

1 **DIMINUIÇÃO DO ÍNDICE DE NECROSE EM ENXERTOS CUTÂNEOS EM**
2 **COELHOS MEDIANTE A APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS**
3 **XENÓGENAS**

4
5 **REDUCING OF THE NECROSIS INDEX IN SKIN GRAFTS IN RABBITS**
6 **THROUGH APPLICATION OF XENOGENOUS MESENCHYMAL STEM CELLS**

7
8 **RESUMO**

9 O presente estudo teve como objetivo avaliar a inflamação em auto-enxertos cutâneos obtidos
10 no terceiro, sétimo e décimo quarto dia de pós-operatório, além disso, buscou-se determinar
11 diferenças no processo de cicatrização no grupo tratado com células tronco mesenquimais
12 xenógenas em relação ao grupo controle utilizando a avaliação microscópica e imuno-
13 histoquímica. A avaliação microscópica foi realizada utilizando cortes histológicos, corados
14 pela técnica de histoquímica com hematoxilina-eosina (HE), e a imuno-histoquímica os com
15 cortes foram submetidos a anticorpos específicos. As variáveis analisadas foram quantidade de
16 vasos, células inflamatórias (COX-2 e Macrófagos) e presença de necrose. Os dados foram
17 analisados estatisticamente pelo software R. A quantidade de vasos foi maior ($p < 0,0001$) no
18 grupo tratamento (GT) durante o dia 3, enquanto no grupo controle (GC) foi maior no dia 7. No
19 dia 3 houve menor porcentagem de necrose no grupo tratamento (GT) ($p = 0,038$). Nos demais
20 dias avaliados não houve diferença entre a porcentagem de necrose observada nos dois
21 tratamentos ($p = 0,98$), sendo de 53% para o grupo controle (GC) e 47% para o grupo tratamento
22 (GT). Em relação ao número de macrófagos não houve diferença entre os grupos ($p = 0,5637$).
23 Entretanto, entre os dias houve diferença significativa ($p = 0,0223$), sendo menor número de
24 macrófagos no terceiro dia. A imunomarcação de COX-2 foi similar entre os grupos ($p =$
25 $0,5637$) e entre os dias ($p = 0,9843$). Portanto, o emprego das células tronco mesenquimais

26 xenógenas em enxertos cutâneos promoveu menor ocorrência de necrose, favorecendo sua
27 cicatrização, e não induziu o processo inflamatório, sendo assim factível seu uso em cirurgias
28 reconstitutivas.

29 **PALAVRAS-CHAVE:** Células tronco. Cicatrização. Cirurgia reconstitutiva. Enxertos.
30 Inflamação.

31

32 **ABSTRACT**

33 The present study aimed to assess inflammation in skin autografts obtained on the third, seventh
34 and fourteenth postoperative day, in addition, it sought to determine differences in the healing
35 process in the group treated with xenogenous mesenchymal stem cells in relation to to the
36 control group using microscopic and immunohistochemical evaluation. Microscopic evaluation
37 was performed using histological sections, stained by the hematoxylin-eosin (HE)
38 histochemistry technique, and immunohistochemistry with sections were subjected to specific
39 antibodies. The variables analyzed were the number of vessels, inflammatory cells (COX-2 and
40 Macrophages) and the presence of necrosis. The data were analyzed statistically by software R.
41 The number of vessels was higher ($p < 0.0001$) in the treatment group (GT) during day 3, while
42 in the control group (CG) it was higher on day 7. On day 3 there was a lower percentage of
43 necrosis in the treatment group (GT) ($p = 0.038$). On the other evaluated days, there was no
44 difference between the percentage of necrosis observed in the two treatments ($p = 0.98$), being
45 53% for the control group (CG) and 47% for the treatment group (GT). Regarding the number
46 of macrophages, there was no difference between groups ($p = 0.5637$). However, between days
47 there was a significant difference ($p = 0.0223$), with a lower number of macrophages on the
48 third day. The immunostaining of COX-2 was similar between groups ($p = 0.5637$) and between
49 days ($p = 0.9843$). Therefore, the use of xenogenous mesenchymal stem cells in skin grafts

50 promoted a lower occurrence of necrosis, favoring its healing, and did not induce the
51 inflammatory process, thus making its use in reconstructive surgery feasible.

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

53

54

INTRODUÇÃO

55 O enxerto cutâneo é um segmento de pele separado por completo a partir de uma região
56 saudável e utilizado novamente para cobrir outra área desprovida de superfície epitelial
57 (PAVLETIC 2011). Inicialmente o enxerto é desprovido de vascularização e sua sobrevivência
58 depende da revascularização, que deve ocorrer até o sétimo ou oitavo dia de pós-operatório. As
59 causas mais comuns de insucesso de enxertos são a ausência de conexões vasculares entre o
60 enxerto e o leito receptor e as infecções (FOSSUM 2013).

61 As células tronco mesenquimais (MSCs) são células provenientes da camada
62 embrionária da mesoderme (BELTRÁN 2012, VOLK & THEORET 2013). Podem atuar no
63 processo de reparação tecidual e possuem função imunomoduladora e anti-inflamatória, pois
64 suprimem os linfócitos T e não expressam antígenos de MHC de classe II (BRACHELENTE
65 et al. 2013). As MSCs do tipo xenógenas, quando transplantadas, são capazes de promover a
66 recuperação do tecido devido a sua capacidade multipotencial e as suas características
67 imunológicas (TOBIAS & JOHNSTON 2012). Além disso, participam do processo de
68 cicatrização tecidual (MAXSON et al. 2012).

69 No processo de cicatrização, há a fase inflamatória, em que ocorre hemostasia, migração
70 de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual (ISAAC et al. 2010). Primeiramente, há
71 a migração de neutrófilos provenientes de vasos sanguíneos, seguida da migração de monócitos,
72 que se diferenciam em macrófagos. Estes, juntamente com os neutrófilos, são responsáveis pela
73 remoção de partículas estranhas, bactérias e tecidos mortos do leito da ferida, além de
74 produzirem uma diversidade de fatores, como o fator de crescimento de células endoteliais

75 (VEGF). No entanto, a duração excessiva dessa fase ocasiona presença excessiva de exsudato
76 na ferida, o que pode separar as camadas do tecido e atrasar a cicatrização (ARNOLD & WEST
77 1991).

78 O presente estudo teve como objetivo avaliar a inflamação mediante avaliação
79 histológica e imuno-histoquímica em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos três, sete
80 e quatorze dias de pós-operatório, e determinar diferenças no processo de cicatrização no grupo
81 tratado com células tronco mesenquimais xenógenas em relação ao grupo controle.

82

83

MATERIAL E MÉTODOS

84 As análises foram realizadas em 30 amostras (blocos de parafina) de pele com tecido
85 cicatricial de auto-enxertos cutâneos procedentes de 30 coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus*
86 *cuniculus*, que foram eutanasiados no projeto de pesquisa intitulado “Efeitos das células tronco
87 mesenquimais xenógenas de tecido adiposo na neovascularização e cicatrização de auto
88 enxertos cutâneos em coelhos”, protocolo do comitê de ética nº 17346/15.

89 Das 30 amostras, 15 amostras correspondiam ao grupo controle (GC) e 15 ao grupo
90 tratamento (GT) intralesional com células tronco mesenquimais xenógenas. As amostras do GC
91 foram apenas do tecido cicatricial de auto enxerto cutâneo, enquanto as do GT receberam, por
92 via tópica (intralesional), uma dose de 2×10^6 células tronco no transoperatório e uma segunda
93 dose (intralesional) de 2×10^6 células tronco mesenquimais xenógenas no sétimo dia do pós-
94 operatório. As amostras de ambos os grupos foram coletadas nos dias três, sete e quatorze de
95 pós-operatório.

96 Os cortes foram corados pelo método histoquímico para posterior análise em microscopia
97 óptica. Utilizou-se Hematoxilina & Eosina para avaliação de epiderme e derme quanto à
98 presença de células mononucleares, polimorfonucleares, plasmócitos, necrose, proliferação
99 vascular e fibroblástica.

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

108 O procedimento geral para todos os anticorpos foi a desparafinização dos cortes do tecido
109 em estufa a 60°C/1 hora. Após, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de xilol
110 e álcool. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica, o bloqueio da peroxidase
111 endógena e a incubação do anticorpo. Para a avaliação do anticorpo ciclooxigenase-2 (COX-2,
112 CX-294, Dako) e macrófago (MCA 874, mouse monoclonal, AbD SEROTEC, cód. Batch
113 1209) foi utilizada a técnica do Sistema de detecção Polímero. O percentual de positividade
114 para COX-2 foi realizado através das imagens do software Image J®, com o plug-in Threshold
115 Colour, obtendo-se o percentual de imunomarcção por meio da análise de partículas
116 automatizadas de acordo com seleção e medida das áreas com base na cor. A avaliação dos
117 macrófagos e o índice angiogênico foi realizado pela contagem de células imunorreativas
118 (MAEDA et al. 1995) com o auxílio de um analisador (Image J) que emite imagens para o
119 programa computacional de análise de partículas automatizadas. A contagem foi realizada em
120 cinco campos, selecionados previamente com elevada densidade de células.

121 A análise estatística foi realizada com auxílio do software R (R foundation, Austria). Os
122 dados histoquímicos foram analisados da seguinte maneira: inicialmente foi testada a
123 distribuição dos resíduos (Shapiro) e homocedasticidade das variâncias (Barlett). O número de
124 células resultante da análise histopatológica foi comparado entre os tratamentos e dias de

125 avaliação pela análise de variância, com medidas repetidas no tempo. Quando o resultado foi
126 significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. A porcentagem de necrose foi
127 comparada entre os grupos para cada dia de avaliação pelo teste de exato de Fisher. A
128 significância foi fixada em 5% ($p < 0,05$). Os dados da imunomarcagem de COX-2 e macrófagos
129 foram comparados pelo teste de Friedman e pós-teste de Dunns.

130

131

RESULTADOS

132 Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados encontrados quanto à avaliação
133 microscópica, conforme apresentado na Figura 1. Na análise histoquímica foi possível observar
134 que no dia 3 houve diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que no grupo controle (GC) (Figura
135 2A) houve maior presença de neutrófilos quando comparado ao grupo tratado (GT) (Figura 2D)
136 ($p = 0,00001$), sendo similar a quantidade dessas células nos demais dias de avaliação. Quanto
137 à presença de plasmócitos foi similar entre os tratamentos ($p = 0,309$) e superior no dia 7 em
138 relação ao dia 3 ($p = 0,0172$) (Figura 3). A quantidade de monócitos foi significativa, sendo foi
139 maior ($p = 0,0036$) no grupo tratamento (GT) quando comparada ao grupo controle (GC)
140 (Figura 4) em todos os momentos avaliados ($p = 0,0683$).

141 Avaliando a presença de fibroblastos houve diferença significativa, sendo maior ($p =$
142 $0,0073$) no dia 7 e 14 do que no dia 3 e similares entre os tratamentos ($p = 0,827$) (Figura 5). A
143 quantidade de vasos foi maior ($p < 0,0001$) no grupo tratamento (GT) durante o dia 3, enquanto
144 no grupo controle (GC) foi maior no dia 7 (Figura 6).

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

150 Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados encontrados quanto à avaliação
151 imuno-histoquímica de macrófagos, conforme apresentado na figura 7. Em relação ao número
152 de macrófagos não houve diferença entre os grupos ($p = 0,5637$). Entretanto, entre os dias houve
153 diferença significativa ($p = 0,0223$), sendo menor número de macrófagos no terceiro dia. Não
154 houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados encontrados quanto à imunomarcação
155 para COX-2, conforme apresentado na figura 8. A imunomarcação de COX-2 foi similar entre
156 os grupos ($p = 0,5637$) e entre os dias ($p = 0,9843$) (Figura 9).

157

158

DISCUSSÃO

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

171 As cirurgias reconstrutivas proporcionam inúmeros benefícios, tais como permitir que o
172 paciente retorne rapidamente a suas atividades, além de apresentarem melhores resultados
173 estéticos. Todavia, os enxertos cutâneos desprovidos de artéria e veia estão sujeitos à necrose e
174 à isquemia após serem implantados no leito receptor. Diante disso, o emprego de componentes

175 que estimulem a angiogênese e favoreçam a cicatrização tem sido estudado (PAZZINI et al.
176 2017), como as células tronco mesenquimais. No presente estudo, a partir da avaliação
177 histoquímica, foi encontrada uma redução na porcentagem de necrose no terceiro dia de pós
178 operatório, condizendo com os resultados obtidos por Treichel (2014) e indicando melhora da
179 cicatrização e inflamação, mediante uso das células tronco.

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

188 O processo inflamatório inicia-se como consequência ao reconhecimento da agressão,
189 sendo regulado por meio da ação de vários fatores, como a quantidade e a qualidade do agente
190 causador, o estado do organismo do paciente, os mediadores anti e pró inflamatórios liberados
191 e do sistema imune (FILHO 1998). Nessa fase são recrutadas diversas células inflamatórias
192 para o sítio da lesão, como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Os macrófagos exercem várias
193 funções imunológicas, no processo de cicatrização e na inflamação (LI & FU 2012). Apesar
194 disso, na avaliação imuno-histoquímica do presente trabalho, não houve diferença entre os
195 grupos quanto ao número de macrófagos, resultados contrários a Treichel (2014), que encontrou
196 numerosos macrófagos no grupo tratado durante a avaliação histológica.

197 Pela análise da COX-2, no presente estudo, não houve diferença entre os grupos ou entre
198 os dias. Este resultado se assemelha ao encontrado por Textor et al. 2018, o qual não verificou
199 diferença significativa no grupo tratado com MSCs por via tópica. No entanto, houve um grande

200 aumento da expressão de COX-2 na primeira semana observada no grupo tratado com MSCs
201 por via injetável.

202

203

CONCLUSÕES

204 Conclui-se que o emprego das células tronco mesenquimais xenógenas em enxertos
205 cutâneos promoveu menor ocorrência de necrose, favorecendo a cicatrização do enxerto, além
206 de não induzir o processo inflamatório, sendo assim factível seu uso em cirurgias reconstrutivas.

207

208

AGRADECIMENTOS

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

217

218

REFERÊNCIAS

219

220 ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol. Ther.**, [s.l.], v. 52,
221 n. 3, p. 407-22, 1991.

222

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

226

227 BRACHELENTE, C.; PORCELLATO, I.; SFORNA, M.; LEPRI, E.; MECHELLI, L.;
228 BONGIOVANNI, L. The contribution of stem cells to epidermal and hair follicle tumours in
229 the dog. **Veterinary Dermatology**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 188-e41, 2013.

230

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

234

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

236

237 TOBIAS, K. M.; JOHNSTON, S. A. **Veterinary Surgery Small Animal.** 1st ed. Elsevier,
238 2011.

239

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

244

245 GARROS, I. C.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B.; TORRES, O. J.
246 M.; AGULHAM, M. A.; ARAÚJO, A. C. F.; SANTIS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, R.
247 M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas
248 abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir. Bras.**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 55-
249 65, 2006.

250

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

254

255 ISAAC, C.; LADEIRA, P.; RÊGO, F.; ALDUNATE, J.; FERREIRA, M. Processo de cura
256 das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, [s.l.], n. 89, v.3-4, p. 125-131,
257 2010.

258

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

261

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

263

264 MAEDA, K.; HIRAKAWA, K.; TAKATSUKA, S.; OGAWA, Y.; ONODA, N.; SAWADA,
265 T.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; KONDO, Y. Tumor angiogenesis and tumor cell

266 proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British Journal of Cancer**, [s.l.],
267 v. 72, n. 2, p. 319-323, 1995.

268

269 MAXSON, S.; LOPEZ, E. A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; LEROUX, M.
270 A. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells**
271 **Translational Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012.

272

273 MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stemcells reside
274 in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, [s.l.], v. 119, p. 2204-
275 2213, 2006.

276

277 NAMBU, M.; KISHIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; MIZUNO, H.; YANAGIBAYASHI, S.;
278 YAMAMOTO, N.; AZUMA, R.; NAKAMURA, S.; KIYOSAWA T.; ISHIHARA, M.;
279 KANATANI, Y. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous
280 adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Ann. Plast. Surg**,
281 [s.l.], v. 62, n. 3, p. 317-321, 2009.

282

283 PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive**
284 **Surgery**. 3rd ed. Wiley-Blackwell, 2011.

285

286 PAZZINI, J. M.; SERAFIM, E. L.; USCATEGUI, R. R. A.; ALMEIDA, V. T.; OLIVA, C. A.
287 C.; GÄRTNER, F.; AMORIM, I.; FARIA, F.; RÊMA, A.; FILHO, N. P. R.; FERREIRA, M.
288 G. P. A.; SILVA, A. C.; HUPPES, R. R.; MORAES, P. C.; OLIVEIRA, J. A; DE NARDI, A.
289 B. Skin grafts associated with platelet rich plasma and surgical sponge – literature review.
290 **Journal of Agricultural Science**, [s.l.], v. 9, n. 4, p. 51-60, 2017.

291

292 ROSA, M. B. **Células estromais mesenquimais indiferenciadas alogênicas, ultrassom**
293 **terapêutico ou laser no tratamento de feridas cutâneas de coelhos**. 2012. 60 p. Tese
294 (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,
295 2012.

296

297 TEXTOR, J. A.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; ARISTIZOBAL, F. A.; KOL,
298 A.; LEJEUNE, S. S.; BLEDSOE, A.; DAVIDYAN, A.; GRAY, S. N.; BOHANNON-
299 WORSLEY, L. K.; WOOLARD, K. D.; BORJESSON, D. L. Allogeneic stem cells alter gene
300 expression and improve healing of distal limb wounds in horses. **Stem Cells Transl. Med**,
301 [s.l.], v. 7, n. 1, p. 98–108, 2018.

302

303 TREICHEL, T. L. E. **Contribuições para o uso de células estromais mesenquimais no**
304 **reparo de feridas cutâneas e no transplante de pele em coelhos**. 2014. 93 p. Tese
305 (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria,
306 2014.

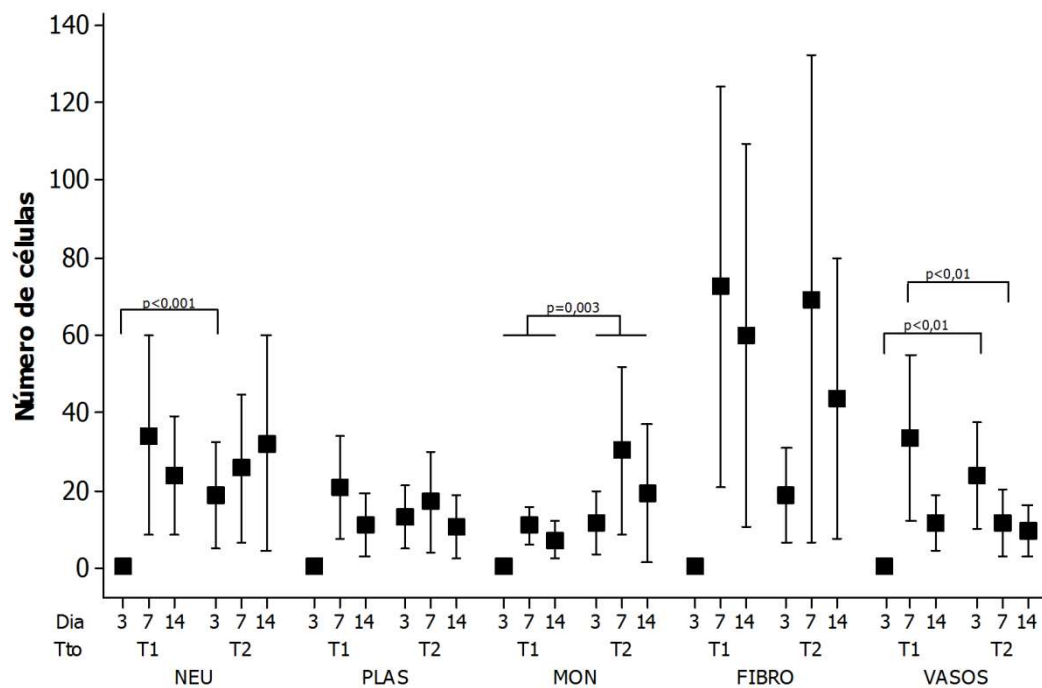
307

308 VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals
309 in regenerative medicine. **Wound Repair Regen**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 382–394, 2013.

310

311 WU, Y.; CHEN, L.; SCOTT, P. G.; TREDGET E. E. Mesenchymal stem cells enhance
312 wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, [s.l.], v. 25, n. 10, p.
313 2648-2659, 2007.

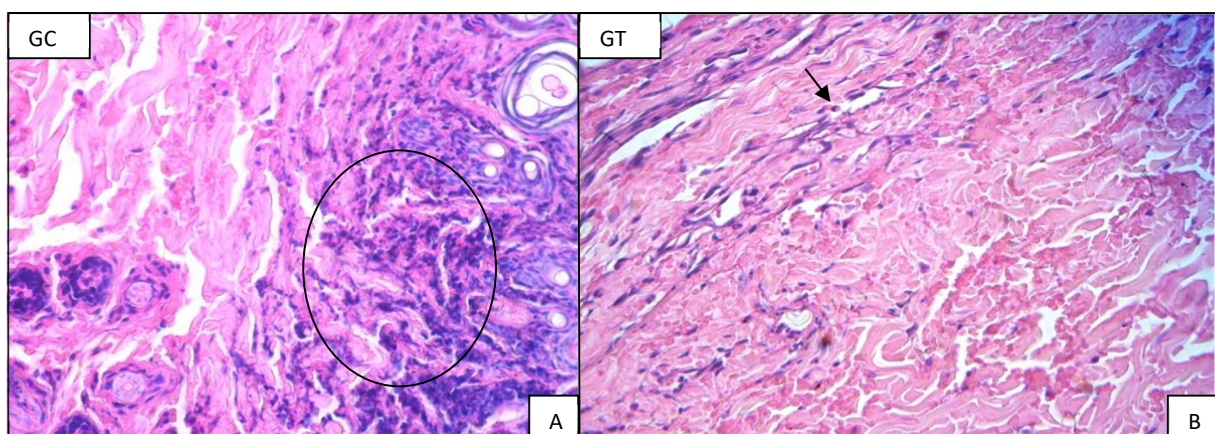
314



316

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

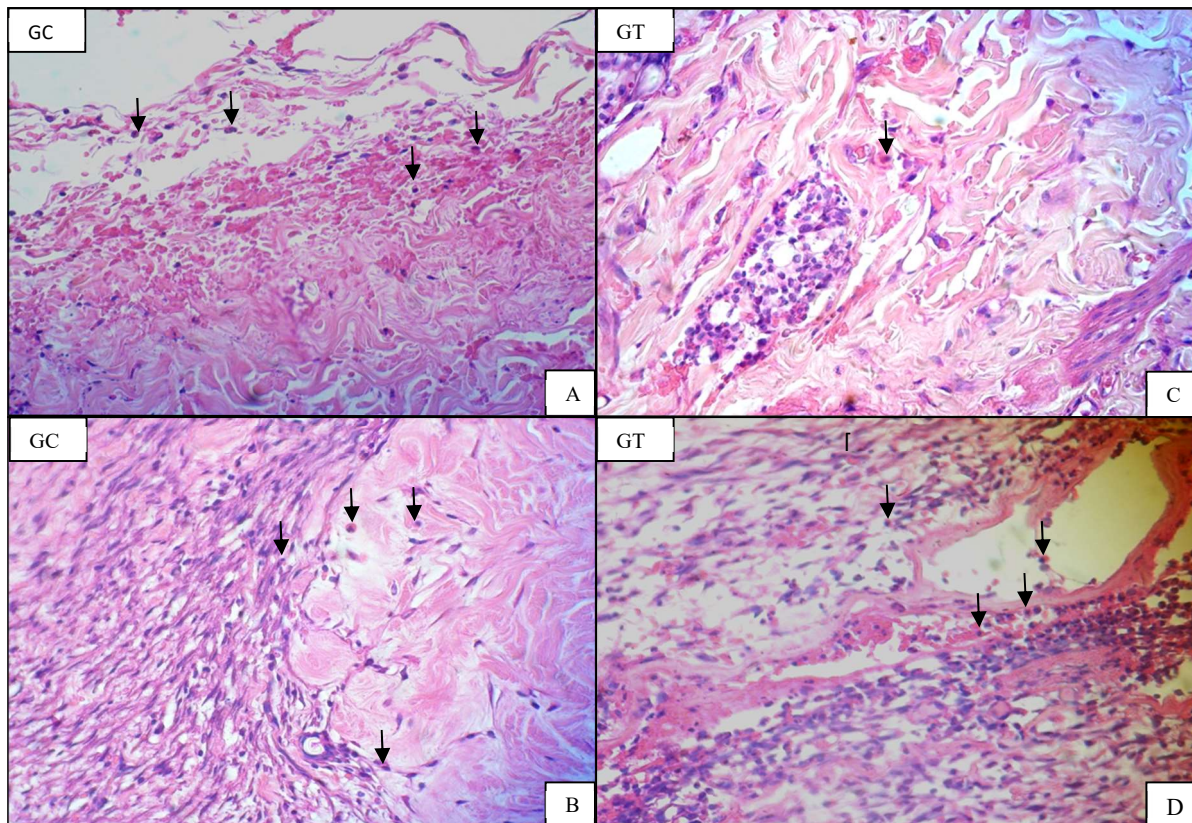
320



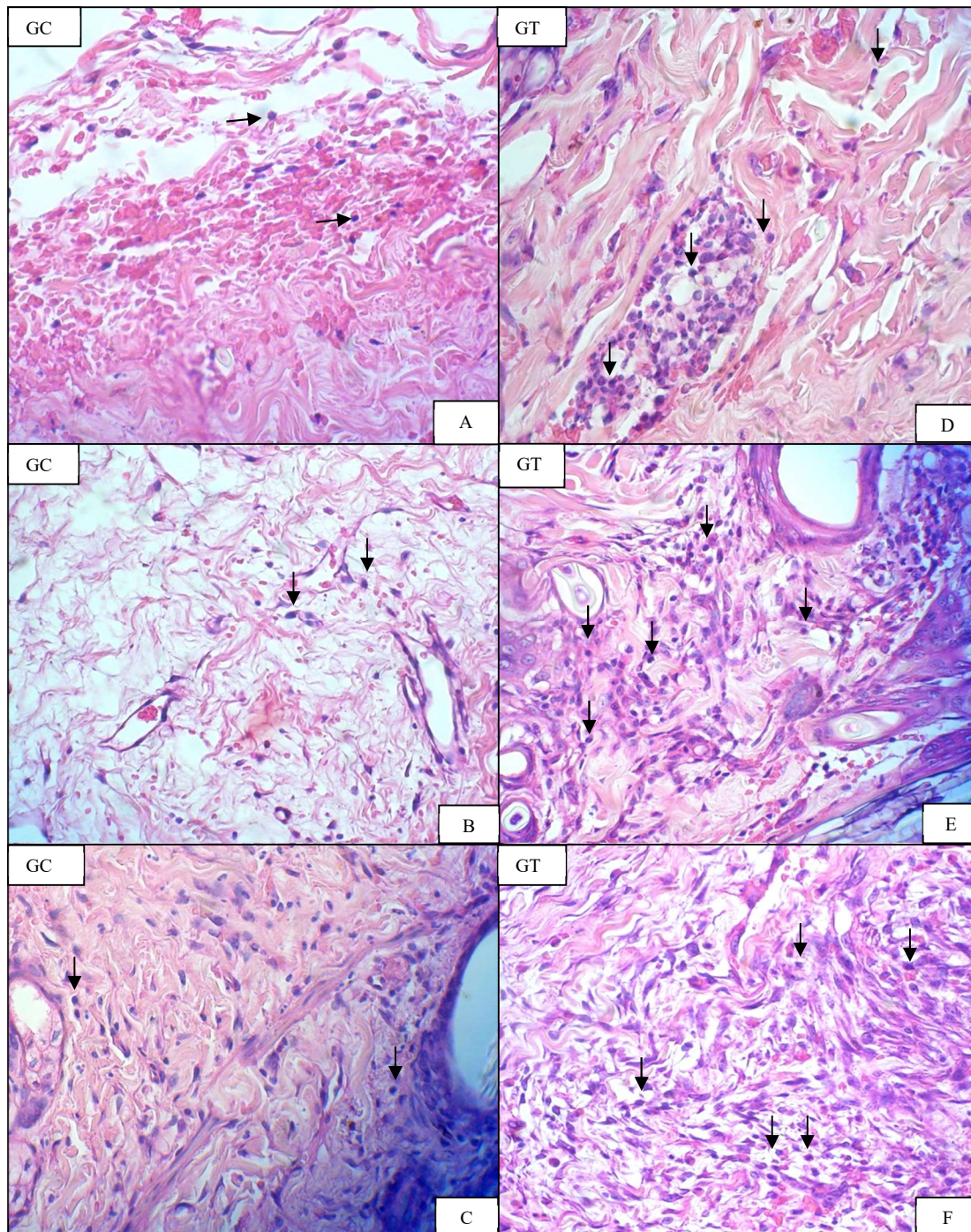
321

322 **Figura 2** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*
 323 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de

324 neutrófilos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no terceiro dia de pós-operatório.
325 (A) Presença acentuada de células inflamatórias (neutrófilos) no GC (região circunscrita). (B)
326 Presença discreta de células inflamatórias (neutrófilos) no GT (seta). Coloração HE. Aumento
327 de 400X.
328



329
330 **Figura 3** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*
331 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de
332 plasmócito em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no terceiro e no sétimo dia pós-
333 operatório. (A) Presença de plasmócitos no GC no 3º dia de pós operatório (setas). (B) Presença
334 de plasmócitos no GC no 7º dia de pós operatório (setas). (C) Presença de plasmócitos no GT
335 no 3º dia de pós operatório (seta). (D) Presença de plasmócitos no GT no 7º dia de pós
336 operatório (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.
337



338

339 **Figura 4** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*

340 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de

341 monócito em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos no 3º dia pós-operatório. (A) Presença

342 de monócito no GC no 3º, 7º e 14ª dia pós-operatório (setas). (B) Presença de monócito no GC

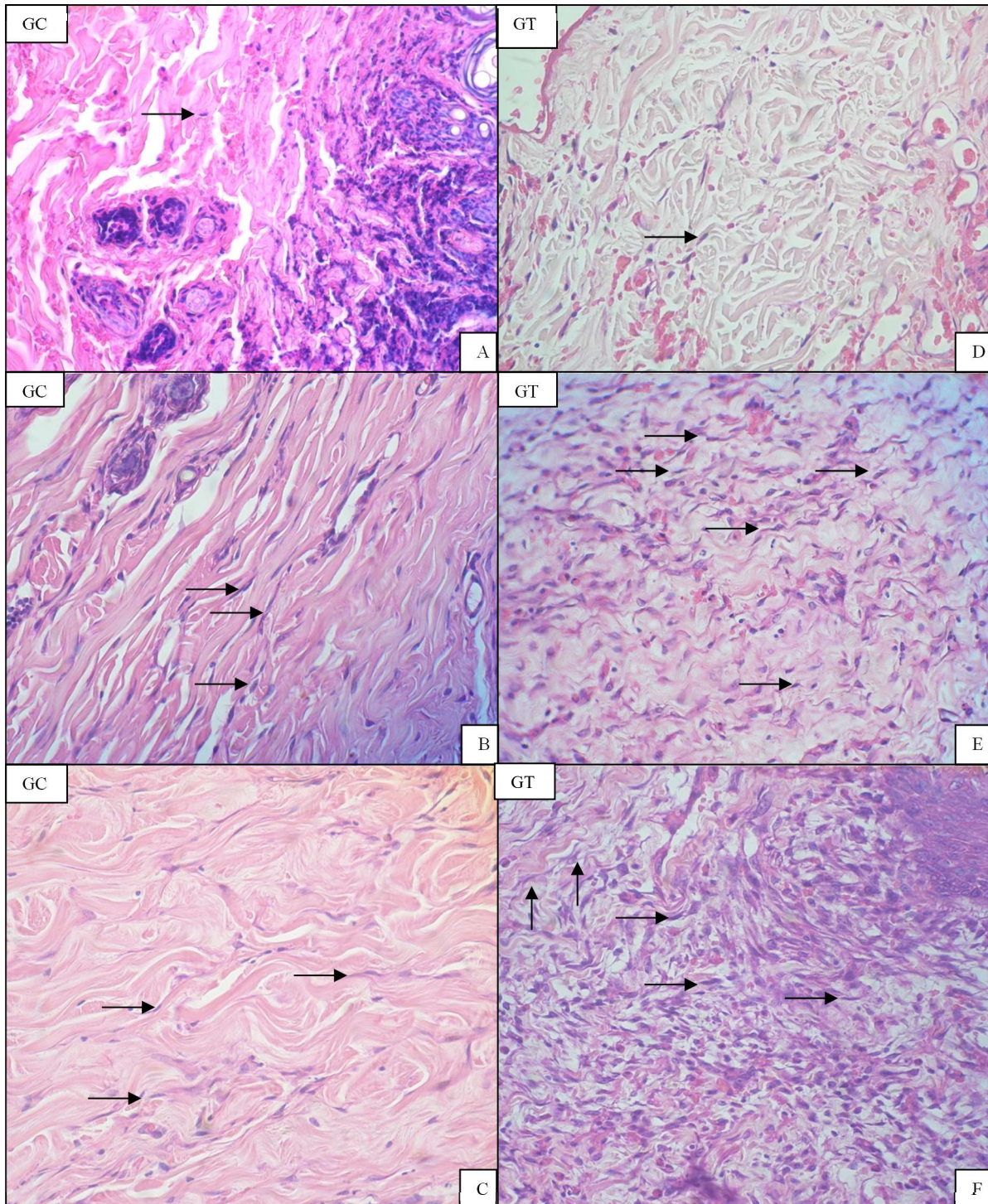
343 no 7º dia pós-operatório (setas). (C) Presença de monócito no GC 14ª dia pós-operatório (setas).

344 (D) Presença de monócito no GT no 3º dia pós-operatório (setas). (E) Presença de monócito no

345 GT no 7º dia pós-operatório (setas). (F) Presença de monócito no GT no 14ª dia pós-operatório

346 (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.

347

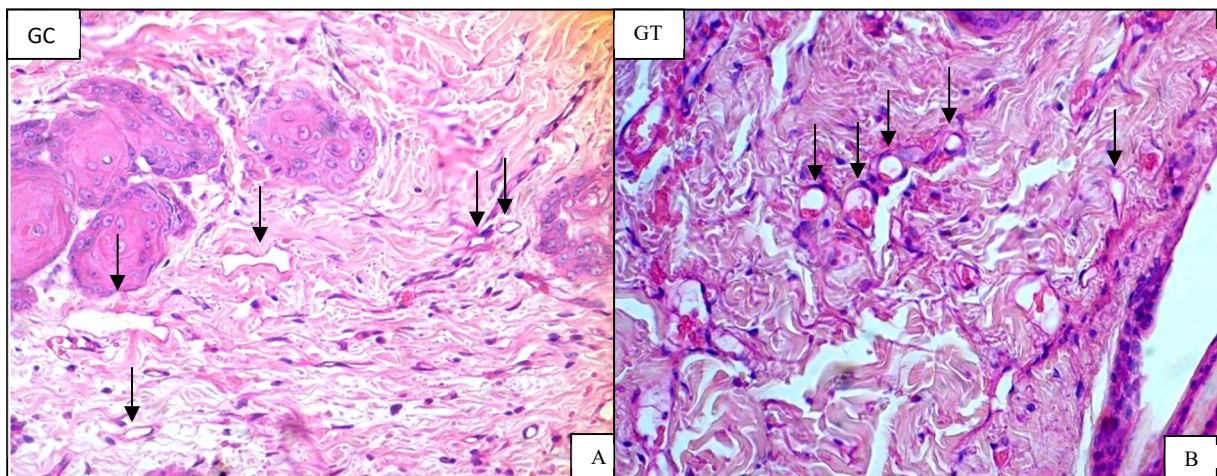


348

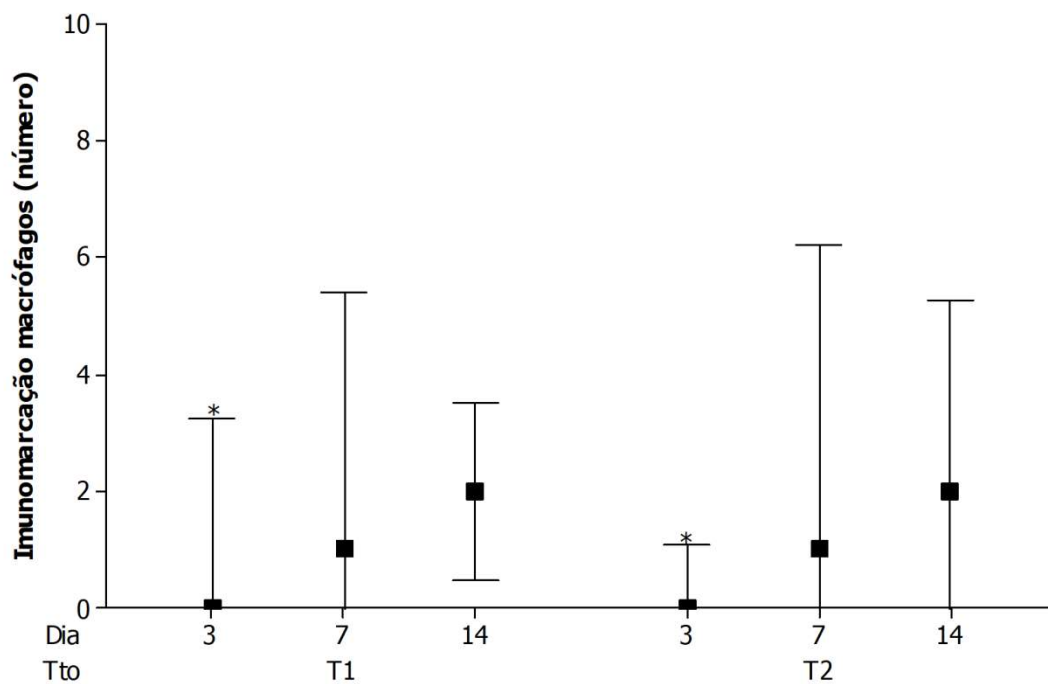
349 **Figura 5** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*

350 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de

351 fibroblastos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos três, sete e catorze dias pós-
352 operatório. (A) Presença de fibroblastos no GC no 3º dia pós-operatório (setas). (B) Presença
353 de fibroblastos no GC no 7º dia pós-operatório (setas). (C) Presença de fibroblastos no GC no
354 14ª dia pós-operatório (setas). (D) Presença de fibroblastos no GT no 3º dia pós-operatório
355 (setas). (E) Presença de fibroblastos no GT no 7º dia pós-operatório (setas). (F) Presença de
356 fibroblastos no GT no GC no 14ª dia pós-operatório (setas). Aumento de 400X. Coloração HE.
357



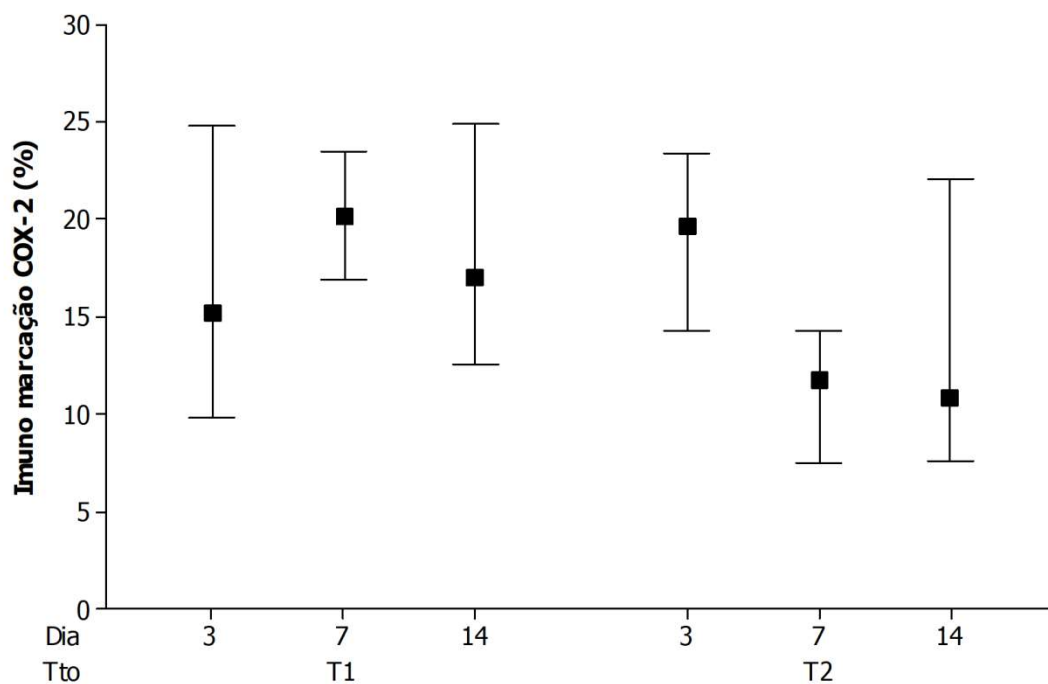
358 **Figura 6** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*
359 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. Aspecto histológico da contagem de
360 vasos em amostras de auto enxertos cutâneos obtidos aos três, sete e catorze dias pós-operatório.
361 (A) Presença de vasos no GC no 7º dia de pós operatório (setas). (B) Presença de vasos no GT
362 3º dia de pós operatório (setas). Coloração HE. Aumento de 400X.
363
364



365

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

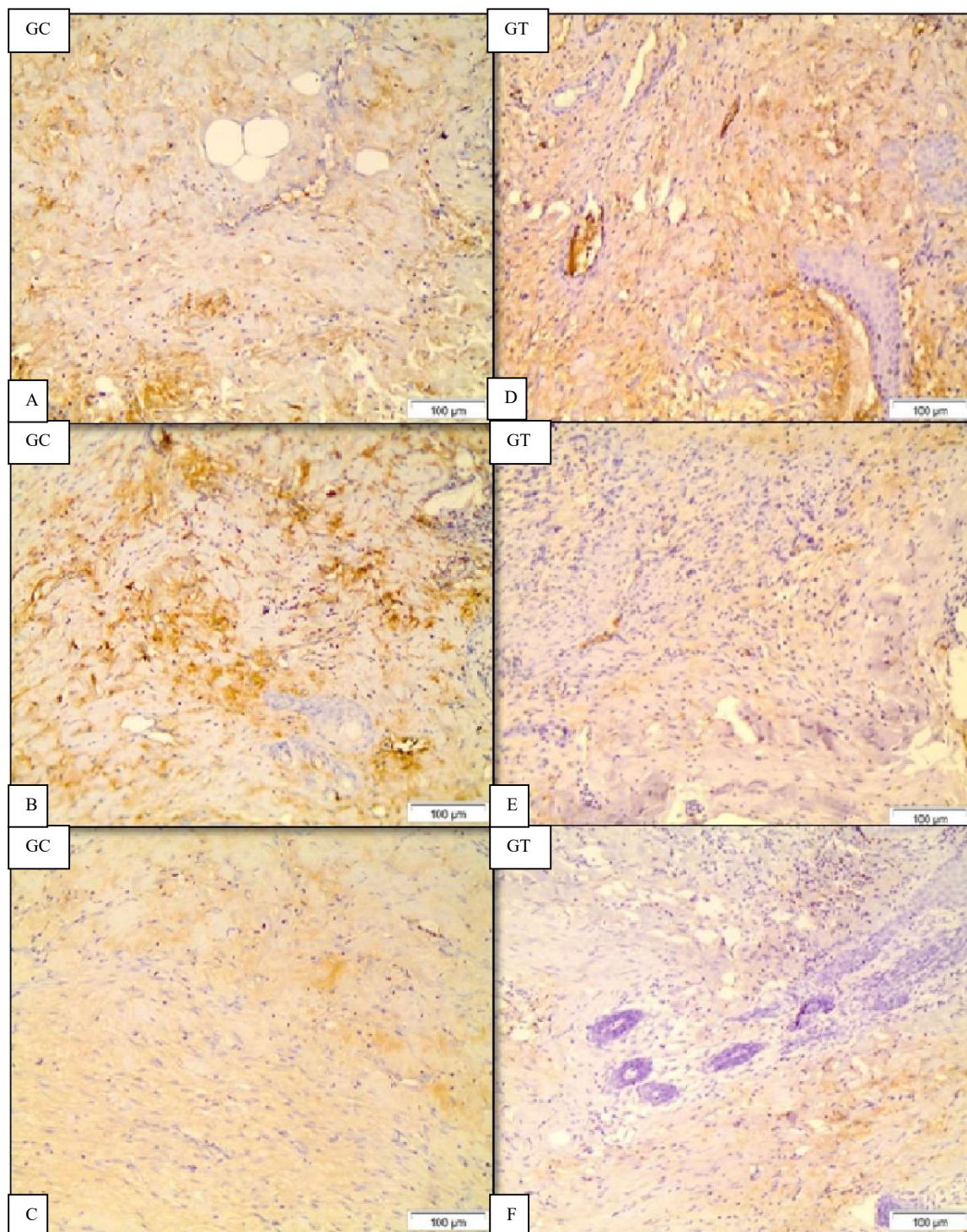
369



370

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

374



375

376 **Figura 9** - Fotomicrografia óptica da pele de coelhos fêmeas da espécie *Oryctolagus cuniculus*
377 submetidos ao procedimento de cirurgia reconstrutiva. **(A)** Imunomarcção para Cox-2 no GC
378 no 3º dia pós-operatório. **(B)** Imunomarcção para Cox-2 no GC no 7º dia pós-operatório. **(C)**
379 Imunomarcção para Cox-2 no GC no 14º dia pós-operatório. **(D)** Imunomarcção para Cox-2
380 no GT no 3º dia pós-operatório. **(E)** Imunomarcção para Cox-2 no GT no 7º dia pós-operatório.
381 **(F)** Imunomarcção para Cox-2 no GT no 14º dia pós-operatório. Imunomarcção com Cox-2.
382 Aumento de 100x.