

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

**CONTRIBUIÇÕES PARA O USO DE CÉLULAS  
ESTROMAIS MESENQUIMAIS NO REPARO DE FERIDAS  
CUTÂNEAS E NO TRANSPLANTE DE PELE EM COELHOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Tiago Luis Eilers Treichel**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**CONTRIBUIÇÕES PARA O USO DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MESENQUIMAIS NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS E  
NO TRANSPLANTE DE PELE EM COELHOS**

**por**

**Tiago Luis Eilers Treichel**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Ney Luis Pippi**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**CONTRIBUIÇÕES PARA O USO DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MESENQUIMAIS NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS E NO  
TRANSPLANTE DE PELE EM COELHOS**

elaborada por  
**Tiago Luis Eilers Treichel**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Débora Cristina Olsson, Dr<sup>a</sup>. (IFC - Concórdia)**

---

**Fabiano Zanini Salbego, Dr. (UDESC)**

---

**Marcelo Leite da Veiga, Dr. (UFSM)**

---

**Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 14 de março de 2014.

## DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese de Doutorado ao meu avô materno Honório Mozarte Eilers (*in memoriam*), que mesmo com toda a sua simplicidade, foi o primeiro mestre que a vida me deu. Agradeço pelas orações diárias que, tenho certeza, continuam partindo de outro plano.

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar necessito muito agradecer à Deus, por propiciar a realização dos meus sonhos e objetivos, sempre apontando o melhor caminho a seguir. Ao meu pai Alfredo Treichel, que me deixou muito feliz ao superar alguns pequenos contratempos com a sua saúde.

Agradeço também a minha mãe, Elisabeth Eilers, que prestes a completar a sua sexta década de vida, teve a coragem e a ousadia dos jovens e aceitou mudar-se de cidade para poder nos acompanhar em busca dos nossos objetivos, dando prova mais uma vez do seu amor incondicional.

À minha esposa e futura mamãe dos meus filhos, Andriéli Treichel, que me enche de orgulho ao concluir sua segunda especialização, iniciar o seu mestrado e ingressar no magistério de nível superior na mesma faculdade em que eu trabalho. Somos agora colegas, além de amigos, namorados e marido e mulher. Definitivamente, “... nós vibramos em outra frequência, sabemos que não é bem assim”.

Nós três, que findadas as oportunidades nas cidades onde vivíamos, partimos em busca de crescimento pessoal e profissional em outros “pagos”, sempre unidos e fornecendo apoio e amor um ao outro. Não tenho palavras para descrever o que significa para mim esta pequenina, mas valorosa família!

Ao professor Ney Luis Pippi e sua esposa, aos quais também me deixam sem adjetivos para qualifica-los. Gostaria apenas de registrar o quanto tento buscar inspiração neste professor para guiar o começo da minha caminhada como docente, sem a pretensão de igualar-me a ele, pois seu nome está merecidamente marcado na história da medicina veterinária brasileira. Serve de exemplo para mim também no aspecto pessoal, no tratamento dispensado a sua família e ao amor que sente pela esposa, filhos e netos.

Ao chamado “Quarteto Fantástico”, composto pelo Jaime, Maurício e Saulo, além de mim. À estes colegas e amigos, o meu agradecimento por todos os momentos em que projetamos, operamos, processamos células e lidamos com os animais ou simplesmente almoçamos no RU. Em especial ao meu *brother* Jaime Aramburú, por todos os momentos em que sonhamos com projetos aprovados, mudanças e melhorias nas pesquisas e convênios. Pelas inúmeras reuniões que participamos, viagens de estudo, jantares e jogos do Grêmio. Sempre tentando me “colocar em fria”, mas penso que “não era nada pessoal”.

Aos demais colegas da pós-graduação, especialmente o Paulo Leme Jr. e o Jorge Castro por todas as ideias para projetos de pesquisa e ajuda no desenvolvimento dos que conseguimos executar. À Laetícia Barbosa, pelo companheirismo durante o desenvolvimento dos projetos dela, aos finais de semana que cuidamos dos seus cães, das tardes na placa de força da Educação Física e por ter me doado a Cristal. Principalmente, por ter colhido sangue dos meus coelhos, sei que foi bem complicado.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, programa de excelência com conceito 7 na avaliação da CAPES e a Maria, competente secretária do Programa, sempre disposta a ajudar no que for possível.

A Nelci, pela ajuda no bloco 05 e a Nara, pelo auxílio no Laboratório de Terapia Celular Regenerativa, durante a execução do experimento.

Aos estagiários Betina Müller, Bianca Eidt e Gabriel Damião pela ajuda nas cirurgias, no Laboratório e no trato com os animais.

A professora Ivana Cruz, do Laboratório de Biogenômica e todo o seu pessoal, em especial ao Alencar Machado, por todos os testes realizados e considerações feitas para aprimorar os trabalhos.

Aos professores Marcelo da Veiga e Maria Izabel da Rocha, pelas análises histológicas e o livre trânsito no Laboratório de Histologia (LABITEX) para esclarecimento das dúvidas.

Ao professor Marcos Braz Vaz pela análise estatística dos artigos.

Aos colegas e acadêmicos da Faculdade de Itapiranga (FAI Faculdades), em especial ao coordenador do curso, professor Sandro Charopen Machado e família, pela recepção que tivemos na minha primeira e atual experiência como docente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela viabilização da bolsa, que me proporcionou dedicação exclusiva as atividades do doutorado.

Por fim, mas não menos importante, aos meus queridos coelhos que involuntariamente participaram destas pesquisas, o meu mais profundo agradecimento. Ao coelho doador do tecido adiposo e da pele, minhas mais sinceras desculpas. Todos permanecerão para sempre na minha lembrança e fica a esperança de que nada disso tenha sido em vão!

“Seria mais fácil fazer como todo mundo faz.  
O caminho mais curto, produto que rende mais.  
Seria mais fácil fazer como todo mundo faz.  
Um tiro certo, modelo que vende mais.

Mas nós dançamos no silêncio,  
choramos no carnaval.  
Não vemos graça nas gracinhas da TV,  
morremos de rir no horário eleitoral.

Seria mais fácil fazer como todo mundo faz,  
sem sair do sofá, deixar a Ferrari pra trás.  
Seria mais fácil, como todo mundo faz.  
O milésimo gol sentado na mesa de um bar.

Mas nós vibramos em outra frequência,  
sabemos que não é bem assim.  
Se fosse fácil achar o caminho das pedras,  
tantas pedras no caminho não seria ruim”

**Letra da música “Outras Frequências”, de Humberto Gessinger  
(Engenheiros do Hawaii)**

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### CONTRIBUIÇÕES PARA O USO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS NO REPARO DE FERIDAS CUTÂNEAS E NO TRANSPLANTE DE PELE EM COELHOS

AUTOR: TIAGO LUIS EILERS TREICHEL

ORIENTADOR: DR. NEY LUIS PIPPI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2014.

Esta tese foi realizada em três etapas distintas, sendo a primeira destinada a analisar a terapia celular na cicatrização de pele em coelhos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de cicatrização da fração vascular estromal (FVE) e das células estromais mesenquimais (CEM) e comparar qual apresenta melhor eficácia e maior facilidade de uso. Para este estudo foram utilizados 15 coelhos divididos em três grupos. Foi criada uma ferida de pele de 4 cm<sup>2</sup> em todos os coelhos. Os animais do grupo A não receberam nenhum tipo de tratamento, enquanto que no grupo B foram tratados com FVE do tecido adiposo e no grupo C foram tratados com CEM. A análise histológica demonstrou que as etapas da cicatrização ocorreram de maneira mais satisfatória nos grupos tratados. Na análise estatística, os dois grupos tratados não apresentaram diferença significativa entre si, mas quando comparados com o grupo controle houve diferença significativa. Concluiu-se que tanto o uso da FVE quanto das CEM são viáveis e apresentaram melhores resultados que o controle, inclusive tornando a cicatriz resultante do processo esteticamente aceitável. Na segunda etapa foi determinado o grau de estresse oxidativo das CEM em cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o isolamento e o cultivo das CEM a partir de amostras de tecido adiposo de três coelhos, processadas imediatamente após a colheita e com 12 ou 24 horas de intervalo, mantendo-as em cultivo até a nona passagem. As amostras de cada animal foram divididas em três novas amostras, sendo que a primeira foi processada imediatamente após a colheita, e as demais com 12 e 24 horas de intervalo. O ensaio da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) demonstrou que os cultivos imediatos tiveram um aumento da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir da quarta passagem, células cultivadas após 12 horas, a partir da terceira passagem e após 24 horas, a partir da terceira passagem, mas com um outro



episódio durante a nona passagem. O teste de PicoGreen demonstrou que os cultivos imediatos obtiveram uma maior liberação de DNA apenas na sétima e nona passagens; 12 horas, morte celular somente na nona passagem e 24 horas, durante as três últimas passagens avaliadas. Nas condições em que o experimento foi realizado e com base nos resultados obtidos é possível concluir que o tecido adiposo pode ser cultivado até 24 horas após a colheita, desde que mantido em condições ideais. Na terceira etapa foi testado o possível potencial imunossupressor das CEM. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do alotransplante de pele a fresco em coelhos, utilizando como agente imunomodulador células estromais mesenquimais, associadas ou não à ciclosporina. Para a elaboração deste experimento foram utilizados 20 coelhos machos, da raça Nova Zelândia Branco, divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Grupo A: realizado apenas o transplante. Grupo B: aplicação de CEM nos dias -1, 0, 3, 7 e 10, associado ao uso da ciclosporina. Grupo C: somente a aplicação de CEM, nos mesmos períodos que o grupo anterior. Grupo D: apenas ciclosporina injetável. Para a comparação das médias foi usado o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. As taxas de sobrevivência do enxerto foram de 7,2 dias ( $\pm 3,49$ ) para o grupo B; 11,4 dias ( $\pm 3,58$ ) para o grupo C; 9,0 dias ( $\pm 1,22$ ) para o grupo D e 13,0 dias ( $\pm 1,41$ ) para o grupo A. As interleucinas foram avaliadas nos grupos A, B e C e neste ponto, a utilização associada da ciclosporina com as CEM, parece ter sido benéfica para a inibição de alguns destes fatores. Pode-se concluir que tanto a aplicação da ciclosporina quanto das CEM alógenas, quando administradas isoladamente, não foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência do enxerto de pele, mas as duas terapias, quando utilizadas de maneira associada, foram responsáveis por causar uma rejeição mais rápida do tecido transplantado do que o grupo controle. Ainda assim, os valores mensurados das principais interleucinas pró-inflamatórias foram menores quando esta associação ocorreu.

**Palavras-chave:** cultivo celular, estresse oxidativo, cicatrização, imunossupressão.

## **ABSTRACT**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **CONTRIBUTIONS TO THE USE OF MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN SKIN WOUND AND SKIN TRANSPLANTATION REPAIR IN RABBITS**

AUTHOR: TIAGO LUIS EILERS TREICHEL  
ADVISOR: DR. NEY LUIS PIPPI

Defense Date and Local: Santa Maria, March 14, 2014.

This thesis was carried out in three distinct stages; the first being intended to analyzing the cell therapy of skin wound healing in rabbits. The aim of this work was to evaluate the healing potential of the stromal vascular fraction (SVF) and mesenchymal stromal cells (MSC) and to compare which one presents better efficiency and ease of use. For this study we used 15 rabbits divided into three groups. A skin wound of 4 cm<sup>2</sup> was created in all rabbits. The animals of group A did not receive any kind of treatment, whereas in group B they were treated with SVF from adipose tissue, and in group C they were treated with MSC. Histological analysis demonstrated that the healing stages occurred more satisfactorily in the treated groups. In the statistical analysis, the two treated groups showed no significant difference between them, but when compared with the control group there was a significant difference. It was found that both the use of SVF as well as MSC are viable and showed better results than the control, even making the resulting scar of the process aesthetically acceptable. In the second step we determined the degree of oxidative stress in the cultured MSC. The goal of this study was to evaluate the isolation and culture of MSC from adipose tissue samples from three rabbits, processed immediately after harvest and within 12 or 24 hours intervals, keeping them in culture until the ninth pass. The samples from each animal were divided into three new samples, the first of which was processed immediately after harvest, and the others within 12 and 24-hour intervals. The dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay demonstrated that immediate cultures had an increased overall rate of reactive oxygen species (ROS) from the fourth passing, cultured cells after 12 hours, from the third passage and after 24 hours, after the third pass, but with another episode during the ninth passage. The PicoGreen test demonstrated that the immediate cultures obtained a greater release of DNA

only in the seventh and ninth passages, 12 hours, cell death only in the ninth passageway and 24 hours, during the last passes evaluated. In conditions in which the experiment was conducted, and based on the results, we conclude that adipose tissue may be cultured until 24 hours after harvest, since kept in ideal conditions. In the third step, the possible immunosuppressive potential of MSC was tested. The aim of this work was to assess the viability of the fresh allograft skin in rabbits, using as an immunomodulatory agent, mesenchymal stromal cells, associated or not to cyclosporine. To prepare this experiment, 20 New Zealand White male rabbits were used, randomly divided into four experimental groups. Group A: only transplantation done. Group B: application of MSCs on days -1, 0, 3, 7 and 10, always associated with cyclosporine. Group C: only the application of MSC in the same periods that in the previous group. Group D: only injectable cyclosporine. The Tukey test, at 5% probability level, was used to compare the means. The graft survival rates were 7.2 days ( $\pm 3.49$ ) for group B, 11.5 days ( $\pm 3.58$ ) for group C, 9.0 days ( $\pm 1.22$ ) for group D, and 13.0 days ( $\pm 1.41$ ) for group A. Interleukins were evaluated in groups A, B and C, and at this point, the combined use of cyclosporine with the MSC, appears to have been beneficial for inhibition of some of these factors. It can be concluded that both application of cyclosporine as well as the halogen MSC, when administered alone were not able to increase the rate of skin graft survival, but both therapies, when associated, were responsible for causing a faster rejection of transplanted tissue than the control group. Still, the measured values of the key pro-inflammatory interleukins were lower when this association occurred.

**Key words:** cell culture, oxidative stress, healing, immunosuppression.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. ARTIGO 1 – Transplante de fração vascular estromal ou células estromais mesenquimais para o reparo de feridas cutâneas experimentais em coelhos.....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e métodos.....	22
Resultados e discussão.....	27
Conclusão.....	30
Literatura citada – Referências bibliográficas .....	31
3. ARTIGO 2 – Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas do tecido adiposo de coelhos em cultivo.....	38
Resumo.....	38
Abstract.....	39
Introdução.....	40
Material e métodos.....	43
Resultados e discussão.....	47
Conclusão.....	51
Literatura citada – Referências bibliográficas .....	52
4. ARTIGO 3 – Alotransplante de pele em coelhos associado ao uso de Células Estromais Mesenquimais como terapia imunomoduladora.....	62
Resumo.....	62
Abstract.....	63
Introdução.....	64
Material e métodos.....	66
Resultados e discussão.....	69
Conclusão.....	75
Literatura citada – Referências bibliográficas .....	76
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO.....	87
7. REFERÊNCIAS.....	88

# 1. INTRODUÇÃO

Os avanços cirúrgicos obtidos a partir do século XX, garantiram às ciências médicas a possibilidade de transferir diversos órgãos e tecidos entre diferentes partes de um único organismo ou mesmo entre indivíduos. Em se tratando de transplante de órgãos, as últimas duas décadas projetaram uma melhoria notável para o sucesso a curto prazo, entretanto resultados a longo prazo ainda são bem menos satisfatórios.

Diversos órgãos estão sujeitos ao desenvolvimento de um grande número de doenças. Para aqueles acometidos por graves doenças, principalmente no denominado estágio final, a única terapia de escolha passa a ser o transplante deste órgão (DOMEN et al., 2011). Os órgãos ou tecidos transplantados entre indivíduos geneticamente diferentes, mas de mesma espécie, são denominados de aloenxertos.

Os benefícios do alotransplante de pele são cada vez mais evidentes, à medida que torna-se possível o reparo de regiões danificadas do corpo, principalmente regiões de mãos e face, a um nível que não tornou-se possível por outros métodos (HORNER et al., 2009). Contudo, os enxertos apresentem uma taxa de sobrevivência tida como excelente no curto prazo, mas em períodos maiores de tempo esta mesma taxa de sobrevivência passa a ser limitada e grande parte dos enxertos serão rejeitados (DOMEN et al., 2011).

Cabe ressaltar que o transplante de tecidos é a terceira área na qual o sistema imunológico age de forma mais prejudicial, logo após a hipersensibilidade e auto-imunidade (WELSH; MALE, 1992). Por conta disto, aloenxertos de pele originários a partir de doadores incompatíveis são rejeitados de maneira aguda em pacientes imunocompetentes, sendo que os sinais clínicos desta rejeição irão se manifestar dentro de duas semanas, conforme relata Nakano (1992). Esta rejeição é antígeno-específica, sendo que a epiderme é apontada como o componente mais antigênico da pele (NANCHALAL; WARD, 1992).

Dada a característica imunológica da pele, que a torna o tecido mais antigênico do corpo, tem-se o maior obstáculo para a sobrevivência do enxerto de pele, resultando em episódio de rejeição dentro de 10-12 dias sem terapia imunossupressiva. A tolerância para enxertos de pele é bem dificultada para ser induzida, exceto sobre condições particulares (SBANO et al., 2008).

São três os mais importantes tipos de antígenos de histocompatibilidade envolvidos na estimulação de rejeição aos enxertos: as moléculas do MHC classe I e classe II, além das moléculas dos grupos sanguíneos principais (TIZARD, 2009). Embora mantenham uma distribuição variável, todos eles são expressos na superfície das células enxertadas, sendo

que as moléculas do MHC classe I são encontradas em quase todas as células nucleadas, enquanto que as moléculas do MHC classe II distribuem-se de forma restrita e variável entre os mamíferos (TIZARD, 2009).

Considerando-se que as diferenças entre as moléculas do MHC de indivíduos aparentados são menores, é sempre preferível que os pais ou os irmãos do receptor sejam os doadores do enxerto. Caso esta situação não seja possível, o doador deve ser selecionado de forma aleatória e as inevitáveis respostas de rejeição deverão ser suprimidas pela administração de drogas, tais como a ciclosporina ou o tacrolimus (TIZARD, 2009).

Um dos principais avanços para o desenvolvimento de uma rotina bem-sucedida de aloenxertos foi o desenvolvimento de agentes imunossuppressores potentes, mas seletivos, tendo a ciclosporina como a droga de maior sucesso. Esta, trata-se de um medicamento com ação extremamente potente, mas seletiva, sobre os linfócitos T, utilizada especialmente no transplante de órgãos, pois seu efeito imunossupressor evita a rejeição (PAULINO, 2002).

A ciclosporina pode ser administrada tanto pela via oral, quanto intravenosa e sua característica de suprimir a síntese de interleucina 2 (IL-2) e outras citocinas, garante a sua atuação inibindo a ativação e expansão proliferativa de linfócitos T. Contudo, a utilização contínua de drogas imunossupressoras para prevenir a rejeição do tecido alotransplantado está associada a diversos riscos, oriundos dos potenciais efeitos colaterais (HORNER et al., 2009).

A própria ciclosporina pode desencadear graves efeitos colaterais, tais como: hipertensão, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, síndrome hemolítico-urêmica, dentre outros. Além disso, assim como as demais drogas imunossupressoras, a ciclosporina pode também aumentar a suscetibilidade a infecções oportunistas, bem como favorecer o desenvolvimento de certas neoplasias malignas (PAULINO, 2002). Nestas condições, sendo o indivíduo mais susceptível à infecção e esta verdadeiramente ocorrendo, a imunossupressão necessita ser suspensa e o enxerto costuma ser perdido por rejeição (WELSH; MALE, 1992).

A obtenção de um estado de tolerância permanente para o enxerto, no qual não haja uma resposta imune para os antígenos do doador, sem a utilização de uma terapia imunossupressora e por um longo período de tempo, tornou-se o principal objetivo na rotina de transplantação de órgãos sólidos humanos (SBANO et al., 2008). Por este motivo é que vários pesquisadores tentaram, em diversas pesquisas, reduzir a quantidade necessária de medicação imunossupressora e por conseguinte os efeitos secundários concomitantes. Tentando-se ainda, evitar a rejeição por indução de um estado imunologicamente mais competente (HORNER et al., 2009).

A utilização de terapias adjuvantes com aplicação de células estromais poderia, de acordo com alguns autores, minimizar drasticamente o uso contínuo de drogas imunossupressoras, além de reduzir os sintomas da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH), melhorar o quimerismo misto e promover a sobrevivência do aloenxerto (LECHLER et al., 2005; BLUESTONE et al., 2007).

As células estromais mesenquimais (CEM) são reconhecidas como células progenitoras multipotentes, virtualmente presentes em todos os tecidos adultos (HERZOG et al., 2003; PROCKOP et al., 2003). Diversos trabalhos com modelos animais já demonstraram que as CEM poderiam migrar para locais de lesão e auxiliar no reparo de tecidos feridos (TREICHEL et al., 2010; PINTO FILHO et al., 2013). Atualmente, especula-se que, além da já reconhecida atuação exercida por estas células no reparo ou regeneração de órgãos ou tecidos, elas também possuiriam propriedades imunorregulatórias (BARTHOLOMEW et al., 2002; DJOUAD et al., 2003; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; DENG et al., 2004; UCELLI et al., 2006; RASMUSSEN, 2006).

Células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea teriam um potencial terapêutico benéfico para o tratamento de auto-imunidade e a prevenção da rejeição do enxerto (CAPLAN; DENNIS, 2006; LE BLANC, 2006; UCELLI et al., 2007). O potencial das CEM para suprimir a resposta das células T alorreativas seria dado por propriedades imunomodulatórias exibidas por estas células (TSE et al., 2003; MAITRA et al., 2004; AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Diversos fatores secretados pelas CEM seriam capazes de induzir a supressão das células T (CAPLAN; DENNIS, 2006; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; BARTHOLOMEW et al., 2002; CHAPEL et al., 2003).

O impacto das CEM alogênicas para o transplante de órgãos ainda é pobremente investigado e os mecanismos através dos quais estas células poderiam exercer sua função imunossupressora, permanecem ainda não esclarecidos (XU et al., 2007). Em diversos estudos *in vitro*, o potencial para supressão da proliferação de células T foi demonstrado por CEM de diferentes espécies, tanto em condições autólogas, quanto alorreativas, em resposta a estímulos dependentes como o contato celular, além de mecanismos independentes (TSE et al., 2003; MEISEL et al., 2004; AGGARWAL; PITTENGER, 2005; RASMUSSEN et al., 2005).

A possibilidade de expandir células-tronco adultas ou embrionárias em cultivo para posterior utilização em medicina regenerativa ou desenvolvimento de novas drogas é o que mais tem atraído à atenção da comunidade científica recentemente. Entretanto, os cultivos celulares ainda apresentam uma enorme barreira no caminho do desenvolvimento destas

técnicas. Células-tronco mantidas por longo tempo em cultura acabam desenvolvendo anormalidades cromossômicas (MAITRA et al., 2005; BAKER et al., 2007; SARREN et al., 2009). Como resultado destas alterações, complicações como aumento da carcinogênese e perda do potencial funcional podem impedir a aplicação terapêutica destas células (RUBIO et al., 2005; FURLANI et al., 2009). Portanto, se faz extremamente importante a expansão das células-tronco com a melhor qualidade, no intuito de diminuir anormalidades cromossômicas para aplicação clínica (LI et al., 2010).

Considerando a possibilidade de utilização da terapia celular com o intuito de diminuir a quantidade necessária de drogas imunossupressoras para a manutenção de órgãos ou tecidos transplantados e sendo poucos os estudos que avaliam esta possibilidade e o nível de estresse oxidativo das células estromais mesenquimais quando em cultivo, este trabalho teve por objetivos:

- isolar e cultivar as células estromais mesenquimais (CEM) derivadas do tecido adiposo de coelho;
- determinar a eficácia do uso das células estromais mesenquimais (CEM) derivadas do tecido adiposo no reparo de feridas de pele;
- quantificar o grau de estresse oxidativo de células estromais mesenquimais em cultivo;
- avaliar a viabilidade do alotransplante de pele a fresco em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), utilizando como agente imunomodulador células estromais mesenquimais (CEM), associadas ou não à ciclosporina;
- verificar após o alotransplante de pele a fresco, o comportamento clínico e funcional dos enxertos por meio da avaliação dos animais e do tecido transplantado;
- comparar os níveis de rejeição sem e com o uso das CEM, associadas ou não à ciclosporina;
- analisar a viabilidade e rejeição do tecido transplantado, por meio de histologia;
- dosar os níveis de citocinas, através das interleucinas 6 e 10 e o Fator de Necrose Tumoral (TNF) ao término do período de avaliação.

Este trabalho foi redigido em forma de artigos, seguindo-se as normas para a confecção de tese da UFSM (MDT, PRPGP/UFSM, 2012).



## **2. ARTIGO SUBMETIDO A PUBLICAÇÃO**

Archives of Veterinary Science - Revista Científica do Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná

**Transplante de fração vascular estromal ou células estromais mesenquimais para o  
reparo de feridas cutâneas experimentais em coelhos**

**Stromal vascular fraction or mesenchymal stromal cells transplantation for repair of  
experimental skin injuries in rabbits**

**Tiago Luis Eilers Treichel<sup>1</sup> Ney Luis Pippi<sup>2</sup>**

### **RESUMO**

A pele apresenta-se como maior órgão do corpo, sendo responsável por diversas funções de extrema importância. Pelo fato de estar sempre em constante exposição ao meio externo, está permanentemente sujeita à traumas. Processos biológicos altamente complexos estão presentes no reparo da pele, envolvendo muitos tipos de células, matriz extracelular e fatores regulatórios. O uso da terapia celular torna-se cada vez mais uma alternativa, visando acelerar o processo cicatricial, diminuindo tempo de internação hospitalar e desgaste do paciente, principalmente com a cicatriz resultante após o reparo da pele. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de cicatrização da fração vascular estromal (FVE) e das células estromais mesenquimais (CEM) e comparar qual delas apresenta melhor eficácia e maior facilidade de uso. Para este estudo foram utilizados 15 coelhos divididos em três

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n.1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: tiagoufsm@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

<sup>2</sup> Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

grupos. Foi criada uma ferida de pele de 4 cm<sup>2</sup> no tórax de todos os coelhos. Os animais do grupo A não receberam nenhum tipo de tratamento, enquanto que no grupo B foram tratados com FVE do tecido adiposo e no grupo C foram tratados com CEM. As aplicações foram realizadas no leito da ferida, imediatamente após a criação do defeito. Biópsias foram realizadas aos 7, 14 e 21 dias, além da mensuração das feridas para planimetria. A análise histológica demonstrou que as etapas da cicatrização ocorreram de maneira mais satisfatória nos grupos tratados. Na análise estatística, os dois grupos tratados não apresentaram diferença significativa entre si, mas quando comparados com o grupo controle houve diferença. Concluiu-se que tanto o uso da FVE quanto das CEM são viáveis e apresentaram melhores resultados que o controle, inclusive tornando a cicatriz resultante do processo esteticamente aceitável.

**Palavras-chave:** células-tronco; cicatrização; pele; tecido adiposo

## **ABSTRACT**

The skin is the largest organ of the body, being responsible for different utmost important functions. Because it is under exposure to the external environment, it is constantly subject to trauma. Highly complex biological processes are present in skin repair, involving many cell types, extracellular matrix and regulatory factors. The use of cell therapy becomes increasingly an option to accelerate the healing process, decreasing the length of hospital stay, and patient's wear, especially with the resulting scar after skin repair. This study aims to evaluate the healing potential of the stromal vascular fraction (SVF) and mesenchymal stromal cells (MSC) in order to compare which one presents a better efficiency and ease of use. For this study we used 15 rabbits divided into three groups. We created a skin wound of 4 cm<sup>2</sup> in chest all rabbits. Group A animals received no treatment, while the ones in group B were treated with SVF adipose tissue, and the others of group C were treated with MSC.

Applications were performed in the wound bed immediately after the creation of the defect. Biopsies were performed at 7, 14 and 21 days, in addition to the measurement of wound planimetry. Histological analysis demonstrated that healing stages occurred more satisfactorily in the treated groups. According to statistical analysis, the two treated groups showed no significant difference between them, but there was a difference when comparing them to the control group. In conclusion, we saw that both the use of SVF and MSC are feasible and showed better results than the control, besides making the resulting scar aesthetically acceptable.

**Key words:** adipose tissue; skin; stem cells; wound healing

## INTRODUÇÃO

A pele apresenta-se como maior órgão do corpo, sendo responsável por diversas funções de extrema importância, tais como: primeira linha de defesa do organismo, funcionando como uma barreira mecânica para patógenos, regula a temperatura corporal, previne a desidratação do corpo, além de promover sensações a partir do tato (Proksch et al., 2008).

Pelo fato de estar sempre em constante exposição ao meio externo, a pele está permanentemente sujeita à traumas, sendo que, cicatrizes resultantes de soluções de continuidade não afetam o paciente somente pela questão estética, mas também de maneira psicossocial (Brown et al., 2008).

Associado a isto, feridas crônicas afetam gravemente a qualidade de vida do paciente (Franks et al., 2006), acarretando em expansivos gastos médicos, principalmente em tratando-se de saúde pública (Ubbink et al., 2008). Ainda, como outro fator que corrobora para a importância da terapia com células-tronco, Franks et al. (2006) citam que as feridas de pele estão frequentemente correlacionadas a pessoas e animais de idade mais avançada, justamente

quando o organismo passa a apresentar uma pobre reserva de células-tronco funcionais (Zouboulis et al., 2008).

É sabido que o principal objetivo da cicatrização de feridas de pele é reparar o defeito e restaurar, pelo menos em parte, a perda da integridade, as forças de tensão e a função de barreira da pele (Singer et al., 2000). Entretanto, tratando-se de feridas de pele de grande extensão, causadas por queimaduras, o prognóstico pode não ser satisfatório, seja pela formação de cicatrizes ou pela perda de funções dos anexos da pele, afetando gravemente a qualidade de vida do paciente após sua recuperação (Fu e Li, 2009).

De maneira bastante satisfatória, diversas pesquisas tem trazido à tona um melhor entendimento da biologia das células-tronco e experimentos tem demonstrado que células-tronco adultas podem participar da regeneração de órgãos e tecidos em quase todos os tipos de lesões (Fu e Li, 2009).

Embora as células-tronco embrionárias apresentem uma grande capacidade de auto-renovação e plasticidade, seu uso se torna restrito, por questões científicas, políticas e éticas. Já o uso de células-tronco adultas, especialmente células estromais mesenquimais (CEM), não compartilham de muitos destes problemas. Kim et al. (2007) citam que estas células podem ser isoladas da medula óssea ou de outros tecidos, como o tecido adiposo.

Meirelles et al. (2006) citam que propriedades específicas das células-tronco, tais como a clonogenicidade – capacidade de ativar sua duplicação quando em ambientes com baixa densidade de células, a multipotencialidade – possibilidade de originar células mais especializadas em grandes quantidades e a capacidade autorrenovação, aumentam o potencial terapêutico das células-tronco e despertam cada vez mais o interesse dos pesquisadores para novas possibilidades de tratamento e reparo para diferentes órgãos e tecidos.

Para Li et al. (2006) processos biológicos altamente complexos estão presentes no reparo da pele, envolvendo muitos tipos de células, matriz extracelular e fatores regulatórios.

Especula-se que para o reparo de tecidos lesados, duas fontes principais de células estejam envolvidas: 1) as células-tronco presentes no próprio tecido, como as no caso da epiderme (Janes et al., 2002) ou 2) células-tronco originárias da medula óssea, como as células estromais mesenquimais e as hematopoiéticas que migram para os tecidos injuriados (Li et al., 2006).

Yokomizo et al. (2011) propõe que, com relação a outras técnicas para o reparo de tecidos, a terapia celular com células mesenquimais adultas apresente vantagens, permitindo, desta maneira, uma regeneração de alta qualidade, sem a formação de cicatrizes ou fibrose.

Diversos estudos já realizados comprovaram a presença de células-tronco no tecido adiposo humano e, mais do que isso, compararam o potencial de diferenciação destas células com as isoladas da medula. Um dos primeiros trabalhos a sustentar esta teoria foi publicado por Zuk et al., ainda em 2002.

Além disto, outros fatores contribuem para o aumento dos cultivos de células estromais mesenquimais adipócito-derivadas, pois, como bem coloca Yokomizo et al. (2011) – a obtenção do tecido adiposo é fácil, causando mínimo desconforto para o paciente e, associado a isto, capacidade proliferativa maior quando comparada com as células derivadas da medula óssea. Por conta disso, sugere-se que o tecido adiposo representa uma fonte ideal de células-tronco autólogas.

Considerando o que foi exposto anteriormente, pode-se inferir que o tecido adiposo trata-se de uma fonte importante de células-tronco mesenquimais para diferentes procedimentos de terapias celulares, principalmente na dermatologias cirúrgica e cosmiátrica, pois as células podem ser obtidas em grandes quantidades, a partir de cirurgias de lipoaspiração, com material que seria rotineiramente descartado (Casteilla et al. 2004).

Desta maneira, este trabalho tem como objetivos: isolar a fração vascular estromal do tecido adiposo de coelhos, promover o cultivo desta fração para obtenção de células estromais

mesenquimais, utilizar tanto a fração quanto as células cultivadas para o reparo de ferida de pele nesta mesma espécie, avaliando o potencial de cicatrização e comparando qual delas apresenta melhor eficácia e maior facilidade de uso.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria e seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), baseados na Lei nº 11.794, de 08.10.2008 e no DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

Para a elaboração deste experimento foram utilizados 15 (quinze) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, machos, com idade aproximada de seis meses e massa corporal média de três quilogramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram submetidos ao exame clínico completo e exames laboratoriais como hemograma e perfil bioquímico e para tal, foram colhidos 3 mL de sangue da veia jugular de cada animal.

Descartadas quaisquer alterações que os desqualificassem para o experimento, os animais foram alojados em boxes individuais e mantidos com ração industrializada e água *ad libitum*, por um período não inferior a 15 dias, para sua adaptabilidade às condições ambientais e ao convívio humano, bem como para detecção de possíveis enfermidades.

Após a constatação de que os animais estavam aptos a participar do experimento e respeitado o período de adaptabilidade, os coelhos foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais com cinco animais em cada. Um outro coelho alheio aos demais foi utilizado para a colheita de tecido adiposo.

O primeiro grupo ou Grupo A foi considerado como controle negativo. Os animais do segundo grupo ou Grupo B foram submetidos à colheita de tecido adiposo e receberam a

fração vascular estromal (FVE) imediatamente após a colheita de tecido adiposo e processamento desta fração em laboratório. Por fim, os animais do terceiro grupo ou Grupo C receberam as células estromais mesenquimais (CEM) após cultivo da FVE em laboratório, por período superior a 14 dias.

No período que antecedia ao procedimento cirúrgico, todos os animais foram pesados e submetidos à tricotomia ampla, da região torácica, para criação da ferida e das orelhas, para acesso à veia auricular caudal. Para a realização do procedimento cirúrgico os animais permaneceram em jejum alimentar e hídrico por duas horas previamente à intervenção.

A medicação pré-anestésica foi constituída a partir da associação de cloridrato de cetamina ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intramuscular (IM). A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano ao efeito, através do uso de máscara, com sistema inalatório aberto, vaporizado em 100% de oxigênio, com respiração espontânea.

Para colheita do tecido adiposo, após antissepsia e colocação dos panos de campo foi realizada com bisturi uma incisão de pele com cerca de 4 cm na região dorsal, entre as escápulas. Abaixo da pele o tecido adiposo (TA) é facilmente visualizado e procede-se a colheita de 10 gramas, pesado em balança e depositado em um frasco de vidro estéril contendo solução de Hank's. O espaço morto foi reduzido com fio absorvível sintético 3-0 em padrão contínuo simples e a derme ocluída com fio inabsorvível sintético 4-0 em padrão isolado simples. O frasco contendo o TA foi encaminhado ao Laboratório de Terapia Celular Regenerativa da UFSM para ser processado.

No interior de uma capela de fluxo laminar, abria-se o recipiente contendo o fragmento de TA e com uma pinça de dissecação o tecido transferido para uma placa de Petri.

Com o auxílio de uma tesoura, seccionava-se a gordura 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 em temperatura ambiente, com solução de Hank's e com o auxílio de uma peneira que não permita a passagem dos fragmentos de gordura. A lavagem ocorria três vezes, até que o tecido e a solução de Hank's adquirissem uma aparência mais clara. Concluída esta etapa, a gordura era transferida para um tubo de polipropileno estéril de 50 mL e adicionada à mesma, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II, na proporção 1:3 (volume:volume), ou seja, para os dez gramas de gordura eram necessários 30 mL de colagenase diluída.

Os tubos contendo o TA com a colagenase permaneciam no banho-maria a uma temperatura de 37°C e eram agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, a colagenase promove a digestão do colágeno, permitindo que diversos tipos celulares sejam liberados do tecido, o que gera um aspecto leitoso após, aproximadamente, 25 minutos. Ao ser observado o aspecto leitoso, os tubos eram retirados do banho-maria e neutralizados através da adição de meio de cultivo completo – Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), em um volume de 1:1.

Os tubos de TA com o meio completo adicionado eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante dez minutos. O sobrenadante descartado e a fração resultante lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 400 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. O procedimento de lavagem era repetido novamente e ao término da nova centrifugação o sobrenadante, contendo a fração adipocitária, era desprezado e o botão celular, contendo a fração vascular estromal (FVE), era ressuscitado em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e imediatamente aplicado no leito da ferida dos animais do grupo B.



Para aplicação nos animais do Grupo C, foi colhido TA de um único doador. O processamento dava-se da mesma maneira que para o transplante autógeno, entretanto, após a obtenção da FVE, a mesma era plaqueada em garrafas de cultura primária de 75cm<sup>2</sup>. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C, com concentração de 5% de dióxido de carbono. Após as primeiras 48 horas, o meio de cultivo era trocado, também por DMEM com 10% de SFB.

Sempre que o cultivo atingia confluência de 90% visualizado em microscópio invertido, o repique era realizado através de tripsinização e expandido em outra garrafa. Desta maneira, células não aderentes eram descartadas, permanecendo em cultivo apenas as aderentes. Na quinta passagem realizada, aproximadamente aos 14 dias, os cultivos foram tripsinizados, lavados com meio de cultivo DMEM e preparados em tubos *Eppendorf* para aplicação nos animais do Grupo C.

Para criação da ferida de pele, o animal era devidamente anestesiado, conforme protocolo descrito anteriormente, previamente tricotomizado e com a antissepsia realizada, um fragmento de pele com dimensão de 2 x 2 cm era excisado, sobre a parede lateral direita do tórax, na região das últimas costelas. A hemostasia foi realizada por compressão mecânica dos vasos sangrantes.

Após a criação do defeito, os animais dos dois grupos tratados (B e C) receberam uma aplicação local de  $2 \times 10^6$  células estromais mesenquimais, por via subcutânea, nas bordas da ferida. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam curativo compressivo com gaze e atadura.

No período de pós-operatório imediato os animais receberam para analgesia sulfato de morfina (5 mg.kg<sup>-1</sup>), via intramuscular (IM), quatro vezes ao dia, durante três dias. Os animais foram submetidos à limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica e troca do curativo, uma vez ao dia.

No período de pós-operatório os animais foram avaliados clinicamente, uma vez ao dia, quantos aos parâmetros fisiológicos e quanto ao seu comportamento e retorno da alimentação. As feridas foram registradas através de fotografias e tiveram suas medidas de altura e largura mensuradas a cada dois dias, para obtenção da medida de área total da ferida.

Fragments de pele para biópsias foram retirados aos 7, 14 e 21 dias. Para esta colheita, os animais foram anestesiados conforme o mesmo protocolo descrito. Foi realizada uma incisão de pele na borda da ferida com o auxílio de um *punch* para biópsia de pele de 6 mm, removendo-se a interface entre o tecido sadio e o leito da ferida, não havendo necessidade de sutura.

Após a remoção do fragmento de pele, o mesmo foi fixado em formol tamponado e emblocado 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.

Na análise estatística das medidas de área da ferida, o modelo matemático utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial duplo 3x3 (3 grupos e 3 tempos):  $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}$ .

Para a pressuposição de normalidade dos dados, os valores obtidos foram submetidos ao teste de *Shapiro-Wilk*. A homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de *Hartley*. A análise de variância do modelo não identificou a interação entre os fatores, portanto apenas os modelos simples foram verificados. Para o fator grupo (qualitativo) a comparação de médias foi feita pelo teste de *Tukey* e para o fator tempo (quantitativo) os dados foram submetidos à análise de regressão linear. Foi utilizado o software R (2013) para as análises estatísticas, empregando-se o nível de 5% de significância em todos os testes.

Os animais foram avaliados criteriosamente durante o período dedicado a este estudo. Após o término do experimento e período de avaliação pós-cirúrgica de até 21 dias, todos os coelhos foram encaminhados para doação.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O primeiro resultado de importância a ser observado com relação a este trabalho diz respeito a utilização não só de células autógenas, como no caso da fração vascular estromal, mas também do uso de CEM alógenas, sem que isto tenha causado algum tipo de reação nos animais que receberam estas aplicações. A mesma situação foi descrita por Liu et al. (2006) quando os autores citam que nem as células autólogas, nem as alógenas induziram imunorreação no hospedeiro, na aplicação local e mesmo na administração sistêmica.

O reparo da pele após uma situação de injúria trata-se de um intrincado e complexo processo celular. As fases clássicas da cicatrização do tecido incluem: inflamação, proliferação e remodelação, estando as células-tronco envolvidas neste mecanismo (Nauta et al., 2011).

Quando ocorre uma injúria, o primeiro estágio no processo cicatricial, a inflamação, é iniciado. De acordo com Li e Fu (2012) é nesta primeira fase que são recrutadas muitas células inflamatórias para o sítio da lesão, tais como os neutrófilos e os monócitos (macrófagos). Na avaliação histológica deste trabalho, foram encontrados numerosos macrófagos do tecido celular subcutâneo dos grupos tratados.

Conforme cita Li e Fu (2012), os macrófagos são algumas das principais células do sistema imune inato, desempenhando várias funções na inflamação, imunidade e cicatrização das feridas. Ainda que não tenha sido possível determinar o motivo pelo qual haviam mais macrófagos nas feridas dos grupos tratados, pode-se pressupor que a presença destas células

contribuiu de certa maneira para o sucesso do tratamento, pois possivelmente atraíram as células-tronco para o sítio de lesão, através do fenômeno denominado de *homing*.

Especula-se que as CEM possuam funções anti-inflamatórias não só *in vitro*, mas *in vivo* também, secretando fatores solúveis que diminuem a inflamação, as reações imunes e apoptose. Galindo et al. (2011) corroboram com esta teoria, ao afirmar que o transplante de CEM diminui de maneira significativa estes fatores. Desta maneira, tem-se que a primeira contribuição das células-tronco para tratamento de lesões seria o seu possível potencial anti-inflamatório.

A fase proliferativa na cicatrização das feridas é caracterizada por angiogênese, formação de tecido de granulação, epitelialização e contração da ferida (Li e Fu, 2012). O tecido de granulação é formado basicamente por fibroblastos e novos vasos sanguíneos. Aqui, novamente nota-se uma melhor atividade celular nos grupos tratados, agora aos 14 dias, quando a derme analisada em algumas amostras destes grupos, estava representada por um tecido de granulação maduro, embora com poucos anexos e infiltrado por alguns polimorfonucleares isolados ou em focos entre feixes de colágeno. Ainda foi possível visualizar aos 14 dias, dilatação de vasos linfáticos e até mesmo a regeneração de fibras musculares no tecido celular subcutâneo.

Os fibroblastos, células formadas do tecido de granulação, são também a maior população de células estromais na pele e sua principal função é manter a integridade estrutural do tecido conectivo. Para alguns pesquisadores, como Smith et al. (2010) e Yoon et al. (2010), as CEM regulariam a proliferação, migração e expressão gênica para acelerar a cicatrização das feridas e também desempenhariam um papel de extrema importância no ordenamento e organização da produção de matriz para minimizar a formação de cicatrizes.

Kim et al. (2007) também citam esta possibilidade, ao afirmar que as CEM adipócito-derivadas estimulam a migração dos fibroblastos e regulam os níveis de colágenos

do tipo I e III e fibronectina. Ainda nesta segunda fase do processo cicatricial, a neovascularização também é importante, pois é neste momento que as CEM secretam e liberam muitos fatores, tais como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), entre outros que contribuem para a angiogênese (Li e Fu, 2012).

Altman et al. (2008) também sustentam esta hipótese afirmando que, embora não seja conhecida a forma pela qual as células-tronco dão origem a novos vasos sanguíneos no tratamento de feridas, elas são capazes de se diferenciar em células endoteliais progenitoras e promover angiogênese.

Tanto a contração dos fibroblastos na derme quanto a migração dos queratinócitos a partir da epiderme desempenham importante papel no fechamento das feridas. Para Kim et al. (2007) as CEM derivadas de tecidos adiposo tem demonstrado capacidade para reduzir o tamanho das feridas e acelerar a reepitelização em estudos animais *in vivo*, da mesma maneira como neste trabalho pode ser observada uma velocidade maior de cicatrização nos grupos tratados com células-tronco.

Na última fase deste processo, durante a remodelação, o colágeno é remodelado e realinhado conforme as linhas de tensão e as células que não se adaptam a esta necessidade são removidas por apoptose (Gennero et al., 2011). Ainda assim, remodelações patológicas que resultam na formação de cicatrizes, podem ser observadas em diversas feridas de pele. Estudos anteriores demonstraram que a aplicação de CEM contribuiu para a remodelação e atenuação do remodelamento anormal de muitos tecidos, como no caso da pele (Neuss et al., 2010).

Esta especulação vai ao encontro do que pode ser avaliado clinicamente neste trabalho, haja vista que nas avaliações visuais, ao final do período de acompanhamento, pode-se perceber que os grupos tratados apresentaram cicatrização completa das feridas, com área

cicatricial de tamanho diminuto e bastante discreta, conforme pode ser visualizado e comparado na figura 01.

Através dos testes estatísticos aplicados para estas amostras, pode-se perceber que, ao final do período de avaliação, o grupo controle apresentou uma área média de ferida de  $2,70 \pm 1,87 \text{ cm}^2$ , enquanto que os dois grupos tratados, seja com a fração vascular estromal ou com as células estromais mesenquimais, apresentaram a área média de ferida com  $0,88 \pm 1,09$  e  $1,41 \pm 1,46 \text{ cm}^2$ , respectivamente. Os dois grupos tratados não apresentaram diferença estatística significativa entre si, mas quando comparados com o grupo controle, esta diferença existiu (Tabela 01).

Além do estudo qualitativo, aplicou-se também nestes dados a análise estatística de regressão linear para avaliação do fator tempo, conforme demonstrado na Figura 2. Nesta nova análise quantitativa, é possível perceber que os grupos B e C mantiveram a velocidade de cicatrização bastante próxima entre si, aos 7 e 14 dias, com cicatrização completa da ferida ao término do período de avaliação, aos 21 dias. Enquanto isto, o grupo controle sempre manteve uma velocidade de cicatrização mais retardada, sendo que a ferida somente teve sua cicatrização completada após os 21 dias de avaliação deste trabalho.

## CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos após a realização desta pesquisa e considerando as condições em que foi executada, é possível concluir que o isolamento da fração vascular estromal do tecido adiposo de coelhos é uma técnica viável de ser executada, bem como o cultivo desta fração para obtenção das células estromais mesenquimais, forneceu número suficiente de células para aplicação nos animais. Com relação à cicatrização das feridas, pode-se observar que no grupo controle houve uma evolução normal da ferida, temporal e morfológica, enquanto que nos grupos tratados a epiderme mostrou espessura maior e o tecido

de granulação mostrou-se ligeiramente mais maduro do que nos controles. O uso da fração ou das células cultivadas não apresentou nenhuma reação nos animais. Os dois grupos tratados não apresentaram diferença estatística entre si com relação a área da ferida, ao final do período de avaliação, mas ambos apresentaram diferença quando comparados com o grupo controle. Sugere-se o uso das células estromais mesenquimais cultivadas conforme estas condições, pela praticidade e possibilidade de pronto emprego, ao se optar pela terapia celular para o reparo de feridas cutâneas ou em demais tecidos que vierem a ser pesquisados.

### **AGRADECIMENTOS**

O autor agradece a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que viabilizou a bolsa de estudo de mestrado, que possibilitou o desenvolvimento deste e de outros projetos de pesquisa.

### **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

O presente projeto foi apresentado ao Comitê Interno de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria e aprovado com parecer número 049/2011, na reunião do dia 09 de maio de 2011.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALTMAN, A.; MATTHIAS, N.; YAN, Y. et al. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v.29, p.1431-1442, 2008.

BROWN, B.C.; MCKENNAC, S.P.; SIDDHIC, K. et al. The hidden cost of skin scars: quality of life after skin scarring. **Journal Plastic Reconstructive Aesthetic Surgery**, v.61, p.1049-1058, 2008.

CASTEILLA, L.; CHARRIER, G.; LAHARRAGUE, P. et al. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: come back to sources. **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique**, v.49, n.5, p.409-418, 2004.

FRANKS, P.J.; MOFFATT, C.J.; DOHERTY, D.C. et al. Longer-term changes in quality of life in chronic leg ulceration. **Wound Repair Regeneration**, v.14, p.536-541, 2006.

FU, X.; LI, H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. **Cell Tissue Research**, v.335, p.317-321, 2009.

GALINDO, L.T.; FILIPPO, T.R.; SEMEDO, P. et al. Mesenchymal stem cell therapy modulates the inflammatory response in experimental traumatic brain injury. **Neurology Research International**, 564089, 2011.

GENNERO, L.; DE SIENA, R.; DENYSENKO, T. et al. A novel composition for in vitro and in vivo regeneration of skin and connective tissues. **Cell Biochemistry and Function**, v.29, p.311-333, 2011.

JANES, S.M.; LOWELL, S.; HUTTER, C. Epidermal stem cells. **Journal Pathology**, v.197, p.479-491, 2002.

KIM, W.S.; PARK, B.S.; SUNG, J.H. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal Dermatology Science**, v.48, p.15-24, 2007.

LI, H.; FU, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. **Cell Tissue Research**, v.348, p.371-377, 2012.

LI, H.; FU, X.; OUYANG, Y. et al. Adult bone-marrow-derived mesenchymal stem cells contribute to wound healing of skin appendages. **Cell Tissue Research**, v.326, p.725-736, 2006.



LIU, H.; KEMENY, D.M., HENG, B.C. et al. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. **Journal Immunology**, v.176, p.2864-2871, 2006.

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, n.11, p.2204-2213, 2006.

NAUTA, A.; GURTNER, G.C.; LONGAKER, M.T. Wound healing and regenerative strategies. **Oral Diseases**, v.17, p.541-549, 2011.

NEUSS, S.; SCHNEIDER, R.K.; TIETZE, L. Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. **Cells Tissues Organs**, v.191, p.36-46, 2010.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1063-1072, 2008.

SINGER, A.J.; THODE, H.C.J.; MCCLAIN, S.A. Development of a Histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. **Academic Emergency Medicine**, v.7, p.1083-1088, 2000.

SMITH, A.N.; WILLIS, E.; CHAN, V.T. et al. Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. **Experimental Cell Research**, v.316, p.48-54, 2010.

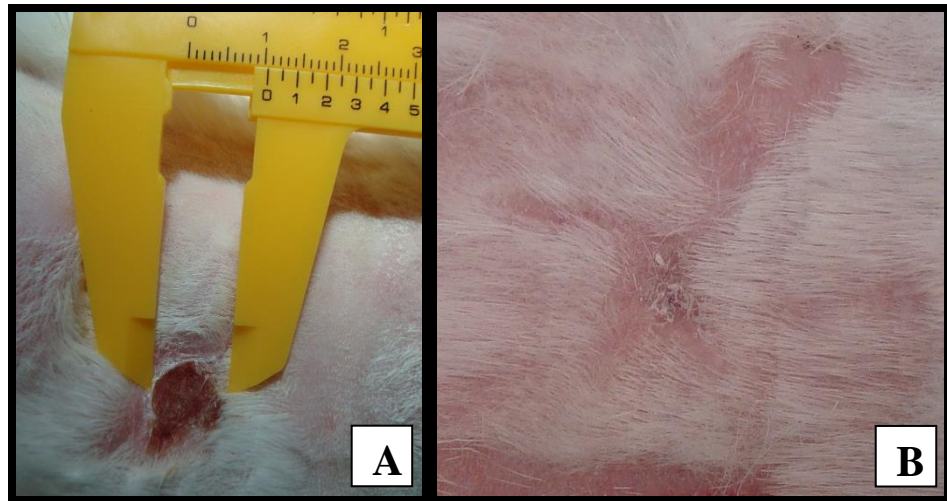
UBBINK, D.T.; WESTERBOS, S.J.; NELSON, E.A. et al. A systematic review of topical negative pressures therapy for acute and chronic wounds. **Brazilian Journal Surgery**, v.95, p.685-692, 2008.

YOKOMIZO, V.M.G.; BENEMOND, T.M.H.; BRESSAN, F.F. et al. Células-tronco derivadas de tecido adiposo: isolamento, cultivo *in vitro* e perspectivas de utilização em dermatologia. **Surgery Cosmetic Dermatology**, v.3, n.1, p.55-59, 2011.

YOON, B.S.; MOON, J.H.; JUN, E.K. et al. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. **Stem cells and Development**, v.19, p.887-902, 2010.

ZOUBOULIS, C.; ADJAYE, J.; AKAMATSU, H. et al. Human skin stem cells and the ageing process. **Experimental Gerontology**, v.43, n.11, p.986-997, 2008.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n.12, p.4279-4295, 2002.

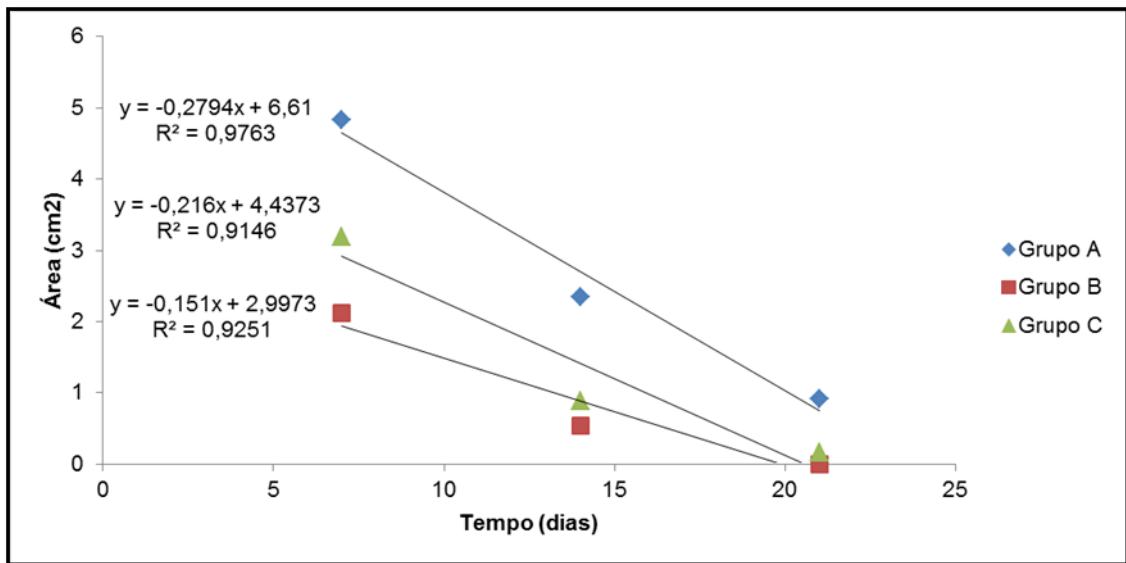


**Figura 1** – Aspecto da fase final da cicatrização das lesões cutâneas aos 21 dias de pós-operatório. A letra em destaque corresponde o grupo ao qual pertence o animal.

**Tabela 1** – Comparação entre as médias de altura, largura e área obtidas dos grupos controle (A), fração de células (B) e células cultivadas (C) aos 21 dias após a criação da ferida (média  $\pm$  desvio padrão).

Grupo	Altura (cm)	Largura (cm)	Área (cm <sup>2</sup> )
A	1,61 $\pm$ 0,63a	1,47 $\pm$ 0,62a	2,70 $\pm$ 1,87a
B	0,71 $\pm$ 0,66c	0,69 $\pm$ 0,63b	0,88 $\pm$ 1,09b
C	1,15 $\pm$ 0,72b	0,92 $\pm$ 0,61b	1,41 $\pm$ 1,46b

Valores com letras distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,001).



**Figura 2** – Análise estatística de regressão demonstrando a média da cicatrização completa em dias, para os três grupos analisados.

### **3. ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade

Federal de Santa Maria, RS

#### **Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas do tecido adiposo de coelhos em cultivo**

#### **Evaluation of oxidative stress in adipocytes derived Mesenchymal Stromal Cells in growing rabbits**

**Tiago Luis Eilers Treichel<sup>3</sup> Ney Luis Pippi<sup>4</sup>**

#### **RESUMO**

A possibilidade de expandir células estromais adultas ou embrionárias em cultivo para posterior utilização em medicina regenerativa ou desenvolvimento de novas drogas é o que mais tem atraído à atenção da comunidade científica recentemente. As atividades celulares normais requerem um estado redox balanceado, sendo que qualquer distúrbio neste equilíbrio pode resultar em estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o isolamento e o cultivo das células estromais mesenquimais (MSCs, do inglês mesenchymal stromal cells) a partir de amostras de tecido adiposo processadas imediatamente após a colheita e com 12 ou 24 horas de intervalo, mantendo-as em cultivo até a nona passagem. Para a elaboração deste experimento foram utilizadas amostras de tecido adiposo de três coelhos da raça Nova Zelândia Branco, machos e com idade aproximada de seis meses. As

---

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n.1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: tiagoufsm@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

amostras de cada animal foram divididas em três novas amostras, sendo que a primeira foi processada imediatamente após a colheita, e as demais com 12 e 24 horas de intervalo. Os isolamentos da FVE foram realizados de maneira satisfatória em todas as amostras. Não foi observada diferença estatística significativa na primeira passagem no teste de Dunnett, para a quantidade e a viabilidade de células, entre os cultivos realizados nos três intervalos de tempo. O ensaio da DCFH-DA demonstrou que os cultivos imediatos tiveram um aumento da taxa total de ROS a partir da quarta passagem; células cultivadas após 12 horas, a partir da terceira passagem; e após 24 horas, a partir da terceira passagem, mas com um outro episódio durante a nona passagem. O teste de PicoGreen demonstrou que os cultivos imediatos obtiveram uma maior liberação de DNA apenas na sétima e nona passagens; 12 horas, morte celular somente na nona passagem; 24 horas, durante as três últimas passagens avaliadas. Nas condições em que o experimento foi realizado e com base nos resultados obtidos é possível concluir que o tecido adiposo pode ser cultivado até um dia após a colheita, desde que mantido em condições ideais. Recomenda-se ainda a utilização destas células no momento da terceira passagem, quando se apresentam em grande quantidade, altamente viáveis e sem indicação de que estejam sob situações de estresse.

**Palavras-chave:** cultivo celular, passagens, quantificação celular, viabilidade celular, espécies reativas de oxigênio.

## **ABSTRACT**

The possibility of expanding adult or embryonic stromal cells in culture for subsequent use in regenerative medicine and development of new drugs has recently attracted the attention of the scientific community. Normal cellular activities require a balanced redox state, and any disturbance in this balance can result in oxidative stress. The goal of this work was to evaluate the isolation and cultivation of MSCs from samples of adipose tissue

processed immediately after harvest and after 12 or 24 hours interval, keeping them in cultivation until the ninth passage. To prepare this experiment, samples of adipose tissue from three New Zealand White rabbits, males, approximately six months old, were used. The samples from each animal were divided into three new samples, the first of which was processed immediately after harvest, and the others with an interval of 12 and 24 hours. The SVF isolations were satisfactorily performed for all samples. No statistically significant difference was observed in the first pass Dunnett's test, for cell number and viability, among cultures performed between the three time intervals. The DCFH-DA assay showed that the cultures had an immediate increase in the total rate of ROS from the fourth passage; cells cultured after 12 hours, after third passage; and after 24 hours from the third passage, but with another episode during the ninth passage. PicoGreen test showed that immediate cultures had a higher DNA release only at the seventh and ninth passages; 12 hours, cell death only at ninth passage; 24 hours, during the last three evaluated passages. In conditions in which the experiment was conducted, and based on the obtained results, it is possible to conclude that adipose tissue can be grown up to a day after harvest, since it is kept in ideal conditions. It is further recommended the use of these cells at the time of the third passage, when they are present in large quantities, highly viable and with no indication that they are under stress.

**Key words:** cell culture, passages, cell quantification, cell viability, reactive oxygen species.

## INTRODUÇÃO

Com relação ao uso de células estromais mesenquimais (MSC, da sigla em inglês) derivadas de diferentes sítios, LEU et al. (2010) citam a utilização das adipócito-derivadas (ADSCs) como mais vantajosa, haja vista que a técnica para colheita é menos invasiva e um número praticamente ilimitado de células pode ser fornecido através de cultivo *in vitro*. O



mecanismo pelo qual estas células poderiam contribuir no local da lesão permanece ainda desconhecido.

Atualmente são três as teorias mais aceitas na tentativa de explicar o que ocorre durante a terapia celular: fusão entre as MSCs e as células originárias do tecido que recebeu a terapia, diferenciação das MSCs em células especializadas no local da lesão ou a contribuição poderia dar-se através de mecanismo parácrino, no qual as células liberariam fatores de crescimento no leito da ferida (NARDI; MEIRELLES, 2006). Esta última parece ser a teoria mais aceita pela comunidade científica.

Aceitando-se este último mecanismo como o que melhor poderia explicar a atuação destas células em um sítio de lesão, as características parácrinas das ADSCs tem se demonstrado diferentes daquelas originárias da medula óssea, apresentando mais efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (BANAS, 2008).

Nardi; Meirelles (2006) citam que as MSCs estão virtualmente presentes em todos os órgãos e tecidos de pessoas e animais, ou seja, cada estrutura teria seu compartimento de células estromais, que permaneceriam quiescentes no seu microambiente aguardando que algum estímulo as mobilizassem para o reparo daquele órgão ou tecido. Entretanto, em alguns casos quando a lesão é muito extensa ou crônica, este “reservatório” de células pode não ser suficiente para o tratamento proposto e células de outros nichos, como da medula óssea ou do tecido adiposo poderiam ser mobilizadas.

Ainda não é claro o mecanismo pelo qual estas células são estimuladas a deixar as condições ótimas de seu microambiente no nicho celular para migrar e reparar um órgão ou tecido lesionado. Provavelmente, um aspecto que pode afetar diretamente a autorrenovação e diferenciação destas células seja a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) no microambiente (SMITH et al., 2000; PERVAIZ et al., 2009; JUNTILLA et al., 2010).

O desbalanceamento entre os níveis de ROS e antioxidantes gera condições de estresse oxidativo que será prejudicial para as células. Entretanto, evidências sugerem que sob condições homeostáticas, as ROS são fundamentais para as vias de transdução múltipla de sinais, agindo como um segundo mensageiro e regulando funções como proliferação, diferenciação e apoptose (MONTEIRO; STERN, 1996; DROGE, 2002).

O aparato de proteção das células consiste principalmente de proteínas antioxidantes como as superóxido dismutases (SOD), presentes na mitocôndria (SOD2) e no citoplasma (SOD1) das células (ZELKO et al., 2002). As SODs intracelulares convertem superóxido em peróxido de hidrogênio. Este por sua vez, é reduzido em água e oxigênio pela catalase e glutathione peroxidase-1 (GPx), localizadas principalmente no peroxissomo e citoplasma, respectivamente (MORENO et al., 1995).

Condições de estresse oxidativo podem ser geradas por uma diminuição das proteínas antioxidantes ou um aumento no ROS (DROGE, 2002). Fatores como a idade (HARMAN, 1956), além de doenças e desordens degenerativas como diabetes (GIACCO; BROWNLEE, 2010), câncer (OBERLEY, 2002) e esclerose lateral amiotrófica (BAILLET et al., 2010) predisõem humanos e animais ao estresse oxidativo.

A possibilidade de expandir células estromais adultas ou embrionárias em cultivo para posterior utilização em medicina regenerativa ou desenvolvimento de novas drogas é o que mais tem atraído à atenção da comunidade científica recentemente. Entretanto, os cultivos celulares ainda apresentam uma enorme barreira no caminho do desenvolvimento destas técnicas. Células-tronco mantidas por longo tempo em cultura acabam desenvolvendo anormalidades cromossômicas (MAITRA et al., 2005; BAKER et al., 2007; SARREN et al., 2009).

Como resultado destas alterações, complicações como aumento da carcinogênese e perda do potencial funcional podem impedir a aplicação terapêutica destas células (RUBIO

et al., 2005; FURLANI et al., 2009). Portanto, se faz extremamente importante a expansão das células-tronco com a melhor qualidade, no intuito de diminuir anormalidades cromossômicas para aplicação clínica (LI et al., 2010)

As atividades celulares normais requerem um estado redox balanceado, sendo que qualquer distúrbio neste equilíbrio pode resultar em estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007). Algumas espécies reativas de oxigênio (ROS), como  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  são geradas durante o metabolismo celular normal e metabolizadas, entretanto o excesso de ROS resulta em estresse oxidativo (GRIENGLING et al., 2000; YOON et al., 2002). Tipos celulares diferentes suportam níveis diferentes de exposição ao estresse oxidativo. Altos níveis de ROS geralmente causam morte celular por apoptose (CAO et al., 2008) ou induzem estado de senescência quando o nível de ROS é subletal (LU; FINKEL, 2008).

Sob condições normais de cultura ocorre o encurtamento dos telômeros durante a proliferação contínua, ocasionando uma senescência replicativa. Em algumas condições de estresse como estresse oxidativo, danos ao DNA, mutação oncogênica, as células podem entrar em senescência sem, no entanto, ocorrer o encurtamento dos telômeros, mecanismo conhecido como senescência prematura induzida por estresse (GUO et al., 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o isolamento da FVE e o cultivo das MSCs a partir de amostras de tecido adiposo processadas imediatamente após a colheita e com 12 ou 24 horas de intervalo, a manutenção das MSCs em cultivo até a nona passagem, além de sua quantificação, viabilidade e estresse oxidativo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Colheita do Tecido Adiposo (TA)**

Para colheita do tecido adiposo, foram utilizados três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, machos, com idade aproximada de seis meses e

massa corporal média de três quilogramas. A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maleato de midazolam ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e sulfato de morfina ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por via intramuscular (IM). A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano ao efeito, através do uso de máscara.

Realizou-se uma incisão de pele com cerca de 4 cm na região dorsal, entre as escápulas, pois abaixo da pele o tecido adiposo torna-se facilmente visualizado. Procedia-se a colheita de três fragmentos de cinco gramas para cada animal, pesado em balança em um frasco de vidro estéril contendo solução de Hank's. O espaço morto foi reduzido com fio absorvível sintético 3-0 em padrão contínuo simples e a derme ocluída com fio inabsorvível sintético 4-0 em padrão isolado simples. A primeira amostra de cada animal foi processada imediatamente após a colheita, enquanto que a segunda amostra permaneceu na solução de Hank's, por 12 horas, em temperatura ambiente. Por fim, a terceira amostra aguardou 24 horas, sob as mesmas condições.

#### **Processamento do TA para obtenção da fração vascular estromal (FVE)**

No interior de uma capela de fluxo laminar, o TA era transferido para uma placa de Petri e a gordura seccionada várias vezes, em diversos fragmentos menores. Os pequenos fragmentos de TA foram lavados em temperatura ambiente, com solução de Hank's. Esta lavagem foi repetida três vezes. Concluída esta etapa, a gordura era transferida para um tubo de polipropileno estéril de 50 mL e adicionada à mesma, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II, na proporção 1:3. Os tubos contendo o TA com a colagenase eram transferidos para o banho-maria e permaneciam no equipamento em uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ , sendo agitados manualmente, a cada cinco minutos. Nestas condições, a colagenase promove a digestão do colágeno, o que gera um aspecto leitoso após, aproximadamente, 25 minutos.

A colagenase era neutralizada através da adição de meio de cultivo completo, em um volume de 1:1. Os tubos de TA com o meio completo adicionado eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante dez minutos. O sobrenadante era descartado e a fração lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 400 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. O procedimento de lavagem era repetido novamente e ao término da nova centrifugação o sobrenadante era desprezado e o botão celular, contendo a fração vascular estromal (FVE), ressuspenso em 10 mL de Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) e plaqueadas em garrafas de cultura primária de 75cm<sup>2</sup>.

#### **Cultivo das células estromais mesenquimais (MSCs)**

As garrafas eram incubadas em estufa a 37°C e com concentração de 5% de dióxido de carbono. Quarenta e oito horas após o início do cultivo, foi possível visualizar as primeiras células estromais. Neste instante, realizava-se a troca do meio de cultivo, de maneira que o conteúdo presente na garrafa era aspirado e desprezado, para posteriormente o DMEM ser repostado, ainda suplementado com 20% de SFB, num volume final de 10 mL.

Quando o cultivo atingia uma confluência maior que 90%, ao redor de uma semana após seu início, uma passagem ou repique era realizado. Para isto, o conteúdo das garrafas era novamente aspirado e desprezado para adição de 10 mL de tripsina. Após 2-3 minutos na estufa, a tripsina juntamente com as MSCs, era aspirada da garrafa e depositada em um tubo de polipropileno de 50 mL. A adição de 10 mL de meio de cultivo completo era realizada para neutralizar a ação da tripsina.

Os tubos eram então centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante dez minutos. Após este procedimento, o sobrenadante era desprezado e o novo botão celular, formado pela sedimentação das MSCs, tinha seu volume dividido em duas novas garrafas de cultura primária de 75cm<sup>2</sup>. À estas duas novas garrafas, eram adicionados 10 mL de DMEM,

agora suplementados com 10% de SFB. Foram realizadas nove passagens e em todos estes procedimentos as células de cada amostra foram quantificadas, através de contagem celular em Câmara de Neubauer e as viabilidades analisadas, com o corante Azul de Trypan. Também foram separadas alíquotas de 1 mL dos botões celulares, para testes que verificaram o estresse oxidativo destas células em cultura.

#### **Ensaio da Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)**

Este ensaio é empregado para a determinação da taxa total de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) presente na amostra em teste. Baseia-se no princípio de utilização do reagente 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o qual é não fluorescente, mas que atravessa a membrana celular facilmente, sendo desacetilado por enzimas esterases, formando assim o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína. Este por sua vez, quando em contato com ROS é oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína que emite fluorescência (BASS et al., 1983). Logo, as passagens celulares foram testadas quanto a presença de ROS, utilizando a metodologia descrita por Esposti e colaboradores (2002), através da adição de 50  $\mu$ L de suspensão celular, juntamente com 65  $\mu$ L de tampão Tris HCl 10 mM pH 7,4 e 10  $\mu$ L do reagente DCFH-DA 0,1mM. Após uma hora de incubação sob temperatura ambiente e proteção da luz direta, foi realizada a leitura da fluorescência a 488nm de excitação e 525nm de emissão.

#### **Quantificação da DNA dupla fita livre no meio – DNA PicoGreen®**

Com a finalidade de determinar a viabilidade celular das passagens celulares em questão, utilizou-se o reagente corante Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA, obtido da empresa Invitrogen (*Life Technologies*) para determinar a presença da molécula de DNA dupla fita (dsDNA) no meio extracelular, pois o mesmo possui alta afinidade pelo dsDNA. Esta metodologia baseia-se no princípio de que as células que entram em processo de morte

celular, têm por consequência o rompimento de membranas, tanto plasmática quanto nuclear, havendo a liberação do DNA de forma íntegra para o meio extracelular.

Esta técnica foi realizada baseando-se em determinações prévias descritas por AHN e colaboradores (1996), de forma que foi adicionado 50 $\mu$ L de amostra para 50 $\mu$ L do reagente diluído em tampão T.E. 1X. Após cinco minutos de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram lidas quanto a fluorescência a 480nm de excitação e 520nm de emissão. A metodologia empregada foi baseada no descrito por Ahn e colaboradores (1996), utilizando 50 $\mu$ L de amostra juntamente com 50 $\mu$ L do reagente de uso (1:1; v:v), seguido de incubação por 5 minutos em temperatura ambiente e posterior leitura da emissão de fluorescência a 480nm de excitação e 520nm de emissão.

Os resultados obtidos foram tabelados em programa *Microsoft Excel* versão 2011 sendo expressos em média  $\pm$  desvio/erro padrão (SE) e os testes e análises estatísticas foram efetuados em programa *GraphPad Prism 5* com análise de variância de uma via, seguido de *post hoc* de Dunnett. Foram considerados resultados estatisticamente significativo os dados com  $p \leq 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os processamentos para isolamento da fração vascular estromal foram realizados de maneira satisfatória com todas as amostras, inclusive para aquelas em que foi respeitado o intervalo de 12 ou 24 horas. Após as primeiras 48 horas de incubação a 37 °C na estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, foi possível visualizar as primeiras células estromais mesenquimais em microscópio invertido, em aumento de 40 vezes (Figura 1A). Neste momento, o meio de cultivo de todas as amostras foi substituído.

Completada a primeira semana, a confluência de todas as amostras superou os 90% e iniciaram-se os procedimentos de passagens (Figura 1B). Nesta primeira passagem, os três

cultivos realizados imediatamente após a colheita do TA apresentaram uma média de 1.996.667 células estromais mesenquimais, enquanto que os cultivos realizados 12 e 24 horas após a colheita tiveram uma média de 2.403.333 e 2.780.000, respectivamente. Esta primeira quantificação, não demonstrou diferença estatística significativa, sugerindo que o TA mantido em solução de Hank`s por até um dia, não impediu o isolamento e cultivo das MSCs. Da mesma forma, as taxas de viabilidade celular também não apresentaram diferença, permanecendo em 99,89, 99,87 e 99,64%, para os cultivos imediato, após 12 e 24 horas, respectivamente.

Na avaliação da quantidade de células existentes em cada cultivo, apenas a segunda passagem demonstrou diferença entre os intervalos de tempo (Figura 2). As amostras que aguardaram 24 horas até o processamento, obtiveram uma média de 11.926.000, número superior aos 3.225.000 e 5.720.000 dos cultivos imediato e após 12 horas. Para a viabilidade celular, somente na oitava passagem um dos grupos sobressaiu-se sobre os demais (Figura 3). Nesta ocasião, novamente os cultivos de 24 horas obtiveram uma média de viabilidade de 97,13, enquanto que os grupos dos cultivos imediato e 12 horas registraram menores taxas de viabilidade celular, 93.85 e 92.60, respectivamente.

Desconsiderando-se os intervalos realizados para o processamento das amostras, para obtenção de médias gerais dos cultivos, é possível determinar que a quantidade de células em cultivo aumentou da primeira até a terceira passagem, quando atingiu seu ponto máximo, diminuindo seu número até a quinta passagem, quando a partir daí, mantiveram-se estáveis até o final do período de avaliação (Figura 4). Por outro lado, as taxas de viabilidade iniciaram maiores, próximas de 100%, diminuindo na terceira passagem, quando passaram a oscilar até atingir seu menor nível de viabilidade na oitava passagem (Figura 5).

Para que as células possam executar suas atividades normais, é necessário um ambiente com estado redox balanceado. Alterações neste estado, seja por desregulação do



metabolismo ou outro dano celular, resultam em estresse oxidativo, atualmente relacionado a causa de diversas doenças celulares (HALLIWELL, 2007). Deste modo, uma grande quantidade de células altamente viáveis, não necessariamente significariam uma boa opção como terapia, haja vista que estas células poderiam apresentar-se estressadas e inclusive predispor o animal receptor ao desenvolvimento de doenças, como o câncer.

O ensaio da Diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) foi utilizado para determinação da taxa total destas espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), em todas as amostras de cultivo das células estromais mesenquimais. Nas células cultivadas imediatamente após a colheita, foi possível perceber um aumento da taxa total de ROS a partir da quarta passagem, porém este efeito não se manteve a partir da sexta passagem (Figura 06), indicando um efeito hormese.

Nos cultivos realizados 12 horas após a colheita, a presença significativa de ROS foi observada mais cedo, a partir da terceira passagem e também por um período maior de tempo, estendendo-se até a sexta passagem. O mesmo ocorreu para os cultivos realizados após 24 horas, sendo que estas últimas ainda apresentaram um novo episódio de maior produção de ROS, durante a nona passagem, com diferença estatística.

PETERSON et al. (2010) citam que a manutenção do cultivo de MSCs em condições de hipóxia, aumentariam a viabilidade celular, entretanto, aumentariam também as taxas de ROS e produção de  $H_2O_2$ . Como uma alternativa, estes pesquisadores propuseram um protocolo de hipóxia-reoxigenação, no qual as células seriam submetidas a um período de hipóxia (15 min, 1%  $O_2$ ) com posterior reoxigenação (30 min, 21%  $O_2$ ). Desta maneira, a execução deste protocolo, permitiria a manutenção da viabilidade e função celular, além de preservar um estado oxidante tolerável pelas células.

De maneira geral, as células apresentam diferentes níveis de tolerância ao estresse oxidativo. Podem entrar em estado de senescência se expostas a níveis subletais de ROS (LU;

FINKEL, 2008) ou chegar até mesmo ao estágio de morte celular por apoptose, quando expostas a níveis altos de ROS (CAO et al., 2008). As células que, expostas a estas situações de estresse, podem entrar em estado de senescência, sofrerão encurtamento dos telômeros e possivelmente danos ao DNA e mutações oncogênicas (GUO et al., 2010). Conhecido como senescência prematura induzida pelo estresse, este tipo de senescência pode significar um risco em potencial àquelas pessoas ou animais tratados com estas células. Por outro lado, HALLIWELL (2003) e DAY; SUZUKI (2006) propuseram que pequenas mudanças no nível de ROS possuiriam efeitos benéficos sobre o crescimento e viabilidade celular.

Neste contexto, CARRIÈRE et al. (2009) demonstraram em seu estudo que uma exposição transitória de ADSCs a uma moderada geração de ROS mitocondrial antes da aplicação in vivo, aumentou fortemente a propriedade pró-angiogênicas destas células. Para alcançar este objetivo, os pesquisadores utilizaram dois diferentes tipos de inibidores mitocondriais, rotenona e antimicina. Este aumento de ROS mitocondrial estimulou a produção de HGF e VGF. Os autores ressaltam ainda que este tratamento prévio com uma geração de ROS mitocondrial moderada induziu uma alta resistência de ADSCs a morte celular induzida por lesões oxidativas.

ORCIANI e colaboradores (2010) afirmam que as células estromais mesenquimais derivadas de pele humana parecem ser mais propensas a eventos apoptóticos. Em seu trabalho, os autores compararam estas células a queratinócitos humanos, através da adição de 0,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante duas horas e analisaram os efeitos do estresse oxidativo quatro, 12, 24 e 48 horas após. Segundo os pesquisadores, os queratinócitos parecem ter uma maior defesa antioxidante, pois estão continuamente expostos na pele. As MSCs por sua vez, são cercadas por um microambiente complexo que as protege dos insultos externos, não mantendo um sistema de defesa particularmente eficiente.

Esta situação, de acordo com a justificativa encontrada pelos autores daquele experimento, representaria o mecanismo de defesa primário destas células contra situações de estresse. No presente trabalho, as taxas de ROS avaliadas pela DCFH-DA aumentaram principalmente entre a quarta e quinta passagem em todos os intervalos de tempo testados e a morte celular, identificada através da liberação de DNA pelo teste de PicoGreen, iniciou a partir da sétima passagem, mas evidenciou-se fortemente na nona passagem.

Neste caso, as células cultivadas imediatamente após a colheita apresentaram uma maior liberação de DNA, ou seja, taxas maiores de morte celular apenas na sétima e nona passagens. As amostras que aguardaram 12 horas demonstraram taxa significativa de morte celular somente na última avaliação, realizada na nona passagem. Já aquelas amostras em que foi respeitado o intervalo de 24 horas, apresentaram um maior período de morte celular, durante as três últimas passagens avaliadas: sétima, oitava e nona.

## **CONCLUSÃO**

Nas condições em que o experimento foi realizado e com base nos resultados obtidos é possível concluir que, assim como o processamento do tecido adiposo realizado imediatamente após a colheita, as amostras deste mesmo tecido que aguardaram 12 ou 24 horas preservadas em solução de Hank's e em temperatura ambiente, foram eficazes para a realização bem sucedida do isolamento da fração vascular estromal e cultivo das células estromais mesenquimais. Recomenda-se ainda a utilização destas células no momento da terceira passagem, quando se apresentam em grande quantidade, altamente viáveis e sem indicação de que estejam sob situações de estresse oxidativo. Se necessário, poderiam ainda ser utilizadas por um período mais prolongado de cultivo, até a sétima passagem, quando os primeiros indícios de morte celular foram verificados.

## AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de doutorado que possibilitou a realização desta pesquisa.

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Santa Maria, sob número 043/2012 e seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILLET, A. et al. The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v.35, n.10, p.1530-1537, 2010. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11064-010-0212-5>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1007/s11064-010-0212-5.

BAKER, D.E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. **Nature Biotechnology**, v.25, n.2, p.207-215, 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/nbt/journal/v25/n2/pdf/nbt1285.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1038/nbt1285.

BANAS, A. et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. **Stem Cells**, v.26, n.10, p.2705-2712, 2008. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2008-0034/pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1634/stemcells.2008-0034.

CAO, C. et al. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.43, p.28897-28908, 2008. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/285/19/14842.2>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1074/jbc.A109.804144.

CARRIÈRE, A. et al. Preconditioning by Mitochondrial Reactive Oxygen Species Improves the Proangiogenic Potential of Adipose-Derived Cells-Based Therapy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.29, p.1093-1099, 2009. Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/content/29/7/1093.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.188318.

DAY, R.M.; SUZUKI, Y.J. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. **Dose Response**, v.3, n.3, p.425-442, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2475947/>. Acesso em: 07 fev. 2014.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p. 47-95, 2002. Disponível em: <http://physrev.physiology.org/content/82/1/47.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

FURLANI, D. et al. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. **Cell Transplantation**, v.18, n.3, p.319-331, 2009. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/cog/ct/2009/00000018/00000003/art00009?token=004e19d3734e3a9b367232d45232b4524736a5e574b465d48743568293c62207d673f582f6b216>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.3727/096368909788534906.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v.107, n.9, p.1058-1070, 2010. Disponível em:

<http://circres.ahajournals.org/content/107/9/1058.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545.

GRIENGLING, K.K. et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, n.10, p.2175-2183, 2000. Disponível em: <http://atvb.ahajournals.org/content/20/10/2175.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1161/01.ATV.20.10.2175.

GUO, Y.L. et al. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence and self-renewal. **Stem Cells and Development**, v.19, n.9, p.1321-1331, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128305/pdf/scd.2009.0313.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1089/scd.2009.0313.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochemical Journal**, v.401, n.1, p.1-11, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17150040>. Acesso em: 07 fev. 2014.

JUNTILLA, M.M. et al. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. **Blood**, v.115, n.20, p.4030-4038, 2010. Disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/115/20/4030.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1182/blood-2009-09-241000.

LEU, S. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. **Journal of Translational Medicine**, v.8, p-63, 2010. Disponível em: <http://www.translational-medicine.com/content/pdf/1479-5876-8-63.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1186/1479-5876-8-63.

LI T.S. et al. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. **Cardiovascular Research**, v.89,

n.1, p.157-165, 2011. Disponível em:  
<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/89/1/157.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1093/cvr/cvq251.

LU, T.; FINKEL, T. Free radicals and senescence. **Experimental Cell Research**, v314, n.9, p.1918-1922, 2008. Disponível em:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482708000323>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.01.011.

MAITRA, A. et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v.37, p.1099-1103, 2005. Disponível em:  
<http://www.nature.com/ng/journal/v37/n10/pdf/ng1631.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1038/ng1631.

MONTEIRO, H.P.; STERN, A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. **Free Radical Biology & Medicine**, v.21, n.3, 323-333, 1996. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584996000512>. Acesso em: 07 fev. 2014.

MORENO, S. et al. Immunocytochemical localization of catalase in the central nervous system of the rat. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.43, n.12, p.1253-1267, 1995. Disponível em: <http://jhc.sagepub.com/content/43/12/1253.long>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1177/43.12.8537642.

OBERLEY, T.D. Oxidative damage and cancer. **American Journal of Pathology**, v.160, n.2, p.403-408, 2002. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850635/pdf/3033.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2014.

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

em: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-31265-X\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-31265-X_11). Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1007/3-540-31265-X\_11.

ORCIANI, M. et al. Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. **Free Radical Biology & Medicine**, n.49, n.5, p.830-838, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158491000359X>. acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.007.

PERVAIZ, S. et al. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.11, n.11, p.2777-2789, 2009. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ars.2009.2804>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1089/ars.2009.2804.

PETERSON, K.M et al. Improved survival of mesenchymal stromal cell after hypoxia preconditioning: role of oxidative stress. **Life Sciences**, v.88, n.1-2, p.65-73, 2011. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320510004844>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1016/j.lfs.2010.10.023.

RUBIO, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Research**, v.65, p.3035-3039, 2005. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/65/8/3035.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4194.

SAREEN, D. et al. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. **PloS ONE**, v.4, n.10, e7630, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2765070/>. Acesso em: 07 fev. 2014.

SMITH, J. et al. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. **Proceedings of the National Academy of**



**Sciences**, v.97, n.18, p.10032-10037, 2000. Disponível em:

<http://www.pnas.org/content/97/18/10032.full.pdf+html>. Acesso em: 07 fev. 2014.

YOON, S.O. et al. Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging.

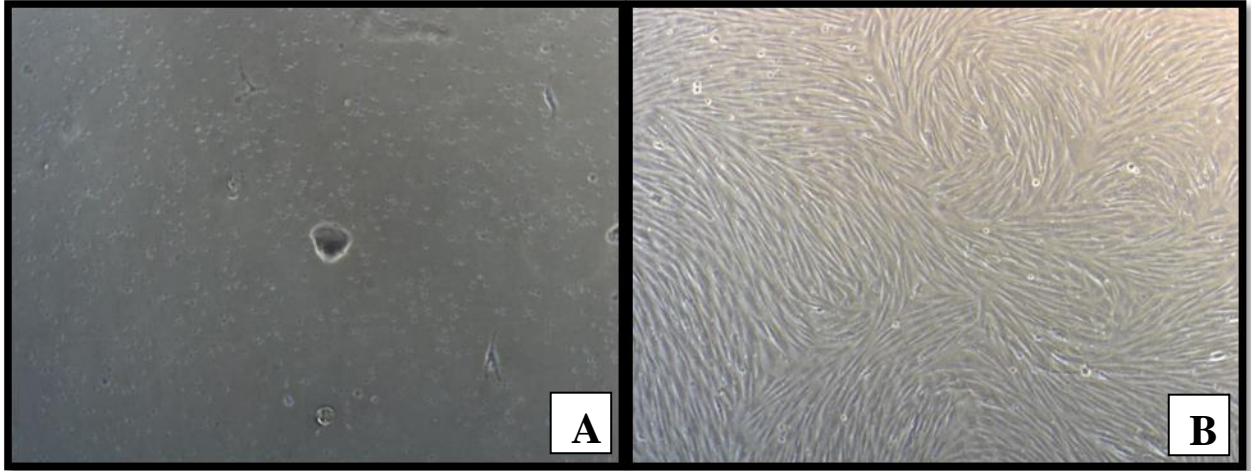
**Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, n.12, p.1597-1604, 2002. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0047637402000957>. Acesso em: 07

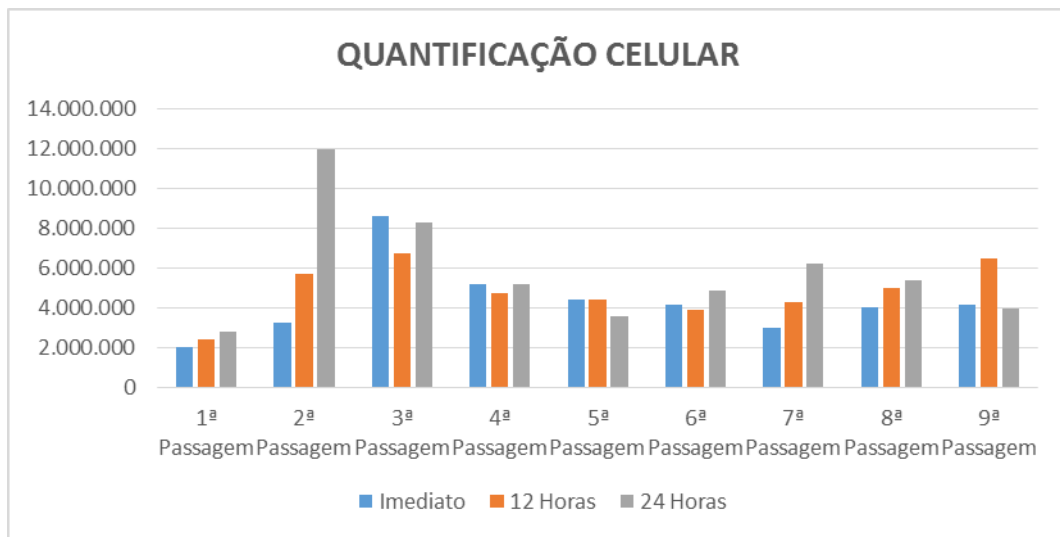
fev. 2014. doi: 10.1016/S0047-6374(02)00095-7.

ZELKO, I.N. et al. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression.

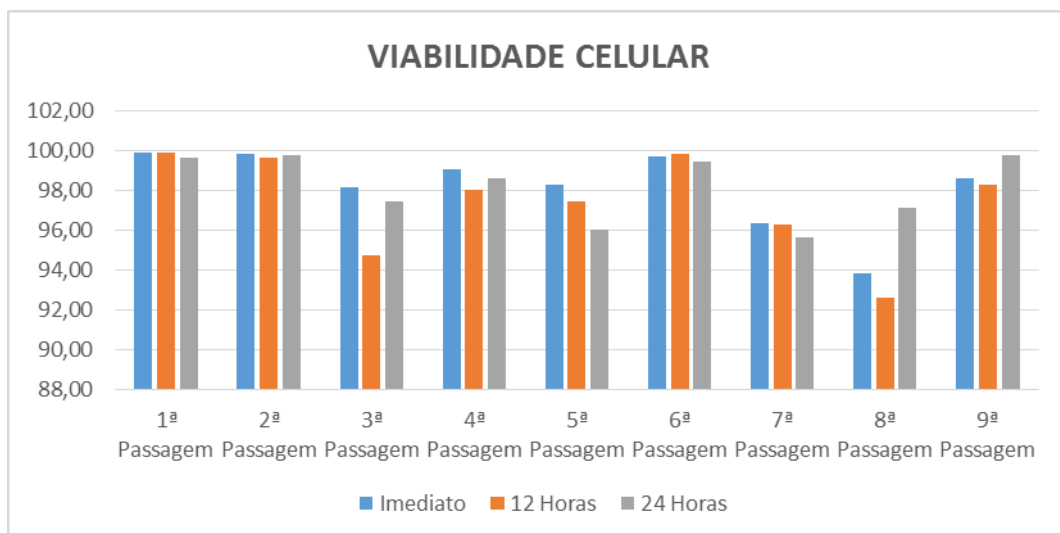
**Free Radical Biology & Medicine**, v.33, n.3, p.337-349, 2002.



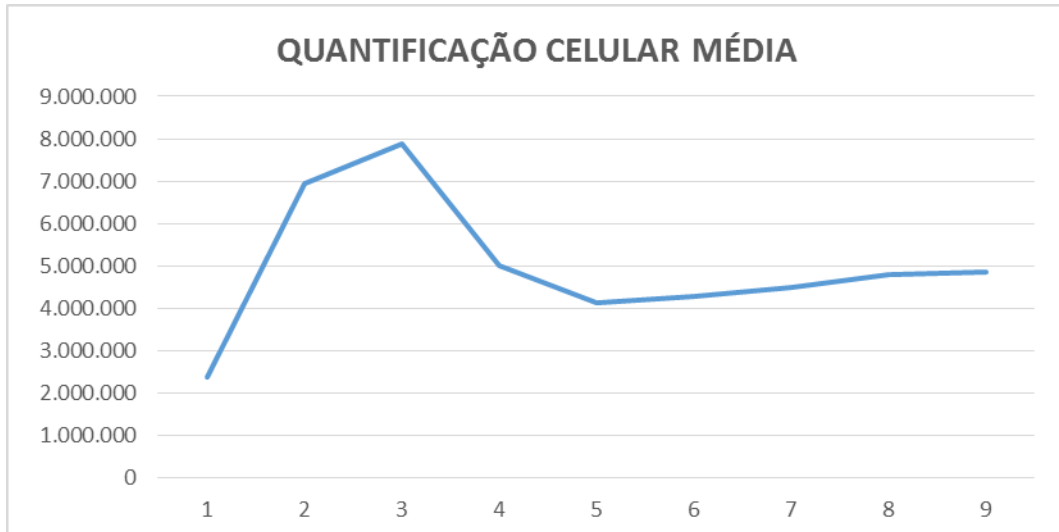
**Figura 1** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Visualização das células estromais mesenquimais em cultivo, aos 2 dias (A) e após 7 dias (B).



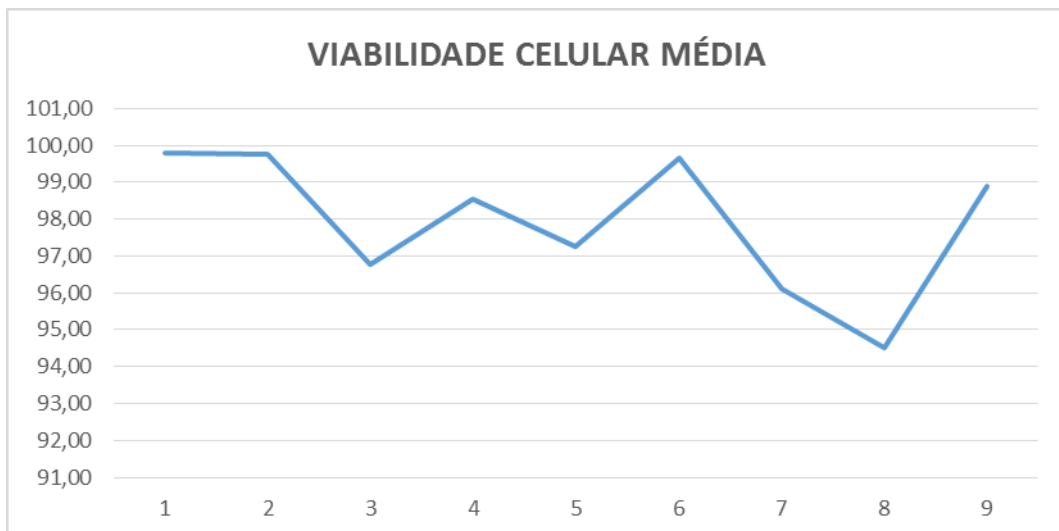
**Figura 2** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Avaliação da quantificação celular durante as nove passagens, para os cultivos realizados nos três intervalos de tempo.



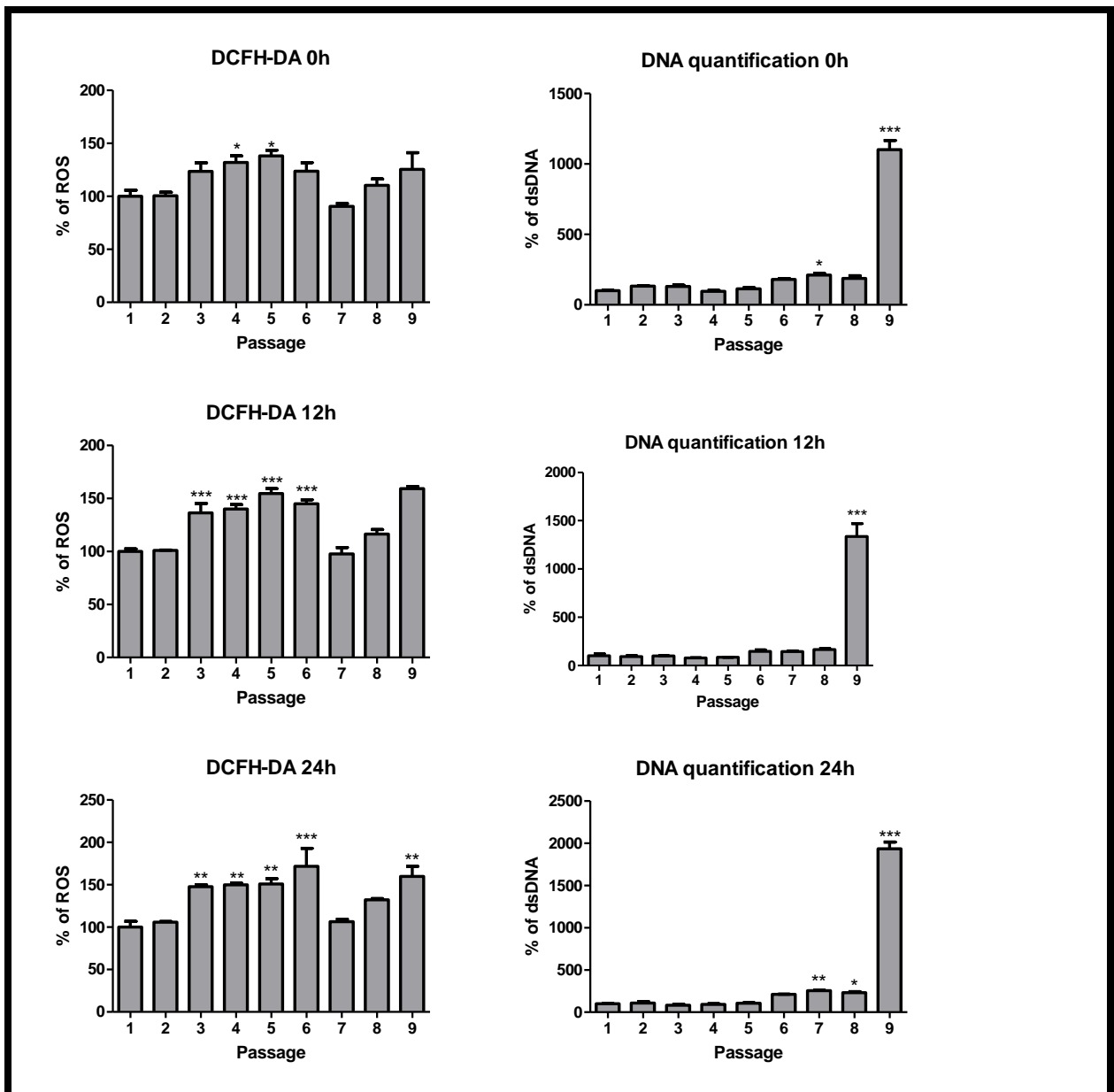
**Figura 3** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Avaliação da viabilidade celular durante as nove passagens, para os cultivos realizados nos três intervalos de tempo.



**Figura 4** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Avaliação da quantificação celular média, durante as nove passagens.



**Figura 5** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Avaliação da viabilidade celular média, durante as nove passagens.



**Figura 6** - Avaliação do estresse oxidativo de Células Estromais Mesenquimais derivadas de tecido adiposo de coelhos em cultivo. Demonstração gráfica da liberação de ROS durante as nove passagens, para os cultivos realizados nos três intervalos de tempo (à esquerda) e quantificação da liberação de DNA durante as nove passagens, para os cultivos realizados nos três intervalos de tempo (à direita). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$  para desvio padrão.

#### **4. ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

CIÊNCIA RURAL - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade

Federal de Santa Maria, RS

### **Alotransplante de pele em coelhos associado ao uso de Células Estromais Mesenquimais como terapia imunomoduladora**

**Allograft skin in rabbits associated with the use of Mesenchymal Stromal Cells as  
immunomodulatory therapy**

**Tiago Luis Eilers Treichel<sup>5</sup> Ney Luis Pippi<sup>6</sup>**

#### **RESUMO**

O uso de enxertos de pele de espessura total em cirurgia plástica e reconstrutiva é frequentemente comum em algumas situações para reparar defeitos. O conceito de que enxertos de pele alogênicos são rejeitados é conhecido desde a década de 1980. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do alotransplante de pele a fresco em coelhos, utilizando como agente imunomodulador células estromais mesenquimais (CEM), associadas ou não à ciclosporina. Para a elaboração deste experimento foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, machos, com 6 meses de idade e massa corporal média de 3 quilogramas, divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Grupo A: realizado apenas o transplante. Grupo B: aplicação de CEM nos dias -1, 0, 3, 7 e 10, sempre associado ao uso da ciclosporina. Grupo C: somente a aplicação de CEM, nos mesmos períodos que o

---

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Avenida Roraima, n.1000, Bairro Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Email: tiagoufsm@yahoo.com.br. \*Autor para correspondência.

<sup>6</sup> Professor do Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

grupo anterior. Grupo D: apenas ciclosporina injetável. Os animais foram submetidos a exame visual da pele transplantada diariamente. As biópsias foram realizadas quando haviam sinais clínicos de rejeição. Para a comparação das médias foi usado o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. O grupo B apresentou a menor taxa de sobrevivência do enxerto, com 7,2 dias ( $\pm 3,49$ ). O grupo C apresentou uma rejeição de 11,4 dias ( $\pm 3,58$ ), enquanto que o grupo D rejeitou o enxerto aos 9,0 dias ( $\pm 1,22$ ). Por fim, o grupo A rejeitou os seus enxertos apenas aos 13,0 ( $\pm 1,41$ ) dias. As interleucinas foram avaliadas nos grupos A, B e C e neste ponto, a utilização associada da ciclosporina com as CEM, parece ter sido benéfica para a inibição de alguns destes fatores. Pode-se concluir que tanto a aplicação da ciclosporina quanto das CEM alógenas, quando administradas isoladamente, não foram capazes de aumentar a taxa de sobrevivência do enxerto de pele, mas as duas terapias, quando utilizadas de maneira associada, foram responsáveis por causar uma rejeição mais rápida do tecido transplantado do que o grupo controle. Ainda assim, os valores mensurados das principais interleucinas pró-inflamatórias foram menores quando esta associação ocorreu.

**Palavras-chave:** terapia celular, imunossupressão, enxerto de pele, rejeição.

## **ABSTRACT**

The use of full thickness skin graft, to repair defects in cosmetic and reconstructive surgery, is often common in some situations. The concept that allogeneic skin grafts are rejected is known since the 1980s. The aim of this work was to evaluate the viability of fresh allograft skin in rabbits, using as an immunomodulatory agent, mesenchymal stromal cells (MSC), associated or not to cyclosporine. To design the experiment, 20 New Zealand White rabbits, males, 6 months old and mean body weight of 3 Kg, were randomly divided into four experimental groups. Group A: transplant performed only. Group B: application of MSC on days -1, 0, 3, 7 and 10, always associated with the use of cyclosporine. Group C: only the

application of MSC in the same periods as the previous group. Group D: only injectable cyclosporine. The animal's transplanted skin was daily subjected to visual inspection. Biopsies were performed when there were clinical signs of rejection. Tukey test at 5% probability was used in order to compare the means. Group B showed the lowest rate of graft survival, with 7.2 days ( $\pm 3.49$ ). Group C showed an 11.4 days ( $\pm 3.58$ ) rejection, while group D rejected the graft after 9.0 days ( $\pm 1.22$ ). Finally, group A rejected their grafts only after 13.0 ( $\pm 1.41$ ) days. Interleukins were evaluated in groups A, B and C, and at this point the use of cyclosporine associated with MSC, seems to have been beneficial by inhibiting some of these factors. It can be concluded that both the application of cyclosporine as well as the halogen MSCs, were not able to increase skin graft survival when administered alone. The two therapies, when used in an associated manner, caused a faster rejection of transplanted tissue than in the control group. Still, the measured values of the key pro-inflammatory interleukins were lower when this association occurred.

**Key words:** cell therapy, immunosuppression, skin graft, rejection.

## INTRODUÇÃO

O uso de enxertos de pele de espessura total em cirurgia plástica e reconstrutiva é frequentemente comum em algumas situações como para reparar defeitos causados pela excisão de tumores, traumas, defeitos congênitos, queimaduras, diabetes, irradiação e feridas crônicas. Em geral, enxertos de pele são empregados quando um simples fechamento da ferida ou retalhos locais são insuficientes para gerar resultados satisfatórios (ZOGRAFOU et al., 2011).

O conceito de que enxertos de pele alogênicos são rejeitados é conhecido desde a década de 1980. Em pacientes imunocompetentes, aloenxertos de pele de doadores incompatíveis são rejeitados de maneira aguda. Sinais clínico-patológicos de rejeição



aparecem dentro das primeiras duas semanas (NAKANO et al., 1992). A rejeição é antígeno-específica, sendo a epiderme o componente mais antigênico da pele (NANCHALAL & WARD, 1992).

Tanto a resposta celular quanto a humoral estão envolvidas na rejeição do aloenxerto de pele, mas esta atividade é primariamente mediada pelas células T. Estas células detectam os alo-antígenos diretamente por encontrar intactas as moléculas de alo-MHC (complexo maior de histocompatibilidade) na superfície das células do doador ou indiretamente, pelos antígenos alogênicos do doador que são apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) do receptor. As células de Langerhans representam 4% da população celular da epiderme, mas apresentam um papel importante na rejeição, pois elas são as mais proeminentes APCs da pele e expressam o importante antígeno de classe II HLA-DR (NAKANO et al., 1992; NANCHALAL & WARD, 1992).

Células Estromais Mesenquimais (CEM) são progenitoras multipotentes presentes em tecidos adultos (HERZOG et al., 2003). Atualmente, estudos em modelos animais têm demonstrado que as CEM poderiam migrar para sítios de lesão e ajudar a reparar danos teciduais (TREICHEL et al., 2011; PINTO FILHO et al., 2013).

Além do reparo e regeneração dos tecidos, mais recentemente está sendo demonstrado que as CEM também possuem propriedades imunorregulatórias (AGGARWAL & PITTEGER, 2005; RASMUSSEN, 2006). CEM exibem propriedades imunomoduladoras e potencial para suprimir respostas alorreativas das células T. A supressão das células T induzidas pelas CEM parece ser mediada por vários fatores solúveis, bioativos e supressivos secretados pelas próprias células (AGGARWAL & PITTEGER, 2005).

De particular interesse, o regime terapêutico baseado nas células como adjuvantes pode potencialmente minimizar o uso contínuo de drogas imunossupressivas, reduzir os sintomas da Doença do Enxerto Contra Hospedeiro (DECH), aumentar o quimerismo e

promover a sobrevivência do enxerto (BLUESTONE et al., 2007). Embora as propriedades imunossupressivas sejam bem estabelecidas, o mecanismo pelo qual estas células exercem suas funções imunossupressivas ainda não está claro (LE BLANC & RINGDEN, 2005).

Existem várias tentativas para elucidar os mecanismos da imunossupressão mediada pelas CEM. Estes estudos têm rendido vários resultados, mas não há uma conclusão de consenso alcançada. Alguns estudos tem mostrado que fatores solúveis como as TGF $\beta$  e PGE2 mediam os efeitos imunossupressivos das CEM (RASMUSSEN et al., 2005), enquanto outros pesquisadores tem argumentado que o contato direto célula-célula é o maior mecanismo (SOTIROPOULOU et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do alotransplante de pele a fresco em coelhos, utilizando como agente imunomodulador Células Estromais Mesenquimais (CEM) derivadas do tecido adiposo de doadores da mesma espécie e cultivadas em laboratório, associadas ou não à ciclosporina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a elaboração deste experimento foram utilizados 20 (vinte) coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, machos, com idade aproximada de seis meses e massa corporal média de três quilogramas. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais com cinco animais em cada, totalizando 20 animais.

Para colheita do tecido adiposo, um coelho doador alheio aos demais, foi submetido a procedimento cirúrgico de lipectomia. A medicação pré-anestésica foi constituída da associação de cloridrato de cetamina (20 mg kg<sup>-1</sup>), maleato de midazolam (2 mg kg<sup>-1</sup>) e sulfato de morfina (5 mg kg<sup>-1</sup>) por via intramuscular (IM). A indução e manutenção anestésica foram realizadas com isoflurano ao efeito, através do uso de máscara.

Foram colhidos 10 gramas de tecido adiposo (TA) na região dorsal do animal, entre as escápulas. O espaço morto foi reduzido com fio absorvível sintético 3-0 em padrão contínuo simples e a derme ocluída com fio inabsorvível sintético 4-0 em padrão isolado simples.

No interior de uma capela de fluxo laminar, o tecido adiposo foi seccionado várias vezes e os pequenos fragmentos de TA lavados em temperatura ambiente, com solução de Hank's. Concluída esta etapa, foi adicionado ao TA, uma solução de 1 mg/mL de colagenase tipo II, na proporção 1:3. Os tubos contendo o TA com a colagenase permaneciam no banho-maria a uma temperatura de 37°C e eram agitados manualmente, a cada cinco minutos, o que produzia um aspecto leitoso após, aproximadamente, 25 minutos.

A colagenase utilizada para digerir o tecido era neutralizada através da adição de meio de cultivo completo, em um volume de 1:1. Os tubos de TA com o meio completo adicionado eram centrifugados a 600 G, em temperatura ambiente, durante dez minutos. O sobrenadante era descartado e a fração lavada com meio completo e centrifugada, desta vez, a 400 G, em temperatura ambiente, durante cinco minutos, por duas vezes.

Ao término do procedimento, a fração vascular estromal (FVE) era ressuspensa em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e plaqueadas em garrafas de cultura primária de 75cm<sup>2</sup>. As garrafas eram incubadas em estufa a 37°C, com concentração de 5% de dióxido de carbono, por um período de aproximadamente 14 dias. Sempre que o cultivo atingia uma confluência maior que 90%, as células eram repicadas.

Para colheita dos fragmentos de pele a serem transplantados, o mesmo animal utilizado para obtenção do TA foi eutanasiado por aprofundamento da anestesia. Foram demarcadas áreas de 3 x 3 cm com lápis dermatográfico na pele. Realizou-se a incisão

cutânea, divulsão e completa excisão do tecido subcutâneo, com posterior lavagem da pele com solução salina.

Os animais receptores foram anestesiados conforme o protocolo descrito anteriormente. Um fragmento de pele com dimensão de 3 x 3 cm foi excisado sobre a parede lateral do tórax, para criar o leito que receberia o tecido transplantado. O enxerto era suturado com pontos isolados simples, com fio de sutura inabsorvível 4-0 (FIGURA 1B).

Para analgesia dos coelhos foi administrado sulfato de morfina ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), via intramuscular (IM), três vezes ao dia, durante três dias. Os animais foram submetidos à limpeza da ferida cirúrgica com solução fisiológica e troca do curativo, uma vez ao dia. Os animais foram submetidos a exame visual da pele transplantada diariamente e o enxerto fotografado para posterior análise. Transplantes com área de necrose igual ou superior a 90% eram considerados perdidos e o dia em que ocorria esta situação era considerado o tempo máximo de sobrevivência do enxerto.

Os animais do primeiro grupo (A) não receberam nenhum tipo de tratamento após o transplante, sendo considerado o grupo controle. Os coelhos do segundo grupo (B) receberam a aplicação de  $2 \times 10^6$  células estromais mesenquimais (CEM) no pré-operatório (dia -1) via intravenosa (IV), durante o período transoperatório (dia 0) diretamente no leito do transplante e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório (IV), sempre associado ao uso de protocolos convencionais para imunossupressão, com o agente ciclosporina injetável, na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , de 24/24 horas (Figura 1A). Os animais do terceiro grupo (C) receberam somente a aplicação de CEM, nos mesmos períodos que os animais do grupo anterior. Por fim, os coelhos do quarto grupo (D) foram tratados apenas com ciclosporina injetável, na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , de 24/24 horas.

Para colheita das biópsias, os coelhos eram submetidos a um novo procedimento cirúrgico. Realizava-se uma incisão de pele ao redor do transplante, removendo a interface

entre o tecido transplantado e a pele do próprio animal. Após a remoção da amostra para biópsia, o espaço subcutâneo era reduzido com sutura contínua simples, utilizando fio de sutura absorvível 3-0. A dermorrafia foi realizada através de pontos isolados simples, utilizando fio de sutura inabsorvível 4-0.

Após a remoção do fragmento de pele, o mesmo foi fixado em formol tamponado e emblocado 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 Goldner e Picrosírius para avaliação histopatológica. Neste dia foi colhido ainda um mL de sangue, da veia auricular caudal, para dosagem das interleucinas 6 e 10, através de *kit* comercial próprio para este fim.

Para a pressuposição de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias os dados foram submetidos aos testes de Shapiro Wilk e Hartley, respectivamente, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Para a comparação das médias foi usado o teste de Tukey, também ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram programadas e elaboradas no software R (2013). Também foram elaborados intervalos de confiança para a média da temperatura corporal dos coelhos com nível de confiança de 95%.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todos os animais toleraram o procedimento e tiveram uma recuperação satisfatória no pós-cirúrgico imediato. Considerando a temperatura corporal retal dos coelhos de 38,5 até 40°C, sob condições de estresse (MEZADRI et al., 2004), é possível afirmar, com 95% de confiança, que os tratamentos não causaram alterações de temperatura acima ou abaixo dos intervalos definidos, nas mensurações diárias. Os primeiros animais a apresentarem sinais clínicos de rejeição foram dois coelhos do grupo B, ou seja, que receberam aplicação diária de

ciclosporina associado ao uso de CEM. Estes animais rejeitaram por completo o enxerto aos três e quatro dias de pós-operatório (FIGURA 1D).

Foi exatamente este grupo que apresentou a menor taxa de sobrevivência do enxerto, com o tecido transplantado sendo rejeitado em média, com 7,2 dias ( $\pm 3,49$ ). Os animais do grupo C, que receberam apenas aplicações de CEM, apresentaram uma rejeição média de 11,4 dias ( $\pm 3,58$ ) (FIGURA 1E), enquanto que aqueles animais do grupo D, tratados apenas com ciclosporina, rejeitaram o enxerto aos 9,0 dias ( $\pm 1,22$ ) de pós operatório, em média (FIGURA 1F). Por fim, os animais do grupo A, utilizados como controle, rejeitaram os seus enxertos em média apenas aos 13,0 ( $\pm 1,41$ ) dias, após o procedimento de transplantação (FIGURA 1C).

Os animais que receberam apenas um único tipo de tratamento para controle da rejeição, seja as CEM ou a ciclosporina, não apresentaram diferença estatística significativa com relação ao grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de tratamento. Isto provavelmente ocorreu pela menor manipulação dos animais do primeiro grupo. Na ausência de situações de maior estresse, o enxerto pode ter tardado a falhar. Já os animais do grupo B, cujo tratamento foi a associação das CEM com a ciclosporina, apresentaram diferença estatística significativa em comparação com os animais do grupo controle ( $P < 0.05$ ), indicando que esta tentativa de associação terapêutica não obteve êxito.

As taxas de sobrevivência dos enxertos encontradas neste estudo, estão em desacordo com as encontradas por SBANO et al. (2008). Embora estes autores tenham utilizado ratos como modelo experimental, a divisão dos grupos ocorreu da mesma maneira. Os dados apresentados por estes pesquisadores, entretanto, mostram uma sobrevivência do enxerto de 17 ( $\pm 1,8$ ) dias para o grupo controle, 15 ( $\pm 3,8$ ) dias para aqueles animais que receberam apenas ciclosporina, 19 ( $\pm 3$ ) dias quando os animais receberam ciclosporina associada as CEM e 13 ( $\pm 1$ ) dias quando a aplicação das células ocorreu de maneira isolada.

Ainda que os ratos tratados a partir da associação das duas terapias tenham tido, segundo aqueles autores, uma taxa de sobrevivência do enxerto de 57%, os mesmos também relataram não ter havido diferença estatística significativa entre os grupos. Mesmo sugerindo um possível efeito sinérgico dos dois tratamentos e apesar da grande quantidade de dados sobre as propriedades imunossupressoras das CEM *in vitro* (LE BLANC et al., 2003), apenas poucos relatos sugerem que estas propriedades imunomoduladoras de CEM alogênicas poderiam ser transpostas para o cenário *in vivo*, haja vista o pouco conhecimento sobre a resposta imune do hospedeiro as CEM.

SBANO et al. (2008) também ressaltam ainda que resultados variados derivam provavelmente da utilização de modelos animais diferentes, a própria fonte para isolamento das CEM e a via de administração da terapia celular. Cabe ressaltar que o protocolo de utilização das CEM adotado por aqueles pesquisadores, consistia em apenas duas aplicações de  $5,7$  e  $10,3 \times 10^6/\text{kg}$  de células nos dias zero e três, em uma frequência menor, mas em maior quantidade de células do que o presente trabalho.

Corroborando para aumentar a controvérsia sobre a imunogenicidade e o potencial imunomodulador das CEM *in vivo*, alguns estudos em animais relatam que CEM alogênicas ou xenogênicas são rejeitadas em um hospedeiro imunocompetente (GRINNEMO et al., 2004; INOUE et al., 2006). Os próprios autores já citados, SBANO et al. (2008) concluíram que o seu estudo de um modelo de transplante de pele demonstrou um claro papel imunogênico das CEM alogênicas, quando administradas em ratos imunocompetentes, estimulando desta forma, a rejeição do enxerto.

Esta situação poderia ser evitada a partir de uma nova associação, desta vez dentro da própria terapia celular. Utilizando-se células do doador em conjunto com células do próprio receptor, conforme proposto por AKSU et al. (2008). Neste trabalho, os pesquisadores utilizando-se de oito grupos, optaram por uma co-infusão de medula óssea do doador com

células estromais mesenquimais do próprio hospedeiro. Além de um grupo controle e um segundo grupo que recebeu apenas a ciclosporina, os demais receberam o medicamento imunossupressor mais a transfusão de medula óssea em frequências progressivas (1, 2 ou 3 vezes) associada ou não a quatro aplicações de CEM aos 0, 7, 14 e 21 dias.

Os autores obtiveram como resultados, taxas maiores de sobrevivência dos enxertos. Os sete grupos tratados diferenciaram-se significativamente do grupo controle e os dois grupos que receberam duas ou quatro aplicações de medula óssea em conjunto com mais quatro aplicações de CEM, apresentaram diferença estatística quando comparados com o grupo da ciclosporina. De maneira bastante curiosa, os autores relatam ainda que os dois grupos que receberam mais aplicações de medula óssea com e sem as CEM, apresentaram sinais clínicos severos da doença do enxerto contra o hospedeiro, sendo necessário inclusive o sacrifício dos animais. Novamente, ressalta-se a importância do ajuste de doses e frequências.

Na análise histológica foi possível observar que a partir do final da primeira semana o grupo das CEM já estava em processo de cicatrização mais avançado, confirmados pela presença de crosta e por já possuir anexos dérmicos ao final da segunda semana. Pode-se perceber também um efeito de retardo na cicatrização, devido a utilização da droga ciclosporina. Salienta-se desta maneira, a ineficácia da terapia combinada da droga com a aplicação das CEM.

As demais avaliações realizadas não demonstraram maiores influência da ciclosporina ou mesmo das CEM nos animais tratados. O exame de sangue dos coelhos demonstrou que o hematócrito teve uma média geral de 43,5 ( $\pm$  2,61) na avaliação pré-cirúrgica, considerando-se os quatro grupos, enquanto que na avaliação realizada anteriormente ao procedimento de biópsia, esta média foi de 40,7 (2,63), apresentando diferença estatística significativa ( $P < 0,001$ ). As avaliações das plaquetas não apresentaram diferença antes do transplante e no momento da biópsia. As médias gerais foram de 230.350



( $\pm 79.240$ ) e após de 219.444 ( $\pm 54.040$ ). A taxa de leucócitos também não apresentou variação nestes dois períodos, apresentando como médias gerais 5,00 ( $\pm 1,64$ ) e 5,30 ( $\pm 1,77$ ).

Na avaliação da função renal, a taxa de creatinina foi maior no dia do transplante do que no momento da biópsia. Anteriormente ao primeiro procedimento, sua média foi de 1,09 ( $\pm 0,11$ ), enquanto que no segundo momento a média diminuiu para 0,92 ( $\pm 0,19$ ), apresentando diferença estatística ( $P < 0,002$ ). Por outro lado, a função hepática não se alterou. A avaliação da transaminase oxalacética demonstrou que no dia do transplante sua média foi de 61,7 ( $\pm 22,55$ ), enquanto que no momento anterior à biópsia, sua média foi de 62,9 ( $\pm 23,94$ ).

As células sentinelas, ao se defrontarem com agentes infecciosos ou com os PAMPs (padrão molecular associado a patógenos), passam a sintetizar e secretar muitas proteínas diferentes, incluindo as citocinas principais: IL-1 (interleucina 1) e TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), bem como IL-6, IL-12 e IL-18. Ao detectaram patógenos invasores, tanto macrófagos quanto mastócitos serão capazes de secretar o TNF- $\alpha$ . A presença deste fator no sítio de lesão estimula a liberação local de quimiocinas e citocinas, promovendo a aderência, a migração, a atração e a ativação dos leucócitos ao sítio invadido. Uma maior concentração de TNF- $\alpha$  é responsável pelos “sinais cardeais” da inflamação (TIZARD, 2009).

As interleucinas foram avaliadas nos grupos A, B e C e neste ponto, a utilização associada da ciclosporina com as CEM, parece ter sido benéfica para a inibição de alguns destes fatores. Na avaliação do TNF, o único grupo a divergir estatisticamente ( $P < 0,001$ ) dos demais foi o B, com uma média de 68,2 ( $\pm 5,26$ ), enquanto os grupos A e C obtiveram médias maiores, com 125,2 ( $\pm 3,56$ ) e 115,6 ( $\pm 9,61$ ), respectivamente, indicando um possível quadro inflamatório mais proeminente. Ocorrendo logo no início do processo inflamatório, a produção de TNF- $\alpha$  logo é seguida por ondas de IL-1 e IL-6.

Quando devidamente estimulados, os macrófagos são capazes de sintetizarem duas proteínas, chamadas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Da mesma maneira que o TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$  irá atuar sobre as células do endotélio vascular, de maneira que se tornem adesivas para os neutrófilos. Em quadros de doenças graves, circula pela corrente sanguínea e juntamente com o TNF- $\alpha$ , será responsável pelo comportamento doente, causando febre, letargia, mal-estar e falta de apetite. Para as IL-1, dos três grupos avaliados todos diferiram estatisticamente entre si ( $P < 0.001$ ). O grupo A apresentou a maior média, com 87,8 ( $\pm 7.19$ ), seguido pelo grupo C, com 67,2 ( $\pm 8,17$ ), enquanto que no grupo B, a média foi a menor, 34,8 ( $\pm 3,27$ ), mais uma vez sinalizando um quadro de menor inflamação a partir da associação dos tratamentos (TABELA 1).

A interleucina 6 (IL-6) também atua como uma citocina pró-inflamatória, sendo secretada por células T e macrófagos para estimular a resposta imune. Neste caso a combinação das duas terapias mais uma vez colaborou para a diminuição das IL-6, com o grupo A apresentando a maior média, seguido pelo grupo C e após pelo B. As médias foram 104,2 ( $\pm 7,26$ ), 83,4 ( $\pm 5,12$ ) e 49,6 ( $\pm 5,02$ ), respectivamente.

Já a interleucina 10 (IL-10) uma inibidora de macrófagos ativados, mantém a capacidade de inibir a expressão de moléculas do MHC de classe II nos macrófagos. Neste caso, a avaliação das IL-10, não apresentou diferenças entre nenhum dos três grupos pesquisados. As médias foram de 55,6 ( $\pm 4,88$ ), 50,2 ( $\pm 2,39$ ) e 48,6 ( $\pm 7,09$ ) para os grupos A, B e C, respectivamente. Enquanto isto, na avaliação do interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ), os três grupos voltaram a diferenciar-se entre si. O grupo A apresentou a maior média, com 162,0 ( $\pm 4,58$ ), seguido pelo grupo C, com 145,8 ( $\pm 5,17$ ) e por fim, pelo grupo B, com 80,0 ( $\pm 5,39$ ).

Um grande número de trabalhos *in vitro* já sustentavam especulações que as CEM poderiam diminuir citocinas pró-inflamatórias, ao passo que aumentariam as anti-inflamatórias, embora sejam em menor quantidade os estudos *in vivo*. Os poucos estudos realizados em animais, também citam haver diminuição destas interleucinas, como é o caso

dos trabalhos de AKSU et al. (2008); SBANO et al. (2008) e mais recentemente LAROCCA et al. (2013), sendo que este último merece destaque e aponta para uma nova perspectiva de investigação. Neste trabalho, os animais receberam uma única aplicação de CEM adipócito-derivadas um dia após o transplante de pele. Os enxertos e os linfonodos dos animais foram colhidos no dia três ou dez após o procedimento. De maneira muito interessante, os autores observaram altos níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  nos linfonodos drenantes daqueles animais que receberam aplicação alógena de CEM quando comparados com os animais do grupo controle, no décimo dia após o transplante.

## **CONCLUSÃO**

Nas condições em que o experimento foi realizado e com base nos resultados obtidos é possível concluir que tanto a aplicação do medicamento imunossupressor ciclosporina quanto das células estromais mesenquimais alógenas, quando administradas isoladamente, não foram capazes de aumentar a taxa de sobrevida do enxerto de pele, quando comparadas com o grupo controle. Além disso, as duas terapias quando utilizadas de maneira associada, foram responsáveis por causar uma rejeição mais rápida do tecido transplantado do que o grupo controle. Ainda assim, os valores mensurados das principais interleucinas pró-inflamatórias foram menores quando esta associação ocorreu, havendo diferença estatística significativa com relação ao grupo controle e o grupo que recebeu apenas células estromais mesenquimais.

## **AGRADECIMENTOS**

O autor agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de doutorado que possibilitou a realização desta pesquisa.

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Universidade Federal de Santa Maria, sob número 043/2012 e seguiu os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005. Disponível em: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/105/4/1815.full.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
- AKSU, A.E. et al. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. **Clinical Immunology**, v.127, p.348-358, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661608000399>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1016/j.clim.2008.02.003.
- BLUESTONE, J.A. et al. What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.650-654, 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/nri/journal/v7/n8/full/nri2137.html>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1038/nri2137.
- GRINNEMO, K.H. et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.5, p.1293-1300, 2004. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0022-5223/PIIS0022522303015137.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.07.037.

HERZOG, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003. Disponível em:

<<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/102/10/3483.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1182/blood-2003-05-1664.

INOUE, S. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. **Transplantation**, v.81, p.1589-1595, 2006. Disponível em: <<http://journals.lww.com/transplantjournal/pages/articleviewer.aspx?year=2006&issue=06150&article=00014&type=abstract>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1097/01.tp.0000209919.90630.7b.

LAROCCA, R.A. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells increase skin allograft survival and inhibit Th-17 immune response. **PLoS ONE**, v.8, n.10, p.1-9, 2013. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076396&representation=PDF>>. Acesso em: 23 jan. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0076396.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.1, p.11-20, 2003. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x/pdf>. Acesso em: 22 jan. 2014.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplant**, v.11, p.321-334, 2005. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/1083->

[8791/PIIS1083879105000959.pdf](http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.01.005)>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.01.005.

MEZADRI, T.J. et al. Animais de laboratório. In: \_\_\_\_\_. **Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis: UFSC, 2004. Cap.4, p.69-100.

NAKANO, M. et al. Clinicopathologic studies on human epithelial autografts and allografts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.90, p.899-909, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1410042>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

NANCHALAL, J.; WARD, C.M. New grafts for old? A review of alternatives to autologous skin. **British Journal of Plastic Surgery**, v.45, p.354-363, 1992. Disponível em: <<http://download.journals.elsevierhealth.com/pdfs/journals/0007-1226/PII000712269290004H.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

PINTO FILHO, S.T.L. et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v.20 (Edição Comemorativa), p.49-59, 2013. Disponível em: <<http://www.fmvz.unesp.br/rvz/index.php/rvz/article/viewFile/652/445>> Acesso em: 29 jan. 2014.

R (2013). R: A language and environment for statistical computing, 2013. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v.312, p.2169-2179, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482706001224>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

SBANO, P. et al. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. **Archives of Dermatological Research**, v.300,

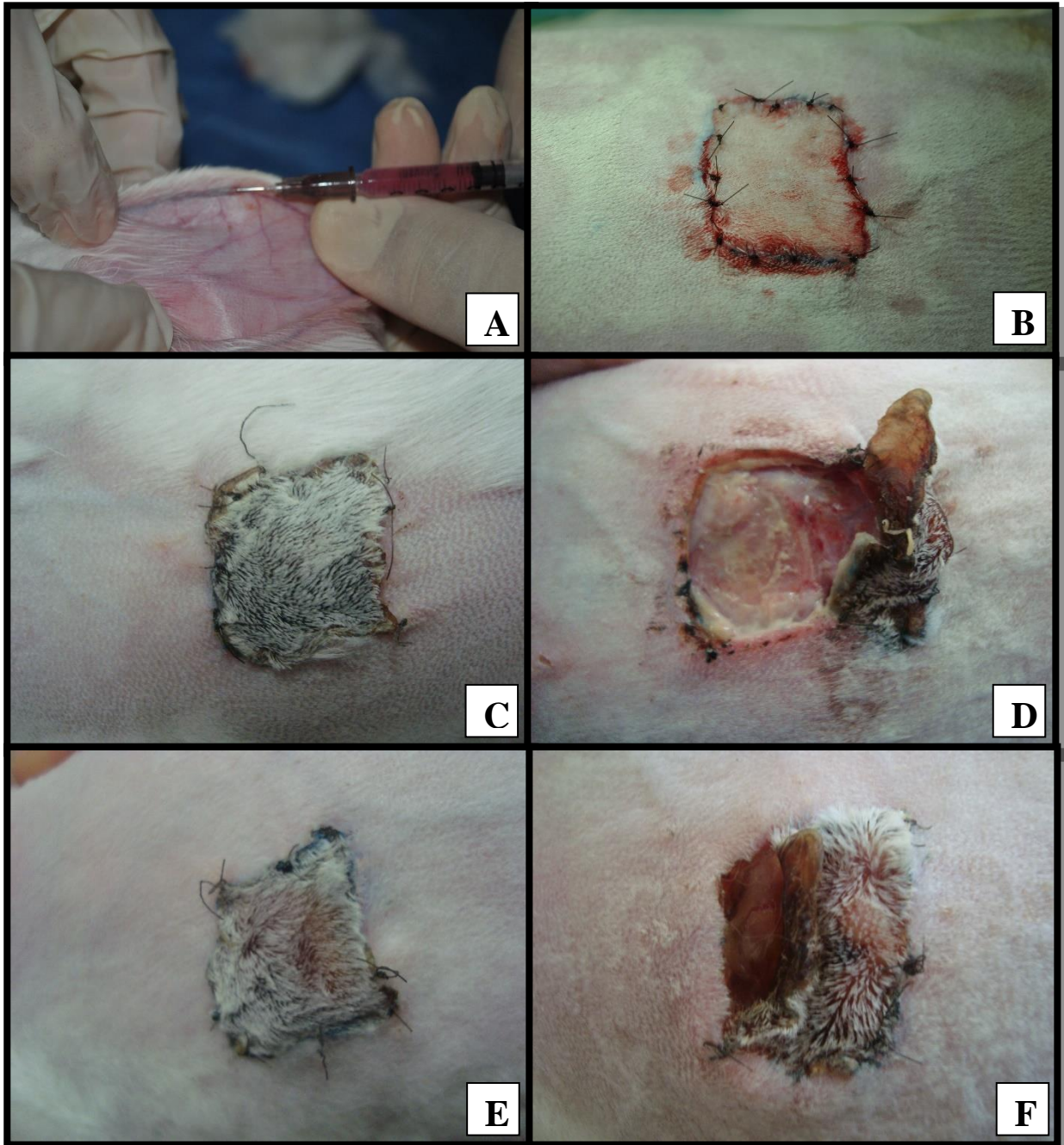
p.115-124, 2008. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00403-007-0827-9>>. Acesso em: 22 jan. 2014. doi: 10.1007/s00403-007-0827-9.

SOTIROPOULOU, P.A. et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. **Stem cells**, v.24, p.74-85, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1634/stemcells.2004-0359/pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1634/stemcells.2004-0359.

TIZARD, I.R. Rejeição a enxertos de órgãos. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 8.ed. São Paulo: Elsevier, 2009. Cap.29, p.391-402.

TREICHEL, T.L.E. et al. 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**, v.48, n.1, p.62-72, 2011. Disponível em: < <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/34377>>. Acesso em: 29 jan. 2014.

ZOGRAFOU, A. et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.64, p.1647-1656, 2011. Disponível em: [http://www.jprasurg.com/article/S1748-6815\(11\)00386-X/pdf](http://www.jprasurg.com/article/S1748-6815(11)00386-X/pdf). Acesso em: 13 jan. 2014. doi: 10.1016/j.bjps.2011.07.009.



**Figura 1** - Alotransplante de pele em coelhos associado ao uso de Células Estromais Mesenquimais como terapia imunomoduladora. **A.** Aplicação de células estromais mesenquimais diluídas em meio de cultivo, na veia auricular caudal de um coelho, no dia anterior ao transplante de pele. **B.** Enxerto de pele alógeno de 3 x 3 cm suturado no coelho receptor. **C.** Aspecto do enxerto de pele em animal do grupo A, aos 12 dias. **D.** Aspecto do enxerto de pele em animal do grupo B, aos 4 dias. **E.** Aspecto do enxerto de pele em animal do grupo C, aos 8 dias. **F.** Aspecto do enxerto de pele em animal do grupo D, aos 8 dias.



**Tabela 1** – Alotransplante de pele em coelhos associado ao uso de Células Estromais Mesenquimais como terapia imunomoduladora. Avaliação estatística dos valores obtidos para os dias de rejeição dos enxertos de pele, interleucinas, fator de necrose tumoral e interferon  $\gamma$ .

Parâmetros Observados	Rejeição (dias)		IL-1 (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Grupo A	13,0a	1,41	87,8a	7,19	104,2a	7,26
Grupo B	7,2b	3,49	34,8c	3,27	49,6c	5,02
Grupo C	11,4ab	3,58	67,2b	8,17	83,4b	5,12
Grupo D	9,0ab	1,22				
Parâmetros Observados	TNF (pg/ml)		INFg (ug/ml)		IL-10 (pg/ml)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Grupo A	125,2 <sup>a</sup>	3,56	162,0a	4,58	55,6a	4,88
Grupo B	68,2b	5,26	80,0c	5,39	50,2a	2,39
Grupo C	115,6a	9,61	145,8b	5,17	48,6a	7,09

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## 5. DISCUSSÃO

A opção pelo uso do coelho neste três experimentos relatados deu-se porque trata-se de uma espécie bastante utilizada na prova de irritantes cutâneos primários, rubefacientes, fotossensibilizadores, irritantes dos olhos e outros alérgicos, em razão de sua característica hipersensibilidade. Além disto, é tida como a espécie de eleição para o teste de capacidade pirógena de preparados farmacológicos e biológicos. Por fim, as grandes veias marginais da orelha desta espécie permitem um acesso fácil ao sistema circulatório, constituindo-se em um recurso valioso na investigação sorológica e imunológica (COUTO, 2002).

Na primeira parte deste trabalho, que avaliou o uso de células estromais mesenquimais para o reparo da pele, a medida da ferida criada foi de 2 x 2 cm, enquanto que no experimento final, que avaliou o possível potencial imunossupressor destas mesmas células, o enxerto de pele media 3 x 3 cm e foi realizada a remoção do tecido subcutâneo. Estas medidas foram suficientes para atender os critérios avaliados nas duas etapas do trabalho, embora a literatura apresente em um grande número de publicações, áreas de ferida e enxertos com medidas menores. Vale ressaltar também, que a maior parte destes trabalhos utilizam ratos ou camundongos, espécies com menor área de superfície da pele, portanto.

Este é o caso de algumas pesquisas como a de SBANO et al. (2007), que utilizaram enxertos de espessura total de 1,5 x 1,5 cm, em seu trabalho com ratos Wistar. XU et al. (2007) por sua vez, utilizaram enxertos de 1,0 x 1,5 cm. Interessante observar que este trabalho apresentou uma alternativa bastante curiosa para fixação do enxerto, pois os pesquisadores não suturaram o enxerto ao leito criado nos animais receptores, mas sim recobriram o enxerto com gaze impregnada com um tipo de geleia de petróleo e fecharam seu curativo com um adesivo plástico, removendo sete dias após o transplante. Esta possibilidade de fixação eliminaria um dos grandes entraves presentes neste tipo de pesquisa, a dificuldade de manter o enxerto fixado pela complicada contenção dos animais e a tendência que os mesmos apresentam de tentar coçar a ferida ou remover o enxerto.

Demais pesquisadores como ZOGRAFOU et al. (2011) optaram por um enxerto de espessura total de 3 x 3 cm, em seu trabalho que avaliou a sobrevivência do enxerto de pele após transplante autólogo de células estromais derivadas de tecido adiposo em ratos. DOMEN et al. (2011) utilizaram enxertos de 1,5 x 1,5 em seu trabalho, também com ratos.

Com relação a quantidade de células estromais mesenquimais e a frequência de aplicação que deveriam ser utilizadas na terapia celular, tanto para o reparo/regeneração de

órgãos ou tecidos, quanto para o possível potencial imunossupressor, não há nenhum tipo de consenso na literatura. SBANO (2007) utilizou  $5,7 \times 10^6$ /kg diluídas em 200  $\mu$ L de 0,9% de solução de NaCl no dia 0 e  $10,3 \times 10^6$ /kg no dia 3, para o transplante de pele em ratos. XU et al. (2007) por sua vez, aplicaram  $3 \times 10^6$  células estromais mesenquimais na veia da cauda de camundongos, no dia anterior ao transplante de pele. ZOGRAFOU et al. (2011) utilizaram  $1 \times 10^6$  células estromais mesenquimais ressuspendidas em 0,5 mL de Tampão fosfato-salino (PBS). Sua aplicação foi realizada com uma seringa de 1 mL e distribuída em 10 pontos ao redor do enxerto.

No presente trabalho, foi realizada uma aplicação local de  $2 \times 10^6$  células estromais mesenquimais, por via subcutânea, nas quatro bordas da ferida, na pesquisa que avaliou a cicatrização da pele após administração da terapia celular. No trabalho seguinte, que testou o potencial imunossupressor destas células, os coelhos receberam a mesma aplicação de  $2 \times 10^6$  células, entretanto com uma frequência maior e desta vez pela via intravenosa. As aplicações foram realizadas no pré-operatório (dia -1), durante o período transoperatório (dia 0) diretamente no leito do transplante e nos dias 3, 7 e 10 de pós-operatório (IV). Como não foi possível visualizar um padrão na literatura, ou seja, uma quantidade de células necessária e uma frequência ideal, estas condições foram determinadas a partir de experiências prévias. Esta mesma condição foi determinante pela escolha da quinta passagem para utilização das células em cultivo.

Para o trabalho que avaliou o possível potencial imunossupressor das células estromais mesenquimais, a dose utilizada do imunossupressor ciclosporina foi de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , dose padrão para evitar a rejeição de órgãos e tecidos, conforme SBANO (2007). Ainda com relação a este último trabalho, a determinação de viabilidade ou não do enxerto seguiram o que foi estipulado por ZOGRAFOU et al. (2011). Neste trabalho, os autores classificaram o enxerto como viável, quando a pele se apresentava de uma coloração esbranquiçada ou rosácea, macia e com textura normal, enquanto que os enxertos considerados inviáveis, eram aqueles que apresentavam a pele necrótica, escurecida, rígida e que não sangrava quando cortada.

Na avaliação do estresse oxidativo (EO), constatou-se uma maior taxa de produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) na quarta e quinta passagem para o cultivo imediato e a partir da terceira até a sexta passagem para os cultivos realizados após 12 e 24 horas. Entretanto, a morte celular determinada pela liberação do DNA, foi mais intensa a partir da nona passagem. Isto pode ser justificado pelo pressuposto de que, de maneira geral, as células apresentam diferentes níveis de tolerância ao estresse oxidativo. Podem entrar em estado de

senescência se expostas a níveis subletais de EROs (LU; FINKEL, 2008) ou chegar até mesmo ao estágio de morte celular por apoptose, quando expostas a níveis altos de EROs (CAO et al., 2008).

A própria utilização de CEM como uma terapia para o tratamento de várias lesões em diferentes tecidos poderia aumentar o estresse oxidativo e a concentração de  $H_2O_2$ . Estas observações já foram realizadas, embora o mecanismo para desenvolvimento de tal fenômeno permaneça pouco estabelecido (PERVAIZ et al., 2009). Considerando-se que o estado fisiológico da medula óssea, por exemplo, apresente uma baixa tensão de oxigênio e nutrientes (ELIASSON; JONSSON, 2010), é possível especular que a transposição de CEM para outros tecidos com um ambiente de alta tensão de oxigênio, caracterizando um cenário hipóxia-reoxigenação, poderia predispor a formação de EROs (VENARDOS et al., 2007).

Considerando que o tratamento com CEM poderia levar à formação de EROs, ainda assim TAVARES e colaboradores (2010) relataram uma menor presença de citocinas inflamatórias em grupos tratados com as células em modelos de infarto agudo do miocárdio. Estes autores propõem que a redução destas citocinas, com posterior diminuição do processo inflamatório, seria dado pela degradação proteica destes fatores por um forte desequilíbrio redox. Posteriormente, CHEN et al. (2011) corroboraram com esta possibilidade, ao afirmar que a terapia com CEM derivadas de tecido adiposo minimizaram danos nos rins após lesão de insuficiência renal, através da supressão do estresse oxidativo e resposta inflamatória. Os resultados encontrados por estes autores e a justificativa fornecida pelos mesmos, poderia justificar também, os resultados encontrados no presente trabalho, que mostraram um menor quadro inflamatório, tanto para a cicatrização da pele, quanto na manutenção do enxerto, este último inclusive, registrou diminuição das interleucinas inflamatórias.

A utilização eficaz de células estromais mesenquimais como estratégia terapêutica no tratamento de indivíduos portadores de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, tais como infarto agudo do miocárdio (CHEN et al., 2004), isquemia cerebral (KUROZUMI et al., 2005) e diabetes (LEE et al., 2006; EZQUER et al., 2008) já é conhecido e relatado na literatura médica. Entretanto, são escassas as informações relacionadas ao potencial destas células para gerenciar o estresse oxidativo, embora alguns trabalhos demonstrem que estas células seriam altamente resistentes à morte induzida por EO. Possivelmente, esta menor susceptibilidade aos efeitos prejudiciais das espécies reativas, se correlacionem com a capacidade das CEM “limparem” de maneira eficaz o peróxido e o peroxinitrito (VALLE-PRIETO; CONGET, 2010).

Especula-se que as CEM seriam capazes de expressar algumas enzimas necessárias para o reparo do próprio DNA (SILVA et al., 2003). Desta maneira, possuiriam principalmente mecanismos enzimáticos, mas também não-enzimáticos para desintoxicar espécies reativas, bem como corrigir possíveis danos oxidativos de proteoma e genoma, garantindo assim, uma gestão eficiente de EO.

No entanto, parece ser consenso na literatura que, quando o EO ocorre em excesso, serão acumulados danos celulares que poderão resultar em senescência, apoptose ou transformação das células (VALLE-PRIETO; CONGET, 2010). A garantia de manutenção de um estado redox não prejudicial às células, seria assegurado por um “maquinário” celular, complexo e abundante. Por este motivo, uma gestão eficiente do EO para ser um recurso crítico e de maior relevância para as células estromais, pois é necessário considerar que estas células, quando *in vivo* apresentam uma vida útil muito longa e são expostas a situações de EO por longos períodos de tempo.

Os efeitos terapêuticos observados após o transplante de CEM em indivíduos com doenças relacionadas com o EO poderia ser atribuído, entre outros mecanismos, com o potencial destas células para limpar, de forma exógena e eficaz, espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, após o *homing* no nicho de tecidos danificados (VALLE-PRIETO; CONGET, 2010).

Assim sendo, as células estromais poderiam “limpar” de maneira extrínseca insultos oxidativos, como por exemplo, a inflamação. Além desta nova hipótese levantada, surge também outro viés na tentativa de elucidar alguns benefícios já conhecidos da atuação destas células, no reparo ou na regeneração dos mais diferentes órgãos ou tecidos.

TEPPER et al. (2003) descreveram como mecanismos básicos de neovascularização, a angiogênese e a vasculogênese. O primeiro mecanismo ocorre através do surgimento de microvasos a partir de uma rede capilar pré-existente, enquanto que o segundo mecanismo, conta com o surgimento de novos vasos sanguíneos, formados por células endoteliais progenitoras que se diferenciaram *in situ*.

Até o momento, a angiogênese é reconhecida como a única forma de neovascularização em tecidos adultos, de maneira que a vasculogênese permaneceria restrita ao desenvolvimento do embrião (RISAU et al., 1988). Contudo, após as descobertas recentes das células progenitoras endoteliais, alguns autores apresentaram novos elementos com o intuito de comprovar que a vasculogênese também poderia ocorrer em tecidos adultos (ASAHARA et al., 1997).

Desta maneira, a plasticidade das células estromais mesenquimais poderia contribuir para a vasculogênese, através da sua diferenciação *in vivo* em células endoteliais progenitoras. PLANAT-BENARD et al. (2004) descreveram esta situação de diferenciação das células estromais mesenquimais em células endoteliais, tanto *in vitro*, como em situações *in vivo*.

Assim, o efeito indireto da terapia celular, ou seja, o efeito parácrino ou autócrino com células estromais mesenquimais parece ser o principal mecanismo para regular a angiogênese. Na complexa cascata da neovascularização, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é tido como o principal controlador, mantendo um controle de *feedback* positivo exercido pelas células endoteliais (MUROHARA et al., 1998; TAUB et al., 2000). UYSAL et al. (2010) observou aumento dos níveis de VEGF em seus grupos experimentais, o que indica este efeito indireto, mas ainda assim, ressalta que a relação entre a aplicação de CEM e a possibilidade de neovascularização permaneceria obscura, sendo necessário investigações mais detalhadas.

CARRIÈRE et al. (2009) demonstraram em seu estudo que uma exposição transitória de CEM derivadas de tecido adiposo a uma moderada geração de EROs mitocondrial antes da aplicação *in vivo*, aumentou fortemente a propriedade pró-angiogênicas destas células. Para alcançar este objetivo, os pesquisadores utilizaram dois diferentes tipos de inibidores mitocondriais, rotenona e antimicina. Este aumento de EROs mitocondrial estimulou a produção de fator de crescimento do hepatócito (HGF) e VEGF. Os autores ressaltam ainda que este tratamento prévio com uma geração de EROs mitocondrial moderada induziu uma alta resistência destas CEM a morte celular induzida por lesões oxidativas.

Todas estas possibilidades expostas, poderiam explicar o motivo pelo qual a utilização da terapia celular auxiliou na cicatrização da ferida de pele e diminuiu a inflamação tanto na avaliação da cicatrização, quanto na manutenção do enxerto. As células estromais mesenquimais foram cultivadas até a quinta passagem, quando foram utilizadas para a terapia. Neste momento do cultivo, houve aumento na taxa de produção de EROs, independentemente do momento em que foi realizado o processamento. Estas células que apresentavam-se de certo modo estressadas, mas de maneira moderada, pois não haviam indícios de morte celular, possivelmente tenham recebido estímulo para aumentar a produção de VEGF. Após a aplicação destas células nos pacientes, por quaisquer uma das vias de administração, o VEGF em maior quantidade carregado por estas células, poderia ter estimulado a angiogênese ou, até mesmo, uma situação de vasculogênese.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nas três pesquisas realizadas, pode-se concluir que o isolamento da fração vascular estromal do tecido adiposo de coelhos é uma técnica viável de ser executada e o cultivo desta fração para obtenção das células estromais mesenquimais forneceu número suficiente de células para aplicação nos animais. Com relação à cicatrização das feridas, pode-se observar que no grupo controle houve uma evolução normal da ferida, temporal e morfológica, enquanto que nos grupos tratados a epiderme mostrou espessura maior e o tecido de granulação mostrou-se ligeiramente mais maduro do que nos controles. O uso da fração ou das células cultivadas não apresentou nenhuma reação nos animais. Com relação as células cultivadas, recomenda-se a sua utilização no momento da terceira passagem, quando se apresentam em grande quantidade, altamente viáveis e sem indicação de que estejam sob situações de estresse oxidativo. Por fim, pode-se concluir também que tanto a aplicação do medicamento imunossupressor ciclosporina quanto das células estromais mesenquimais alógenas, quando administradas isoladamente, não foram capazes de aumentar a taxa de sobrevida do enxerto de pele, quando comparadas com o grupo controle. Apesar disso, as duas terapias quando utilizadas de maneira associada, foram responsáveis por causar uma rejeição mais rápida do tecido transplantado do que o grupo controle. Ainda assim, os valores mensurados das principais interleucinas pró-inflamatórias foram menores quando esta associação ocorreu.

## 7. REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, p. 1815-1822, 2005.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, p. 964-967, 1997.

BAKER, D.E. et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 207-215, 2007.

BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 42-48, 2002.

BLUESTONE, J.A. et al. What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 650-654, 2007.

CAO, C. et al. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human skin keratinocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.283, p.28897-28908, 2008.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as tropic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1076-1084, 2006.

CARRIÈRE, A. et al. Preconditioning by Mitochondrial Reactive Oxygen Species Improves the Proangiogenic Potential of Adipose-Derived Cells-Based Therapy. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, p. 1093-1099, 2009.

CHAPEL, A. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. **The Journal of Gene Medicine**, v. 5, p. 1028-1038, 2003.

CHEN, S.L. et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **The American Journal of Cardiology**, v. 94, p. 92-95, 2004.



CHEN, Y.T. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Protects Kidneys against Ischemia-Reperfusion Injury through Suppressing Oxidative Stress and Inflammatory Reaction. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, p. 51, 2011.

COUTO, S.E.R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. (Org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002. cap. 12, p. 93-103.

DENG, W. et al. Allogeneic bone marrow-derived flk-1+Sca-1- mesenchymal stem cells leads to stable mixed chimerism and donor-specific tolerance. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 861-867, 2004.

DJOUAD, F. et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animal. **Blood**, 102, p. 3837-3844, 2003.

DOMEN, J. et al. Tolerance induction by hematopoietic cell transplantation: Combined use of stem cells and progenitor cells. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 30, n. 5, p. 507-514, 2011.

ELIASSON, P.; HONSSON, J.I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, p. 17-22, 2010.

EZQUER, F.E. et al. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 14, p. 631-640, 2008.

FURLANI, D. et al. A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart. **Cell Transplantation**, v. 18, p. 319-331, 2009.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, p. 3483-3493, 2003.

HORNER, B.M. et al. Induction of Tolerance to an Allogeneic Skin Flap Transplant in a Preclinical Large Animal Model. **Transplantation Proceedings**, v. 41, p. 539-541, 2009.

KUROZUMI, K. et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. **Molecular Therapy**, v. 11, p. 96-104, 2005.

LE BLANC, K. Mesenchymal stromal cells: tissue repair and immune modulation. **Cytherapy**, v. 8, p. 559-561, 2006.

LECHLER, R.I. et al. Organ transplantation-how much of the promise has been realized? **Nature Medicine**, v. 6, p. 605-613, 2005.

LEE, R.H. et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 17438-17443, 2006.

LI, T.S. et al. Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. **Cardiovascular Research**, v. 89, p. 157-165, 2011.

LU, T.; FINKEL, T. Free radicals and senescence. **Experimental Cell Research**, v. 314, p. 1918-1922, 2008.

MAITRA, B. et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. **Bone Marrow Transplantation**, v. 33, p. 597-604, 2004.

MEISEL, R. et al. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood**, v. 12, p. 4619-4621, 2004.

MUROHARA, T. et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. **Circulation**, v. 97, p. 99-107, 1998.

NAKANO, M. et al. Clinicopathologic studies on human epithelial autografts and allografts. **Plastic Reconstructive Surgery**, v. 90, p. 899-909, 1992.

NANCHALAL, J.; WARD, C.M. New grafts for old? A review of alternatives to autologous skin. **Brazilian Journal Plastic Surgery**, v. 45, p. 354-363, 1992.

PAULINO, C.A. Agentes imunoestimulantes e imunossupressores. In: SPINOSA, H.G; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. (Org.). **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 54, p. 596-608.

PERVAIZ, S.; TANEJA, R.; GHAFARI, S. Oxidative stress regulation of stem and progenitor cells. **Antioxidant Redox Signal**, v. 11, n. 11, p. 2777-2789, 2009.

PINTO FILHO, S.T.L. et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v.20 (Edição Comemorativa), p. 49-59, 2013.

PLANAT-BENARD, V. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, p. 656-663, 2004.

PROCKOP, D.J.; GREGORY, C.A.; SPEES, J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, suplemento 1, p. 11917-11923, 2003.

RASMUSSEN, I. et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. **Experimental Cell Research**, v. 1, p. 33-41, 2005.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 312, p. 2169-2179, 2006.

RISAU, W. et al. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. **Development**, v. 102, p. 471-478, 1988.

RUBIO, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Research**, v. 65, p. 3035-3039, 2005.

SAREEN, D. et al. Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. **PloS ONE**, v.4, e7630, 2009.

SBANO, P. et al. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. **Archives of Dermatological Research**, v. 300, p. 115-124, 2008.

SILVA, W.A. et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 21, p. 661-669, 2003.

TAVARES, A.M.V. et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life Sciences**, v. 87, p. 699-706, 2010.

TAUB, P.J.; SILVER, L.; WEINBERG, H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 105, p. 1034-1042, 2000.

TEPPER, O.M. et al. Endothelial progenitor cells: the promise of vascular stem cells for plastic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 111, p. 846-854, 2003.

TIZARD, I.R. Drogas e outros agentes que afetam o sistema imune. In:\_\_\_\_. **Imunologia Veterinária**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, 2009. cap. 36, p. 489-498.

TREICHEL, T.L.E. et al. 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**, v.48, n.1, p.62-72, 2011.

TSE, W.T. et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, p. 389-397, 2003.

UCCELLI, A. et al. Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 6, p. 17-22, 2006.

UCCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression. **Trends in Immunology**, v. 28, p. 219-226, 2007.

UYSAL, C.A. et al. Effect of Mesenchymal Stem Cells on Skin Graft to Flap Prefabrication: An Experimental Study. **Transplantation Surgery and Research**, v. 65, n.2, p. 237-244, 2010.

VALLE-PRIETO, A.; CONGET, P.A. Human Mesenchymal Stem Cells Efficiently Manage Oxidative Stress. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 12, p. 1885-1893, 2010.

VENARDOS, K.M. et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1539-49, 2007.

WELSH, M.; MALE, D. Transplante e Rejeição. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (Org.). **Imunologia**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap. 24, p. 24.1-24.10.

XU, G. et al. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Research**, v. 17, p. 240-248, 2007.

ZOGRAFOU, A. et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.64, p.1647-1656, 2011.