOS.....	39

4.1 Modelo de lesão cutânea e protocolo anestésico.....	39
4.2 Coleta e isolamento das CEMI.....	39
4.3 Avaliação fotográfica e planimetria.....	39
4.4 Avaliação estatística.....	40
4.5 Avaliação histopatológica.....	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

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 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).

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou em menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (CESARETTI, 1998) 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.

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.

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.

A cicatrização depende de vários fatores, locais e gerais, como: localização anatômica, tipo da pele, raça, técnica cirúrgica utilizada, suporte nutricional, oxigenação tecidual, infecção, necrose, tamanho da ferida, idade do paciente e imunossupressão. Além disso, a cicatrização em uma mesma espécie varia se a ferida ocorre no feto, no recém-nascido ou no indivíduo adulto (JULÍA et al., 1992; HESS, 2002).

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos, remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente. (MANDELBAUM, et al 2003.)

Os recursos tecnológicos disponíveis vêm aumentando desde então, e hoje dispomos de uma gama enorme de adjuvantes do processo cicatricial, alguns deles são células tronco mesenquimais, ultrassom e laser.

Meirelles et al. (2006) afirmam 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, fluido 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).

A fração originária do tecido adiposo apresenta uma população de células heterogêneas, incluindo células sanguíneas 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 do tecido adiposo (ADSCs), podem ser usadas clinicamente para terapia celular regenerativa, quando são obtidas em quantidades suficientes (MOSELEY et al., 2006) e são mais facilmente processadas a partir da gordura lipoaspirada (ZUK et al., 2002).

Para o tratamento de lesões, a utilização de terapias alternativas não invasivas na aceleração da cicatrização têm se mostrado de fundamental importância para o estímulo da preservação das funções fisiológicas, da estrutura celular e para a melhora na qualidade do tecido neoformado (YAMADA, 2003). Dentre os tratamentos não-invasivos, a energia ultrassônica é um dos procedimentos físicos adjuvantes mais utilizados em fisioterapia e medicina regenerativa para o tratamento de diversas doenças.

Seus efeitos terapêuticos têm se mostrado benéficos no tratamento de uma grande variedade de condições, como cicatrização de úlceras (DYSON; SUCKLING, 1978), estímulo à neovascularização em tecidos isquêmicos (HOGAN et al., 1982), integração de enxertos de pele total (AMANCIO et al., 2006) e também na cicatrização tendinosa (SILVEIRA, 2003). O ultrassom terapêutico (UST) induz mudanças fisiológicas como ativação de fibroblasto, colágeno e diminuição de células inflamatórias por aceleração do metabolismo celular (OLSSON et al., 2006) e, quando aplicado de maneira adequada, pode reduzir a dor (STEISS; ADAMS, 1999).

O laser apresenta propriedades físicas da luz como absorção, reflexão, transmissão ou refração. Para a laserterapia, a propriedade mais importante é a absorção, pois a terapia só terá efeito se a luz for absorvida pelo tecido (ALMEIDA-LOPES, 1998). Os efeitos que a laserterapia proporcionam

no local de absorção e adjacências são os efeitos primários, que resultam em estímulo microcirculatório e trofismo celular (PAIM et al., 2002). CRUAÑES (1984) comentou que após aplicação do laser, sua energia transforma-se um efeito biológico. SILVEIRA et al. (2009) afirmaram que o laser estimula a atividade antioxidante e protege a célula contra danos oxidativos durante a cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Pela estimulação do metabolismo e a multiplicação celular o laser apresenta grande potencial na aceleração do reparo tecidual. No caso de feridas, há aumento na proliferação de fibroblastos, conseqüentemente aumenta a deposição de colágeno e desencadeia a formação de uma cicatriz mais elástica e resistente à tensão (MIKAIL, 2006).

Neste trabalho, será discutida a viabilidade clínica e a eficácia da terapia celular, através do uso das células estromais mesenquimais indiferenciadas, provenientes do tecido adiposo, ultrassom terapêutico e laser para o tratamento de lesões cutâneas induzidas experimentalmente em coelhos. Desta maneira, tem-se como objetivos:

- 1) avaliar o modelo de lesão proposto; avaliar a técnica de colheita e processamento do tecido adiposo em coelhos;
- 2) avaliar o cultivo celular de células derivadas do tecido adiposo de coelhos;
- 3) comparar a reparação cutânea com e sem os adjuvantes: células, ultrassom e laser, avaliando o tempo de cicatrização e a qualidade cicatricial das feridas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pele

A pele é o primeiro contato que o corpo possui com o meio exterior. (ROSS; ROMRELL, 1993). 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 composta 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 morfológicamente 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).

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 as 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

Uma ferida é representada pela interrupção da continuidade de um tecido corpóreo, em maior ou menor extensão, causada por qualquer tipo de trauma físico, químico, mecânico ou desencadeada por uma afecção clínica, que aciona as frentes de defesa orgânica para o contra ataque (CESARETTI, 1998) 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 apresenta 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 frequente 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, à 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).

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).

2.3 Cicatrização

O reparo tecidual é um estado dinâmico que compreende diferentes processos, entre eles, inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular, como colágeno, elastina e fibras reticulares (THOMAS et al., 1995). A síntese de colágeno é processo rápido e harmônico que tem seu início com a lesão intersticial e se estende até o final da fase de cicatrização, quando ocorre a remodelação dos tecidos (ROCHKIND et al., 1989).

A cicatrização depende de vários fatores, locais e gerais, como: localização anatômica, tipo da pele, raça, técnica cirúrgica utilizada, suporte nutricional, oxigenação tecidual, infecção, necrose, tamanho da ferida, idade do paciente e imunossupressão. Além disso, a cicatrização em uma mesma

espécie varia se a ferida ocorre no feto, no recém-nascido ou no indivíduo adulto (JULÍA et al., 1992; HESS, 2002).

Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação. (ORTONNE & CLÉVY 1994). Outros autores classificam de uma forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação; inflamação; proliferação; contração da ferida; remodelação (FAZIO et al., 2000). Em um determinado período de tempo as fases coincidem e acontecem simultaneamente, permitindo, assim, o sucesso da cicatrização (ABLA & ISHIZUKA 1995; SANTOS 2000).

O processo de reparação tissular compreende dois mecanismos de restauração dos tecidos: a regeneração e a cicatrização (ABLA & ISHIZUKA 1995; SANTOS 2000).

A regeneração ocorre com reposição tissular "original". O trauma inicial gera uma resposta inflamatória aguda, manifesta através de edema e formação de exsudato seroso, rico em leucócitos, que cessa em menos de 24 horas. As células epidérmicas, das margens da ferida e das invaginações epidérmicas dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas e sebáceas começam a proliferar e migrar no leito da ferida, ocluindo rapidamente sua superfície (ABLA & ISHIZUKA, 1995; SANTOS, 2000).

O processo de cicatrização ou reparo das feridas é composto de uma série de estágios complexos, interdependentes e simultâneos, que são descritos em fases, que resultarão ao final em uma cicatriz, um tecido não idêntico ao original (SANTOS, 2000; CESARETTI, 1998).

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou provocadas intencionalmente como parte da realização de procedimentos, remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de protegê-las de forma a evitar que se complicassem e repercutissem em danos locais ou gerais para o paciente. (MANDELBAUM, et al 2003).

Os registros mais antigos sobre manuscritos egípcios que datam de 3000-2500 a.C, mencionam curativos à base de mel, graxa, fios de linho e

diversos tipos de excrementos, que faziam parte dos princípios da farmacopéia egípcia. Hipócrates, que lançou as bases da medicina científica, recomendava que as feridas fossem mantidas limpas e secas, e preconizava sua limpeza com água morna, vinho e vinagre. A partir do século XIX, durante a Guerra da Criméia, foram criados vários tipos de curativos, à base de fibras de linho, que, sendo reutilizadas várias vezes, se tornavam gradativamente mais macias, mas eram pouco absorventes (MANDELBAUM, 2003).

Os recursos tecnológicos disponíveis vêm aumentando desde então, e hoje dispomos de uma gama enorme de adjuvantes do processo cicatricial, alguns deles são células tronco mesenquimais, ultrassom e laser.

2.4 Células-tronco mesenquimais (CTM)

A terapia com células-tronco tem recebido uma atenção significativa na atualidade, devido à ideia 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 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, fluido 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).

A fração originária do tecido adiposo apresenta uma população de células heterogêneas, incluindo células sanguíneas 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 do tecido adiposo (ADSCs), podem ser usadas clinicamente para terapia celular regenerativa, quando são obtidas em quantidades suficientes (MOSELEY et al., 2006) e 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 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.

2.5 Ultrassom Terapêutico (UST)

Para o tratamento de lesões, a utilização de terapias alternativas não invasivas na aceleração da cicatrização tem se mostrado de fundamental importância para o estímulo da preservação das funções fisiológicas, da estrutura celular e para a melhora na qualidade do tecido neoformado (YAMADA, 2003). Dentre os tratamentos não-invasivos, a energia ultrassônica é um dos procedimentos físicos adjuvantes mais utilizados em fisioterapia e medicina regenerativa para o tratamento de diversas doenças.

Seus efeitos terapêuticos têm se mostrado benéficos no tratamento de uma grande variedade de condições, como cicatrização de úlceras (DYSON; SUCKLING, 1978), estímulo à neovascularização em tecidos isquêmicos (HOGAN et al., 1982), integração de enxertos de pele total (AMANCIO et al., 2006) e também na cicatrização tendinosa (SILVEIRA, 2003). O ultrassom terapêutico (UST) induz mudanças fisiológicas como ativação de fibroblasto, colágeno e diminuição de células inflamatórias por aceleração do metabolismo celular (OLSSON et al., 2006) e, quando aplicado de maneira adequada, pode reduzir a dor (STEISS; ADAMS, 1999).

O ultrassom (US) é uma modalidade de energia sonora longitudinal, de penetração superficial e profunda, que, ao ser transmitido aos tecidos biológicos, é capaz de produzir alterações celulares por efeitos mecânicos. A transmissão ocorre pelas vibrações das moléculas do meio através do qual a onda se propaga. Este meio irradiado oscila ritmicamente com a frequência do

gerador ultrassônico por efeito piezoelétrico, ao comprimir e expandir a matéria (GUIRRO et al., 1995; ARNAULD-TAYLOR, 1999).

Apesar das controvérsias existentes sobre a aceleração da cicatrização (DYSON, 1990), o UST tem sido usado com muita frequência há mais de 40 anos para o tratamento de distúrbios musculoesqueléticos como tendinites, sinovites, tenosinovites, epicondilites, bursites e osteoartrites (KLAIMAN et al., 1998). Porém, revisões sistemáticas têm repetidamente concluído que não há evidências suficientes para suportar os benefícios dos efeitos do UST nas doses frequentemente utilizadas nas clínicas (WARDEN, 2003).

A ação do UST sobre os tecidos depende grandemente da intensidade empregada, e por isso a calibração inadequada pode levar à ineficiência do tratamento ou a produção de novas lesões (GUIRRO; SANTOS, 1997). Experimentos demonstraram que a interação do UST com os tecidos biológicos pode ser benéfica mesmo em processos cicatriciais tardios, melhorando as propriedades mecânicas dos tecidos; porém, se os efeitos acústicos forem mantidos sobre a estrutura tecidual por tempo prolongado, podem provocar desagregação das estruturas e retardo da cicatrização (MAXWELL, 1995).

A terapia pode agir como um estímulo para as células envolvidas no processo de reparo, particularmente na fase inflamatória, no tempo de tratamento e na frequência de sessões (FERNANDES et al., 2003). Em intensidades terapêuticas, a energia mecânica não chega a lesar as membranas celulares, mas acelera o intercâmbio entre as células (RODRIGUES; GUIMARÃES, 1998).

2.6 Laser

O laser, amplificação da luz por emissão estimulada de radiação, originou-se da abreviação de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, cuja teoria é do físico Albert Einstein, que, em 1917, expôs os

princípios físicos da emissão estimulada (fenômeno laser), sendo este classificado como de “alta potência” (com potencial destrutivo) e em “baixa potência” (sem potencial destrutivo) (VINCK, et al., 2003).

Essa terapia foi utilizada primeiramente por Mester e colaboradores, que usaram o laser de argônio de 488 e 515nm. Subsequentemente foi introduzido o laser hélio-neon (HeNe), que emite luz vermelha com comprimento de onda de 632.8nm, mais recentemente usualmente substituído por um aparelho de preço mais reduzido, mais potente, o laser de diodo, com comprimento de onda de 660-950nm (LUCAS, et al., 2000).

Os tratamentos experimentais em pacientes iniciaram-se na década de 1970 após relatos de resultados positivos da irradiação com a terapia a laser de baixa intensidade (TLBI) em culturas de células e em experimentos animais. Estudos realizados foram insuficientes para confirmar os efeitos benéficos da TLBI (IUSIM, et al 1992; NUSSBAUM, et al., 1994).

O laser apresenta propriedades físicas da luz como absorção, reflexão, transmissão ou refração. Para a laserterapia, a propriedade mais importante é a absorção, pois a terapia só terá efeito se a luz for absorvida pelo tecido (ALMEIDA-LOPES, 1998). Os efeitos que a laserterapia proporcionam no local de absorção e adjacências são os efeitos primários, que resultam em estímulo microcirculatório e trofismo celular (PAIM et al., 2002). CRUAÑES (1984) comentou que após aplicação do laser, sua energia transforma-se um efeito biológico. SILVEIRA et al. (2009) afirmaram que o laser estimula a atividade antioxidante e protege a célula contra danos oxidativos durante a cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

Pela estimulação do metabolismo e a multiplicação celular o laser apresenta grande potencial na aceleração do reparo tecidual. No caso de feridas, há aumento na proliferação de fibroblastos, conseqüentemente aumenta o nível de colágeno e desencadeia a formação de uma cicatriz mais elástica e resistente a tensão (MIKAIL, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética em Pesquisas com Animais

Este estudo foi submetido à aprovação do Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria, seguindo os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), julgado e aprovado no processo número: 049/2011.

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 quatro meses e massa corporal média de 3,5 kg, provenientes do Biotério Central da UFSM. Os animais foram submetidos ao exame clínico completo para avaliar sua condição de saúde e assim foram classificados para o projeto ou devolvidos ao biotério.

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

3.3 Separação dos animais

Após a constatação de que os animais se apresentavam 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 da ferida cutânea (FIGURA 01).

Os grupos foram denominados conforme o seguinte delineamento:

Grupo A (controle): os animais deste grupo não receberam nenhum tipo de tratamento, permanecendo com a ferida cirúrgica aberta, sobre a qual foi realizada apenas a troca diária de curativo.

Grupo B (CTM): animais com a ferida cutânea que, ao término do procedimento cirúrgico, foram tratados com transplante alógeno de células mesenquimais indiferenciadas, previamente isoladas e cultivadas.

Grupo C (UST): animais com a ferida cutânea que foram tratados com aplicação local de ultrassom terapêutico.

Grupo D (*laser*): animais com a ferida cutânea que foi tratada com aplicação local de *laser*.

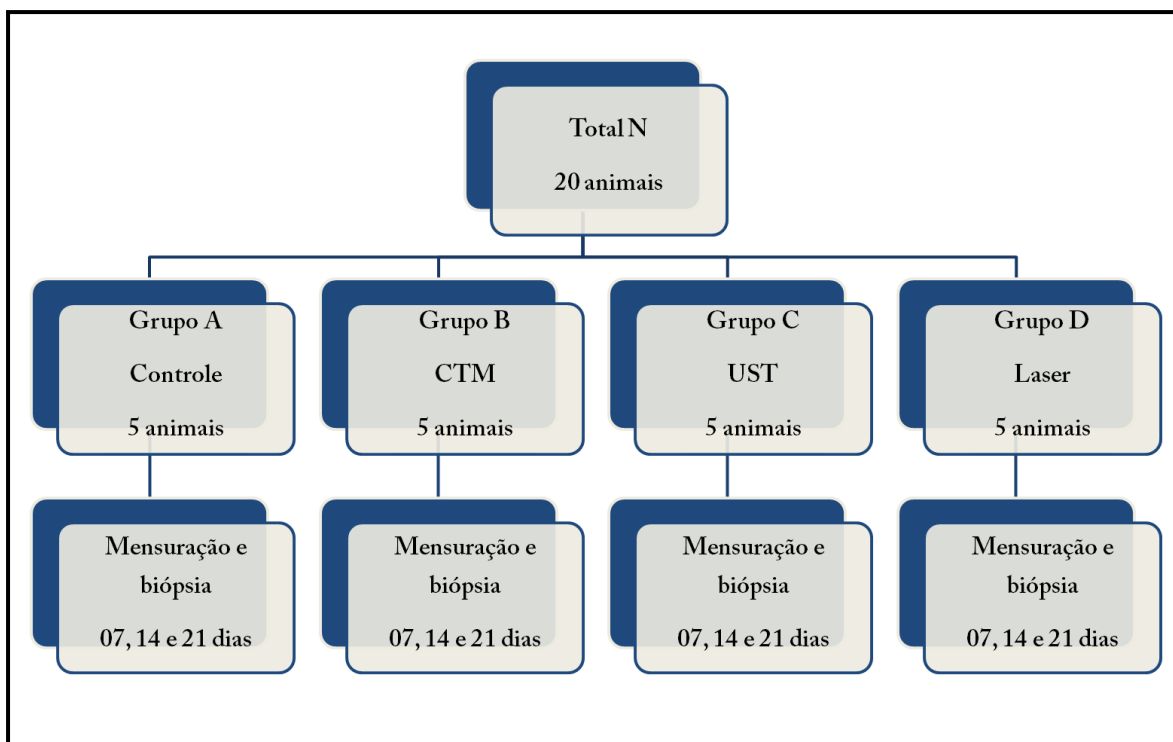


FIGURA 1 – Organograma demonstrando a separação dos vinte animais nos quatro grupos experimentais deste trabalho.

3.4 Fase pré-operatória e protocolo anestésico

No período que antecedeu ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla, da parede lombar, torácica e abdominal direita, para criação do defeito cutâneo, e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal. O animal, no qual foi colhido tecido adiposo para isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais, teve a face dorsal cervical tricotomizada. 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 cetamina¹ (30 mg kg⁻¹), maleato de midazolam² (3 mg kg⁻¹) e sulfato de morfina³ (5 mg kg⁻¹) por via intramuscular (IM). Feito isso, os animais foram encaminhados ao bloco cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental (LACE). Após foi realizada indução e manutenção anestésica com isoflurano⁴ 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 Lactato⁵, por meio de canulação da veia auricular caudal com cateter 24 G⁶, 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.

¹ Cetamina[®]. Univet S.A. São Paulo, SP

² Dormonid Injetável[®]. Roche Brasil. Jacarepaguá, RJ

³ Dimorf Injetável[®]. Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP

⁴ Isoflurane[®]. Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. Itapira, SP.

⁵ Ringer com Lactato de Sódio[®]. Aster Produtos Médicos Ltda. Sorocaba, SP.

⁶ Cateter Intravenoso Angiocath 24 G[®]. BD Brasil. São Paulo, SP.

3.5 Células-tronco mesenquimais (CTM)

3.5.1 Colheita do tecido adiposo (TA)

Foi utilizado um coelho macho, de aproximadamente 4 kg, oriundo do Biotério Central da UFSM. Após a tricotomia e a antissepsia ampla da região dorsal cervical, próximo às escápulas, o animal foi anestesiado conforme protocolo já descrito 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, foi obtido por meio de incisão na linha média dorsal do animal, na região interescapular.

O tecido adiposo foi identificado, divulsionado com pinças de Halsted e seccionado com tesoura de Metzemaum (FIGURA 02 A). Vasos sangrantes foram pinçados e ligados com fio absorvível sintético 3-0 (poliglactina 910)⁷. O espaço morto reduzido com este mesmo fio de sutura, em padrão contínuo simples e a dermorrafia realizada com fio inabsorvível sintético 4-0 (mononáilon)⁸, com pontos isolados de Wolff (FIGURA 02 B). Os pontos de pele foram removidos sete dias após o procedimento cirúrgico. O fragmento de TA contendo aproximadamente 10g, colhido foi imediatamente depositado em um recipiente de vidro, estéril, contendo 150 mL de solução de Hanks (FIGURA 02 C).

⁷ Vicryl®. Ethicon-Johnson. São José dos Campos, SP.

⁸ Mononylon®. Ethicon-Johnson. São José dos Campos, SP.

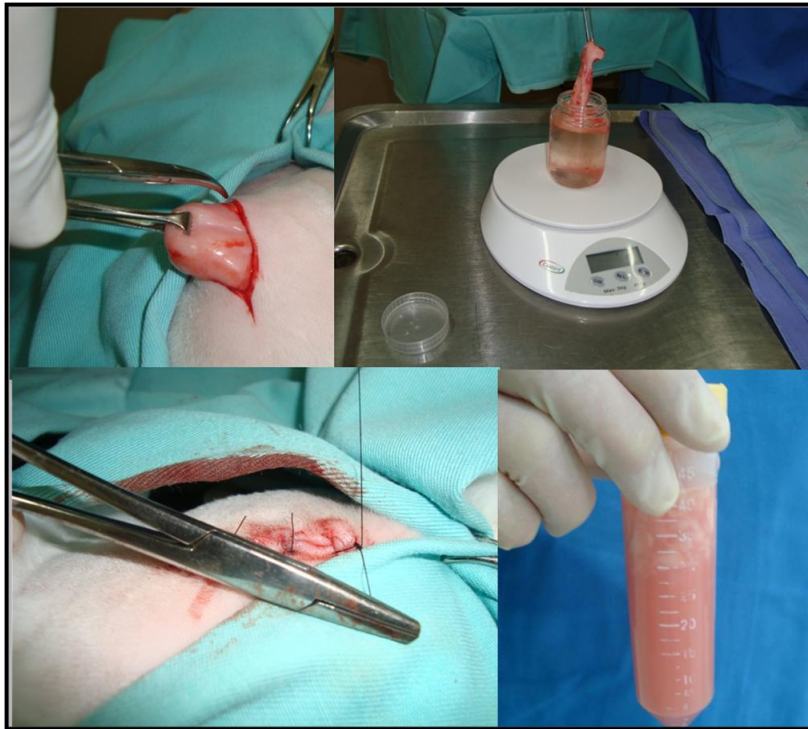


FIGURA 02: A – coleta do tecido adiposo; B – sutura em pontos de Wolf; C – pesagem e armazenamento em recipiente contendo solução de Hanks.

3.5.2 Processamento do TA para obtenção de Células-tronco Mesenquimais (CTM)

O procedimento foi 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 foi aberto e, com uma pinça de dissecação, o tecido foi transferido para uma placa de Petri. Com o auxílio de uma tesoura, a gordura foi seccionada várias vezes, em diversos fragmentos menores, até não ser mais possível sustentá-la com a pinça de dissecação. Os pequenos fragmentos de TA foram lavados com solução de Hanks e com o auxílio de uma peneira que não permitiu a passagem da gordura.

Concluída esta etapa, a gordura foi transferida para tubos Falcon, de 50 mL e adicionado ao TA, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo I⁹ (0,5 mg/mL) e tipo II¹⁰ (0,5 mg/mL), na proporção 1:3 (volume:volume), ou seja, para os dez gramas de gordura foram necessários 30 mL de colagenase. Os tubos foram tampados e lacrados com uma película semi-transparente, resistente a água¹¹, para diminuir o risco de uma possível contaminação e encaminhados para o banho-maria.

Os tubos contendo o TA com a colagenase permaneceram no banho-maria a uma temperatura de 37 °C e foram agitados manualmente, a cada cinco minutos. Durante o momento em que os tubos estiveram no banho-maria, os mesmos foram inspecionados frequentemente, visto que a obtenção de um aspecto leitoso é o indicativo de que a digestão está completa (FIGURA 03 A e B).

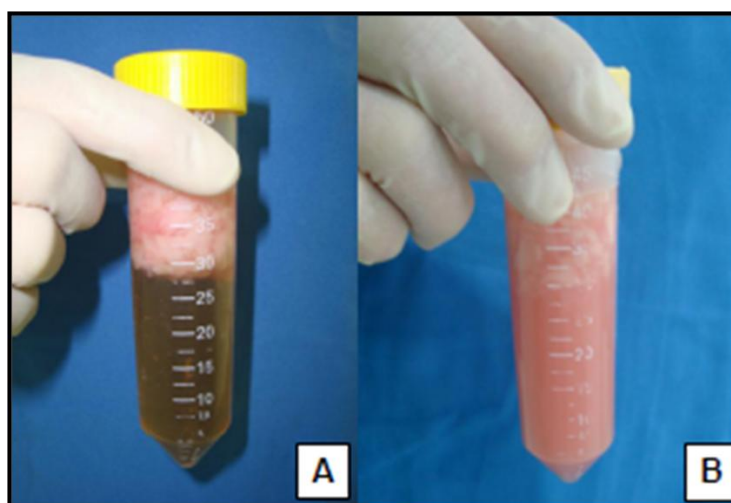


FIGURA 3: A - Tubo Falcon contendo fragmentos do tecido adiposo e colagenase antes da digestão em banho-maria. B - Aspecto apresentado pelo tecido adiposo (leitoso), após a digestão pela colagenase em banho-maria.

Ao ser observado o aspecto leitoso, os tubos foram retirados do banho-maria e encaminhados novamente para a capela de fluxo laminar. Dada a citotoxicidade da colagenase, foi necessário neutralizá-la pela adição de meio

⁹ Collagenase Type I, C0130[®]. Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA

¹⁰ Collagenase Type II, C6885[®]. Sigma-Aldrich. Saint Louis, EUA

¹¹ Parafilm "M"[®]. Pechinery Plastic Packaging. Chicago, EUA.

completo, em um volume de 1:1, sendo que o total foi distribuído de maneira equivalente, em dois novos tubos Falcon. Os tubos de TA com o meio completo adicionado foram centrifugados a 600xg, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Foi realizada uma agitação manual vigorosa dos tubos. Após, os tubos foram recolocados na centrífuga, por mais cinco minutos, com a mesma rotação.

O sobrenadante foi descartado e a fração lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 440xg, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. O procedimento de lavagem foi repetido novamente e ao término da nova centrifugação o sobrenadante foi 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 câmara de Neubauer. O restante do botão contendo a FVE foi imediatamente encaminhado para cultivo celular.

3.6 Procedimento cirúrgico para criação do defeito

Com o animal devidamente tricotomizado na parede lombar, torácica e abdominal direita e posicionado em decúbito esternal, foi realizada antissepsia com álcool-iodo-álcool e colocação de panos de campo. O protocolo anestésico foi o mesmo utilizado para a colheita do tecido adiposo, conforme descrito anteriormente.

Utilizando-se um molde de plástico quadrado, vazado em seu interior, apresentando um de 2 x 2 cm, foi demarcado na pele a área que foi excisada na parede abdominal direita, caudal à última costela, com o auxílio de lápis dermatográfico. Foi realizada a incisão cutânea e a divulsão do tecido subcutâneo com o auxílio de uma tesoura de Metzembaum. 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).

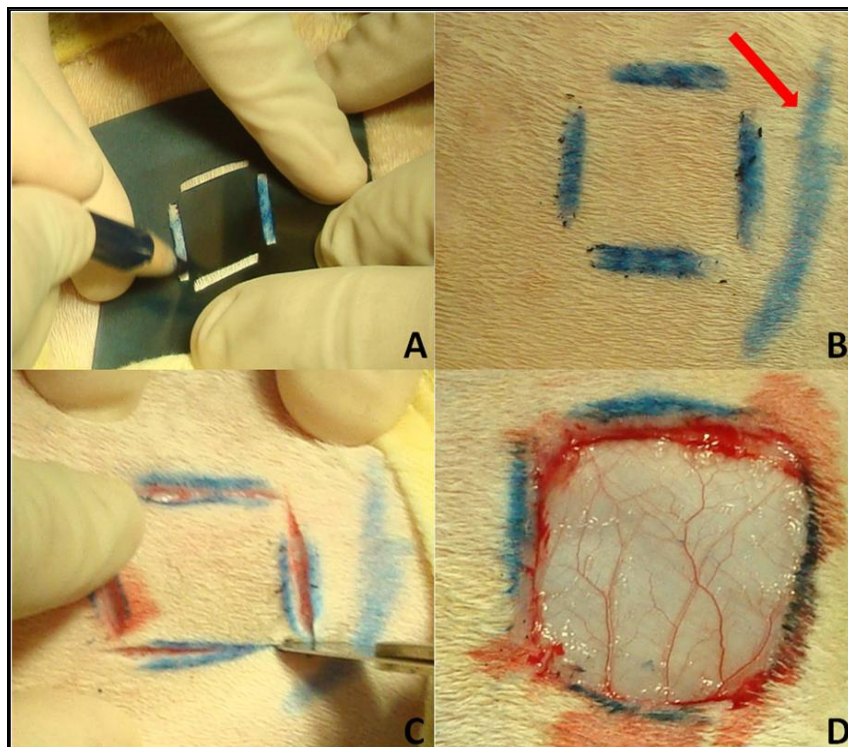


FIGURA 04: A – demarcação da área com auxílio do molde plástico; B – visualização da área, caudal a ultima costela direita (seta vermelha); C – incisão da pele demarcada; D – ferida pronta.

3.7 Tratamentos

No local da criação da ferida cirúrgica experimental, foi realizado tratamento da lesão de acordo com o grupo a que o animal pertencia. O Grupo A, controle negativo, não recebeu nenhum tratamento para a cicatrização do defeito criado, apenas curativo com gaze umedecida em gel a base de água e atadura, fixados com esparadrapo e trocados diariamente.

Os animais do Grupo B (CTM) receberam, um botão celular (*pellet*) contendo as CTM isoladas da fração vascular estromal do tecido adiposo, após o cultivo em laboratório por um período que possibilitou a realização de cinco

passagens. Foram aplicadas 1.10^6 células por animal, suspensas em 0,4 ml de meio (DEMEM). O botão foi recebido no interior do bloco cirúrgico, de maneira estéril, em um tubo Eppendorf. A suspensão celular foi aspirada com uma seringa hipodérmica de 1 mL e a aplicação da CTM ocorreu no espaço subcutâneo, nas quatro bordas do defeito criado, 0,1 ml em cada borda, próximo ao leito da ferida cirúrgica (FIGURA 5 A).

Os animais do Grupo C (UST) receberam gel próprio para ultrassom como meio acoplador para o transdutor. Os animais foram submetidos a aplicações diárias de UST pulsátil, na frequência de 3 MHz e intensidade de $0,1 \text{ W/cm}^2$, durante 10 dias, com aplicação de seis minutos na ferida cutânea (FIGURA 5 B).

Os animais do Grupo D receberam sessões de laserterapia em dez dias consecutivos. A caneta foi posicionada encostada na pele devidamente limpa, formando um ângulo reto. O aparelho utilizado foi um emissor de diodo de Arseneto de Gálio (AsGa), com comprimento de onda de 904 nm, potência de 45 mW e densidade de potência média de 120 mW/st , na dosimetria de 3 J/cm^2 em modo pontual (FIGURA 5 C).

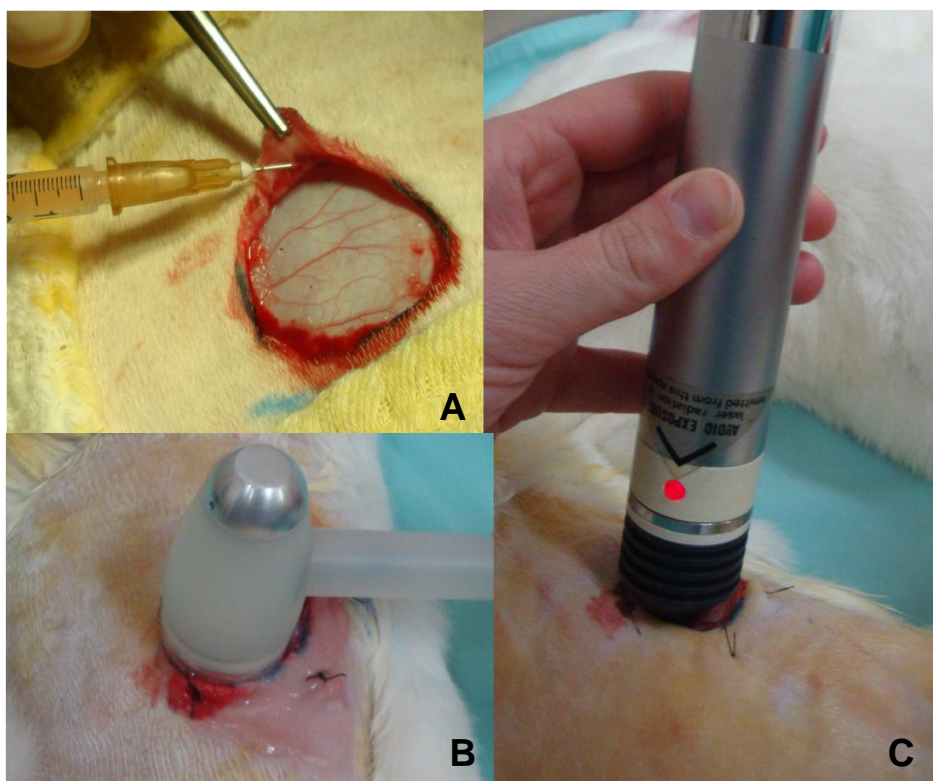


FIGURA 5: A – aplicação das CMI no tecido subcutâneo; B – aplicação de ultrassom no leito da ferida; C – aplicação de laser no leito da ferida.

3.8 Cuidados pós-operatórios

No pós-operatório imediato os animais foram monitorados até o restabelecimento completo de sua consciência, e então encaminhados para os seus boxes. Foi administrado meloxicam¹² (0,2 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, quatro vezes ao dia, durante três dias. A troca do curativo foi realizada em todos os animais diariamente até a cicatrização completa da ferida.

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 foram anestesiados e posicionados em decúbito ventral. As medidas (altura e largura) foram obtidas com a utilização de um paquímetro e

¹² Maxican 2%®. Ouro Fino. Ribeirão Preto, SP

desenhadas em lâmina plástica transparente para posterior conferência. As novas feridas, ocasionadas pelas biópsias, não foram levadas em consideração nas mensurações seguintes (FIGURA 6).

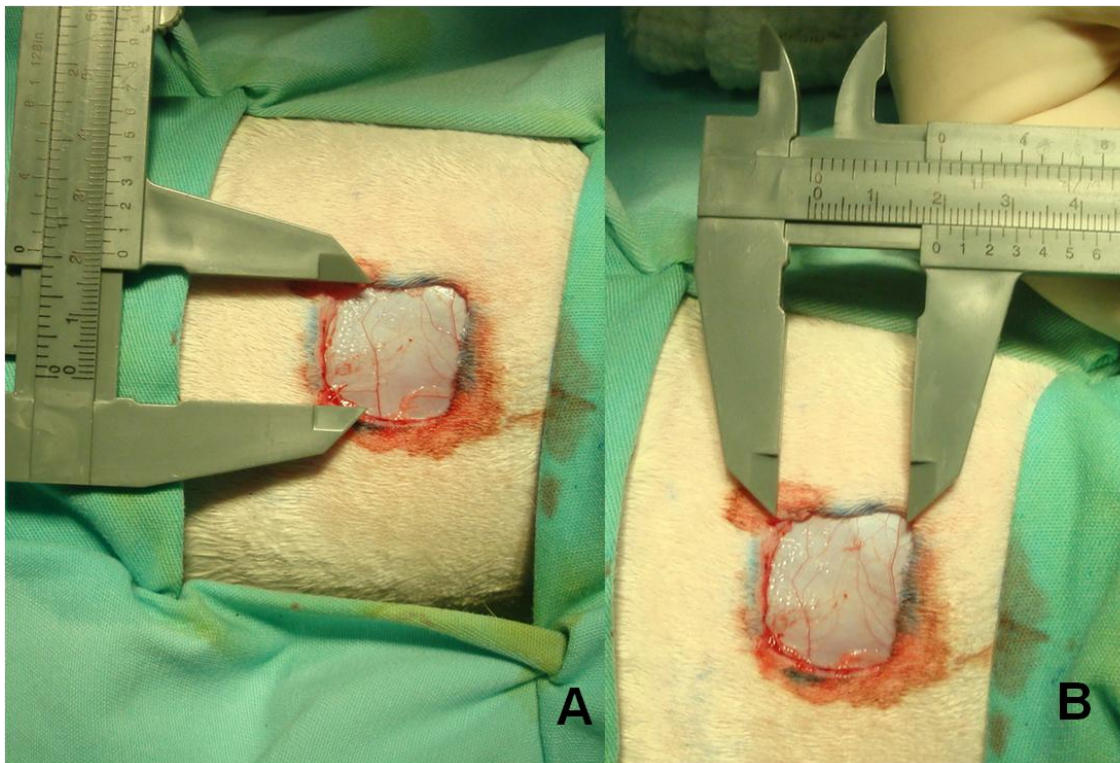


FIGURA 6: A- medida da altura da ferida (dorso-ventral); B – medida da largura da ferida (crânio- caudal).

3.9.3 Avaliação histológica

Para a realização da biópsia tecidual, os animais foram anestesiados conforme o protocolo descrito anteriormente e submetidos ao procedimento cirúrgico, 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 ferida criada e do tecido não lesado. A biópsia de sete dias foi realizada na margem dorsal da ferida, enquanto que a segunda biópsia foi realizada na borda caudal e, por fim, a biópsia de 21 dias realizada na margem ventral da ferida.

O fragmento colhido foi fixado em formol tamponado, desidratado gradualmente em álcool etílico (concentrações de 70°GL, 80°GL, 90°GL e 99,9°GL), diafanizado com xileno e impregnado e incluído em parafina histológica. Os tecidos foram cortados utilizando micrótomo rotativo (Leica) na espessura de 7 micrômetros. Os cortes foram corados com a coloração Hematoxilina & Eosina. Após a coloração as lâminas foram montadas com lamínula e Entellan (Merck).

3.10 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 medidas, com posterior teste de análise de regressão, através do software computacional estatístico SAS[®]. Foi considerada diferença estatística significativa quando o nível de significância foi igual ou menor que 1% ($p < .0001$).

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. Porém, algumas feridas demonstraram deformação logo após sua execução. Além disso, em alguns animais a área da ferida aos 07 dias foi maior que a medida da ferida, realizada no dia 0 (zero). 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 caudal à última costela e a realização de curativos com bandagens, impediu que os animais se auto-mutilassem ou interferissem na ferida.

4.2 Colheita e isolamento das CMI

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.

4.3 Avaliação fotográfica e planimetria

As medidas das feridas (altura, largura e área) obtidas no dia do procedimento cirúrgico (dia 0), e aos 7, 14 e 21 dias de pós-operatório foram de

fácil realização, e bastante confiáveis. O contorno da ferida foi desenhado em lâmina plástica para posterior avaliação, o que confirmou as medições originais. 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.

4.4 Avaliação estatística

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®. (TABELA 1)

TABELA 1 – Planimetria de feridas induzidas em coelhos, submetidos a diferentes tratamentos e avaliados em quatro momentos. A – controle não tratado; B – tratado com células estromais mesenquimais indiferenciadas; C – tratado com ultrassom terapêutico; D – tratado com laser.

DIA	GRUPO	ALTURA (cm)	LARGURA (cm)	ÁREA (cm ²)
0	A	2,0	2,0	4,0
0	B	2,0	2,0	4,0
0	C	2,0	2,0	4,0
0	D	2,0	2,0	4,0
0	Desvio Padrão	0,00	0,00	0,00
7	A	2,12 ^{bc}	1,86 ^a	3,98 ^{bc}
7	B	1,94 ^c	1,66 ^a	3,19 ^c
7	C	2,9 ^a	2,20 ^a	6,42 ^a
7	D	2,74 ^{ab}	2,16 ^a	5,91 ^{ab}
7	Desvio Padrão	0.53101194	0.36577243	1.72794211
14	A	1,02 ^b	1,26 ^{ab}	1,44 ^b
14	B	1,00 ^b	0,78 ^b	0,88 ^b
14	C	1,90 ^a	1,24 ^{ab}	2,37 ^{ab}
14	D	2,22 ^a	1,82 ^a	4,10 ^a
14	Desvio Padrão	0.66985859	0.53001986	1.59861782
21	A	0,36 ^b	0,46 ^{ab}	0,16 ^a
21	B	0,50 ^{ab}	0,32 ^b	0,16 ^a
21	C	0,94 ^{ab}	0,94 ^a	1,04 ^a
21	D	1,18 ^a	0,80 ^{ab}	0,98 ^a
21	Desvio Padrão	0.49786386	0.38402303	0.69929495

* Letras diferentes correspondem à diferença estatística significativa.

Analisando a tabela anterior, com as médias corrigidas, pode-se observar que no momento da criação do defeito cirúrgico não há diferença estatística significativa entre os grupos. Aos 7 dias de pós-operatório, os animais dos grupos que receberam as CEMI (grupo B) diferem estatisticamente dos grupos ultrassom (grupo C) e laser (grupo D), porém não diferem do grupo controle (grupo A). Aos 14 dias, há diferença estatística entre os grupos CEMI e controle em relação ao grupo laser, no entanto, não há em relação ao grupo ultrassom. Já aos 21 dias não há diferença significativa entre nenhum dos grupos.

4.5 Avaliação histopatológica

As biópsias para avaliação histopatológica foram realizadas nos dias 7, 14 e 21 de pós-operatório. Os resultados obtidos encontram-se descritos no Quadro 1.

QUADRO 1 – Alterações observadas na histopatologia

Coelho	Úlcera	Crosta	TFID	TFMD	Fibrose dérmica	DS/PH	DL	DIG	RFM	Acantose
GAC1-7	++	+++	+	-	-	+	-	-	-	-
GAC1-14	+++	++	+	++	-	++	-	-	+	+
GAC1-21	-	+	-	+	++	+	-	+	-	++
GAC2-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GAC2-14	-	-	+	+	++	+	++	+	-	+
GAC2-21	-	-	-	+++	+	-	-	-	++	-
GAC3-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GAC3-14	+	-	+	-	++	+	-	+	+	+
GAC3-21	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-
GAC4-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GAC4-14	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GAC4-21	+	+	+	+++	-	-	+	-	-	-
GAC5-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GAC5-14	-	-	+	++	+++	-	++	-	-	+++
GAC5-21	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GBC1-7	+++	+++	-	+	+++	+	+	-	-	+++
GBC1-14	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+++
GBC1-21	-	-	-	+++	-	+	-	-	-	+
GBC2-7	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+
GBC2-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GBC2-21	+	+	+	++	+	+	-	-	-	+++

GBC3-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GBC3-14	-	-	+	++	++	++	+	-	-	-	+++
GBC3-21	-	-	-	+	++	++	++	-	-	-	++
GBC4-7	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-	+
GBC4-14	-	-	++	-	++	+++	-	-	-	-	++
GBC4-21	NR	NR	NR	-	NR	NR	-	NR	NR	-	NR
GBC5-7	-	-	+	-	+++	+	-	-	-	-	+
GBC5-14	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GBC5-21	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GCC1-7	-	-	-	++	+	+	-	-	-	-	NR
GCC1-14	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	+++
GCC1-21	++	+++	++	+	-	+++	-	-	-	-	++
GCC2-7	++	++	+	+	+	+++	+	-	-	-	-
GCC2-14	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GCC2-21	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL
GCC3-7	-	-	-	+	+++	+	-	-	-	-	-
GCC3-14	+++	++	++	+	-	+++	++	-	++	-	-
GCC3-21	-	-	+	+	++	+	+	-	++	-	-
GCC4-7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
GCC4-14	-	-	+	+	++	+	+	-	++	-	-
GCC4-21	+++	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
GCC5-7	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	++
GCC5-14	+++	+++	+	++	+	+++	-	-	-	-	-
GCC5-21	++	++	-	++	+	+	+	-	+++	-	-
GDC1-7	-	-	-	+	+++	++	+	-	-	-	-
GDC1-14	++	+++	+	-	+	++	+	-	++	-	-
GDC1-21	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	++
GDC2-7	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
GDC2-14	-	-	-	+	++	+	-	-	+	-	-
GDC2-21	+	++	+	++	-	++	-	-	-	-	+
GDC3-7	+	++	+	-	+	+	-	-	-	-	+
GDC3-14	-	-	+	+	+	++	-	-	-	-	-
GDC3-21	-	-	++	++	-	+++	-	-	-	-	-
GDC4-7	++	++	+	-	-	+	+	-	-	-	-
GDC4-14	-	-	+	+	+++	+	-	-	-	-	-
GDC4-21	++	++	++	+	+	++	-	-	-	-	-
GDC5-7	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
GDC5-14	-	-	++	-	=	+	-	-	-	-	-
GDC5-21	++	-	++	-	-	+++	-	-	-	-	+

- = negativo; + = leve intensidade; ++ = moderada intensidade; +++ = acentuada intensidade; TFID = Tecido fibrovascular imaturo dérmico; TFMD = Tecido fibrovascular maduro dérmico; DS/PH = Dermatite superficial/profunda heterofílica; DL = Dilatação de linfáticos; DIG = Dermatite intersticial granulomatosa; NR: amostra não representativa; RFM: regeneração de fibras musculares; AL; ausência de lâmina.

5. DISCUSSÃO

Em trabalhos realizados com feridas experimentais em animais, os que as realizam em ratos, optam pela região dorsal cervical devido à não interferência do animal nesta região (SILVA, et al., 2001; VICENTINI, et al, 1996). Neste trabalho, optou-se por realizar as feridas caudalmente à última costela, levando-se em consideração o método de contenção de coelhos, no qual a região cervical dorsal é usada para segurar o animal (SUCKOW & DOUGLAS 1996).

Dos vinte animais utilizados, em treze as feridas apresentaram área maior do que a inicial ao sétimo dia de pós-operatório. Destas, uma recebeu tratamento com CEMI, cinco foram tratadas com US, cinco com laser e duas eram do grupo controle. Já aos 14 dias apenas três coelhos do grupo laser apresentavam área maior que a do dia zero. Coelho et, al. (1999) também encontraram essa deformação no tecido aos 7 dias. O aumento da área da ferida ocorreu devido à retração das bordas da lesão por ação das linhas de força, conhecidas como linhas de Langer, determinadas pelos sistemas fibrilares da pele, principalmente das fibras elásticas. Para a produção das feridas de forma quadrada, a pele foi incidida no sentido longitudinal e transversal, determinando aumento da área, devido à distensão provocada pela incisão transversal às linhas de Langer, conforme ressaltou Algower (1977).

A diminuição da área da lesão ocorreu devido ao mecanismo de contração que, juntamente com a epitelização, caracteriza a cicatrização por segunda intenção, conforme descrito por MADDEN & AREM (1991). Alinhados nos eixos de contração e produzindo movimentos centrípetos das bordas da ferida os miofibroblastos, através de seus filamentos de actina, são capazes de reduzir a área da lesão facilitando a epitelização. (POPE, 1993; CHANDRASOMA ; TAYLOR, 1993).

O real mecanismo pelo qual se inicia a contração da ferida é ainda controverso; pode ocorrer nos bordos da ferida, na sua parte mais profunda, ou em ambos os locais (BEVILACQUA, 1981). A curto prazo, o fechamento de uma ferida pela contração de suas margens é considerado insuficiente, pois

resta quase sempre uma área central cujo fechamento é por epitelização, de modo que a cicatrização se completa como resultado de uma combinação dos processos de contração e epitelização (McGRATH, 1982).

A inflamação constitui parte do processo de cicatrização (BALBINO et al, 2005), sendo assim, o uso de anti-inflamatórios poderia alterar os resultados do experimento. Neste trabalho isto não é válido, já que se optou pelo uso do anti-inflamatório Maxicam na dose de $0,2\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ uma vez ao dia por 3 dias para todos os grupos, isso excluiu a possibilidade de alteração de algum grupo.

O acompanhamento da evolução pela medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é o parâmetro mais empregado na prática clínica diária de fisioterapeutas e médicos, motivo da sua utilização neste trabalho. A medida da área da lesão pela planimetria foi escolhida por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica, havendo outros relatos do seu emprego para o seguimento da evolução de lesões cutâneas (TREICHEL, et al., 2011; AMORIM, et al., 2006).

Na histopatologia não houve diferença estatística entre os grupos. Porém não foi analisado neste trabalho a presença e quantificação do colágeno neoformado, tão quanto os miofibroblastos, o que foi usado por Amorim et al, (2006) como avaliação qualitativa da ferida, onde encontrou colágeno e reepitelização na área de cicatrização.

A frequência utilizada do ultrassom no experimento foi 3 MHz, já que o efeito desejado foi a cicatrização cutânea. A frequência está relacionada com o número de ondas que passam por um determinado ponto em unidade de tempo, varia, em geral, entre 1 e 3 MHz, embora outras frequências possam ser programadas. Frequências mais elevadas são mais adequadas para o tratamento de tecidos superficiais, enquanto que as frequências mais baixas são mais propícias para o tratamento das estruturas profundas (MCDIARMID e BURNS, 1987).

O tipo de US utilizado foi o pulsátil, que, segundo alguns autores, demonstra superioridade em relação ao contínuo, já que minimiza os efeitos térmicos e potencializa os efeitos mecânicos (WEBSTER, 1978). O tratamento com o ultrassom foi iniciado no primeiro dia, imediatamente depois de produzida a lesão, com o objetivo de interferir já nos estágios iniciais do

processo de reparação, na fase inflamatória aguda, conforme recomenda Young (1990).

Há referências quanto ao emprego da irradiação ultrassônica nas bordas das lesões, no seu centro, em local destituído de pele ou em ambas as regiões (SIMÕES, 1988). Neste trabalho, a irradiação envolveu simultaneamente as bordas e o centro da lesão produzida, em função das dimensões do cabeçote e da área da lesão, o que foi proposital, tendo em mente que se pretendia estimular os miofibroblastos, sensíveis ao ultrassom, aumentando assim a contração da cicatriz, como já referido por outros autores (FERREIRA, 2008).

Conforme indicado por Warren (1976), o cabeçote ultrassônico foi mantido constantemente na posição vertical em relação à superfície da ferida e em contato total com o tecido, sendo continuamente movimentado para evitar a formação de zonas de aquecimento localizado que pudessem lesá-lo.

Quanto ao uso da terapia laser neste trabalho, como descrito em literatura, a realização da radiação com o laser diodo Arseneto de Gálio se mostrou simples e segura e o aparelho pequeno, de fácil aplicação à pele (KOLARI, 1985). A escolha da aplicação do laser logo após o procedimento cirúrgico baseou-se no trabalho de Lopes (1999) que relata maior afluência de elementos defensivos e um elevado número de mitoses das células do estrato germinativo especialmente nas primeiras 24 horas após a lesão.

Conforme Robbins (1991) até o 5º dia da injúria a neovascularização atinge um pico e o número de fibroblastos é maior que o de fibras colágenas, pois é nesse período que ocorre a síntese do mesmo, sendo a partir do 14º dia que ocorre um persistente acúmulo de colágeno e proliferação de fibroblastos. Nessa mesma ocasião, inicia-se o prolongado processo de empalidecimento da cicatriz, sendo esta decorrente do aumento do acúmulo de colágeno na cicatriz incisional e da involução dos canais vasculares.

A dosagem de 3 J/cm² foi utilizada uma vez que 3 a 6 J/cm² promovem efeitos cicatrizantes. A caneta posicionada perpendicularmente à ferida do animal diminuiu a dispersão das ondas eletromagnéticas, uma vez que houve comprovações de que a reflexão da pele na incidência de feixes de laser é de 4 a 7% e pode variar com a aplicação prévia de pomadas, líquidos em geral e secreções sebáceas, provavelmente sendo a causa da pouca eficiência no

tratamento do Grupo D, pode ter havido permanência de algum resquício do gel a base d'água, utilizado nos curativos.

Segundo Ortiz *et al* (2001) existe ainda uma maior necessidade de estudos experimentais e clínicos para confirmar se os efeitos da laserterapia de baixa potência são pró ou antiinflamatórios. Os resultados deste experimento condizem com esta questão, uma vez que o grupo tratado com laser apresentou a pior média de área, que pode ter sido causada por um processo inflamatório prolongado. Na terceira semana o grupo laser se equiparou aos demais, o que poderia ser explicado por um efeito tardio e cumulativo, levando-se em consideração que sua aplicação foi somente nos primeiros 10 dias.

Posto a existência de grande diversidade de dados e ausência de uma padronização, ainda é muito difícil interpretar e interrelacionar as informações existentes sobre os efeitos dos lasers de baixa potência. SURINCHAK *et al.* (1983) e BASFORD (1986), afirmam que necessitam-se estudos detalhados a fim de determinar comprimento de onda, tempo de radiação, número de aplicação e dosimetria específicos com a espécie animal e patologia em questão.

No que diz respeito a aplicação das células estromais mesenquimais indiferenciadas, a escolha da via local para administração das células foi determinada pelo fato de que em alguns casos, a aplicação sistêmica de células mesenquimais 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 passavam por este órgão.

Optou-se nesse trabalho por aplicar as CEMI no tecido subcutâneo, devido a facilidade de aplicação e o íntimo contato deste tecido com a derme, corroborando com Treichel *et al.* (2011). Contudo, há trabalhos onde as células foram aplicadas diretamente na derme e apresentaram resultados satisfatórios (ESCOBAR *et al.* 2011).

As CTM podem ter um papel primário ou adjuvante na regeneração tecidual. Para determinar isso, é necessário um acompanhamento molecular de

seu comportamento na área receptora, esclarecendo se ela faz a regeneração ou estimula outros grupos celulares a executá-la. A marcação dessas células com genes repórteres pode ser uma opção adequada (PORTINHO et al., 2006).

No que se refere à planimetria, aos 7 dias de pós-operatório, os animais dos grupos que receberam as CEMI (grupo B) diferem estatisticamente dos grupos ultrassom (grupo C) e laser (grupo D), porém não diferem do grupo controle (grupo A). Aos 14 dias, há diferença estatística entre os grupos CEMI e controle em relação ao grupo laser, no entanto, não há em relação ao grupo ultrassom. Já aos 21 dias não há diferença significativa entre nenhum dos grupos. O que nos sugere que embora tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos nas primeiras semanas, ao final da cicatrização não há diferença na eficácia dos tratamentos utilizados.

O ultrassom terapêutico e o laser são amplamente utilizados como adjuvantes cicatriciais, tanto em humanos como em animais. No presente estudo, seu uso foi comparado à aplicação de células estromais mesenquimais indiferenciadas. Na primeira e segunda semana, a medida da área da ferida foi maior nos grupos ultrassom e laser, maior inclusive do que o grupo controle. Os autores associam essa maior área, com o excesso de manipulação empregada devido ao uso dos aparelhos, que como já descrito, necessitam de contato com a lesão. A manipulação excessiva dos tecidos pode causar retardo na cicatrização (HEDLUND, 2008).

O grupo CEMI apresentou menor valor de área nas três análises, 7, 14 e 21 dias comparado com os demais grupos. Isto ocorreu provavelmente devido ao efeito observado nos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrando que as células tronco limitam a resposta inflamatória assim como promovem uma via anti-inflamatória. Quando as células tronco são introduzidas em um ambiente onde há uma inflamação elas podem alterar o padrão de secreção de citocinas pelas células dendríticas e células T, resultando em uma alteração de um ambiente pro-inflamatório para um anti-inflamatório ou tolerante. As células-tronco não expressam antígenos MHC classe II ou moléculas co-estimulatórias além de suprimir a proliferação de células T. As células tronco suprimem as reações imunológicas mediadas por linfócitos além de induzir a inibição da proliferação

das células T por um terceiro tipo celular ou fatores mitogênicos. As células-tronco são capazes de modular a aceitação de enxertos por parte do paciente após o transplante (JIANG et al., 2002). 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).

O bom desempenho cicatricial do grupo controle, se comparado aos demais grupos, pode estar associado ao correto tratamento de ferida, como indicado por Hedlund (2008), a ferida foi mantida limpa, hidratada e o curativo trocado periodicamente.

Conforme interpretação do Quadro 1, no grupo controle houve evolução normal da ferida, temporal e morfológica, assim como no grupo CEMI, porém neste ainda a epiderme mostra espessura maior do que nos controles, chegando a ter hiperplasia pseudoepiteliomatosa e o TG mostra-se ligeiramente mais maduro do que nos controles.

No grupo ultrassom foram observadas mais ulcerações e maior infiltrado inflamatório no TG. E por fim, no grupo laser a evolução das feridas seguiu o curso temporal normal; neste se observou variação na espessura da epiderme e no número de anexos, que parece maior do que nos controles e outros tratamentos. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados. Acredita-se que elevado número de amostras não representativas se deva ao tempo de armazenamento destas amostras em formol.

CONCLUSÃO

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 – a técnica de colheita do tecido adiposo foi eficaz e proporcionou a obtenção de botões celulares com quantidade de células e viabilidade aceitáveis.

3 – A aplicação local das células mesenquimais estromais indiferenciadas acelerou o tempo de reparação cutânea, com destaque para a primeira semana, que apresentou diferença estatística significativa na planimetria em relação ao grupo ultrassom. E a segunda semana que apresentou diferença estatística significativa na planimetria em relação ao grupo laser.

4 – Clinicamente, não há sinais de rejeição das células alogênicas aplicadas.

5 – Com 21 dias de evolução não há diferença entre os tratamentos.

6 – Sugerem-se novos estudos, especialmente com cultivo celular, sobre o reparo da pele.

7 – Sugerem-se novos estudos com a associação de terapias.

REFERÊNCIAS

ABLA, L.E.F., ISHIZUKA, M.M.A. Fisiopatologia das Feridas. _____In: Ferreira LM. **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu; 1995. p.5-11.

ALGOWER, M. **Manual de Cirurgia**, Barcelona: Científicomédica, 1977, p. 3-14.

ALMEIDA LOPES, L. **Estudo in vitro da Análise proliferativa de Fibroblastos**. 1998. 31 f. Dissertação (Mestrado). Univap, São José dos Campos.

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**. v.34, n.1, 2008.

AMANCIO, A.C.G. et al. Estimulação ultra-sônica da integração de enxertos de pele total: estudo experimental em coelhos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.5, p.276-279, 2006.

AMORIM, E. et al.; Efeito do uso tópico do extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (Babaçu) na cicatrização de feridas cutâneas - estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira** – v. 21, 2006.

ARNOULD-TAYLOR, W. **Princípios e prática de fisioterapia**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. 236p. BAKER, K.G. et al. A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. **Physical Therapy**, v.81, p.1351-1358, 2001.

BASFORD, J.R. Low-energy laser treatment of pain and wounds: hype, hope, or hokum? **Mayo Clin. Proc.**, v.61, p. 671-75, 1986.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.41, n.1, p. 27-51, 2005.

BEVILACQUA, G.S. **Bases da cirurgia**. São Paulo: Pedagógica e Universitária; 1981. p. 99-118.

CESARETTI, I.U.R. **Processo fisiológico de cicatrização da ferida**. *Pelle Sana* 1998. v.2, p.10-2.

CHANDRASOMA, P., TAYLOR. **Patologia básica**. 2 ed. Hall do Brasil, 1993. p.70-89.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de Feridas após Cobertura com Substitutos Temporários de Pele. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

CRUAÑES, J.C. **La terapia láser, hoy**. Barcelona: Centro Documentación láser de Meditec, 1984. 164p.

DYSON, M. Role of ultrasound in wound healing. In: KLOTH, L.C.; MILLER, K.H. **Wound healing**. Philadelphia: F.A. Davis, 1990. p.259-85.

ESCOBAR et al. Uso de células-tronco adultas de tecido adiposo na cicatrização da pele: estudo controlado, randomizado **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**. 2011; v.26, n.3, p.394-401.

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J.B. Cicatrização de feridas. _____ In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. **Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p.23-28.

FERNANDES, M.A.L. et al. Efeito do ultra-som terapêutico em tendinite experimental de eqüinos: estudo clínico, ultrasonográfico e histopatológico de dois protocolos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.1, p.27-34, 2003.

FERREIRA, AS et al.; Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultrassom de baixa intensidade em pele de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, vol. 12, n.5, 2008, p. 351-358

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.

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.
GIMBLE, J.M.; et al. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Journal of the American Heart Association**. v.100, p.1249-1260, 2007.

GUIRRO, R.; SANTOS, S.C.B. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v.4, n.2, p.76-82, 1997.

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.

HESS, C.T. **Tratamento de feridas e úlceras**. 4^a ed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso; 2002.

HOGAN, R.D. et al. The effects of ultrasound on microvascular hemodynamics in skeletal muscle: effects on arterioles. **Ultrasound Medicine Biology**, v.8, p.45-55, 1982.

IUSIM, M. et al.; Evaluation of the degree of effectiveness of biobeam low level narrow band light on the treatment of skin ulcers and delayed postoperative wound healing. **Orthopedics**. 1992; v.15, p.1023-1026.

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.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, jul., 2002.

JULÍA, V. et al., **Características de la cicatrización de las heridas en el período fetal**. Cirurgia Pediátrica. 1992; n.5, v.3, p.117-21.

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

KLAIMAN, M.D. et al. Phonophoresis versus ultrasound in the treatment of common musculoskeletal conditions. **Medicine Science & Exercise**, v.30, p.1349-1355, 1998.

KOLARI, P.J. Penetration of unfocused laser light into the skin. **Arch. Dermatol.**, v.277,p.342-44, 1985.

LOPES, L.A. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblasto de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 1999. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Universidade do Vale do Paraíba, 1999.

LUCAS, C. et al.; Efficacy of low level laser therapy on wound healing in human subjects: a systematic review. **Lasers Medical Science**. 2000. v.15, p.81-93.

MADDEN, J., AREM, A. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. **Tratado de Cirurgia**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 156-168.

MANDELBAUM, . H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v.78, n.4, p.393-410, 2003.

MAXWELL, L. Therapeutics ultrasound: its effects on the cellular and molecular mechanisms of inflammations and repair. In: _____. **Physiotherapy**. London: Churchill Livingstone, 1995. Cap.3, p.35-59.

McDIARMID, T., BURNS, P. N. Clinical applications of therapeutic ultrasound. **Physiotherapy**. London, v. 73, n. 4, p. 155-162, 1987.

MCGRATH, M. The effect of prostaglandin inhibitors on wound contraction and myofibroblast. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 69, p. 74-83, 1982.

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.

MILLIS, D. L. et al. Novas Modalidades Terapêuticas na Reabilitação Veterinária. In: PAIM, C. B. V. et al. Enxerto autólogo de pele, em malha, com espessura completa na reparação de feridas carpometacarpianas de cães. Resposta à irradiação laser AsGa. **Ciência Rural**. Santa Maria, n. 3, p. 451-457, 2002.

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.

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

NUSSBAUM EL, BIEMANN I, MUSTARD B. Comparasion of ultrasound/ultraviolet-c and laser for treatment of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. **Physical Therapy**. 1994. v.74, p.812-23.

OLSSON, D.C. et al. Pulsed and continuous ultrasound stimulation in rats healing celiotomy. **Ciencia Rural**, v.36, n.3, p.865-872, 2006.

ORTIZ, M.C.S.; Laser de baixa intensidade: princípios e generalidades – Parte I. *Fisioterapia Brasil*, v. 2, n. 4, p. 241-246, 2001

ORTIZ, M.C.S.; Laser de baixa intensidade: efeitos sobre os tecidos biológicos – Parte II. *Fisioterapia Brasil*, v. 2, n.6, p. 337-352, 2001

ORTONNE, J.P., CLÉVY, J.P. **Physiologie de la cicatrisation cutanée**. Ver Prat 1994; n.44, v.1, p. 733-4.

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

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.

PORTINHO, C. P. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**. 2006; n.21, v.3, p.161-165.

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

ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

ROCHKIND S, ROUSSO M, NISSAN M. **Systemic effects of lowpower laser irradiation on the peripheral and central nervous system, cutaneous wounds, and burns**. *Lasers Surg Med*. 1989;9:174-8.

RODRIGUES, E.M.; GUIMARÃES, C.S. **Manual de recursos fisioterapêuticos**. Rio de Janeiro. Revinter, 1998. 145p.

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.

ROSS; M. H.; ROMRELL; **Histologia texto e Atlas**. 2. ed. Sao Paulo: Editorial medica panamericana, 1993.

SANTOS, V.L.C.G. Avanços tecnológicos no tratamento de feridas e algumas aplicações em domicílio. _____ In: Duarte YAO, Diogo MJD. **Atendimento domiciliar: um enfoque gerontológico**. São Paulo: Atheneu; 2000. p.265-306.

SILVEIRA, S.D. **O ultra-som terapêutico no processo cicatricial de tendões flexores digitais superficiais em cães**. 2003. 74f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Experimental) – Universidade Federal de Santa Maria.

SILVA, C.M.P.; ROCH, R.M.; MORENO, J.S. O Babaçu (*Orbignya phalerata*) como provável fator de risco de infecção humana pelo agente de cromoblastomicose no estado do Maranhão, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. 1995; v28, p.49-52.

SILVA, B.P.; PARENTE, J.P. An anti-inflammatory and immunomodulatory oligosaccharide from *Orbignya phalerata*. **Fitoterapia**. 2001; v.72, p.887-893.

SIMÕES, M.L.P. Cicatrização.____ In: Silva Júnior OC, Zucoloto S, Beer Júnior A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial; 1988. n.9, v.15, p. 266-73.

STEISS, J.E.; ADAMS, C.C. Effects of coat on rate of temperature increase in muscle during ultrasound treatment of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.60, n.1, p.76-80, 1999.

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

SURINCHAK, J. et al., Effects of low-level energy laser on the healing of full-thickness skin defects. **Lasers in Surgery and Medicine**, v.2, p. 267-74, 1983.

SUCKOW, M.A. & DOUGLAS F.A. **The Laboratory Rabbits**. United States of America. 1996

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.

THOMAS, D.W.; ONEILL, I.D.; HARDING, K.G. **Cutaneous wound healing: a current perspective**. *Jornal Oral Maxillofac Surg*; 53:442-7; 1995.

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.

TREICHEL, T. L. E. Transplante de fração total de células mononucleares ou fração vascular estromal associada à membrana celulósica em feridas cutâneas experimentais de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 48, n. 1, p. 62-72, 2011.

VINCK, E.M., Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. **Lasers Medical Science**. 2003. v.18, p.95-9.

VICENTINI, R.M.R.; PINTO-NETO, A.M.; LANE, E. **Cicatrização do sítio cirúrgico incisional. Fisiologia, fisiopatologia e fatores de risco**. Femina 1996; v.24 p.915-8.

YOUNG, S.R.; DYSON, M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of fullthickness excised skin lesions. **Ultrasonics**. 1990; v.28, n.3, p.175-80.

WEBSTER, D.F.; POND, J.B.; DYSON, M.; HARVEY, W. The role of cavitation in the in vitro stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by ultrasound. **Ultrasound medicine & Biology**. 1978; v.4; p.343-5.

WARREN, C.G., KOBLASKI, J.N., SIGELMANN, R.A. Ultrasound coupling media: their relative transmissivity. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. 1976; v.57, p.218-222.

WARDEN, S.J. et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury. **Bone**, v.29, n.5, p.431-436, 2001a.

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.

YAMADA, B.F.A. Úlceras venosas. In: JORGE, S.S.; DANTAS, S.R.P.E. **Abordagem multiprofissional no tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.247-259.

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.