

# DIMINUIÇÃO DO ÍNDICE DE NECROSE EM ENXERTOS CUTÂNEOS EM COELHOS MEDIANTE A APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS XENÓGENAS

## *REDUCING OF THE NECROSIS INDEX IN SKIN GRAFTS IN RABBITS THROUGH APPLICATION OF XENOGENOUS MESENCHYMAL STEM CELLS*

**S. P. MARIA<sup>1</sup>; A. B. DE NARDI<sup>2</sup>; J. L. ALVAREZ<sup>3</sup>; J. M. PAZZINI<sup>4</sup>; L. GIRALDELLI<sup>5</sup>; B. MORAIS<sup>6</sup>; M. BARROS<sup>7</sup>; P. C. MORAES<sup>8</sup>**

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a inflamação em auto-enxertos cutâneos obtidos no terceiro, sétimo e décimo quarto dia de pós-operatório, além disso, buscou-se determinar diferenças no processo de cicatrização no grupo tratado com células tronco mesenquimais xenógenas em relação ao grupo controle utilizando a avaliação microscópica e imuno-histoquímica. A avaliação microscópica foi realizada utilizando cortes histológicos corados pela técnica de histoquímica com hematoxilina-eosina (HE), e a imuno-histoquímica, com cortes submetidos a anticorpos específicos. As variáveis analisadas foram quantidade de vasos, células inflamatórias, COX-2, Macrófagos e presença de necrose. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software R. A quantidade de vasos foi maior ( $p < 0,0001$ ) no grupo tratamento (GT) durante o dia 3, enquanto no grupo controle (GC) foi maior no dia 7. No dia 3 houve menor porcentagem de necrose no grupo tratamento (GT) ( $p = 0,038$ ). Nos demais dias avaliados não houve diferença entre a porcentagem de necrose observada nos dois tratamentos ( $p = 0,98$ ), sendo de 53% para o grupo controle (GC) e 47% para o grupo tratamento (GT). Em relação ao número de macrófagos não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,5637$ ). Entretanto, entre os dias houve diferença significativa ( $p = 0,0223$ ), sendo menor número de macrófagos no terceiro dia. A imunomarcação de COX-2 foi similar entre os grupos ( $p = 0,5637$ ) e entre os dias ( $p = 0,9843$ ). Portanto, o emprego das células tronco mesenquimais xenógenas em enxertos cutâneos promoveu menor ocorrência de necrose, favorecendo sua cicatrização, e não induziu o processo inflamatório, sendo assim factível seu uso em cirurgias reconstrutivas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Células tronco. Cicatrização. Cirurgia reconstrutiva. Enxertos. Inflamação.

### SUMMARY

The present study aimed to assess inflammation in skin autografts obtained on the third, seventh and fourteenth postoperative day, in addition, it sought to determine differences in the healing process in the group treated with xenogenous mesenchymal stem cells in relation to the control group using microscopic and immunohistochemical evaluation. Microscopic evaluation was performed using histological sections, stained by the hematoxylin-eosin (HE) histochemistry technique, and immunohistochemistry with sections were subjected to specific antibodies. The variables analyzed were the number of vessels, inflammatory cells (COX-2 and Macrophages) and the presence of necrosis. The data were analyzed statistically by software R. The number of vessels was higher ( $p < 0.0001$ ) in the treatment group (GT) during day 3, while in the control group (CG) it was higher on day 7. On day 3 there was a lower percentage of necrosis in the treatment group (GT) ( $p = 0.038$ ). On the other evaluated days, there was no difference between the percentage of necrosis observed in the two treatments ( $p = 0.98$ ), being 53% for the control group (CG) and 47% for the treatment group (GT). Regarding the number of macrophages, there was no difference between groups ( $p = 0.5637$ ). However, between days there was a significant difference ( $p = 0.0223$ ), with a lower number of macrophages on the third day. The immunostaining of COX-2 was similar between groups ( $p = 0.5637$ ) and between

<sup>1</sup> Estima Hospital Veterinário, Av. Granadeiro Guimarães, 155, Taubaté, SP, Brasil, CEP 12020-130. \*Autora para correspondência: [soniaprince.m@gmail.com](mailto:soniaprince.m@gmail.com).

<sup>2</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil, CEP 14884-900.

<sup>3</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil, CEP 14884-900.

<sup>4</sup> Rua Oswaldo Cruz, 2939, Jardim Aeroporto, São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15030-400.

<sup>5</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil, CEP 14884-900.

<sup>6</sup> Alphaville Empresarial Edifício Business Center II - Sala 101, Rua Baguaçu, 26, Campinas, SP, Brasil, CEP 13098-326.

<sup>7</sup> Alphaville Empresarial Edifício Business Center II - Sala 101, Rua Baguaçu, 26, Campinas, SP, Brasil, CEP 13098-326.

<sup>8</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, SP, Brasil, CEP 14884-900.

days ( $p = 0.9843$ ). Therefore, the use of xenogenous mesenchymal stem cells in skin grafts promoted a lower occurrence of necrosis, favoring its healing, and did not induce the inflammatory process, thus making its use in reconstructive surgery feasible.

**KEY-WORDS:** Stem cells. Healing. Reconstructive surgery. Grafts. Inflammation.

## INTRODUÇÃO

O enxerto cutâneo é um segmento de pele separado por completo a partir de uma região saudável e utilizado novamente para cobrir outra área desprovida de superfície epitelial (PAVLETIC 2011). Inicialmente o enxerto é isento de vascularização e sua sobrevivência depende da revascularização, que deve ocorrer até o 7º ou 8º dia de pós-operatório (FOSSUM 2013).

As células tronco mesenquimais (MSCs) são células provenientes da camada embrionária da mesoderme (BELTRÁN 2012, VOLK & THEORET 2013). Estudos recentes têm mostrado que MSCs oriundas de tecido adiposo (ADSCs) são capazes de acelerar o processo de cicatrização de feridas (KIM et al. 2007) por meio do aumento da secreção e da deposição de colágeno (KIM et al. 2007, FRANCK et al. 2019). Em modelos de isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos em padrão axial foi expressa redução da necrose e de complicações, o que fundamenta que as MSCs autógenas ou alogênicas têm ações angiogênica (KIM et al. 2011, HAMADA et al. 2019, FRANCK et al. 2019), anti-inflamatória e imunomoduladora (PU et al. 2017, OLIVEIRA et al. 2018, PINTO-FILHO et al. 2018), configurando efeito parácrino (REHMAN et al. 2004). Essas ações ocorrem por trans diferenciação direta compatível com tecido lesionado ou de maneira indireta através da atuação de fatores de crescimento com ação anti-fibrótica ou anti-apoptótica. Outros estudos relatam que ADSCs de suínos transplantadas na articulação de cães com osteoartrite produzem efeito favorável no controle da doença (TSAI et al. 2014), sem que ocorram sinais clínicos de rejeição ao transplante xenógeno.

No processo de cicatrização de feridas, há a fase inflamatória (ISAAC et al. 2010). Primeiramente, há migração de neutrófilos provindos de vasos sanguíneos, seguida da migração de monócitos, que se diferenciam em macrófagos. Estes, juntamente com os neutrófilos, removem partículas estranhas, bactérias e tecidos mortos do leito da ferida, e produzem uma diversos fatores, como o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF). No entanto, a duração extensa dessa fase gera excesso de exsudato na ferida, o que pode atrasar a cicatrização (ARNOLD & WEST 1991).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a inflamação mediante análise histológica e imunohistoquímica em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos 3, 7 e 14 dias de pós-operatório, e determinar diferenças no processo de cicatrização no grupo tratado com MSCs xenógenas oriundas de tecido adiposo canino em relação ao grupo controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (ECUA / FCAV), protocolo número 173466/15, da Faculdade de Ciências Agrárias e

Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), Campus de Jaboticabal / SP, Brasil, para o projeto intitulado “Efeitos das células tronco mesenquimais xenógenas de tecido adiposo na neovascularização e cicatrização de auto enxertos cutâneos em coelhos”.

Foram utilizadas trinta coelhas da raça New Zealand White (*Oryctolagus cuniculus*), com quatorze semanas de idade e peso médio de 3,0kg (desvio padrão 0,14), clinicamente saudáveis e sem alterações físicas. Os animais foram divididos em dois grupos, GC (Grupo Controle), GT (Grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs), intralesional), contendo 15 animais cada. Imediatamente após a enxertia, cada grupo foi dividido aleatoriamente em quatro subgrupos, de acordo com o tempo de eutanásia: 3, 7, 14 com cinco animais cada. Antes do procedimento experimental, todos os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais por um período de adaptação de quatro semanas, em ambiente controlado para redução da resposta ao estresse, recebendo água *ad libitum* e 100 gramas por dia de ração comercial para engorda (Agromix Animal Nutrition, Jaboticabal / SP, Brasil) e 100 gramas de feno a cada 48 horas.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de cães foram obtidas no banco de células-tronco da empresa Regenera Stem Cells® (Campinas / SP, Brasil), criopreservadas em frascos individuais contendo doses de  $2 \times 10^6$  células, prontas para uso. De acordo com informações da empresa, a origem do tecido adiposo é periovariano (10-15 gramas) coletado durante a castração de doadores jovens ( $\leq 2$  anos) e saudável (negativo para cinomose, parvovírus e leishmania). O tecido adiposo coletado foi lavado, fragmentado e incubado por uma hora em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS) com colagenase tipo I a 0,1% e centrifugado. Posteriormente, o precipitado celular foi ressuspenso em cultura (meio Eagle modificado com alta concentração de glicose (LGC Biotechnology, São Paulo, Brasil), 15% de soro fetal bovino (Hyclone Inc., Logan / UT, EUA), 1% de penicilina / estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina (LGC Biotechnology) e incubado a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando atingiu aproximadamente 70% de confluência, as células foram tripsinizadas e expandidas. Parte do material foi separada para caracterização, onde o potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSC) foi avaliado por meio de sua capacidade de se diferenciar em três diferentes linhagens celulares (osteogênica, adipogênica e condrogênica) em condições de cultura específicas. O perfil imunofenotípico das CTMs foi avaliado por citometria de fluxo por expressão de CD44, CD73, CD90, CD105 e ausência de CD34 e CD45.

O Transplante de células-tronco xenógenas ocorreu da seguinte maneira para o GT: a primeira dose de  $2 \times 10^6$  células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) foi intralesional antes de posicionar o enxerto no local

receptor. Imediatamente após o descongelamento do ADSC e posterior diluição de  $2 \times 10^6$  ADSCs em 0,5 mL de solução de ringer com lactato, 0,1 mL foi injetado em cinco locais diferentes (bordas laterais confluentes da ferida e no meio da lesão) usando uma agulha 21 G. Os animais receberam a segunda dose no sétimo dia de pós-operatório, respectivamente, através das fendas laterais dos enxertos. No entanto, nos animais do GC, apenas o auto-enxerto de pele foi realizado. O descongelamento e lavagem das ADSCs foram realizados utilizando o mesmo kit de descongelamento da empresa que garante a viabilidade das ADSCs acima de 70%; por isso, após o descongelamento do ADSC, não foi realizado teste de viabilidade no momento do transplante intralesional.

As análises foram realizadas em 30 amostras (blocos de parafina) de pele com tecido cicatricial de auto-enxertos cutâneos procedentes dos coelhos. Os cortes foram corados pelo método histoquímico para posterior análise em microscopia óptica. Utilizou-se Hematoxilina & Eosina para avaliação de epiderme e derme quanto à presença de células mononucleares, polimorfonucleares, plasmócitos, necrose, proliferação vascular e fibroblástica.

As avaliações microscópicas da quantificação e intensidade da proliferação vascular na derme foram realizadas dividindo o corte em duas porções de análises compreendendo: região distal do subcutâneo e região proximal do subcutâneo. A análise dos cortes histológicos foi realizada pelo mesmo patologista, sem o conhecimento prévio da identificação dos grupos. A avaliação histológica das lâminas foi realizada em microscópio óptico na objetiva de maior ampliação (40X). Os dados obtidos utilizando Hematoxilina & Eosina foram determinados pelo método quantitativo (GARROS et al. 2006) e registrados em fichas individuais para cada animal (BYDLOWSKI 2009).

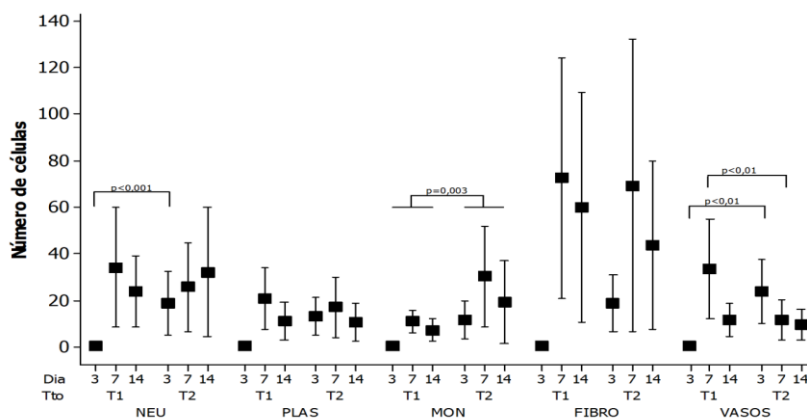
O procedimento geral para todos os anticorpos foi a desparafinização dos cortes do tecido em estufa a 60°C/1 hora. Após, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de xilol e álcool. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica, o bloqueio da peroxidase endógena e a incubação do anticorpo. Para a avaliação do anticorpo ciclooxigenase-2 (COX-2, CX-294, Dako) e macrófago (MCA 874, mouse monoclonal, AbD SEROTEC, cód. Batch 1209) foi utilizada a técnica do Sistema de detecção Polímero. O percentual de

positividade para COX-2 foi realizado através das imagens do software Image J®, com o plug-in Threshold Colour, obtendo-se o percentual de imunomarcagem por meio da análise de partículas automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. A avaliação dos macrófagos e o índice angiogênico foi realizado pela contagem de células imunorreativas (MAEDA et al. 1995) com o auxílio de um analisador (Image J) que emite imagens para o programa computacional de análise de partículas automatizadas. A contagem foi realizada em cinco campos, selecionados previamente com elevada densidade de células.

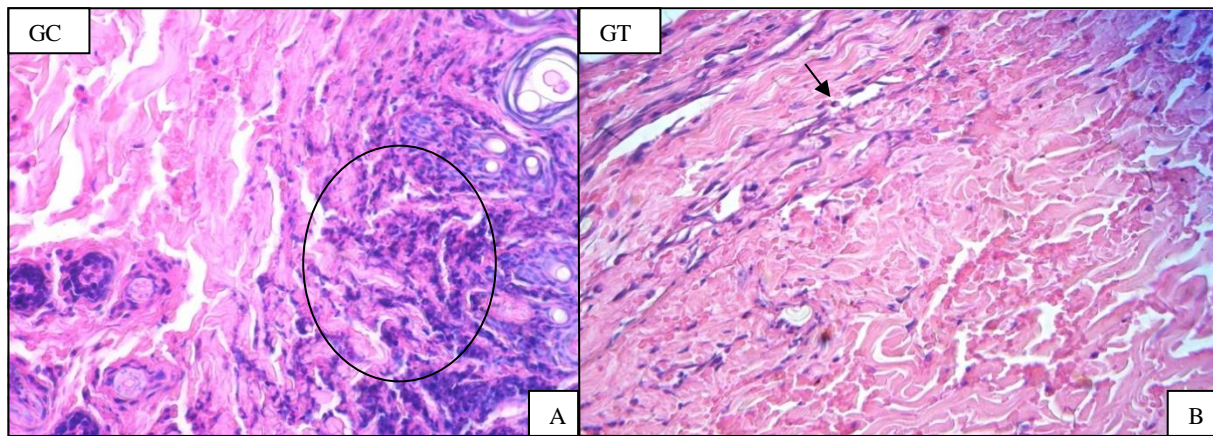
A análise estatística foi realizada com auxílio do software R (R fundation, Austria). Os dados histoquímicos foram analisados da seguinte maneira: inicialmente foi testada a distribuição dos resíduos (Shapiro) e homocedasticidade das variâncias (Barlett). O número de células resultante da análise histopatológica foi comparado entre os tratamentos e dias de avaliação pela análise de variância, com medidas repetidas no tempo. Quando o resultado foi significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A porcentagem de necrose foi comparada entre os grupos para cada dia de avaliação pelo teste de exato de Fisher. A significância foi fixada em 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados da imunomarcagem de COX-2 e macrófagos foram comparados pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunns.

## RESULTADOS

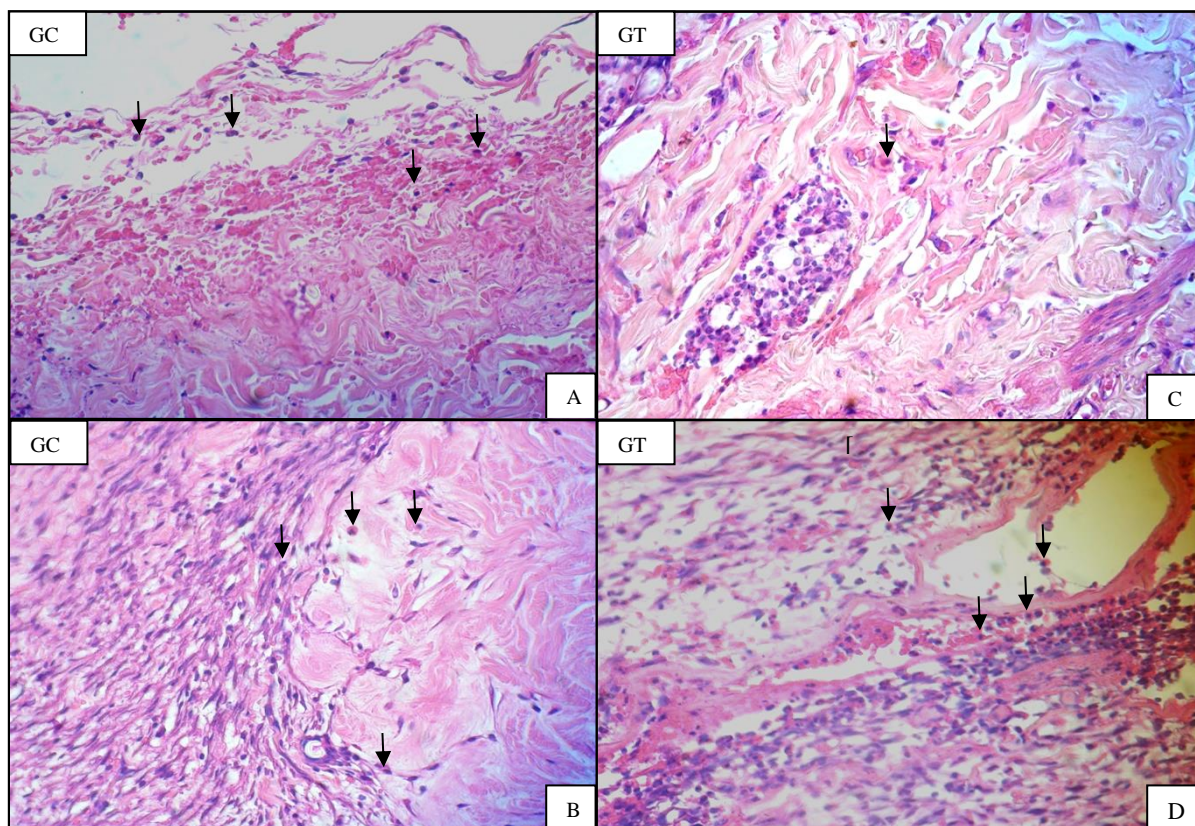
Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos resultados encontrados quanto à avaliação microscópica, conforme apresentado na Figura 1. Na análise histoquímica foi possível observar que no dia 3 houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), sendo que no grupo controle (GC) (Figura 2A) houve maior presença de neutrófilos quando comparado ao grupo tratado (GT) (Figura 2D) ( $p = 0,00001$ ), sendo similar a quantidade dessas células nos demais dias de avaliação. Quanto à presença de plasmócitos foi similar entre os tratamentos ( $p = 0,309$ ) e superior no dia 7 em relação ao dia 3 ( $p = 0,0172$ ) (Figura 3). A quantidade de monócitos foi significativa, sendo maior ( $p = 0,0036$ ) no grupo tratamento (GT) quando comparada ao grupo controle (GC) (Figura 4) em todos os momentos avaliados ( $p = 0,0683$ ).



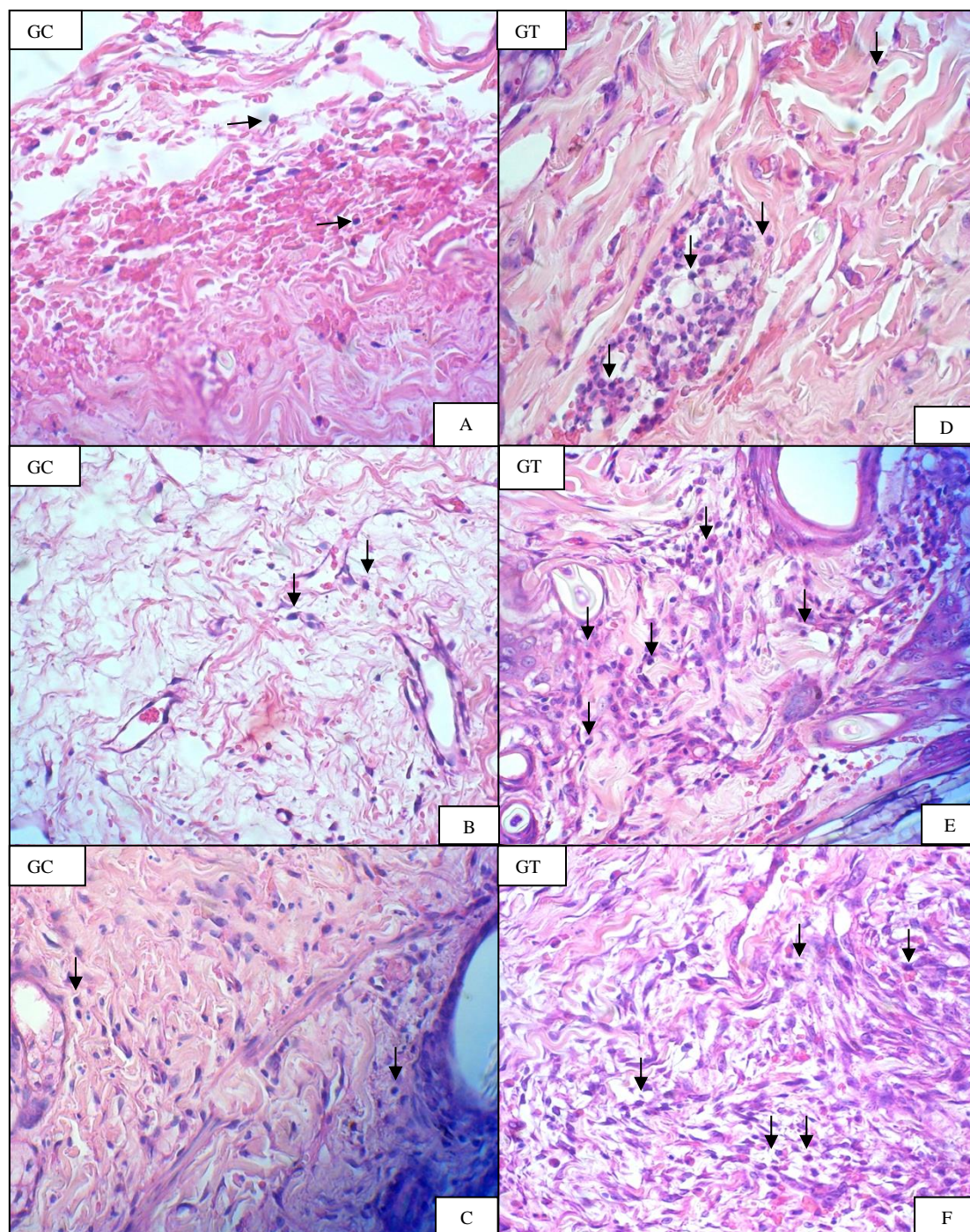
**Figura 1** - Resultado da avaliação microscópica da contagem de células nas amostras de auto enxertos cutâneos de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* obtidos no terceiro, sétimo e décimo quarto dia pós-operatório.



**Figura 2** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de neutrófilos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no terceiro dia de pós-operatório. (A) Presença acentuada de células inflamatórias (neutrófilos) no GC (região circunscrita). (B) Presença discreta de células inflamatórias (neutrófilos) no GT (seta). Coloração HE. Aumento de 400X.



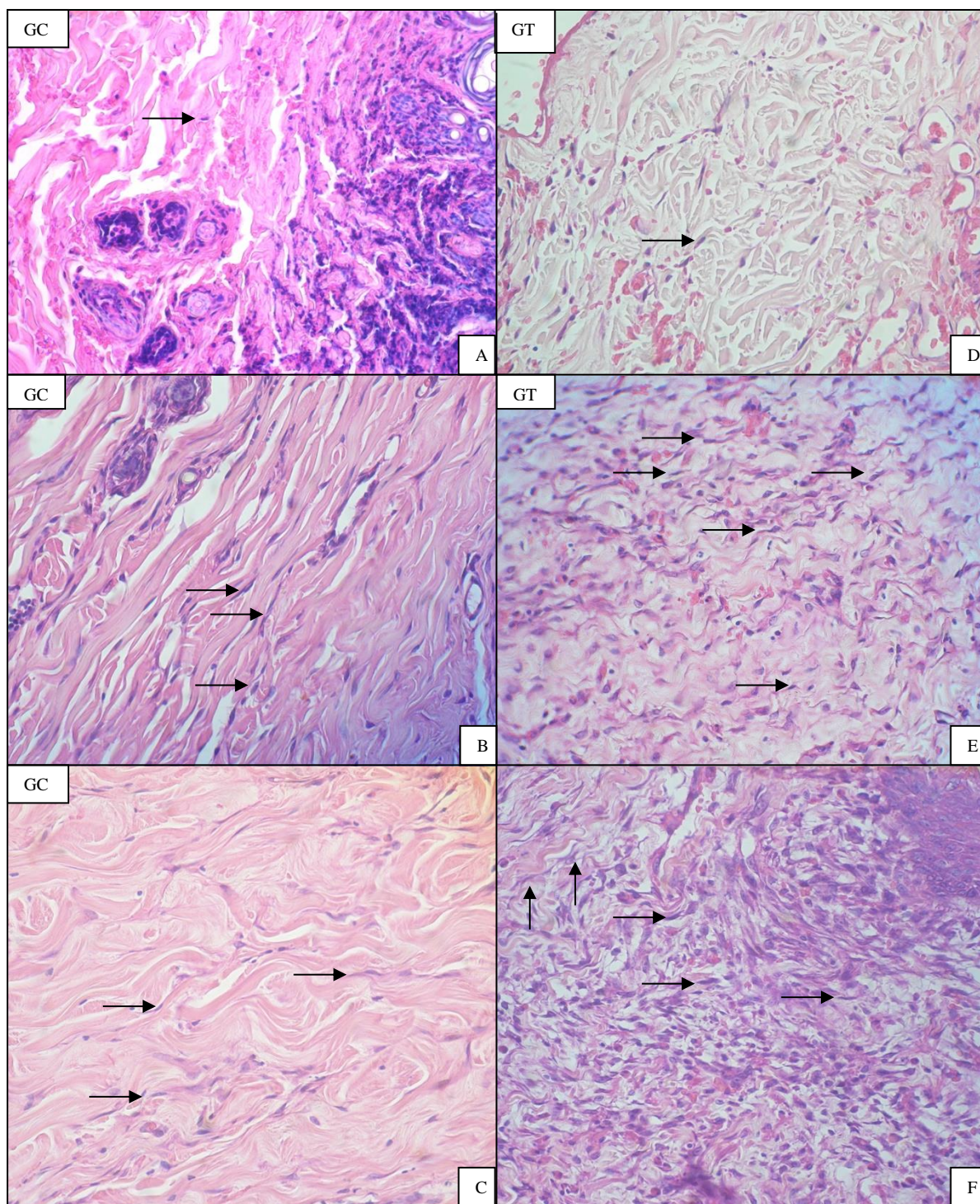
**Figura 3** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de plasmócito em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no terceiro e no sétimo dia pós-operatório. (A) Presença de plasmócitos no GC no 3º dia de pós operatório (setas). (B) Presença de plasmócitos no GC no 7º dia de pós operatório (setas). (C) Presença de plasmócitos no GT no 3º dia de pós 1operatório (seta). (D) Presença de plasmócitos no GT no 7º dia de pós operatório (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.



**Figura 4** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de monócito em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no 3º dia pós-operatório. **(A)** Presença de monócito no GC no 3º, 7º e 14ª dia pós-operatório (setas). **(B)** Presença de monócito no GC no 7º dia pós-operatório (setas). **(C)** Presença de monócito no GC 14ª dia pós-operatório (setas). **(D)** Presença de monócito no GT no 3º dia pós-operatório (setas). **(E)** Presença de monócito no GT no 7º dia pós-operatório (setas). **(F)** Presença de monócito no GT no 14ª dia pós-operatório (setas). Coloração HE. Aumento de 400X. (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.

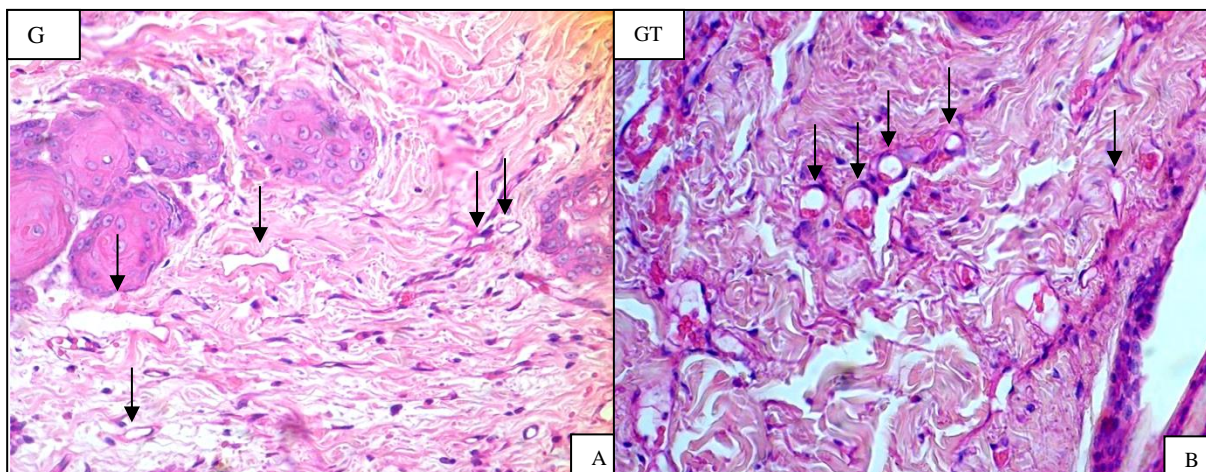
Avaliando a presença de fibroblastos houve diferença significativa, sendo maior ( $p = 0,0073$ ) no dia 7 e 14 do que no dia 3 e similares entre os tratamentos ( $p = 0,827$ ) (Figura 5). A quantidade de vasos foi maior

( $p < 0,0001$ ) no grupo tratamento (GT) durante o dia 3, enquanto no grupo controle (GC) foi maior no dia 7 (Figura 6).



**Figura 5** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de fibroblastos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos três, sete e catorze dias pós-operatório. **(A)** Presença de fibroblastos no GC no 3º dia pós-operatório (setas). **(B)** Presença de fibroblastos no GC no 7º dia pós-operatório (setas). **(C)** Presença de fibroblastos no GC no 14ª dia pós-operatório (setas). **(D)** Presença de fibroblastos no GT no 3º dia pós-operatório (setas). **(E)** Presença de fibroblastos no GT no 7º dia pós-operatório (setas). **(F)** Presença de fibroblastos no GT no GC no 14ª dia pós-operatório (setas). Aumento de 400X. Coloração HE.

no terceiro, sétimo e décimo quarto dia de pós-operatório.

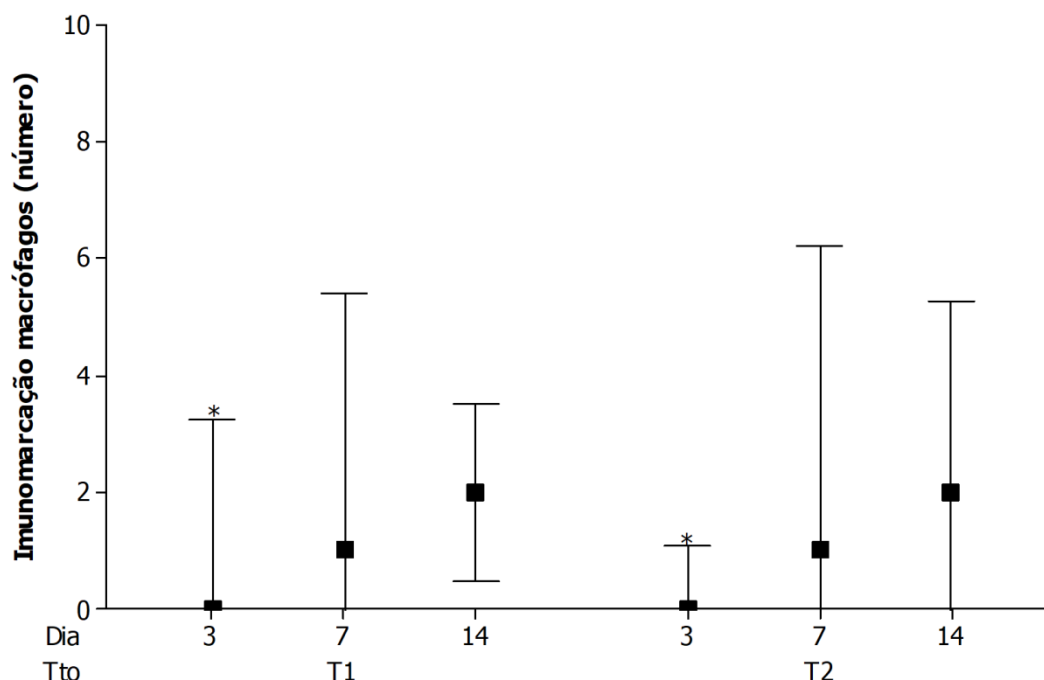


**Figura 6** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de vasos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos três, sete e catorze dias pós-operatório. (A) Presença de vasos no GC no 7º dia de pós operatório (setas). (B) Presença de vasos no GT 3º dia de pós operatório (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.

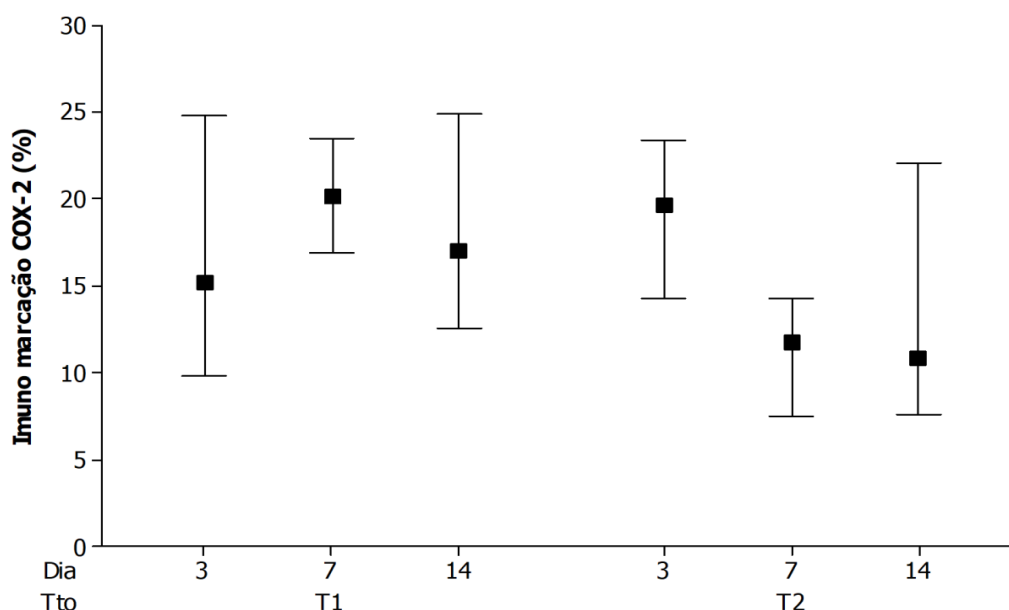
No dia 3 houve menor porcentagem de necrose no grupo tratamento (GT) ( $p = 0,038$ ). Nos demais dias avaliados não houve diferença entre a porcentagem de necrose observada nos dois tratamentos ( $p = 0,98$ ), sendo de 53% para o grupo controle (GC) e 47% para o grupo tratamento (GT). Em relação às porções da ferida distal e proximal não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos resultados encontrados quanto à avaliação imuno-

histoquímica de macrófagos, conforme apresentado na figura 7. Em relação ao número de macrófagos não houve diferença entre os grupos ( $p = 0,5637$ ). Entretanto, entre os dias houve diferença significativa ( $p = 0,0223$ ), sendo menor número de macrófagos no terceiro dia. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos resultados encontrados quanto à imunomarcagem para COX-2, conforme apresentado na figura 8. A imunomarcagem de COX-2 foi similar entre os grupos ( $p = 0,5637$ ) e entre os dias ( $p = 0,9843$ ).



**Figura 7** - Resultado da avaliação imuno-histoquímica quanto a imunomarcagem de macrófagos nas amostras de auto enxertos cutâneos de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* obtidos no terceiro, sétimo e décimo quarto dia pós-operatório.



**Figura 8** - Resultado da avaliação imuno-histoquímica quanto a imunomarcagem de COX-2 nas amostras de auto enxertos cutâneos de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus* obtidos no terceiro, sétimo e décimo quarto dia de pós-operatório.

## DISCUSSÃO

Quando delongam para cicatrizar, as lesões cutâneas tornam-se crônicas, dificultando o tratamento, e transformam-se em um desafio para os profissionais do campo da cirurgia reconstrutiva (GARROS et al. 2006, BYDLOWSKI 2009). O processo de cicatrização necessita da interação de diversas células da derme e epiderme, além da liberação de mediadores inflamatórios, fibroblastos e queratinócitos (NAMBU et al. 2009). As células tronco têm capacidades como a de clonogenicidade, que consiste na habilidade de se duplicar quando se encontram em ambientes com baixa densidade celular; a de multipotencialidade, que consiste na habilidade em originar células com maior especialização e em grandes quantidades; e de auto renovação; sendo que essas características ampliam seu potencial terapêutico (MEIRELLES et al. 2006). Desse modo, os resultados deste estudo vão de encontro com Gianotti (2011) e Rosa (2012) em relação a melhora na cicatrização de feridas mediante ao uso de células tronco mesenquimais.

As cirurgias reconstrutivas proporcionam inúmeros benefícios, tais como permitir que o paciente retorne rapidamente a suas atividades, além de apresentarem melhores resultados estéticos. Todavia, os enxertos cutâneos desprovidos de artéria e veia estão sujeitos à necrose e à isquemia após serem implantados no leito receptor. Diante disso, o emprego de componentes que estimulem a angiogênese e favoreçam a cicatrização tem sido estudado (PAZZINI et al. 2017), como as células tronco mesenquimais.

Conforme Li et al. (2012), determinar o número ideal de células-tronco mesenquimais xenogênicas necessárias para garantir a eficácia do tratamento é complexo pois existem muitas variáveis tais como a origem

das células-tronco mesenquimais, doses, vias de administração, espécies receptoras e objetivos experimentais modelos. Deste modo, a ideia de utilizar duas aplicações de células-tronco mesenquimais xenogênicas partiu da hipótese de que um aumento da dose, ou seja, a presença de mais células no local após o estímulo inicial, poderia aumentar e / ou acelerar a resposta.

No presente estudo, a partir da avaliação histoquímica, foi encontrada uma redução na porcentagem de necrose no terceiro dia de pós operatório, condizendo com os resultados obtidos por Treichel (2014) e indicando melhora da cicatrização e inflamação, mediante uso das células tronco. Ao que tudo indica ocorre uma interação entre as células inflamatórias e as células tronco transplantadas e através de um mecanismo parácrino levando a ativação de citocinas pró inflamatórias e anti-inflamatória, proporcionando assim uma transição favorável da fase inflamatória do processo de cicatrização para a fase proliferativa (KIM et al. 2013)

Em relação aos fibroblastos, não houve diferença entre os grupos. Esse resultado é contrário ao que foi encontrado por Gao et al. 2020, em que houve aumento significativo da migração dos fibroblastos pelos grupos tratados com MSCs comparado ao grupo controle. Quanto à proliferação vascular, esperava-se que ocorresse um aumento da vascularização nos três dias analisados. Entretanto, ocorreu aumento desta no grupo tratado apenas no terceiro dia de pós-operatório, resultado este contrário ao encontrado por Gianotti (2011). Já em outro estudo (WU et al. 2007), foi demonstrado aumento da vascularização nos dias 7 e 14 no grupo tratado com MSCs.

O processo inflamatório inicia-se como consequência ao reconhecimento da agressão, sendo regulado por meio da ação de vários fatores, como a quantidade e a qualidade do agente causador, o estado do



organismo do paciente, os mediadores anti e pró inflamatórios liberados e do sistema imune (FILHO 1998). Nessa fase são recrutadas diversas células inflamatórias para o sítio da lesão, como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Os macrófagos exercem várias funções imunológicas, no processo de cicatrização e na inflamação (LI & FU 2012) sendo classificados como M1 ativados ou pré inflamatórios e M2 ou anti-inflamatórios que tem funções regenerativas que promovem a homeostase do tecido (DAS et al. 2015, KRZYSZCZYK et al. 2018). Apesar disso, na avaliação imuno-histoquímica do presente trabalho, não houve diferença entre os grupos quanto ao número de macrófagos, resultados contrários a Treichel (2014), que encontrou numerosos macrófagos no grupo tratado durante a avaliação histológica.

Nyemeyer et al. 2010 realizou um estudo comparativo entre células mesenquimais autógenas, xenógenas e um grupo controle. Onde comprovou que o transplante de células autólogas apresenta resultados melhores quando comparado ao transplante de células xenógenas. Apesar disso o transplante de células xenógenas apresentou melhores resultados que o grupo controle, justificando sua aplicação.

Dentre as limitações do presente estudo não marcamos as células tronco mesenquimais de cães nas amostras de auto enxerto em coelhos não sendo possível rastrear-las ou localiza-las na ferida.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o presente estudo não demonstrou rejeição no emprego das células-tronco mesenquimais xenógenas derivadas do tecido adiposo de cães em enxertos cutâneos em coelhos, podemos sugerir que seu uso promoveu menor ocorrência de necrose, favorecendo a cicatrização do enxerto, além de não induzir o processo inflamatório. Mais estudos são necessários para avaliar as ações anti-inflamatórias, imunomoduladoras e angiogênicas das células tronco mesenquimais xenógenas em cirurgias reconstrutivas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à instituição de ensino UNESP - campus de Jaboticabal por tantas oportunidades de crescimento. Aos professores Prof. Dr. Andriago Barboza de Nardi, Prof. Dra. Josiane Pazzini e Prof. Dra. Paola pela oportunidade de aprendizado e por todo apoio durante a execução do projeto. À CNPQ pela bolsa de iniciação científica. Aos colegas de graduação e pós graduação Laís e Jorge. À empresa Regenera Vet por disponibilizar as células tronco que propiciaram a existência do projeto, especificamente as colegas Bruna Pereira de Moraes e Michele Andrade de Barros. Ao Dr. Lucas S. C. Rodrigues por todo apoio e oportunidades de crescimento profissional nos últimos anos, à minha família em especial ao meu noivo Bruno por serem meu alicerce.

## REFERÊNCIAS

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. *Pharmacology & Therapeutics*, [s.l.], v. 52, n. 3, p. 407-22, 1991.

BELTRÁN, B. R. **Células madre mesenquimales equinas: obtención y análisis de sus propiedades in vitro**. 2012. 159 p. Tese (Doutorado em Veterinária) - Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 2012.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, [s.l.], v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.

DAS A., SINHA M., DATTA S., ABAS M., CHAFFEE S., SEN C.K. & ROY S. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *The American Journal of Pathology*, v. 185, n. 10, p. 2596-2606, 2015.

FILHO, G. B. *Patologia Geral*. 2ª ed. Guanabara Koogan, 1998.

GAO, S.; CHEN, T.; HAO, Y.; ZHANG, F.; TANG, X.; WANG, D.; WEI, Z.; QI, J. Exosomal miR-135a derived from human amnion mesenchymal stem cells promotes cutaneous wound healing in rats and fibroblast migration by directly inhibiting LATS2 expression. *Stem Cell Research Therapy*, [s.l.], v. 11, n. 56, p. 1-11, 2020.

GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J. M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R. M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 55-65, 2006.

GIANOTTI, W. K. B. **Células-tronco mesenquimais e eletroacupuntura na cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos**. 2011. 47 p. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

ISAAC, C.; LADEIRA, P.; RÊGO, F.; ALDUNATE, J.; FERREIRA, M. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina*, [s.l.], n. 89, v.3-4, p. 125-131, 2010.

LI, H.; FU, X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell and Tissue Research*, [s.l.], v. 348, n. 3, p. 371-377, 2012.

FOSSUM, T. *Small Animal Surgery*. 4th ed. Elsevier, 2013.

FRANCK C.L., SENEGAGLIA A.C., LEITE L.M.B., DE MOURA S.A.B., FRANCISCO N.F. & RIBAS FILHO J.M. Influence of adipose tissue-derived stem cells on the burn wound healing process. *Stem cells international*, v. 2019, 2019.

HAMADA T., MATSUBARA H., YOSHIDA Y., UGAJI S., NOMURA I. & TSUCHIYA H. Autologous adipose-derived stem cell transplantation enhances healing of wound with exposed bone in a rat model. *Plos one*, v. 14, n. 5, p. e0214106, 2019.

KRZYSZCZYK P., SCHLOSS R., PALMER A. & BERTHIAUME F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 419, 2018.

- KIM J.M., LEE J.H., LYOO Y.S., JUNG D.I. & PARK H.M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary dermatology**, v. 24, n. 2, p. 242-e53, 2013.
- KIM E.K., LI G., LEE T.J. & HONG J.P. 2011. The effect of human adipose-derived stem cells on the healing of ischemic wound in a diabetic nude mouse model. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 128, n. 2, p. 387-394, 2011.
- KIM W.S., PARK B.S., SUNG J.H., YANG J.M., PARK S.B., KWAK S.J. & PARK J.S. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **Journal of dermatological science**, v. 48, n. 1, p. 15-24, 2007.
- LI J., EZZELARAB M.B. & COOPER D.K. Do mesenchymal stem cells function across species barriers. Relevance for xenotransplantation. **Xenotransplantation**, v. 19, n. 5, p. 273-285, 2012.
- OLIVEIRA A.P.L., RANGEL J.P.P., RAPOSO V., PIANCA N.G., CRUZ E.P., NETO E.P., FIORIO W.A.B. & MONTEIRO B.S. Allogenic mesenchymal stem cell intravenous infusion in reparation of mild intestinal ischemia/reperfusion injury in New Zealand rabbits. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 710-721, 2018.
- PU C.M., LIU C.W., LIANG C.J., YEN Y.H., CHEN S.H., JIANG-SHIEH C.L., CHEN Y.C. & CHEN Y.L. 2017. Adipose-derived stem cells protect skin flaps against ischemia/reperfusion injury via IL-6 expression. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 6, p. 1353-1362, 2017.
- MAEDA, K.; HIRAKAWA, K.; TAKATSUKA, S.; OGAWA, Y.; ONODA, N.; SAWADA, T.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; KONDO, Y. Tumor angiogenesis and tumor cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British Journal of Cancer**, [s.l.], v. 72, n. 2, p. 319-323, 1995.
- 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**, [s.l.], v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- NAMBU, M.; KISHIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; MIZUNO, H.; YANAGIBAYASHI, S.; YAMAMOTO, N.; AZUMA, R.; NAKAMURA, S.; KIYOSAWA T.; ISHIHARA, M.; KANATANI, Y. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Annals of Plastic Surgery**, [s.l.], v. 62, n. 3, p. 317-321, 2009.
- NIEMEYER P., SZALAY K., LUGINBÜHL R., SÜDKAMP N.P. & KASTEN P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 900-908, 2010.
- PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive Surgery**. 3rd ed. Wiley-Blackwell, 2011.
- PAZZINI, J. M.; SERAFIM, E. L.; USCATEGUI, R. R. A.; ALMEIDA, V. T.; OLIVA, C. A. C.; GÄRTNER, F.; AMORIM, I.; FARIA, F.; RÊMA, A.; FILHO, N. P. R.; FERREIRA, M. G. P. A.; SILVA, A. C.; HUPPES, R. R.; MORAES, P. C.; OLIVEIRA, J. A.; DE NARDI, A. B. Skin grafts associated with platelet rich plasma and surgical sponge – literature review. **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 51-60, 2017.
- PINTO-FILHO S.T.L., DALMOLIN F., PILLAT M.M., GRAÇA D.L., BORGES L., ROSA M.P., DANESI C.C., MACIEL R.M., VEIGA M.L.M., DULLIUS A.I.S. & PIPPI N.L. Análises macroscópica e histopatológica do alotransplante parcial de vesícula urinária com células-tronco mesenquimais alogênicas derivadas do tecido adiposo em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1845-1854, 2018.
- REHMAN J., TRAKTUEV D., LI J., MERFLED-CLAUSS S., TEMM-GROVE C.J., BOVENKERK J.E., PELL C.L., JOHNSTONE B.H., CONSIDINE R.V. & MARCH K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-1298, 2004.
- ROSA, M. B. Células estromais mesenquimais indiferenciadas alogênicas, ultrassom terapêutico ou laser no tratamento de feridas cutâneas de coelhos. 2012. 60 p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- TEXTOR, J. A.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; ARISTIZOBAL, F. A.; KOL, A.; LEJEUNE, S. S.; BLEDSOE, A.; DAVIDYAN, A.; GRAY, S. N.; BOHANNON-WORSLEY, L. K.; WOOLARD, K. D.; BORJESSON, D. L. Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. **Stem Cells Translational Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 98–108, 2018.
- TSAI S.Y., HUANG Y.C., CHUEH L.L., YEH L.S. & LIN C.S. Intra-articular transplantation of porcine adipose-derived stem cells for the treatment of canine osteoarthritis: A pilot study. **World Journal of Transplantation**, v. 4, n. 3, p. 196, 2014.
- TREICHEL, T. L. E. **Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos**. 2014. 93 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 382–394, 2013.
- WU, Y.; CHEN, L.; SCOTT, P. G.; TREDGET E. E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, [s.l.], v. 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.