

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM MODELO ANIMAL**

LUCIANA DA ROSA ZINN SOSTIZZO

Porto Alegre

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**SEGURANÇA E EFICÁCIA DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM MODELO ANIMAL**

LUCIANA DA ROSA ZINN SOSTIZZO

Orientador: Profa. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2024

CIP - Catalogação na Publicação

Sostizzo, Luciana da Rosa Zinn
SEGURANÇA E EFICÁCIA DO USO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
MODELO ANIMAL / Luciana da Rosa Zinn Sostizzo. --
2024.
61 f.
Orientador: Lúcia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Feridas. 2. Regeneração Tecidual. 3. Célula
Tronco Mesenquimal. 4. Terapia Celular. I. Silla,
Lúcia Mariano da Rocha, orient. II. Título.

Epígrafe:

*"Cada pessoa deve trabalhar pelo seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,
participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade"*

Marie Curie

Agradecimentos

A Deus, pela vida.

Aos meus pais, **Carla e Giovanni Zinn**, por todo o suporte, desde sempre.

À minha vó Ida, por ser um exemplo de vida.

Ao meu marido, **Fabiano Sostizzo**, pelo companheirismo, compreensão e incentivo nestes anos todos e em especial nestes dois últimos.

Aos meus filhos, **Arthur e Eduardo**, por tornarem minha vida mais feliz.

À minha orientadora, **Profª Drª Lúcia Silla**, pela oportunidade e pelo aprendizado ímpar nestes anos de convivência.

Ao **DDo. Raul Rodrigues**, por ter estado sempre ao meu lado... muito obrigada pela parceria nos estudos e amizade!

À **Profª Drª Fernanda Visioli** por toda generosidade e doação ao estudo e ao querido **Prof. Dr. Victor Palma**, pelos ensinamentos.

Ao **Prof. Dr. David Driemeier** pela doação ao estudo juntamente com a colaboração de sua **Mda. Brenda Oliveira Silveira**.

A **Profª Drª Ana Paz e Drª Anelise Araújo**, juntamente com as queridas **Mda. Mariana Albin** e a **Acad. Laíza Ruggeri**, que tanto contribuíram neste estudo.

A equipe da Unidade de Experimentação Animal, em especial a **Drª Tuane Garcez** e **Enfª Marta Cioato**, por todos os ensinamentos e carinho com que me apresentaram o mundo animal.

A equipe da Unidade de Processamento Celular Avançado, em especial a **Drª Anelise Pezzi** e **Drª Michele Domingues** pelas discussões e sugestões que facilitaram o caminho.

A equipe da Unidade de Patologia Clínica, em especial a **Drª Letícia Brondani**, por todo o auxílio e disponibilidade.

Aos meus colegas pelo incentivo, em especial a **Enfª Silvete Schneider** e a **Enfª Laiza Quadro**, por terem me ajudado a tornar este sonho realidade.

A todos que de alguma forma contribuíram e não foram citados, toda a minha gratidão.

Aos membros da **banca examinadora**, **Prof. Dr. Renan Bonamigo**, **Prof. Dr. Ricardo Xavier**, **Profª Drª Taline Bavaresco** e **Prof. Dr. Marcelo Alievi**, pela disponibilidade, incentivos e contribuições que qualificaram este estudo.

E por fim, aos **animais** que doaram as suas vidas em prol da ciência.

RESUMO

Introdução: As feridas cutâneas, de forma geral, além do dano tecidual em si, possuem um componente inflamatório importante. Assim, este estudo investiu no uso das Células-Tronco Mesenquimais como terapia, tendo em vista o potencial destas células para regenerar tecidos e regular o sistema imune. **Objetivo:** Avaliar a segurança e eficácia das Células-Tronco Mesenquimais para o tratamento de feridas em camundongos. Investigar o lisado plaquetário na cicatrização das feridas. **Métodos:** Trata-se de um ensaio pré-clínico, prospectivo e controlado. Foram utilizados 42 camundongos C57BL/6, nos quais foi induzida uma ferida excisional para aplicação tópica e seriada dos tratamentos, que foram protegidos por curativo multicamadas. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo hidrogel ($n=4$), grupo gel salino ($n=6$), grupo lisado plaquetário ($n=10$) e grupo lisado com células tronco ($n=10$). Foram analisadas três amostras em relação ao tempo, aos 7 dias ($n=5$), aos 13 dias ($n=7$) para análise imunohistoquímica e aos 21 dias ($n=30$) para a segurança do produto em todos os grupos. O acompanhamento se deu através da avaliação clínica, mensuração e registro fotográfico, além da análise histológica para comparar os grupos. **Resultados:** Não foi identificado nenhum evento adverso relacionado aos tratamentos. Foram encontradas alterações fisiológicas como a presença de edema nas bordas das feridas assim como drenagem de exsudatos e a formação de crostas de forma semelhante em todos os grupos. Os animais do grupo das células mesenquimais apresentaram melhores escores na avaliação das feridas macro e microscópicas, seguidos do grupo lisado plaquetário, grupo gel salino e por último, grupo hidrogel. **Conclusão:** As células mesenquimais são seguras e podem ser utilizadas em estudos clínicos com humanos, por via tópica, por não terem apresentado nenhum evento adverso constatado em modelo animal. Os resultados sugeriram que o gel de células mesenquimais apresenta melhores resultados de eficácia na cicatrização de feridas, seguido do gel de lisado plaquetário quando comparados aos controles.

Palavras chave: Feridas; Regeneração Tecidual; Célula Tronco Mesenquimal; Terapia Celular

ABSTRACT

Background: Skin wounds, in general, in addition to the tissue damage itself, have an important inflammatory component. Therefore, this study invested in the use of Mesenchymal Stem Cells as therapy, given the potential of these cells to regenerate tissues and regulate the immune system. **Objective:** To evaluate the safety and efficacy of Mesenchymal Stem Cells for the treatment of wounds in mice. Investigate platelet lysate in wound healing. **Methods:** This is a pre-clinical, prospective and controlled trial. 42 C57BL/6 mice were used, in which an excisional wound was induced for topical and serial application of treatments, which were protected by a multilayer dressing. The animals were divided into four groups: hydrogel group (n=4), saline gel group (n=6), platelet lysate group (n=10) and stem cell lysate group (n=10). Three samples were analyzed in relation to time, at 7 days (n=5), at 13 days (n=7) for immunohistochemical analysis and at 21 days (n=30) for product safety in all groups. Monitoring took place through clinical evaluation, measurement and photographic recording, in addition to histological analysis to compare the groups. **Results:** No adverse events related to treatments were identified. Physiological changes were found, such as the presence of edema at the edges of the wounds as well as drainage of exudates and the formation of crusts in a similar way in all groups. Animals in the mesenchymal cell group showed better scores in the evaluation of macro and microscopic wounds, followed by the platelet lysate group, saline gel group and finally, the hydrogel group. **Conclusion:** Mesenchymal cells are safe and can be used in clinical studies with humans, topically, as they have not presented any adverse events found in animal models. The results suggested that the mesenchymal cell gel presents better efficacy results in wound healing, followed by the platelet lysate gel when compared to controls.

Descriptors: Wound Healing; Tissue regeneration; Mesenchymal Stromal Cell; Cell therapy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégias para localizar e selecionar artigos de interesse. 14

Figura 2 - Marco conceitual da terapia celular para o tratamento de ferida cutânea.20

ARTIGO:

Figura 1 - Os curativos multicamadas nos animais 35

Figura 2 - A evolução das feridas ao longo do tempo 40

Figura 3 - Apresentação das avaliações microscópicas 42

LISTA DE TABELAS

ARTIGO:

Tabela 1 - Comparação entre o peso (em gramas) nos grupos	39
Tabela 2 - Comparação entre os grupos e os escores da <i>PUSH</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AT: Azul de Tripan

CEUA: Comitê de Ética de Uso em Animais

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPCA: Centro de Processamento Celular Avançado

CTMs: Células-Tronco Mesenquimais

DECH: Doença do Enxerto Contra Hospedeiro

DP: Desvio Padrão

EEG: Equações de Estimações Generalizadas

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: Hematoxilina e Eosina

LP: Lisado Plaquetário

MTT: Corante tetrazólio

NITT: Núcleo de Inovação de Transferência de Tecnologia

PTA: Produto de Terapia Avançada

PUSH: Pressure Ulcer Scale Healing

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SFB: Soro Fetal Bovino

TM: Tricômico de Masson

UEA: Unidade de Experimentação Animal

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	14
2.2 Células-Tronco Mesenquimais	15
2.3 Terapia Celular	16
3 MARCO CONCEITUAL	20
4 JUSTIFICATIVA	21
5 OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo geral	22
5.2 Objetivos específicos	22
6 REFERÊNCIAS	23
7 ARTIGO:	
Segurança e eficácia do uso de células-tronco mesenquimais no tratamento de feridas cutâneas em modelo animal	30
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	51
10 ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e constitui a primeira linha de defesa do organismo, além de participar da termorregulação, da excreção de água e eletrólitos e das percepções táteis de pressão, dor e temperatura; qualquer lesão que leve a uma quebra da continuidade da pele é uma ferida e as causas mais frequentes são: o trauma (mecânico, físico ou químico), a isquemia, a pressão e a cirurgia⁽¹⁾.

As feridas constituem um sério problema de saúde pública devido ao grande número de indivíduos com alterações na integridade da pele e apesar dos escassos registros desses atendimentos no Brasil, o elevado número de pessoas com úlceras contribui para onerar o gasto público, além de interferir na qualidade de vida da população⁽²⁾.

Embora as lesões cutâneas tenham diferentes etiologias, são todas igualmente desencadeadas por fatores que causam alterações moleculares ou estruturais nas células, ocasionando lesão e/ou morte celular; dentre os fatores que danificam as células, podemos citar: hipóxia, agentes físicos, agentes químicos e drogas, agentes infecciosos, reações imunológicas, distúrbios genéticos e desequilíbrios nutricionais⁽³⁾.

O esperado é que o processo de cicatrização siga com a finalidade de cura das feridas, em uma série complexa de reações e interações entre células, envolvendo mediadores inflamatórios e substâncias químicas, em três fases cicatriciais que se sobrepõem: fase inflamatória (do momento da lesão até os dias 4 a 6), fase proliferativa (dos dias 4 a 14) e fase de remodelação (do dia 8 a 1 ano ou mais)⁽⁴⁾.

Na fase inflamatória, a hemostasia é a primeira medida para conter o sangramento, através da vasoconstrição do vaso sanguíneo e ativação da cascata de coagulação pelas plaquetas próximas, formando um coágulo e o início da resposta inflamatória ocorre através da liberação de citocinas e fatores de crescimento, elaboração das prostaglandinas e a liberação de interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral (TNF)- α , fator de crescimento transformador (TGF)- β e produtos bacterianos que acabam por atrair os neutrófilos para a área lesionada, que eliminam bactérias invasoras e detritos celulares, liberam enzimas proteolíticas cáusticas para digerir bactérias e tecidos inviáveis e ainda geram radicais livres reativos de oxigênio que se combinam com o cloro para ajudar a esterilizar a ferida das bactérias⁽⁴⁾. De 48 a 96 horas após a lesão, os monócitos dos tecidos próximos e do sangue são atraídos para a área e transformam-se em macrófagos; o macrófago ativado é importante para a transição para a próxima fase cicatricial pois mediará a angiogênese sintetizando o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos e o TNF- α , além de fagocitar os neutrófilos mortos e continuarem matando patógenos e gerando grandes quantidades de óxido nítrico (ON).

A matriz extracelular danificada também é eliminada pela metaloproteinase da matriz (MMP), que é expressa por queratinócitos, fibroblastos, monócitos e macrófagos em resposta ao TNF- α . A MMP limpa os detritos inflamatórios e assim, permite a migração de células através da matriz extracelular⁽⁴⁾.

Segundo os mesmos autores, na fase proliferativa as células epiteliais localizadas na borda da pele começam a proliferar e enviar projeções para restabelecer uma barreira protetora contra a perda de fluidos e futuras invasões bacterianas além de, estimuladas pelo VEGF, começar a formar novos tubos capilares. Os queratinócitos podem expressar VEGF por IL-1, TNF- α , TGF- β 1 e fator de crescimento de queratinócitos (KGF). O ON é produzido pelas células endoteliais em resposta à hipóxia e em concentrações aumentadas, também protegem o novo tecido dos efeitos tóxicos da lesão de isquemia e reperfusão e causam vasodilatação do endotélio. Os fibroblastos do tecido circundante são atraídos pela sinalização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) para o local da ferida, são ativados e começam a sintetizar colágeno e se proliferar enquanto que os fibroblastos já localizados no local da ferida também começam a sintetizar colágeno e se transformam em miofibroblastos para a contração da ferida e em resposta ao PDGF, começam a sintetizar uma matriz provisória composta de colágeno tipo III, glicosaminoglicanos e fibronectina. Feridas maiores que cicatrizam por segunda intenção são direcionadas, em parte, pelo TGF- β , que causa contração da ferida e epitelização, fazendo com que os fibroblastos sintetizem colágeno tipo I, diminuam a produção de MMP, aumentem a produção de inibidores teciduais de metaloproteinase e a produção de proteínas de adesão celular onde na fase de maturação e remodelação há a finalização do processo cicatricial com a deposição de colágeno em uma rede organizada⁽⁴⁾.

Pelo exposto acima, as feridas cutâneas, além do dano tecidual em si, possuem um componente inflamatório complexo, que é desencadeado pelas células lesionadas como resposta a agressão a qual foram submetidas e que prossegue através de uma cadeia de reações interconectadas podendo ser constatado clinicamente pelo aparecimento dos sinais e sintomas inflamatórios como dor, edema, hiperemia e calor⁽⁵⁾. O presente estudo investiu no uso das Células-Tronco Mesenquimais como terapia, tendo em vista o potencial destas células para regenerar tecidos e também regular os sistemas imunes inato e adaptativo que interferem diretamente na inflamação⁽⁶⁾.

Estudos já demonstraram a eficácia do tratamento de lesões usando CTMs expandidas em meio com soro fetal bovino (SFB)⁽⁷⁾, entretanto, tal método apresenta o risco de anticorpos contra proteínas do SFB em pacientes que o receberam. As células produzidas no Centro de

Processamento Celular Avançado (CPCA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) são expandidas em lisado plaquetário humano, o que apresenta vantagens em comparação ao SFB, como não provocar xenorreações, evitar a transmissão de zoonoses, proteger a estabilidade cromossomal das CTMs, além de apresentar uma expansão numérica superior das mesmas.

O lisado plaquetário (LP) do CPCA foi patenteado em 2022 e sua composição foi verificada através da análise proteômica e de partículas e foi constatado que trata-se de um conteúdo proteico diversificado, relacionado a processos celulares essenciais como proliferação, morfogênese, diferenciação, biossíntese, adesão e metabolismo⁽⁸⁾. Assim, sendo um substrato que contém fatores de crescimento e proteínas auxiliares com capacidade para orquestrar funções fisiológicas, supõe-se que além de servir para meio de cultura celular também possa ter algum benefício na cicatrização de lesões, o que requer investigação.

Embora o LP apresente-se originalmente na forma líquida, se administrado em feridas por via injetável, pode predispor a complicações decorrentes das punções pois o ambiente intra e perilesional se encontra alterado. Assim, a via preferencial em feridas parece ser a tópica e a apresentação ideal, em gel, pois além da segurança na aplicação, o produto permanece em contato com a ferida, evitando que escorra. Um gel é uma forma farmacêutica semissólida que contém um agente gelificante para fornecer viscosidade a um sistema no qual partículas de dimensão coloidal (tipicamente entre 1 nm e 1 µm) são distribuídas uniformemente e pode ainda, conter partículas suspensas⁽⁹⁾.

Atualmente as células mesenquimais de medula óssea expandidas em lisado plaquetário humano têm sido usadas no HCPA como terapia celular para outras finalidades, como o tratamento da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (DECH) aguda resistente a esteróides⁽¹⁰⁾. A segurança foi comprovada⁽¹¹⁾ e, embora não tenha sido o objetivo, também a eficácia da infusão endovenosa deste produto celular⁽¹²⁾.

No âmbito nacional, com o avanço das pesquisas clínicas utilizando produtos de terapias avançadas (PTA) como as células-tronco mesenquimais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC 260 de 2018⁽¹³⁾ a qual especifica uma série de exigências para o registro de PTA. Para tal, requer a comprovação de segurança, eficácia ou eficácia e segurança e a descrição do produto, a composição, os efeitos biológicos em animais e seres humanos. Em 2021, a ANVISA emitiu a RDC 508 sobre o tema⁽¹⁴⁾ que trata sobre boas práticas em células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica, contendo rigorosas normas de segurança e qualidade que devem ser seguidas pelos Centros de Processamentos de Células no Brasil. O CPCA do Hospital de Clínicas é certificado para esta finalidade, atendendo plenamente as exigências.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura buscou por estudos sobre o uso terapêutico das células-tronco mesenquimais e seu efeito frente a cicatrização de lesões de diferentes etiologias nas bases de dados da US National Library of Medicine (PubMed) e da Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), entre janeiro de 2016 e setembro de 2023. Os termos pesquisados foram "*wound healing*", "*mesenchymal stem cell*", "*tissue regeneration*", "*stem cell therapy*" e suas combinações apresentadas na Figura 1.

Os estudos foram selecionados de acordo com a relevância científica e analisados quanto à elegibilidade, sendo excluídos os duplicados e os que não eram relevantes ao tema pesquisado, como por exemplo, os que tratavam de outros tipos de células ou produtos biológicos e para outros tipos de tratamentos que não em feridas. Além destes, também foram acrescentados estudos pré-selecionados considerados relevantes para fundamentação teórica sobre o assunto.

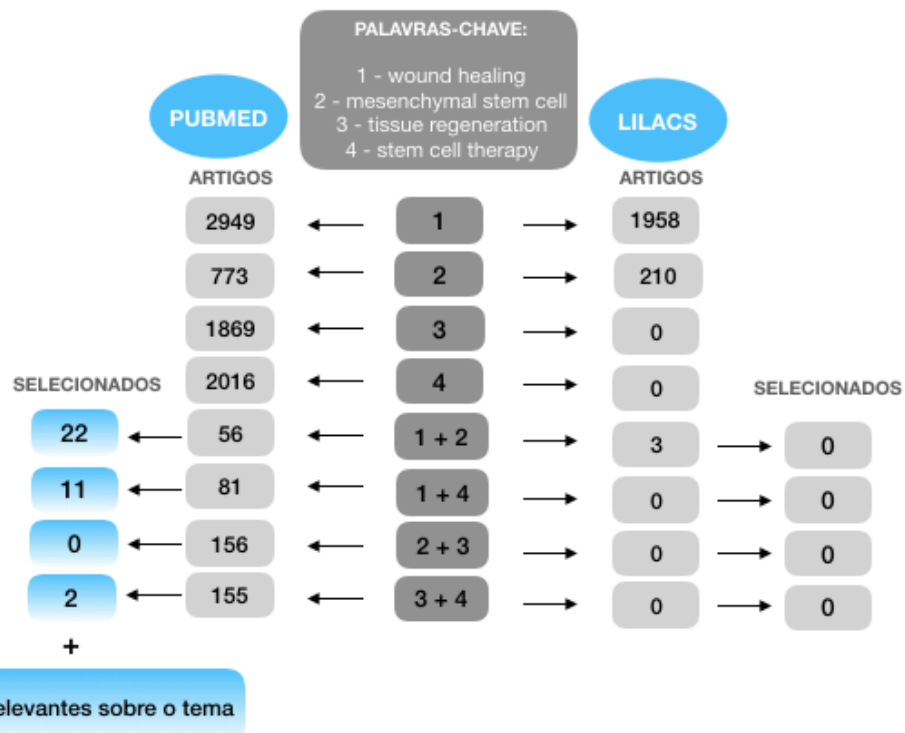


Figura 1. Estratégias para localizar e selecionar artigos de interesse. Fonte: Elaborado pela autora (2023).

2.2 Células-Tronco Mesenquimais

A célula-tronco mesenquimal é uma célula multipotente não hematopoiética com capacidade de auto renovação, diferenciação em outros tecidos e imunomodulação⁽¹⁵⁾, descrita pela primeira vez na década de setenta⁽¹⁶⁾ como uma célula de aparência semelhante à de um fibroblasto e capacidade de adesão a superfícies plásticas, apresentando um grande potencial para o uso em medicina regenerativa. Por conta desse potencial, houve um crescente interesse em seu uso pela comunidade científica nas décadas seguintes, podendo ser evidenciado pela quantidade expressiva de estudos para avaliar sua aplicabilidade terapêutica para o tratamento de diferentes doenças, entre elas, autoimunes, neurodegenerativas e cardiovasculares^(16,17). Além das linhagens mesodérmicas (adipócitos, osteócitos e condrócitos), as CTMs têm a capacidade de transdiferenciação-se em linhagens ectodérmicas (por exemplo células neurais) e endodérmicas (como hepatócitos)⁽¹⁷⁾.

Essas células se encontram em quantidades limitadas e podem ser isoladas a partir de várias fontes no organismo humano, como a medula óssea, o tecido adiposo, a polpa dentária, o cordão umbilical, o fígado e o pulmão fetal, a placenta, o osso trabecular, entre outros^(18,19). As CTMs derivadas da fração estromal da medula óssea fornecem o suporte do estroma para o crescimento e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas, ou seja, na medula óssea provêm um nicho celular para o desenvolvimento e manutenção das características dessas células e suporte à hematopoiese em indivíduos adultos⁽²⁰⁾. Essas células são muito bem estudadas e caracterizadas, pois há muito tempo são utilizadas com sucesso para tratamento de pacientes com cânceres hematológicos ou distúrbios relacionados à medula óssea⁽²¹⁾.

Uma das características que tornam as CTMs ideais para terapia é sua notável capacidade de imunorregulação do microambiente através da ação de citocinas secretadas; além da preservação de sua morfologia, fenótipo e estabilidade genômica após a expansão *in vitro* por poucas passagens⁽²²⁾. Há uma alta capacidade diferenciativa sugerida por estudos do ciclo celular, pois a maioria dessas células se encontra na fase G0-G1 do ciclo celular, enquanto uma pequena fração está envolvida na diferenciação. Além disso, não expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) apenas de classe I (MHC I) em pequenas quantidades em sua superfície – fator importante na transfusão, pois impede que o organismo receptor faça a rejeição dessas células indiferenciadas, pois não as reconhece como impróprias ao organismo^(18,23,24).

As CTMs possuem notáveis propriedades imunomodulatórias, e por isso, tornam-se um importante recurso terapêutico. O efeito anti-inflamatório orquestrado pelas CTMs deve-se a sua capacidade de migrar ao local da inflamação e através de ação parácrina, secretar várias

moléculas bioativas, como citocinas e fatores de crescimento neste microambiente, influenciando os outros tipos celulares. Sabe-se, no entanto, que as CTMs necessitam de ativação prévia de um ambiente inflamatório no hospedeiro, a fim de mediar o seu efeito imunoregulador. Portanto, a presença de IFN- γ (interferon gama) e/ou TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) pode influenciar o efeito imunossupressor destas células e produzir efeitos diferentes em sua função. Enquanto na presença de um ambiente inflamatório, as CTMs se tornam ativadas e adotam um fenótipo imunossupressor secretando elevados níveis de fatores solúveis que inibem a proliferação de células T, por exemplo; e na ausência de um ambiente inflamatório, as CTMs podem adotar um fenótipo pró-inflamatório e aumentar as respostas de células T pela secreção de quimiocinas que recrutam linfócitos para locais de inflamação. Essa versatilidade e especificidade é essencial na terapia. Além disso, as CTMs estão envolvidas na inflamação tecidual, polarizando macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório. Os macrófagos do tipo M1, sintetizam citocinas pró-inflamatórias, com a capacidade de inibir a proliferação celular e danificar tecidos e os com fenótipo anti-inflamatório, do tipo M2, liberam citocinas anti-inflamatórias, que podem promover reparo tecidual. Um desequilíbrio da polarização M1-M2 dos macrófagos é frequentemente associado a condições inflamatórias⁽²⁵⁻²⁸⁾.

Esse tipo celular tem sido testado como terapia para várias doenças como as cardiovasculares, neurológicas, autoimunes, renais, pulmonares, hepáticas e para a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). Os resultados obtidos até o presente momento demonstram que, de uma forma geral, a infusão ou administração das CTMs se mostra bem tolerada, porém a eficácia terapêutica está primariamente associada ao uso para DECH e doenças hematológicas, ósseas e cartilaginosas. Isso deve-se ao fato de que nessas doenças há danos teciduais associados à inflamação, o que acaba afetando a forma de ação das CTMs. Nesse campo, destaca-se o uso das CTMs como potencial terapia para danos teciduais associados à ação inflamatória, como a artrite reumatóide, falência renal, lesão cardíaca, doença do enxerto contra o hospedeiro do transplante alogênico de medula óssea e esclerose múltipla⁽²⁹⁾.

2.3 Terapia celular

O processo de regeneração de lesões teciduais é complexo e ocorre em várias fases, envolvendo diversos mecanismos fisiológicos como a hemostasia, coagulação, remodelamento da matriz extracelular e proliferação celular⁽³⁰⁾. Muitas características das células-tronco mesenquimais fundamentam o seu uso como potencial terapia para lesões na pele, como por exemplo: quando aplicadas na área da ferida, elas se integram e se diferenciam diretamente em

linhagens celulares regenerativas, como células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos o que contribui para o processo de cicatrização⁽³¹⁾; resposta imuno-moduladora através da diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e aumento da formação de macrófagos^(32,33); aumento da migração celular de outros tipos celulares para o tecido lesionado^(34,35); atividade parácrina de secreção de citocinas e fatores de crescimento essenciais para a proliferação celular nos locais da lesão, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para estimular a angiogênese, efeitos antimicrobianos^(36,37) e indução de vascularização no leito da ferida^(38, 39). Os processos de estímulo à cicatrização são relevantes e espera-se que as CTMs sejam uma alternativa terapêutica viável^(40,41).

Historicamente, em 2003, Evangelos e Vincent foram os primeiros a demonstrar o efeito curativo destas células para regeneração tecidual através da injeção local de CTMs autólogas derivadas da medula óssea em 3 pacientes com úlceras onde havia insuficiência de suprimento sanguíneo como complicação, os resultados mostraram maior vascularização, diminuição da ferida e melhora clínica com a cicatrização completa das feridas⁽⁴²⁾. No estudo, o tratamento consistiu em desbridar a ferida para proporcionar que as células entrassem em contato com o tecido viável, quando então as células foram aplicadas topicamente nas feridas e cobertas por um filme transparente e gaze como camada externa, mantidas durante uma noite, quando as feridas foram irrigadas com solução fisiológica e protegidas com curativo de espuma, sendo que a aplicação do tratamento foi repetida por três vezes. Em 2007, Falanga e colaboradores⁽⁴³⁾ utilizaram CTMs de medula óssea em conjunto com um spray de fibrina em 10 pacientes com lesões agudas e crônicas oriundas de câncer de pele, os tratamentos foram aplicados por até 4 vezes e foi observada uma forte correlação direta entre o número de células aplicadas (maior do que 1×10^6 células por cm^2 de área de ferida) e a subsequente diminuição do tamanho da ferida crônica ($p=0,0058$) sem eventos adversos. Em 2008 foram utilizadas CTMs de medula óssea autólogas cultivadas em esponja de colágenos como forma de tratamento tópico em feridas crônicas de 20 pacientes com dermatopatias intratáveis, houve cicatrização de 18 pacientes e 2 morreram por outras causas não relacionadas ao tratamento⁽⁴⁴⁾.

Além disso, existem muitos estudos relatando com sucesso e segurança o uso de CTMs para tratamento de úlceras de pé em pacientes com diabetes, indicando que as células podem melhorar a cicatrização e estão associadas a menos dor, menor taxa de amputação e melhor prognóstico em comparação com o tratamento convencional⁽⁴⁵⁻⁵⁷⁾ e para tratamento de úlceras de membro inferior em pacientes com doença vascular isquêmica foram apontados resultados de melhora da dor, aumento do índice tornozelo-braquial, da cicatrização e redução das taxas de amputação até mesmo em pacientes que falharam previamente no tratamento de

revascularização ou que não era possível nova intervenção^(58, 59). O estudo realizado por Dash e colaboradores⁽⁴⁵⁾ em úlceras crônicas em membros inferiores como em diabéticos e na doença de Buerger (tromboangeíte obliterante) obteve em 12 semanas, cerca de 50% de diminuição da área da úlcera e os pacientes conseguiram caminhar dez vezes mais antes de sentir dor.

Estudos recentes investigaram o uso das células-tronco em feridas cutâneas que por comprometimento na cicatrização resultaram em lesões crônicas, foi considerado que por terem a capacidade de autorrenovação e diferenciação, as células-tronco podem enriquecer as populações de células existentes em feridas crônicas, a fim de superar as barreiras que impedem a progressão da cicatrização e também podem ser utilizadas para aumentar o enxerto, a sinalização e a atividade das células⁽⁶⁰⁾. Outros estudos apontaram a plasticidade intrínseca para originar células envolvidas na cicatrização e aumento da angiogênese⁽⁶¹⁾, a segurança, a cura de úlceras crônicas e a redução da dor^(62,63) e o forte convencimento de que, num futuro próximo, a terapia com CTMs serão uma realidade na prática clínica de úlceras crônicas de pernas⁽⁶⁴⁾.

Outros estudos sobre o tratamento de queimaduras consideram as CTMs uma estratégia promissora, com resultados positivos em relação à melhora na cicatrização de queimaduras^(65,66), na resposta imunológica⁽⁶⁷⁾, na redução da área da ferida⁽⁶¹⁻⁶⁴⁾ e que há justificativa para uso de células-tronco como um complemento às terapias de primeira linha em queimaduras⁽⁷⁰⁻⁷²⁾.

As células-tronco também têm sido estudadas no tratamento das cicatrizes inestéticas, como as quelóides e hipertróficas, que geralmente têm opções de tratamento insatisfatórias. Uma revisão sistemática considerou que todos estudos encontraram melhorias nos resultados da aparência das cicatrizes com o uso das células-tronco^(72,73). Outra revisão sistemática de 18 estudos clínicos sobre o uso CTMs no tratamento de cicatrizes dolorosas, considerou a terapia como sendo promissora e segura, mas que ainda há baixo nível de evidência⁽⁷⁴⁾.

As células-tronco também foram testadas em doenças inflamatórias dermatológicas, como a dermatite atópica e a psoríase, em animais e humanos e em diferentes vias de aplicação (intravenosa, subcutânea, intradérmica, intralesional injetada ou topicamente), com resultados satisfatórios⁽⁷⁵⁾. Outro estudo refere o uso das CTMs injetadas nas fístulas perianais de pacientes com doença de Crohn, com uma taxa de cicatrização de 57% dos casos⁽⁷⁶⁾.

Atualmente alguns estudos não visam mais comprovar os benefícios do uso das CTMs mas buscam aprimorar técnicas para melhorar os resultados terapêuticos das mesmas, como através o uso de uma conformação em 3D⁽⁷⁷⁾ ou do efeito terapêutico de folhas de CTMs derivadas de adipócitos cultivadas em folha para aplicação local⁽⁷⁸⁾.

As CTMs também foram combinadas em uma base creme para a recuperação da pele no pós-laser de CO2 ablativo, que trata a flacidez da pele mas pode produzir hiperpigmentação pós-inflamatória⁽⁷⁹⁾; em estudo sobre tratamento de úlcera plantar crônica na hanseníase,

caracterizadas por altos níveis de espécies reativas de oxigênio, comparou as CTMs isoladas, associadas com vitamina E e vitamina C (antioxidantes), concluiu que as CTMs com vitamina E apresentaram melhor cicatrização da ferida⁽⁸⁰⁾.

Estudos sobre materiais associados com as células comprovam que apresentaram melhores resultados. Foram investigados diferentes biomateriais com a função de andaime para apoiar a regeneração da pele, sendo de origem natural ou sintética. Dentre os naturais, existem os derivados de fontes biológicas e vegetais, como colágeno, quitosana, fibrina e derivados de fontes de proteínas e polissacarídeos e dentre os polímeros sintéticos, os de poliálcool vinílico (PVA), polietilenoglicol (PEG), entre outros⁽⁸¹⁾.

Um dos estudos semeou as CTMs em um hidrogel híbrido à base de arginina e quitosana. O hidrogel consiste em redes tridimensionais que podem reter grande quantidade de água ou fluido biológico, imitando estruturalmente a matriz extracelular natural e portanto, usado como estruturas 3D para promover a cicatrização das feridas. Este gel sintético aumentou a expressão antiinflamatória de IL-10 e macrófagos semelhantes a M2 e reduziram a expressão inflamatória de TNF- α e macrófagos semelhantes a M1. Embora os hidrogéis por si só tenham promovido a vascularização, eles foram muito mais eficazes quando semeados com MSCs⁽⁸²⁾.

Em uma revisão sistemática, quando as células mesenquimais foram combinadas a fotobiomodulação *in vivo*, após o transplante na ferida, apresentaram resultados positivos na cicatrização e na resistência à tração da cicatriz⁽⁸²⁾ sugerindo que novos estudos devam seguir sendo realizados.

3. MARCO CONCEITUAL

As lesões tissulares, como as por trauma mecânico, apresentam como resultado final lesões a nível celular. Neste estudo utilizamos células-tronco mesenquimais, produzidas a partir de técnicas de processamento celular avançado, com a finalidade terapêutica para o tratamento de lesões cutâneas induzidas em modelo animal, conforme demonstrado na Figura 2.

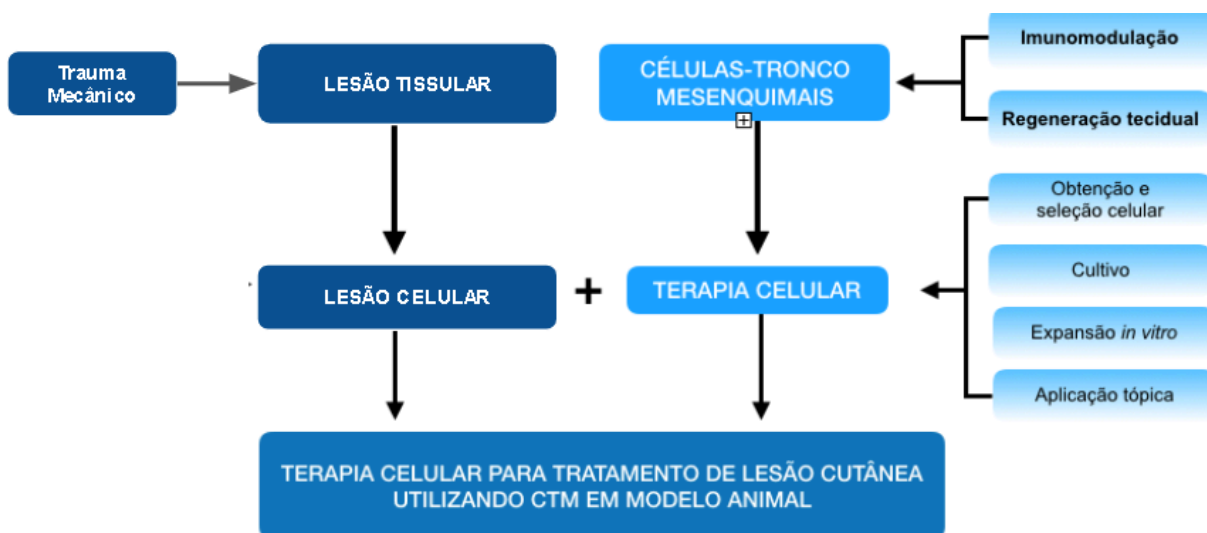


Figura 2. Marco conceitual da terapia celular para o tratamento de ferida cutânea. Fonte Elaborado pela autora (2023).

4. JUSTIFICATIVA

As lesões de pele são frequentes na população brasileira, são debilitantes e causam importante impacto na qualidade de vida das pessoas. Para evitar as complicações de uma ferida, dentre elas a dor, a infecção e a cronificação é recomendável retornar ao estado fisiológico com a maior brevidade possível. Diversas terapias para feridas buscam otimizar o tempo de cura, porém existem lesões de difícil cicatrização ou, até mesmo, não responsivas aos tratamentos disponíveis. Desta forma, torna-se necessário investir em novas alternativas terapêuticas, e as células-tronco têm cientificamente se mostrado de grande valia na cicatrização de lesões em geral, proporcionando imunomodulação do microambiente lesional e recuperação tecidual, conseqüentemente, diminuindo a ferida e minimizando infecções.

Atualmente, no ambulatório de feridas do HCPA, temos uma demanda de pacientes com feridas complexas de diferentes etiologias e dispomos de células-tronco mesenquimais para um possível uso no tratamento destas. Entretanto, as células-tronco mesenquimais de medula óssea de origem alogênica expandidas em lisado plaquetário, como as produzidas no CPCA, até o presente momento, não contam com estudos que respaldem o seu uso por via cutânea.

Assim, em respeito às novas regras regulatórias, fez-se necessário realizar esta pesquisa pré-clínica de segurança e eficácia de um novo produto de terapia avançada no Brasil, para uso posterior em pacientes portadores de feridas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a segurança e eficácia das células-tronco mesenquimais de medula óssea produzidas no Centro de Processamento Celular Avançado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre no tratamento de ulcerações cutâneas induzidas em camundongos para uso posterior em humanos.

5.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um gel para uso tópico em feridas, para ser utilizado combinado com o lisado plaquetário e/ou as células-tronco mesenquimais;
- Caracterizar as respostas biológicas através da análise histológica global (coloração por Hematoxilina e Eosina), quanto à presença de fibras colágenas (coloração por Tricrômico de Masson) e, quanto à angiogênese (imunohistoquímica, pelo marcador anti-CD31+), nas amostras de tecido cutâneo para comparações entre os grupos.

6. REFERÊNCIAS

1. Dealey C. Cuidando de Feridas: um guia para as enfermeiras (3a ed). São Paulo: Atheneu; 2013.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica. Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas. Brasília (DF): MS; 2002.
3. Miller MA, Zachary JF. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2017;2–43.e19. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1. Epub 2017 Feb 17. PMID: PMC7171462.
4. Broughton G 2nd, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun;117(7 Suppl):12S-34S. doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2. PMID: 16799372.
5. Guyton A, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 13a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.
6. Wernicke CM, Grunewald TG, Hendrik J, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, Mueller I, Doering M, Peters C, Lawitschka A, Kolb HJ, Bader P, Burdach S, von Luetlichau I. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *Int Arch Med*. 2011 Aug 15;4(1):27. doi: 10.1186/1755-7682-4-27. PMID: 21843360; PMCID: PMC3169455.
7. Zhang CP, Fu XB. Therapeutic potential of stem cells in skin repair and regeneration. *Chin J Traumatol*. 2008 Aug;11(4):209-21. doi: 10.1016/s1008-1275(08)60045-0. PMID: 18667118.
8. Rodrigues RM, Valim VS, Berger M, da Silva APM, Fachel FNS, Wilke II, da Silva WOB, Santi L, da Silva MAL, Amorin B, Sehn F, Yates JR, Guimarães JA, Silla L. The proteomic and particle composition of human platelet lysate for cell therapy products. *J Cell Biochem*. 2022 Sep;123(9):1495-1505. doi: 10.1002/jcb.30310. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35892149.
9. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. 2a edição. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 463, de 27 de janeiro de 2021. Brasília. 2021.
10. Valim V, Amorin B, Pezzi A, da Silva MAL, Alegretti AP, Silla L. Optimization of the Cultivation of Donor Mesenchymal Stromal Cells for Clinical Use in Cellular Therapy. *CellBio*. 2014;03(01):25–33. doi.org/10.4236/cellbio.2014.31003
11. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MA, Wieck A, Silla L. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell*. 2014 Oct;27(4):137-50. doi: 10.1007/s13577-014-0095-x. Epub 2014 Jun 6. PMID: 24903975; PMCID: PMC4186969
12. Silla L, Valim V, Amorin B, et al. A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil. *Leukemia & Lymphoma*, 55:5, 1203-1205, 2014 DOI: 10.3109/10428194.2013.823495
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. RDC Nº 260, de 21 de dezembro de 2018. Dispõe sobre as regras para a realização de ensaios clínicos com produto de terapia avançada investigacional no Brasil, e dá outras providências. Diário Oficial União. 28 dez 2018.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. RDC Nº 508, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências. Diário Oficial União. 26 jun 2021.

15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7. doi: 10.1126/science.284.5411.143. PMID: 10102814.
16. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. *Transplantation*. 1974 Apr;17(4):331-40. doi: 10.1097/00007890-197404000-00001. PMID: 4150881.
17. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 2015 Apr 28;35(2):e00191. doi: 10.1042/BSR20150025. PMID: 25797907; PMCID: PMC4413017.
18. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13. doi: 10.1242/jcs.02932. Epub 2006 May 9. PMID: 16684817.
19. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1427-30. doi: 10.1126/science.287.5457.1427. PMID: 10688781.
20. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-9. doi: 10.1080/14653240310003611. PMID: 14660044.
21. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1481-3. doi: 10.4161/cc.3.12.1281. Epub 2004 Dec 4. PMID: 15539950.
22. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, Del Fante C, Novara F, de Silvestri A, Amendola G, Zuffardi O, Maccario R, Locatelli F. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):121-30. doi: 10.1002/jcp.20911. PMID: 17187344.
23. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 1999 Oct;181(1):67-73. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199910)181:1<67::AID-JCP7>3.0.CO;2-C. PMID: 10457354.
24. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318-24. doi: 10.1002/path.2469. PMID: 19023885; PMCID: PMC8793150.
25. Fan L, Hu C, Chen J, Cen P, Wang J, Li L. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. *Int J Mol Sci*. 2016 May 5;17(5):650. doi: 10.3390/ijms17050650. PMID: 27164080; PMCID: PMC4881476.
26. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 2008 May;15(10):730-8. doi: 10.1038/gt.2008.39. Epub 2008 Apr 10. PMID: 18401438.
27. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 2010;19(6):667-79. doi: 10.3727/096368910X508762. Epub 2010 Jun 3. PMID: 20525442; PMCID: PMC2957533.

28. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):552-70. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552. PMID: 25426252; PMCID: PMC4178255.
29. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26423725.
30. Golchin A, Farahany TZ, Khojasteh A, Soleimanifar F, Ardeshiryajimi A. The Clinical Trials of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Skin Diseases: An Update and Concise Review. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2019;14(1):22-33. doi: 10.2174/1574888X13666180913123424. PMID: 30210006.
31. Hu R, Ling W, Xu W, Han D. Fibroblast-like cells differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells for vocal fold wound healing. *PLoS One*. 2014 Mar 24;9(3):e92676. doi: 10.1371/journal.pone.0092676. PMID: 24664167; PMCID: PMC3963917.
32. Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW, Le AD. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*. 2010 Oct;28(10):1856-68. doi: 10.1002/stem.503. PMID: 20734355; PMCID: PMC3114043.
33. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):526-39. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.526. PMID: 25426250; PMCID: PMC4178253.
34. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, Sossa CL, Galvis V, Arango-Rodríguez ML. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One*. 2017 Jun 8;12(6):e0177533. doi: 10.1371/journal.pone.0177533. PMID: 28594903; PMCID: PMC5464535.
35. Li M, Zhao Y, Hao H, Dai H, Han Q, Tong C, Liu J, Han W, Fu X. Mesenchymal stem cell-conditioned medium improves the proliferation and migration of keratinocytes in a diabetes-like microenvironment. *Int J Low Extrem Wounds*. 2015 Mar;14(1):73-86. doi: 10.1177/1534734615569053. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25759411.
36. Gneccchi M, Danieli P, Malpasso G, Ciuffreda MC. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:123-46. doi: 10.1007/978-1-4939-3584-0_7. PMID: 27236669.
37. Nuschke A. Activity of mesenchymal stem cells in therapies for chronic skin wound healing. *Organogenesis*. 2014 Jan 1;10(1):29-37. doi: 10.4161/org.27405. Epub 2013 Dec 10. PMID: 24322872; PMCID: PMC4049892.
38. Hong SJ, Jia SX, Xie P, Xu W, Leung KP, Mustoe TA, Galiano RD. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated-fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. *PLoS One*. 2013;8(1):e55640. doi: 10.1371/journal.pone.0055640. Epub 2013 Jan 31. PMID: 23383253; PMCID: PMC3561304.
39. Kosaraju R, Rennert RC, Maan ZN, Duscher D, Barrera J, Whittam AJ, Januszyk M, Rajadas J, Rodrigues M, Gurtner GC. Adipose-Derived Stem Cell-Seeded Hydrogels Increase Endogenous Progenitor Cell Recruitment and Neovascularization in Wounds. *Tissue Eng Part A*. 2016 Feb;22(3-4):295-305. doi: 10.1089/ten.tea.2015.0277. PMID: 26871860; PMCID: PMC4779321.
40. Isakson M, de Blacam C, Whelan D, McArdle A, Clover AJ. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Current Evidence and Future Potential. *Stem Cells Int*.

- 2015;2015:831095. doi: 10.1155/2015/831095. Epub 2015 May 27. PMID: 26106431; PMCID: PMC4461792.
41. Hocking AM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Cutaneous Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2012 Aug;1(4):166-171. doi: 10.1089/wound.2011.0294. PMID: 24527299; PMCID: PMC3623581.
 42. Badiavas EV, Falanga V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. *Arch Dermatol*. 2003 Apr;139(4):510-6. doi: 10.1001/archderm.139.4.510. PMID: 12707099.
 43. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Koultab N, Shroyer D, Carson P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007 Jun;13(6):1299-312. doi: 10.1089/ten.2006.0278. PMID: 17518741.
 44. Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, Sen Y, Kawanishi K, Inada Y, Takakura Y, Okuchi K, Nonomura A. Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Mar;121(3):860-877. doi: 10.1097/01.prs.0000299922.96006.24. PMID: 18317135.
 45. Dash NR, Dash SN, Routray P, Mohapatra S, Mohapatra PC. Targeting nonhealing ulcers of lower extremity in human through autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Rejuvenation Res*. 2009 Oct;12(5):359-66. doi: 10.1089/rej.2009.0872. PMID: 19929258.
 46. Lu D, Chen B, Liang Z, Deng W, Jiang Y, Li S, Xu J, Wu Q, Zhang Z, Xie B, Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Apr;92(1):26-36. doi: 10.1016/j.diabres.2010.12.010. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21216483.
 47. Li XY, Zheng ZH, Li XY, Guo J, Zhang Y, Li H, Wang YW, Ren J, Wu ZB. Treatment of foot disease in patients with type 2 diabetes mellitus using human umbilical cord blood mesenchymal stem cells: response and correction of immunological anomalies. *Curr Pharm Des*. 2013;19(27):4893-9. doi: 10.2174/13816128113199990326. PMID: 23343120.
 48. Qin HL, Zhu XH, Zhang B, Zhou L, Wang WY. Clinical Evaluation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation After Angioplasty for Diabetic Foot. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2016 Sep;124(8):497-503. doi: 10.1055/s-0042-103684. Epub 2016 May 24. PMID: 27219884.
 49. Parham MJ, Grush AE, Ferry AM, Richardson BL, Buchanan EP. Stem Cell Treatment for Diabetic Foot Ulcers: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Adv Skin Wound Care*. 2023 May 1;36(5):1-6. doi: 10.1097/01.ASW.0000923320.13406.01. PMID: 36924415.
 50. Moon KC, Suh HS, Kim KB, Han SK, Young KW, Lee JW, Kim MH. Potential of Allogeneic Adipose-Derived Stem Cell-Hydrogel Complex for Treating Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes*. 2019 Apr;68(4):837-846. doi: 10.2337/db18-0699. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30679183.
 51. Hashemi SS, Mohammadi AA, Kabiri H, Hashempoor MR, Mahmoodi M, Amini M, Mehrabani D. The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial. *J Cosmet Dermatol*. 2019 Dec;18(6):1961-1967. doi: 10.1111/jocd.12931. Epub 2019 May 24. PMID: 31127705.
 52. Amini A, Chien S, Bayat M. Effectiveness of preconditioned adipose-derived mesenchymal stem cells with photobiomodulation for the treatment of diabetic foot ulcers: a systematic review. *Lasers Med Sci*. 2021 Oct 26. doi:10.1007/s10103-021-03451-6.
 53. Bailey AJM, Li H, Kirkham AM, Tieu A, Maganti HB, Shorr R, Fergusson DA, Lalu MM, Elomazzen H, Allan DS. MSC-Derived Extracellular Vesicles to Heal Diabetic Wounds: a Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Animal Studies. *Stem Cell Rev Rep*. 2022

- Mar;18(3):968-979. doi: 10.1007/s12015-021-10164-4. Epub 2021 Apr 24. PMID: 33893619; PMCID: PMC8064883.
54. Shu X, Shu S, Tang S, Yang L, Liu D, Li K, Dong Z, Ma Z, Zhu Z, Din J. Efficiency of stem cell based therapy in the treatment of diabetic foot ulcer: a meta-analysis. *Endocr J.* 2018 Apr 26;65(4):403-413. doi: 10.1507/endocrj.EJ17-0424. Epub 2018 Jan 22. PMID: 29353870.
 55. Lonardi R, Leone N, Gennai S, Trevisi Borsari G, Covic T, Silingardi R. Autologous micro-fragmented adipose tissue for the treatment of diabetic foot minor amputations: a randomized controlled single-center clinical trial (MiFrAADiF). *Stem Cell Res Ther.* 2019 Jul 29;10(1):223. doi: 10.1186/s13287-019-1328-4. PMID: 31358046; PMCID: PMC6664586.
 56. Amini A, Chien S, Bayat M. Potential of stem cells for treating infected Diabetic Foot Wounds and Ulcers: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 2022 Nov;49(11):10925-10934. doi: 10.1007/s11033-022-07721-6. Epub 2022 Aug 25. PMID: 36008608.
 57. Sun Y, Zhao J, Zhang L, Li Z, Lei S. Effectiveness and safety of stem cell therapy for diabetic foot: a meta-analysis update. *Stem Cell Res Ther.* 2022 Aug 13;13(1):416. doi: 10.1186/s13287-022-03110-9. PMID: 35964145; PMCID: PMC9375292
 58. Gupta PK, Chullikana A, Parakh R, Desai S, Das A, Gottipamula S, Krishnamurthy S, Anthony N, Pherwani A, Majumdar AS. A double blind randomized placebo controlled phase I/II study assessing the safety and efficacy of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cell in critical limb ischemia. *J Transl Med.* 2013 Jun 10;11:143. doi: 10.1186/1479-5876-11-143. PMID: 23758736; PMCID: PMC3688296.
 59. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, Saint-Lebesse B, Peyrafitte JA, Fleury S, Gadelorge M, Taurand M, Dupuis-Coronas S, Leobon B, Casteilla L. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy.* 2014 Feb;16(2):245-57. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.11.011. PMID: 24438903.
 60. Raghuram AC, Yu RP, Lo AY, Sung CJ, Bircan M, Thompson HJ, Wong AK. Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. *World J Stem Cells.* 2020 Jul 26;12(7):659-675. doi: 10.4252/wjsc.v12.i7.659. PMID: 32843920; PMCID: PMC7415243.
 61. Gentile P, Garcovich S. Systematic Review: Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells, Platelet-Rich Plasma and Biomaterials as New Regenerative Strategies in Chronic Skin Wounds and Soft Tissue Defects. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 3;22(4):1538. doi: 10.3390/ijms22041538. PMID: 33546464; PMCID: PMC7913648.
 62. Holm JS, Toyserkani NM, Sorensen JA. Adipose-derived stem cells for treatment of chronic ulcers: current status. *Stem Cell Res Ther.* 2018 May 15;9(1):142. doi: 10.1186/s13287-018-0887-0. PMID: 29764508; PMCID: PMC5952370.
 63. Zollino I, Campioni D, Sibilla MG, Tessari M, Malagoni AM, Zamboni P. A phase II randomized clinical trial for the treatment of recalcitrant chronic leg ulcers using centrifuged adipose tissue containing progenitor cells. *Cytotherapy.* 2019 Feb;21(2):200-211. doi: 10.1016/j.jcyt.2018.10.012. Epub 2018 Dec 22. PMID: 30583949.
 64. Amato B, Compagna R, Amato M, Butrico L, Fugetto F, Chibireva MD, Barbetta A, Cannistrà M, de Franciscis S, Serra R. The role of adult tissue-derived stem cells in chronic leg ulcers: a systematic review focused on tissue regeneration medicine. *Int Wound J.* 2016 Dec;13(6):1289-1298. doi: 10.1111/iwj.12499. Epub 2015 Sep 24. PMID: 26399452; PMCID: PMC7949523.
 65. Qiao Y, Zhang Q, Peng Y, Qiao X, Yan J, Wang B, Zhu Z, Li Z, Zhang Y. Efeito do tratamento com células-tronco em queimaduras: uma revisão sistêmica e uma meta-análise. *Int Wound J.* 2023 janeiro;20(1):8-17. doi: 10.1111/iwj.13831. Epub 2022, 13 de maio. PMID: 35560869; PMCID: PMC9797938.

66. Oryan A, Alemzadeh E, Alemzadeh E, Barghi M, Zarei M, Salehiniya H. Effectiveness of the adipose stem cells in burn wound healing: literature review. *Cell Tissue Bank*. 2022 Dec;23(4):615-626. doi: 10.1007/s10561-021-09961-5. Epub 2021 Sep 24. PMID: 34561790
67. Rangatchew F, Vester-Glowinski P, Rasmussen BS, Haastrup E, Munthe-Fog L, Talman ML, Bonde C, Drzewiecki KT, Fischer-Nielsen A, Holmgaard R. Mesenchymal stem cell therapy of acute thermal burns: A systematic review of the effect on inflammation and wound healing. *Burns*. 2021 Mar;47(2):270-294. doi: 10.1016/j.burns.2020.04.012. Epub 2020 May 15. PMID: 33218945.
68. Yi H, Wang Y, Yang Z, Xie Z. Efficacy assessment of mesenchymal stem cell transplantation for burn wounds in animals: a systematic review. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Aug 28;11(1):372. doi: 10.1186/s13287-020-01879-1. PMID: 32859266; PMCID: PMC7456061.
69. Ahmadi AR, Chicco M, Huang J, Qi L, Burdick J, Williams GM, Cameron AM, Sun Z. Stem cells in burn wound healing: A systematic review of the literature. *Burns*. 2019 Aug;45(5):1014-1023. doi: 10.1016/j.burns.2018.10.017. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30497816.
70. Henriksen JL, Sørensen NB, Fink T, Zachar V, Porsborg SR. Systematic Review of Stem-Cell-Based Therapy of Burn Wounds: Lessons Learned from Animal and Clinical Studies. *Cells*. 2020 Nov 26;9(12):2545. doi: 10.3390/cells9122545. PMID: 33256038; PMCID: PMC7761075.
71. Li Y, Xia WD, Van der Merwe L, Dai WT, Lin C. Efficacy of stem cell therapy for burn wounds: a systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jul 29;11(1):322. doi: 10.1186/s13287-020-01839-9. PMID: 32727568; PMCID: PMC7389817.
72. Bojanic C, To K, Hatoum A, Shea J, Seah KTM, Khan W, Malata CM. Mesenchymal stem cell therapy in hypertrophic and keloid scars. *Cell Tissue Res*. 2021 Mar;383(3):915-930. doi: 10.1007/s00441-020-03361-z. Epub 2021 Jan 2. PMID: 33386995; PMCID: PMC7960584.
73. Gentile P, Sterodimas A, Calabrese C, Garcovich S. Systematic review: Advances of fat tissue engineering as bioactive scaffold, bioactive material, and source for adipose-derived mesenchymal stem cells in wound and scar treatment. *Stem Cell Res Ther*. 2021 Jun 2;12(1):318. doi: 10.1186/s13287-021-02397-4. PMID: 34078470; PMCID: PMC8173738.
74. To K, Crowley C, Lim SK, Khan WS. Autologous adipose tissue grafting for the management of the painful scar. *Cytotherapy*. 2019 Nov;21(11):1151-1160. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.08.005. Epub 2019 Sep 17. PMID: 31540805.
75. Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez Á, Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria-de-la-Torre R, Martinez-Lopez A, Arias-Santiago S. Mesenchymal Stromal Cell-Conditioned Medium for Skin Diseases: A Systematic Review. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Jul 23;9:654210. doi: 10.3389/fcell.2021.654210. PMID: 34368115; PMCID: PMC8343397.
76. Dige A, Hougaard HT, Agnholt J, Pedersen BG, Tencerova M, Kassem M, Krogh K, Lundby L. Efficacy of Injection of Freshly Collected Autologous Adipose Tissue Into Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2019 Jun;156(8):2208-2216.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2019.02.005. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30772343.
77. Ezquerra S, Zuleta A, Arancibia R, Estay J, Aulestia F, Carrion F. Functional Properties of Human-Derived Mesenchymal Stem Cell Spheroids: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Stem Cells Int*. 2021 Mar 31;2021:8825332. doi: 10.1155/2021/8825332. PMID: 33884001; PMCID: PMC8041538.
78. Sukho P, Cohen A, Hesselink JW, Kirpensteijn J, Verseijden F, Bastiaansen-Jenniskens YM. Adipose Tissue-Derived Stem Cell Sheet Application for Tissue Healing In Vivo: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018 Feb;24(1):37-52. doi: 10.1089/ten.TEB.2017.0142. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28665192.

79. Kim J, Kim B, Kim S, Lee YI, Kim J, Lee JH. The effect of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell media containing serum on recovery after laser treatment: A double-blinded, randomized, split-face controlled study. *J Cosmet Dermatol*. 2020 Mar;19(3):651-656. doi: 10.1111/jocd.13063. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31328871.
80. Prakoeswa CRS, Natallya FR, Harni ndya D, Thohiroh A, Oktavianti RN, Pratiwi KD, Rubianti MA, Yogatri B, Primasari PI, Herwanto N, Alinda MD, Kusumaputra BH, Astari L, Listiawan MY, Agusni I, Rantam FA. The efficacy of topical human amniotic membrane-mesenchymal stem cell-conditioned medium (hAMMSC-CM) and a mixture of topical hAMMSC-CM+vitamin C and hAMMSC-CM+vitamin E on chronic plantar ulcers in leprosy:a randomized control trial. *J Dermatolog Treat*. 2018 Dec;29(8):835-840. doi: 10.1080/09546634.2018.1467541. Epub 2018 May 10. PMID: 29671368.
81. Lukomskyj AO, Rao N, Yan L, Pye JS, Li H, Wang B, Li JJ. Stem Cell-Based Tissue Engineering for the Treatment of Burn Wounds: A Systematic Review of Preclinical Studies. *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Aug;18(6):1926-1955. doi: 10.1007/s12015-022-10341-z. Epub 2022 Feb 12. PMID: 35150392; PMCID: PMC9391245.
82. Alapure BV, Lu Y, He M, Chu CC, Peng H, Muhale F, Brewerton YL, Bunnell B, Hong S. Accelerate Healing of Severe Burn Wounds by Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Seeded Biodegradable Hydrogel Scaffold Synthesized from Arginine-Based Poly(ester amide) and Chitosan. *Stem Cells Dev*. 2018 Dec 1;27(23):1605-1620. doi: 10.1089/scd.2018.0106. Epub 2018 Oct 23. PMID: 30215325; PMCID: PMC6276600.
83. Yoshimura TM, Cabral FV, Sellera FP, Pozzo L, Ribeiro MS. Could Light-Based Technologies Improve Stem Cell Therapy for Skin Wounds? A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Photochem Photobiol*. 2023 Mar;99(2):519-528. doi: 10.1111/php.13702. Epub 2022 Sep 3. PMID: 36004458.

7. ARTIGO

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo principal desta dissertação foi verificar a segurança e a eficácia do uso das células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões cutâneas em camundongos. A segurança foi constatada visto que não houveram eventos adversos em modelo animal e, portanto, as células mesenquimais produzidas no Centro de Processamento Celular Avançado do HCPA podem seguir sendo pesquisadas, por via cutânea, em humanos.

Quanto à eficácia, as células-tronco mesenquimais desempenharam um papel favorável na cicatrização das feridas através de mecanismos cientificamente comprovados e confirmados por este estudo. O lisado plaquetário continuará sendo estudado por também ter apresentado propriedades cicatriciais além de ter um custo mais acessível para a sua produção.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os potenciais cicatrizantes das células-tronco mesenquimais e do lisado plaquetário continuarão sendo explorados no tratamento de feridas. Uma série de pesquisas serão desenvolvidas sobre a temática do tratamento de feridas com propriedades regenerativas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Para tanto, este estudo integrará um dossiê que estará subsidiando a regulamentação deste produto celular junto à Anvisa visando os testes clínicos.

Ainda, de acordo com os resultados dos futuros estudos em humanos, poderá ser avaliado junto ao Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia do HCPA, o registro de propriedade industrial dos novos produtos que foram desenvolvidos para o tratamento de feridas cutâneas.

10. ANEXOS

A - Ficha do Controle Cirúrgico

Data da Excisão Cirúrgica (D0): _____

Grupo:

Identificação do Animal:

Protocolo anestésico: Isoflurano 2,5% em 0,5L de oxigênio 100% por máscara

Analgesia: Tramadol 20 mg.kg-1, por via intraperitoneal

Tricotomia: Ampla na região do dorso com tricômetro

Antissepsia: Solução de clorexidina alcoólica 2%

Lesão experimental excisional: demarcação de 6 mm de diâmetro (trépano corneal 6 mm)

Exame da ferida:

Sangramento: Ausente Pouco Moderado Intenso

Extensão da ferida: Comprimento (c): _____ cm x Largura (l): _____ cm = _____ cm²

Registro fotográfico

Observações:

ANEXO B - Ficha de Avaliação das Lesões e dos Animais

Data: _____ Data da Excisão cirúrgica: _____

Grupo:

Identificação do Animal:

Aplicação tratamento: ()D0 ()D3 ()D6 ()D9

Remoção curativo: ()D12 Observação: () D15 ()D21

Avaliação da ferida e do animal				
Curativo	() ausente	() cobre < 50%	() cobre > 50%	() íntegro
Odor	() ausente (-)	() pouco (+)	() moderado (++)	() intenso (+++)
Escoriação	() ausente (-)	() pouco (+)	() moderado (++)	() intenso (+++)
Infecção	() ausente (-)	() pouca (+)	() moderada (++)	() intensa (+++)
Dor*	() ausente (-)		() moderada (++)	() intensa (+++)
Outros:				
() Hiperemia	() ausente (-)	() pouca (+)	() moderada (++)	() intensa (+++)
() Edema	() ausente (-)	() pouco (+)	() moderado (++)	() intenso (+++)
() Hematoma	() ausente (-)	() pouco (+)	() moderado (++)	() intenso (+++)
() Crosta	() ausente (-)	() pouco (+)	() moderado (++)	() intenso (+++)
Outro evento?	Qual?			
Incapacidade?	() não () sim			
Óbito?	() não () sim			

* Segundo a NC3RS Mouse Grimace Escal

PUSH Scale											
Comprimento X Largura	0 0 cm ²	1 < 0.3 cm ²	2 0.3-0.6 cm ²	3 0.7-1.0 cm ²	4 1.1-2.0 cm ²	5 2.1-3.0 cm ²	6 3.1- 4.0 cm ²	7 4.1-8.0 cm	8 8.1-12.0 cm ²	9 12.1-24.0 cm ²	10 >24.0 cm ²
Quantidade Exsudato	0 Ausente	1 Pequena	2 Moderada	3 Grande							
Tipo de Tecido	0 Ferida Fechada	1 Tecido Epitelial	2 Tecido de Granulação	3 Esfacelo	4 Tecido Necrótico						

Extensão da ferida: Comprimento (c) : _____ cm x Largura (l): _____ cm = _____ cm²

Pontuação Total PUSH: _____ + _____ + _____ = _____

Número do Registro Fotográfico: _____

Obs:

ANEXO C - Ficha de Controle de Biópsia

Data: _____ **Data da Excisão cirúrgica:** _____ () D7 () D13 () D21

Grupo:

Identificação do Animal:

Anestesia: () Isoflurano 2,5% em 0,5L de oxigênio 100% por máscara

Remoção: () Área total da lesão: margem de 2 mm entre o tecido sadio e a borda da ferida

Conservação: () Fixação da excisão em formaldeído a 10%, incluídos em parafina

Registro fotográfico ()

Observações:

ANEXO D - Carta de Aprovação da CEUA/HCPA



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DIRETORIA DE PESQUISA

Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 2023/0051

Título: ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA PARA O USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM MODELO ANIMAL

Pesquisador Responsável: LUCIA MARIANO DA ROCHA SILLA

Equipe de Pesquisa:

ANELISE BERGMANN ARAÚJO	ANNELISE MARTINS PEZZI DA SILVA	TUANE NERISSA ALVES GARCEZ
ANA HELENA DA ROSA PAZ	LUCIANA DA ROSA ZINN SOSTIZZO	LAÍZA RIEF RUGGERI
RAUL MARQUES RODRIGUES	MARIANA RAUBACK AUBIN	

Data de Aprovação: 12/05/2023

Data de Término: 01/12/2023

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
CAMUNDONGO ISOGÊNICO	M8 Semana(s)	52	28/03/2023	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

ANEXO E - Pedido de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, Lúcia Mariano da Rocha Silla, pesquisador(a) responsável pela pesquisa intitulada “ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DE SEGURANÇA E EFICÁCIA PARA O USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NO TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS EM MODELO ANIMAL”, declaro que conheço e cumprirei as normas vigentes expressas na **Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 e suas complementares** do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Solicito a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelo fato do estudo utilizar material biológico humano que seria descartado.

O Lisado Plaquetário será produzido através do uso de bolsas descartadas de plaquetas humanas oriundas de doadores de banco de sangue devido ao prazo de validade vencido (três dias), após aprovação de testes sorológicos dos doadores para doenças infecciosas.

As Células-Tronco Mesenquimais são provenientes de filtros e bolsas de transplante de medula óssea que seriam descartadas e são recuperadas por lavagem da bolsa, plaqueadas em garrafas de cultura com meio DMEM enriquecido com lisado plaquetário passam por controle de qualidade e se aprovadas são liberadas para uso.

Assim, o presente estudo irá reaproveitar material biológico doado e não irá expor os doadores a nenhum procedimento adicional e nem utilizará informações dos mesmos na pesquisa.

Assumo mediante este Termo, o compromisso de, ao utilizar o material biológico humano, assegurar a confidencialidade e a privacidade dos dados de forma a proteger os doadores.

Dra Lúcia Mariano da Rocha Silla
Pesquisador responsável
CPF: 509.194.660-87

ANEXO F - Monitoramento Clínico e Pontos de Intervenção Humanitários

Modelo de cicatrização de feridas cutâneas

O protocolo deste estudo prevê procedimentos que podem causar morbidade em diferentes sistemas e necessitam de avaliação cuidadosa e específica.

PONTOS CRÍTICOS DO PROTOCOLO

INDUÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA DE 6MM ENTRE ESCÁPULAS: após recuperação anestésica e durante o desenvolvimento do protocolo os animais poderão, a critério do médico veterinário, receber terapias de suporte como fluido em caso de desidratação, analgésico em caso de dor prolongada, glicose e ração hipercalórica em caso de hiporexia e perda de peso. Animais que apresentarem automutilação ou sinais clínicos de infecção (local/ferida cirúrgica com secreção, inchaço, necrose) serão submetidos a eutanásia imediata.

Intercorrências cirúrgicas: hemorragia não controladas;

Intercorrências anestésicas: recuperação prolongada, hipotensão, hipotermia, choque;

Intercorrências temporais do modelo: hemorragias, sangramentos difusos, infecções, dor, automutilação;

ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS:

Intercorrências relacionadas à administração IP repetida (analgésico – tramadol): lesão de pele, peritonite, perfuração de vísceras, hemorragia, administração IV inadvertida;

Intercorrências relacionadas à morfina e ao tramadol: sedação, depressão respiratória, pica, náusea, hiporexia, perda de peso, hipomotilidade intestinal;

Intercorrências relacionadas à aplicação das células: não são esperadas porém poderão ocorrer reações alérgicas ou infecções locais.

PARÂMETROS A SER AVALIADOS E FREQUÊNCIA DE AVALIAÇÃO

Além da avaliação diária da saúde geral em relação a critérios definidos, os animais serão pesados no mesmo horário do dia a cada 3 dias ou em maior frequência (diariamente) caso os animais apresentem qualquer sinal de quebra de bem-estar ou a critério do médico veterinário. Estas avaliações serão utilizadas para orientar as decisões em relação aos animais que apresentarem prejuízos no bem-estar animal. Abaixo há uma breve descrição dos parâmetros a serem monitorados:

PONTOS DE INTERVENÇÃO HUMANITÁRIOS

Ver informações da tabela a seguir com relação aos pontos e condutas de intervenção e os pontos finais relacionados à eutanásia.

PROJETO		CAIXA			DATA																						
ANIMAL	A1	A2	A3	A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3		A1		A2		A3	
IDENTIFICAÇÃO				A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3	A1	A2	A3			
PESO BASAL																											
PESO CORPÓREO	0	PERDA ATÉ 5%		PESO																							
	1	PERDA 6-10%																									
	2	PERDA 11-15%		% PERDA																							
	3	PERDA >15%		ESCORE																							
GRIMACE OLHOS, ORELHAS, FORMATO FACE, VIBRISSAS	0	SEM ALTERAÇÕES																									
	1	ALTERAÇÕES DISCRETAS																									
	2	ALTERAÇÕES EVIDENTES																									
STATUS MENTAL	0	NORMAL, ALERTA E INTERATIVO																									
	1	MENOS ALERTA/INTERATIVO, LEVE/E DEPRIMIDO																									
	2	LETÁRGICO/DESINTERESSADO, VISÍVEL/E DEPRIMIDO																									
	3	MORIMBUNDO, NÃO RESPONSIVO A ESTÍMULOS																									
RESPIRAÇÃO	0	NORMAL																									
	1	DISCRETA ALTERAÇÃO NA FR																									
	2	MARCANTE ALTERAÇÃO NA FR																									
	3	RESPIRAÇÃO SUPERFICIAL OU LABORIOSA																									
MOBILIDADE	0	NORMAL																									
	1	LEVE CLAUDICAÇÃO, MENOS MÓVEL																									
	2	MODERADO DESEQUILÍBRIO, DECÚBITO ESTERNAL PREFERENCIAL, DEAMBULAÇÃO LABORIOSA																									
	3	NÃO SE MOVE OU SE MOVIMENTA POUCO, MESMO QUANDO ESTIMULADO																									
ATENÇÃO AO MEMBRO AFETADO OU À FERIDA CIRÚRGICA	0	NÃO APRESENTA ATENÇÃO À REGIÃO																									
	1	LAMBE AS EXTREMIDADES OU FERIDA CIRÚRGICA																									
	2	APRESENTA LESÕES POR MORDEDURA S/ EXPOSIÇÃO ÓSSEA, DEISCÊNCIA DE PONTOS S/ PREJUÍZOS ADICIONAIS																									
	3	APRESENTA LESÕES POR MORDEDURA C/ EXPOSIÇÃO ÓSSEA DEISCÊNCIA DE PONTOS C/ PREJUÍZOS ADICIONAIS																									
DESIDRATAÇÃO	0	SEM ALTERAÇÃO NO TURGOR DE PELE																									
	1	AUMENTO DISCRETO DO TURGOR DE PELE																									
	2	AUMENTO EVIDENTE DO TURGOR S/ ENOFTALMIA																									
	3	AUMENTO EVIDENTE DO TURGOR C/ ENOFTALMIA																									
OUTROS SINAIS	Hemorragias/sangramentos da ferida																										
	Infecção local ou sistêmica / peritonite																										
	Alergia local																										
INTERVENÇÃO	CONDUTAS = A – B – C – D																										
	EUTANÁSIA = EUT																										
FREQUÊNCIA DE AVALIAÇÃO	ESCORE > 0 EM 2 OU + CATEGORIAS AVALIAÇÃO DIÁRIA			INTERVENÇÃO	PERDA PESO > 6% (ESCORE = OU > 1): RAÇÃO HIPERCALÓRICA NO PISO (CONDUTA A) E/OU GLICOSE 5% NO BEBEDOURO (CONDUTA B); DESIDRATAÇÃO (ESCORE = OU > 2): GLICOSE 5% BEBEDOURO (CONDUTA B) E/OU FLUIDO SC/IP (CONDUTA C); SINAIS DOR / GRIMACE (ESCORE = 2): ANALGÉSICO (CONDUTA D)																						
	ESCORE > 1 EM QQ CATEGORIA NOTIFICAÇÃO VETERINÁRIA			EUTANÁSIA	ESCORE 3 EM QUALQUER CATEGORIA ESCORE DE 2 OU 3 APÓS 48 DE INTERVENÇÃO									HEMORRAGIAS, SANGRAMENTO NASAL RECORRENTE, MUCOSAS PÁLIDAS/ANEMIA, RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA PROLONGADA (>4 h)													

ANEXO G - Guideline ARRIVE 2.0 - pesquisa com animais: experimentos *in vivo*

Os itens descritos abaixo foram seguidos e aprovados pelo CEUA/HCPA antes do início do estudo.

Os 10 itens essenciais

Estes itens são o mínimo a ser incluído em um manuscrito. Sem estas informações, leitores e revisores não serão capazes de avaliar a confiabilidade dos resultados.

Desenho do Estudo	1	Para cada experimento, descreva detalhes resumidos do desenho do estudo: a. Os grupos comparados, incluindo o(s) grupo(s) controle. Se um grupo controle não foi usado, isto deve ser justificado. b. A unidade experimental (ex: um único animal, uma ninhada, ou uma gaiola de animais).
Tamanho da amostra	2	a. Especifique o número exato de unidades experimentais alocadas em cada grupo, e o número total em cada experimento. Indique também o número total de animais utilizados. b. Explique como o tamanho da amostra foi definido. Descreva os detalhes do cálculo amostral, caso ele tenha sido realizado.
Crítérios de inclusão e exclusão	3	a. Descreva quaisquer critérios utilizados para inclusão e exclusão de animais (ou unidades experimentais) durante o experimento, e de dados durante a análise. Especifique se estes critérios foram definidos a priori. Se nenhum critério foi definido, declare explicitamente. b. Para cada grupo experimental, relate quaisquer animais, unidades experimentais ou dados não incluídos na análise e explique por que foram excluídos. Caso não haja exclusões, declare explicitamente. c. Para cada análise, relate o valor exato do n em cada grupo experimental.
Randomização	4	a. Declare se foi utilizada randomização para alocar as unidades experimentais nos grupos controle e tratado. Caso tenha sido, descreva o método utilizado para gerar a sequência de randomização. b. Descreva a estratégia utilizada para minimizar potenciais variáveis de confusão, como a ordem dos tratamentos e medidas ou a localização dos animais/gaiolas no biotério. Se variáveis de confusão não foram controladas, declare explicitamente.
Cegamento	5	Descreva quem estava ciente da alocação das unidades experimentais nos grupos nos diferentes momentos do experimento (durante a alocação, condução do experimento, avaliação dos desfechos e análise de dados).
Desfechos	6	a. Defina claramente todos os desfechos avaliados (ex: morte celular, marcadores moleculares ou mudanças comportamentais). b. Para estudos que testam hipóteses, especifique o desfecho primário, ou seja, o desfecho utilizado para determinar o tamanho da amostra.
Métodos estatísticos	7	a. Descreva em detalhes os métodos estatísticos usados em cada análise, incluindo o software utilizado. b. Descreva quaisquer métodos usados para avaliar se os dados atendem às premissas da abordagem estatística, e o que foi feito caso elas não tenham sido atendidas.
Animais experimentais	8	a. Descreva detalhes apropriados à espécie sobre os animais utilizados, incluindo espécie, linhagem e sublinhagem, sexo, idade ou estágio de desenvolvimento e, caso seja relevante, peso. b. Descreva informações adicionais relevantes sobre a procedência dos animais, estado de saúde/ imunidade, modificações genéticas, genotipagem, e quaisquer procedimentos prévios.
Procedimentos experimentais	9	Para cada grupo experimental, incluindo controles, descreva os procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros os repitam, incluindo: a. O que foi feito, como foi feito e o que foi utilizado. b. Quando e com que frequência. c. Onde (incluindo detalhes de quaisquer períodos de aclimatação). d. Por quê (justifique os procedimentos).
Resultados	10	Para cada experimento conduzido, incluindo replicações independentes, relate: a. Estatísticas resumidas/descriptivas para cada grupo experimental, com uma medida de variabilidade quando aplicável (ex: média e desvio-padrão, ou mediana e amplitude). b. Se aplicável, o tamanho de efeito com um intervalo de confiança.

Os itens recomendáveis

Estes itens complementam os 10 essenciais e adicionam contexto relevante ao estudo. Relatar os itens nos dois conjuntos representa a prática ideal.

Resumo	11	Inclua um resumo preciso dos objetivos da pesquisa, espécie animal utilizada, linhagem/raça e sexo, métodos e resultados principais e conclusões do estudo.
Embasamento científico	12	a. Inclua embasamento científico suficiente para compreender a justificativa e o contexto do estudo, e explique a abordagem experimental. b. Explique como a espécie e modelo animal utilizados atendem aos objetivos científicos e, quando aplicável, sua relevância para a biologia humana.
Objetivos	13	Descreva claramente a pergunta e objetivos da pesquisa e, quando apropriado, a(s) hipótese(s) específica(s) sendo testada(s).
Declaração ética	14	Inclua o nome do Comitê de Ética para Uso de Animais ou equivalente que aprovou o uso de animais neste estudo, e quaisquer números de licença ou protocolo (caso aplicável). Caso a aprovação ética não tenha sido solicitada ou concedida, justifique.
Alojamento e manejo	15	Descreva detalhes das condições de alojamento e criação, incluindo qualquer enriquecimento ambiental.
Cuidados com animais e monitoramento	16	a. Descreva quaisquer intervenções ou cuidados tomados nos protocolos experimentais para minimizar dor, sofrimento e angústia. b. Relate qualquer evento adverso esperado ou inesperado. c. Descreva os critérios de ponto final humanitário estabelecidos para o estudo, os sinais monitorados e a frequência de monitoramento. Caso não tenha havido critérios de ponto final humanitário, declare explicitamente.
Interpretação / Implicações científicas	17	a. Interprete os resultados, levando em conta os objetivos e hipóteses do estudo, teorias atuais e outros estudos relevantes na literatura. b. Comente as limitações do estudo, incluindo fontes potenciais de viés, limitações do modelo animal e imprecisões associadas aos resultados.
Aplicabilidade / tradução	18	Comente sobre a probabilidade dos achados deste estudo serem generalizáveis para outras espécies ou condições experimentais, incluindo qualquer relevância para a biologia humana (quando apropriado).
Registro do Protocolo	19	Faça uma declaração indicando se um protocolo (incluindo a pergunta do estudo, principais pontos do desenho experimental e plano de análise) foi preparado antes do estudo e, caso tenha sido, onde foi registrado.
Acesso aos dados	20	Apresente uma declaração descrevendo se e onde os dados do estudo estão disponíveis.
Declaração de interesses	21	a. Declare quaisquer potenciais conflitos de interesse, sejam eles financeiros ou não. Caso não exista nenhum, isso deve ser declarado. b. Liste todas as fontes de financiamento (incluindo o identificador da verba) e o papel do(s) financiador(es) no desenho, análise e relato do estudo.

Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. Originalmente publicado na *PLOS Biology*, Julho de 2020.



