

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E ELETROACUPUNTURA NA
CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS

WANESSA KRÜGER BEHEREGARAY GIANOTTI

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E ELETROACUPUNTURA NA
CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS

Autor: Wanessa Krüger Beheregaray Gianotti

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de mestre
em Ciências Veterinárias na área de Cirurgia de Pequenos animais

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Co-orientador: Prof^a. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima

Porto Alegre

2011

Wanessa Krüger Beheregaray Gianotti

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E ELETROACUPUNTURA NA
CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS

Aprovada em 09 de Fevereiro de 2011

Emerson Antonio Contesini
Orientador e Presidente da Comissão

Melissa Camassola
Membro da Comissão

Alceu Gaspar Raiser
Membro da Comissão

Carlos Afonso de Castro Beck
Membro da Comissão

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E ELETROACUPUNTURA NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS EM COELHOS

Autor: Wanessa Krüger Beheregaray Gianotti

Orientador: Emerson Antonio Contesini

RESUMO

Durante as duas últimas décadas, têm ocorrido progressos substanciais a respeito do entendimento da fisiopatologia da cicatrização de feridas, e novas terapias tem sido desenvolvidas. Contudo, acelerar o processo de reparo continua sendo um desafio no campo da cirurgia plástica reconstrutiva. Tratamentos inovadores para melhorar a cicatrização e a regeneração cutânea são necessários e é nesse âmbito que as pesquisas com as células-troncos mesenquimais (MSCs) vêm ganhando espaço na última década. As MSCs foram estudadas em diversas áreas no que diz respeito ao seu efeito sobre a cicatrização de lesões e suas aplicações clínicas. Relatos apontam que tanto as MSCs originárias da medula óssea influenciam benéficamente a cicatrização de feridas, quanto originárias do tecido adiposo (ADSCs). A vantagem das ADSCs está na facilidade de serem coletadas, baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento de MSCs por coleta. Estudos demonstram que a eletroacupuntura (passagem de eletricidade através de agulhas de acupuntura inseridas na pele) pode exercer efeito cicatrizante em feridas cutâneas experimentalmente induzidas por meio do aumento da proliferação e da migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo envolvidos no reparo de feridas. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia com ADSCs no processo da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos induzidas experimentalmente. Além disso, avaliar se a eletroacupuntura (EA) é capaz de causar efeito sobre a terapia com ADSCs no reparo de lesões cutâneas experimentais. Para tanto, foram utilizados 32 coelhos divididos em quatro grupos: GCTAD (ADSCs), GCTADE (ADSCs associado a EA), GE (EA) e GC (controle) o período de avaliação das lesões foi de 15 dias. As feridas induzidas cirurgicamente foram avaliadas por observações clínicas e análises histológicas. Os animais do GCTAD apresentaram uma velocidade cicatricial superior aos demais grupos até a quinta avaliação. Já na sétima avaliação o GE passa a ter a melhor taxa de contração cicatricial superando o GCTAD ($p=0,039$) e o GC ($p=0,05$). O GCTAD apresentou as maiores médias nas variáveis histológicas: proliferação vascular ($p=0,059$), proliferação fibroblástica ($p=0,05$) e Ki67. Nas variáveis reepitelização e colagenização as médias foram maiores que a dos outros grupos, mas semelhantes ao GE e a presença de queratina, da mesma forma, semelhante ao GCTADE. O GCTADE se destaca pela presença de folículos pilosos ($p=0,026$) e pelas maiores médias encontradas para as células mononucleares e polimorfonucleares, mas esses valores não configuram diferença estatística significativa. Por meio desse experimento, demonstrou-se que o GCTAD melhora a cicatrização de feridas, acelerando a fase proliferativa do processo cicatricial. A associação dos tratamentos EA e ADSCs só foi considerada superior aos outros tratamentos na avaliação da presença de folículos pilosos. Talvez, o benefício dessa associação seja mais evidente se o estudo for feito por um período superior aos 15 dias, ou seja, durante a fase de remodelamento da cicatrização, onde pode ser que se verifique um aspecto cosmético mais favorável da cicatriz.

Palavras-chaves: célula-tronco mesenquimal, eletroacupuntura, cicatrização de feridas cutâneas, coelhos.

MESENCHYMAL STEM CELLS AND ELECTROACUPUNCTURE AT EXPERIMENTAL WOUND HEALING IN RABBITS

Author: Wanessa Krüger Beheregaray Gianotti

Adviser: Emerson Antonio Contesini

ABSTRACT

The pathophysiology understanding of wound healing has been substantial progress during the last two decades, and new therapies have been developed. However, to accelerate the repair process remains a challenge in the field of reconstructive plastic surgery. Innovative treatments to enhance wound healing and cutaneous regeneration are necessary and in this context the research with mesenchymal stem cells (MSCs) are getting space in the last decade. MSCs have been studied in several areas with regard to its effect on the healing of lesions and their clinical applications. Reports indicate that both MSCs from bone marrow beneficially influence wound healing, as originating from adipose tissue (ADSCs). The advantage of ADSCs is because they can be easily collected, with low rates of morbidity and the high yield of MSCs per collection. Studies show that electro acupuncture (passing electricity through the acupuncture needles inserted into the skin) can have a healing effect on experimentally induced skin wounds by increasing the proliferation and migration of epithelial cells and connective tissue involved in wound repair. Thus, this study aims to evaluate the effect of therapy with ADSCs in the process of skin wound healing in rabbits that were experimentally induced. Moreover, to evaluate whether electro acupuncture (EA) is capable to causing effect on ADSCs therapy in the repair of experimental skin lesions. Therefore, it was used 32 rabbits divided into four groups: GCTAD (ADSCs), GCTADE (ADSCs associated with EA), GE (EA) and CG (control) the evaluation period of the lesions was 15 days. The surgically induced wounds were evaluated by clinical observations and histological analysis. The GCTAD animals showed an accelerated wound healing than the other groups until the fifth assessment. In the seventh evaluation GE replaced by the best healing rate than GCTAD ($p = 0.039$) and CG ($p = 0.05$). The GCTAD had the highest averages in the histological variables: vascular proliferation ($p = 0.059$), fibroblast proliferation ($p = 0.05$) and Ki67. Reepithelialization and collagen variables the averages were higher than other groups, but similar to GE and the presence of keratin, the same way, similar to GCTADE. The GCTADE stands by the presence of hair follicles ($p = 0.026$) and by the major averages found for the mononuclear and polymorph nuclear cells, but these values are not statistically significant. Through this experiment, we show that the GCTAD improves wound healing by accelerating the proliferation phase of healing. The combination of EA and ADSCs treatments were not considered superior to other treatments in assessing the presence of hair follicles. Perhaps the benefit of this association is more evident if the study is done for a period exceeding 15 days, during the remodeling phase of healing, it could be ascertained a more favorable cosmetic appearance of the scar.

Key words: mesenchymal stem cells, eletroacupuncture, wound healing, rabbits.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO	8
2.1 Objetivos Gerais.....	8
2.2 Objetivos Específicos.....	8
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
3.1 Cicatrização.....	9
3.2 Células-tronco.....	12
3.3 Eletroacupuntura.....	16
4. RESULTADOS.....	19
4.1 Células-Tronco Mesenquimais e Eletroacupuntura na Cicatrização de Lesões Cutâneas Experimentais em Coelhos.....	20
4.1.1 Resumo.....	20
4.1.2 Abstract.....	20
4.1.3 Introdução.....	21
4.1.4 Materiais e Métodos.....	23
4.1.5 Resultados.....	28
4.1.6 Discussão.....	35
4.1.7 Conclusão.....	38
4.1.8 Referências	39
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	41
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Um ferimento é uma interrupção da integridade anatômica, fisiológica e funcional dos tecidos do corpo. A perda da integridade da pele pode resultar em um desequilíbrio fisiológico substancial e, finalmente, na incapacidade ou mesmo em morte (AMALSADVALA & SWAIN, 2006). A cicatrização começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restaura um tecido ferido (HEDLUND, 2007). A possibilidade de acelerar a cicatrização e o fechamento de lesões cutâneas com recursos químico-medicamentosos ou físicos, tem sido objeto de investigação de muitos pesquisadores (BEHEREGARAY et al., 2009)

As células-tronco são células indiferenciadas e têm capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos. Ainda, possuem capacidade de dar origem a diversos tipos de tecidos especializados. Desta forma, acredita-se que as células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo, quando estes sofrem uma lesão (SOUZA et al., 2003; OKAMOTO, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; BLOW, 2008).

Assim, por meio de vários trabalhos que vem sendo desenvolvidos ligados à área da medicina regenerativa por intermédio da aplicação de terapia celular com células-tronco mesenquimais (MSCs), pretende-se compreender melhor os mecanismos que influenciam a regeneração tecidual e para que tão logo se supere esta fase de experimentação, sejam disponibilizadas estas inovações da medicina em larga escala nos hospitais (BYDLOWSKI et al., 2009).

Estudos demonstram que a eletroacupuntura (passagem de eletricidade através de agulhas de acupuntura inseridas na pele) pode exercer efeito cicatrizante em feridas cutâneas experimentalmente induzidas; é ainda relatado nessas pesquisas que os animais tratados com eletroacupuntura apresentaram cicatrização completa, acelerada, sem contaminação e com tensão superior àquela dos animais controle (ABOLAFIA et al., 1985; SUMANO et al., 2001; BEHEREGARAY et al., 2009).

O modo com que a estimulação elétrica age para favorecer uma cicatrização mais rápida ou mais efetiva de feridas superficiais não está claro. Existem, porém,

evidencias de que a proliferação e a migração de células epiteliais e de tecido conjuntivo envolvidos no reparo de feridas podem ser aumentadas por um campo elétrico (LOW, 2001; ROBINSON, 2001).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da terapia com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) no processo da cicatrização de feridas cutâneas induzidas em coelhos. Além disso, avaliar a ação do tratamento com eletroacupuntura (EA) associada à terapia com ADSCs no reparo de lesões cutâneas experimentais.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o protocolo de indução de lesões circulares por meio da utilização de *punch*.
- Avaliar e comparar a evolução cicatricial a cada dois dias por um período de 15 dias por meio da taxa de contração cicatricial dos grupos tratados com ADSCs, EA e a associação desses dois.
- Observar se há diferença entre os grupos tratados com auxílio de avaliações clínicas, em que se verifique: presença de tecido necrótico; granulação; sinais de infecção; presença de exsudato; dor; hiperemia; hiperpigmentação; edema; cianose; e crosta.
- Avaliar o efeito dos tratamentos por meio do exame microscópico realizado a partir da coleta de material para análise histológica do tecido cicatricial utilizando as colorações de Hematoxilina Eosina, Tricrômio de Masson nos dias 8 e 15.
- Avaliar a proliferação celular na região de cicatriz dos diferentes grupos de tratamento por meio da expressão do anti-Ki-67 realizado por imunohistoquímica.
- Avaliar a viabilidade de utilização de coelhos como modelo experimental para a aplicação da técnica de EA e a aplicação de ADSCs.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cicatrização de ferimentos começa imediatamente após uma lesão ou incisão e corresponde a uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restaura um tecido ferido (HEDLUND, 2007). Ela é dinâmica (HEDLUND, 2007) e, por isso, poderá ser necessário proceder modificações durante as diferentes fases. O entendimento desse processo é essencial para uma abordagem ponderada ao tratamento das feridas (LIPTAK, 1997; PAVLETIC, 2010).

3.1 Cicatrização

A cicatrização pode ser dividida em fases baseadas nas características microscópicas apresentadas, sendo estas iniciadas, mediadas e sustentadas por eventos bioquímicos complexos que têm como mediadores citocinas e fatores de crescimento. O reconhecimento destas fases, com base nas características macroscópicas, permite ao clínico fazer uma associação entre os eventos microscópicos e bioquímicos; o conhecimento desses eventos direciona ao manejo apropriado da ferida (HOSGOOD, 2006).

A cicatrização, para ser melhor compreendida, pode ser dividida em três fases que se sobrepõem: inflamatória; proliferativa (ou fase de reparo); e de maturação (ou fase de remodelamento). A fase inflamatória é iniciada logo após a lesão e as fases subsequentes são dependentes de cada fase anterior (LIPTAK, 1997; DYSON, 1997; PAVLETIC, 2010; SCHREMI et al., 2010).

Na *fase inflamatória* (de 0 a 3 dias) ocorre a vasoconstrição reflexa e oclusão de pequenos vasos, com acúmulo plaquetário e deposição de coágulos de fibrina. Essa vasoconstrição tem duração de 5 a 10 minutos e é seguida por uma vasodilatação que permite a passagem de células e fluido através das paredes dos vasos sanguíneos para o espaço extravascular, diluindo substâncias tóxicas e favorecendo a diapedese leucocitária (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010). A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea produzem um coágulo que sela os vasos rompidos e impede o extravasamento sanguíneo adicional (DYSON, 1997). O coágulo, formado por plaquetas, fibrina, eritrócitos e leucócitos, também é responsável por estabilizar as bordas da ferida e fornecer a ela uma resistência mínima (HOSGOOD, 2006).

Os neutrófilos possuem vida curta, fagocitam microorganismos e após, degeneram e morrem. Dessa forma, liberam enzimas que auxiliam monócitos a retirar

os restos necróticos do local. As plaquetas são as primeiras células reparadoras a aparecerem em uma ferida, e elas produzem alguns dos fatores de crescimento que cumprem um importante papel na fase reparadora da cicatrização “epidermal growth factor” (EGF), fator plaquetário IV, “insulin-like growth factor-1” (IGF-1), “transforming growth factor-beta” (TGF- β) (SWAIM, 1997). Os monócitos são essenciais à cicatrização. Privada de outros elementos celulares, a feridas continuam cicatrizando; contudo, se privar dos monócitos e suas funções, as feridas não cicatrizam (SWAIM, 1997; BALBINO et al., 2005). Os monócitos atraem fibroblastos para a ferida, estimulando estes para a maturação de síntese de colágeno e tornam-se macrófagos quando ingressam na ferida, fagocitando tecidos e fragmentos mortos (RAISER, 1995b; ANDERSON, 1996; PAVLETIC, 2010). Quando se tornam macrófagos, sintetizam e liberam proteases debridantes que retiram coágulos de fibrina e colágeno, restos e fragmentos de células mortas. Liberam fatores de crescimento de células endoteliais que atraem mais fibroblastos para a ferida. A chegada dos linfócitos coincide com a chegada dos macrófagos, e existe uma interação entre eles. A duração desta fase depende da quantidade de fragmentos e infecção, sendo então importante o debridamento cirúrgico, hemostasia e drenagem da lesão. Quanto mais infectada e mais restos de tecidos mortos restarem na ferida, mais tempo durarão as fases inflamatória e de debridamento, levando a um retardo no processo cicatricial (ANDERSON, 1997; SWAIM, 1997).

A fase de proliferação (ou fibroblástica ou de reparo de 3 a 14 dias) é composta pelos seguintes processos: proliferação fibroblástica, infiltração capilar, e proliferação e migração epitelial. Os dois primeiros processos se apresentam na forma de tecido de granulação (SWAIM, 1997; BALBINO et al., 2005). Os fibroblastos migram para dentro da ferida oriundos de bordas de pele adjacentes (ANDERSON, 1996). Após a remoção de coágulos e tecidos mortos, por volta do terceiro ou quinto dia começam a proliferar os fibroblastos e angioblastos, migrando por meio de filamentos de fibrina (RAISER, 1995a). Logo após, os fibroblastos iniciam a deposição de fibrilas de colágeno (quatro a cinco dias pós-lesão), em associação com aumento na resistência elástica da ferida (RAISER, 1995a; ANDERSON, 1996; PAVLETIC, 2010). Esta deposição é dependente de uma boa oxigenação do local e boa nutrição (ANDERSON, 1996).

Em feridas suturadas, células epiteliais podem cobrir a ferida em 12 a 24 horas. Já em feridas abertas com espessura total, um leito de granulação deve formar-se antes da epitelização; sendo assim, ocorre um intervalo de quatro a cinco dias (PAVLETIC, 2010).

Os fatores mais importantes que influenciam a epitelização são os fatores de crescimento de macrófagos e plaquetas. Fatores de crescimento epidermal também são importantes para proliferação fibroblástica e de tecido de granulação. O excesso de lactato, sintetizado por macrófagos, também estimula a deposição de colágeno. Células endoteliais seguem os fibroblastos migrando para dentro da ferida. Estes “botões” capilares são responsáveis pelo brilho vermelho no tecido de granulação saudável (SWAIN, 1997; PAVLETIC, 2010).

A migração epitelial é guiada pelas fibras de colágeno (HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010). O teor de água no leito da ferida aparentemente facilita a migração epitelial, pois feridas com tecidos adequadamente úmidos curam mais rapidamente do que feridas ressecadas (HANKS & SPODNICK, 2005). As glicoproteínas hidrossolúveis (calônio) encontradas na epiderme, que normalmente atua na inibição da mitose epitelial nos tecidos normais, se encontram diminuídas em ferimentos, permitindo a multiplicação das células epiteliais presentes ao redor da ferida e sua migração para o tecido de granulação adjacente. Enquanto as células epiteliais se deslocam, há a liberação de colagenase para facilitar sua migração abaixo da crosta, que será posteriormente separada da superfície da ferida devido à ação desta enzima. O contato entre as células epiteliais em todos os lados resulta na inibição de uma migração celular adicional (inibição por contato) (HOSGOOD, 2006; HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

A *fase de maturação* ou *remodelação* (14 dias a um ano) é a fase final da cicatrização para uma ferida e corresponde a remodelação e restauração da estrutura normal de tecidos (ANDERSON, 1996). A transição da matriz extracelular em cicatriz requer o remodelamento do tecido conjuntivo presente na lesão (HOSGOOD, 2006). Ocorre então o remodelamento do colágeno, com um equilíbrio entre a deposição e o catabolismo deste, e a substituição do colágeno tipo III, que gradualmente se reduz, pelo colágeno tipo I, que aumenta. Enzimas colagenase específicas (metaloproteinases) produzidas pelos macrófagos, fibroblastos e células epidérmicas degradam os colágenos

tipos I, II, III, X e XIII e as fibras de colágeno não-funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida (PAVLETIC, 2010). Durante esta fase, a quantidade de fibronectina e ácido hialurônico da matriz extracelular são reduzidos e a quantidade de proteoglicanos se eleva. Os proteoglicanos são responsáveis pelo aumento na elasticidade da ferida (DYSON, 1997).

Segundo Hosgood (2006) e Pavletic (2010), nas três semanas iniciais após a lesão a cicatriz apresenta 20 % da sua força final; nas semanas seguintes, este ganho na resistência à tração ocorre em uma velocidade muito mais lenta e a cicatriz alcançará somente 70-80 % da resistência à tração da pele normal. Esta resistência está associada principalmente ao remodelamento do colágeno, resultando em grandes feixes deste e ligações intermoleculares com as fibras de colágeno adjacentes.

Conforme a maturação da ferida progride, a densa rede de capilares do tecido de granulação saudável declina, assim como sua celularidade, devido a apoptose das células. O resultado é a substituição do tecido de granulação pelo tecido cicatricial, concluindo o reparo da lesão. Em feridas crônicas, há o desenvolvimento de uma matriz fibrosa marcada pela deposição de colágeno e uma decadência na quantidade de capilares (DYSON, 1997; HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010).

3.2 Células-tronco

O termo célula-tronco diz respeito às células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e autorrenovação ilimitadas, e que dão origem a uma ampla variedade de tipos teciduais. Sendo designadas segundo sua potencialidade como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Podem ser classificadas ainda em embrionária, fetal e adulta (SOUZA et al., 2003; OKAMOTO, 2004; CIRNE-LIMA, 2007; BLOW, 2008).

As células-tronco totipotentes correspondem às células do embrião recém-formado. Elas podem dar origem tanto a um organismo totalmente funcional, como a qualquer tipo celular do corpo e têm potencial para originar até mesmo células do folheto extraembrionário que formarão a placenta (SOUZA et al., 2003; SCHWINDT et al., 2005; BLOW, 2008; COSTELLO, 2008).

Células-tronco pluripotentes são capazes de originar praticamente todos os tipos de tecido, sem gerar um indivíduo completo, haja vista que não podem formar os anexos embrionários. Compõem a massa celular interna do blastocisto, e participam da formação de todos os tecidos do organismo (CIRNE-LIMA, 2007; RIVEROS, 2007; BLOW, 2008).

As células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presente no indivíduo adulto e com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos celulares (CIRNE-LIMA, 2007). Entretanto, com o avanço das pesquisas, tem se questionado a existência desta categoria, uma vez que células antes consideradas multipotentes, a exemplo das neurais, têm se revelado pluripotentes (RIVEROS, 2007; BLOW, 2008).

Na manutenção e expansão das células-tronco fetais e adultas o cultivo não é permanente; elas tendem ou a se diferenciar em linhagens específicas, que dependem do tipo de origem, ou a morrer depois de alguns repiques (CURY, 2005; NARDI, 2007). Estas, pelo fato de serem mais comprometidas com determinadas linhagens celulares, requerem mecanismos de sinalização celular para que ocorra a sua diferenciação em outro tipo de tecido não relacionado à sua origem (CURY, 2005; YOSHIMOTO, 2005). Porém, alguns tipos de células-tronco adultas, como as mesenquimais, podem ser conservados em cultura durante longo tempo mantendo sua característica indiferenciada (CURY, 2005; BITTENCOURT et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006; NARDI, 2007).

As células-tronco mesenquimais (MSCs) correspondem a aproximadamente <0,05 % de todas as células presentes na medula, apresentam pluripotencialidade para células derivadas do mesoderma: células contráteis, células endoteliais, condrócitos (OKAMOTO, 2004; CARVALHO et al., 2005; CHEN, 2008). Estas células foram descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores em 1974; eles descobriram que as MSCs aderem a placas de cultura, assemelham-se a fibroblastos “*in vitro*”, e formam colônias após um determinado período de cultivo (DIETRICH, 2004; BITTENCOURT et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006). Todas as células terminalmente diferenciadas morrem; as aderentes que sobrevivem são, por definição, as células-tronco mesenquimais (HORWITZ, et al., 2005; SCHWINDT et al., 2005; NARDI & MEIRELLES, 2006). *In vitro*, essas células crescem aderidas à superfície do

frasco de cultura, possuem capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos e expressam imunofenótipos positivos para CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR (DIETRICH, 2004; OKAMOTO, 2004; BITTENCOURT, et al., 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006; CHEN, 2008).

Uma fonte alternativa de células é o lipoaspirado, a partir do qual é isolada uma fração que contém as células-tronco adiposo-derivadas (ADSCs), que também são classificadas como MSCs e tem se mostrado muito eficiente em vários tipos de terapias incluindo o tratamento de lesões de pele e outras cirurgias plásticas (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; NARDI, 2007; RIGOTTI et al., 2007; SÁNDOR & SUURONE, 2008). O tecido adiposo encontra vantagens incontestáveis como fonte de MSCs indiferenciadas por causa de sua fácil aquisição (por meio de lipoaspiração ou lipectomia), baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento (TORRES et al., 2007, NAMBU et al., 2009). Pela colheita de tecido adiposo pode-se obter 2 a 3×10^8 células-tronco por 300 ml de material aspirado (ZUK et al., 2001), quando comparado com a medula óssea, que pode produzir uma células-tronco por 10^5 células estromais (TORRES et al., 2007).

As ADSCs e BMSCs foram estudadas em diversas áreas no que diz respeito ao efeito sobre a cicatrização de lesões e suas aplicações clínicas (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; NARDI, 2007; RIGOTTI et al., 2007; SÁNDOR & SUURONE, 2008). Wu et al. (2007) relataram que as BMSCs influenciam benéficamente a cicatrização de feridas, enquanto Lim & Yoo (2010) relataram que ADSCs também podem promover a cicatrização da ferida.

Riggotti et al. (2007) utilizaram células-tronco retiradas de lipoaspirados para tratamento de feridas causadas por efeito secundário ao tratamento radioterápico em mulheres após a realização de mastectomia obtendo um bom resultado na cicatrização.

Badiavas & Falanga (2003) aplicaram MSCs em três pacientes que possuíam feridas crônicas, há mais de um ano, em que os tratamentos convencionais não haviam se mostrado eficientes. Eles observaram a cicatrização completa das feridas após o tratamento com células-tronco.

Mc Farlin et al. (2006) utilizaram MSCs para cicatrização de feridas cutâneas criadas experimentalmente e observaram aumento da resistência da cicatriz devido ao

aumento da produção de colágeno, mais rápida maturação histológica quando comparada ao grupo controle. Os autores testaram a aplicação de células tanto no local da ferida como por via hematológica, o que também apresentou resultados semelhantes.

Existem pelos menos duas possibilidades pelas quais as MSCs possam promover a cicatrização. Primeira, elas têm a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Pode ser que após a migração para a ferida, elas se ativem ao encontrar o meio repleto de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das MSCs poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no microambiente da ferida secretando fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a enorme plasticidade e habilidade que essas células têm em se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos. Portanto, as MSCs facilitariam a cicatrização de feridas pela trans-diferenciação em mioblastos e queratinócitos depois de migrar para a lesão (Mc FARLIN et al., 2006; SASAKI et al., 2008). De maneira semelhante, a hipótese defendida por Wu et al. (2007) para a ação das MSCs na cicatrização de feridas é que ela ocorra por meio da diferenciação e da liberação de fatores pró-angiogênicos.

Para se entender melhor o mecanismo de ação das MSCs transplantadas no auxílio da cicatrização é necessário se lançar mão de mecanismos para monitorar as células *in vivo*. Atualmente, os métodos incluem a marcação celular com nanopartículas ultramagnéticas, marcadores radioativos, marcador orgânico carregado pela célula, ou proteínas fluorescentes expressas por estas. No entanto, degradações químicas e metabólicas ocorrem, o que reduz a estabilidade desses marcadores, comprometendo a identificação e o monitoramento celular (MULLER-BORER, 2007). Alternativas como o marcador dos cromossomos X e Y, em que se usam as MSCs provenientes de machos para o tratamento em fêmeas, torna-se uma ferramenta eficiente e capaz de localizar as células transplantadas (WU et al., 2007).

Muitos pesquisadores têm feito estudos comparando os transplantes homólogos e autólogos de MSCs e não encontram diferenças terapêuticas significativas; além disso, não se observa rejeição (PLANKA et al., 2008; CHEN et al., 2009). Isso se deve ao fato de as MSCs apresentarem baixa imunogenicidade (LIU et al., 2006).

3.3 Eletroacupuntura

A eletroacupuntura é a passagem de eletricidade através de pontos de acupuntura. Essa técnica foi usada pela primeira vez na China, na década de 1930 e tornou-se popular na década de 1970 sendo, atualmente, usada para tratar dor e transtornos físicos e para induzir analgesia em procedimentos cirúrgicos (SCHOEN, 2006; XIE & PREAST, 2010).

A eletroestimulação pode produzir um nível mais elevado e mais contínuo de estimulação do que o produzido pela estimulação manual das agulhas. As alterações fisiológicas produzidas incluem mudanças transitórias dos níveis de leucócitos, respostas imunológicas e atividade fagocitária, alterações cardiovasculares, aumento significativo de amônia cerebral e efeitos analgésicos. Outros efeitos incluem vasodilatação, eletrotonus, eletroforese, ionização do tecido e mudanças no pH do tecido (SCHOEN, 2006; XIE & PREAST, 2010).

Nos últimos anos, estudos controlados em humanos e animais têm produzido evidências de que correntes elétricas de baixa intensidade levam a uma cicatrização acelerada (LOW, 2001). O modo pelo qual a estimulação elétrica age para proporcionar uma cicatrização mais rápida ou mais efetiva de feridas superficiais não está claro. Existem, porém, evidências de que a proliferação e a migração de células epiteliais e de tecido conjuntivo envolvidos no reparo de feridas possam ser aumentadas por um campo elétrico (LOW, 2001; ROBINSON, 2001).

As contraindicações da eletroacupuntura são: arritmias cardíacas, epilepsia, choque, febre, fraqueza, hipotensão e gravidez (SCHOEN, 2006). Casaubon et al. (1991) observaram em seu estudo que os grupos que receberam eletroestimulação aumentaram o processo inflamatório agudo inicial. Provavelmente, isso acelerou o processo de eliminação de fragmentos celulares e bacterianos que deixaram de liberar mediadores químicos responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos, que, juntamente com macrófagos e leucócitos, são os responsáveis pela fagocitose. Com isso, comprovaram uma passagem mais rápida pela fase inflamatória do processo de cicatrização.

Abolafia et al. (1985) demonstraram que a eletroacupuntura pode exercer efeito cicatrizante em feridas experimentalmente induzidas na pele de ratos. Animais tratados com eletroacupuntura apresentaram uma cicatrização completa, sem contaminação e com tensão superior àquela dos animais controle. Nesse experimento, o grupo controle,

que recebeu tratamento com antissépticos, apresentou contaminação da ferida experimental.

Sumano et al. (2001) encontraram durante o tratamento de todas as feridas com estímulo elétrico um claro aumento na vermelhidão devido ao aumento da irrigação sanguínea (um sinal previamente observados em animais experimentais).

Beheregaray et al. (2009) relataram um caso de tratamento utilizando eletroacupuntura na cicatrização de uma ferida de uma gata causada por deiscência de sutura após mastectomia. Nesse caso, o reparo da lesão ocorreu de maneira acelerada, com resistência e crescimento piloso adequado, fornecendo, assim, características cosméticas favoráveis.

A atividade da acupuntura sobre neovascularização foi estudada por Jansen et al. (1989). Estes autores constataram um aumento no fluxo sanguíneo em *flap* músculo-cutâneo de ratos submetidos à eletroacupuntura. Comparando tratamentos com eletroacupuntura e com os neuropeptídeos SP e CGRP, verificaram que a borda circulatória do *flap* moveu-se distalmente 66 %, 31 % e 49 %, respectivamente. O tratamento com o bloqueador simpático reserpina não alterou o fluxo sanguíneo do enxerto. O mecanismo pelo qual a eletroacupuntura aumenta o fluxo sanguíneo e a sobrevivência do enxerto ainda é desconhecido. Entretanto, têm sido sugeridas duas possíveis vias: (1) uma inibição de fibras nervosas vasoconstrictoras simpáticas ou (2) a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas periféricas de neurônios sensitivos primários de pequeno diâmetro (fibras C ou A δ). Estes autores sugerem que a eletroacupuntura possui maior similaridade com os efeitos atingidos quando se injeta no *flap* os neurotransmissores SP e CGRP do que o efeito obtido com o bloqueio dos neurônios vasoconstrictores simpáticos.

Não existem trabalhos científicos até o momento avaliando a atividade da EA sobre as MSCs na cicatrização de feridas cutâneas, porém Ding et al. (2009) utilizaram a combinação desses tratamentos em ratos com lesão medular induzida e observaram a provável regeneração axonal e a recuperação parcial da função locomotora desses animais.

Os filmes de poliuretano permitem a passagem da água em forma de vapor e do oxigênio. Estes filmes correspondem a uma membrana fina e transparente de poliuretano revestida com uma camada adesiva para prendê-los na superfície da pele nas

bordas da ferida, podendo ser usados como uma membrana de proteção das feridas com mínima produção de exsudato ou como uma barreira protetora (por exemplo, em incisões fechadas) (PAVLETIC, 2010). Estes filmes de poliuretano também são analgésicos (LIPTAK, 1997).

Os curativos oclusivos produzem um ambiente úmido e protegido no ferimento capaz de otimizar o processo de cicatrização. Eles retêm umidade atuam acalmando a superfície dos ferimentos sensíveis e reduzindo o desconforto do paciente (PAVLETIC, 2010). Podem ser amplamente classificados em biológicos e sintéticos. A membrana sintética externa dos curativos oclusivos previne ou minimiza a penetração de contaminantes. Estes requerem menor frequência de troca, aceleram a síntese de colágeno e protegem o novo epitélio de abrasões. Além disso, a taxa de epitelização ocorre de forma duas vezes mais rápida em comparação com feridas expostas ao ar. Os curativos oclusivos são finos, transparentes, biodegradáveis e aderem à pele ao redor, mas não à ferida (LIPTAK, 1997; HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

Os filmes de poliuretano são permeáveis a gás, mas protegem a ferida de contaminantes externos, são considerados semi-oclusivos, permitindo ao vapor de água escapar de sua superfície. Não possuem capacidade absorviva e a umidade pode acumular abaixo do poliuretano, promovendo a proliferação de organismos da pele. O uso exclusivo do filme deve ser evitado na presença de infecções, tecido necrosado ou feridas altamente exsudativas. Os filmes de poliuretano são indicados para feridas com leito de granulação já formado e com exsudato em declínio. Alguns filmes de poliuretano contêm uma gaze e podem ser usados como barreiras protetoras sobre incisões suturadas. Estes filmes também podem ser utilizados como barreiras de contenção para fixar outros curativos e medicamentos tópicos. Os filmes de poliuretano devem ser substituídos a cada 2-3 dias ou quando houver acúmulo de exsudato. Exemplos deste curativo: Allevyn e OpSite (Smith & Nephew), Tegaderm (3M) e Melolite (Smith & Nephew) (LIPTAK, 1997; SWAIN, 1997; HEDLUND, 2007; PAVLETIC, 2010).

4 RESULTADOS

Os resultados desse trabalho serão apresentados em forma de artigo científico que está descrito como subtítulo desse capítulo.

4.1 Células-Tronco Mesenquimais e Eletroacupuntura na Cicatrização de Lesões Cutâneas Experimentais em Coelhos

4.1 Células-Tronco Mesenquimais e Eletroacupuntura na Cicatrização de Lesões Cutâneas Experimentais em Coelhos

4.1 *Mesenchymal stem cells and electroacupuncture at experimental wound healing in rabbits*

4.1.1 Resumo

Ainda hoje, acelerar o processo de reparo continua sendo um desafio no campo da cirurgia plástica reconstrutiva. Tratamentos inovadores para melhorar a cicatrização e a regeneração cutânea são necessários e é nesse âmbito que as pesquisas com as células-troncos mesenquimais (MSCs) vêm ganhando espaço na última década. Relatos apontam que tanto as MSCs originárias da medula óssea influenciam benéficamente a cicatrização de feridas, quanto originárias do tecido adiposo (ADSCs). A vantagem das ADSCs está na facilidade de serem coletadas, baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento de MSCs por coleta. Estudos demonstram que a eletroacupuntura pode exercer efeito cicatrizante por meio do aumento da proliferação e da migração de células epiteliais e do tecido conjuntivo envolvidos no reparo de feridas. Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia com ADSCs no processo da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos induzidas experimentalmente. Além disso, avaliar se a eletroacupuntura (EA) é capaz de causar efeito sobre a terapia com ADSCs no reparo de lesões cutâneas experimentais. Para tanto, foram utilizados 32 coelhos divididos em quatro grupos: GCTAD (ADSCs), GCTADE (ADSCs associado à EA), GE (EA) e GC (controle) o período de avaliação das lesões foi de 15 dias. As feridas induzidas cirurgicamente foram avaliadas por observações clínicas e análises histológicas. Os animais do GCTAD apresentaram uma velocidade cicatricial superior aos demais grupos até a quinta avaliação. Já na sétima avaliação o GE passa a ter a melhor taxa de contração cicatricial superando o GCTAD ($p=0,039$) e o GC ($p=0,05$). O GCTAD apresentou as maiores médias nas variáveis histológicas: proliferação vascular ($p=0,059$), proliferação fibroblástica ($p=0,05$) e Ki67. Nas variáveis reepitelização e colagenização as médias foram maiores que a dos outros grupos, mas semelhantes ao GE e a presença de queratina, da mesma forma, semelhante ao GCTADE. O GCTADE se destaca pela presença de folículos pilosos ($p=0,026$). Esse experimento, evidenciou que o GCTAD melhora a cicatrização de feridas, acelerando a fase proliferativa do processo cicatricial. A associação dos tratamentos EA e ADSCs só foi considerada superior aos outros tratamentos na avaliação da presença de folículos pilosos. Talvez, o benefício dessa associação seja mais evidente se o estudo for feito por um período superior aos 15 dias, ou seja, durante a fase de remodelamento da cicatrização, onde pode ser que se verifique um aspecto cosmético mais favorável da cicatriz.

Palavras-chaves: célula-tronco mesenquimal, eletroacupuntura, cicatrização de feridas cutâneas, coelhos.

4.1.2 Abstract

The pathophysiology understanding of wound healing has been substantial progress during the last two decades, and new therapies have been developed. However, to accelerate the repair process remains a challenge in the field of reconstructive plastic surgery. Innovative treatments to enhance wound healing and cutaneous regeneration

are necessary and in this context the research with mesenchymal stem cells (MSCs) are getting space in the last decade. MSCs have been studied in several areas with regard to its effect on the healing of lesions and their clinical applications. Reports indicate that both MSCs from bone marrow beneficially influence wound healing, as originating from adipose tissue (ADSCs). The advantage of ADSCs is because they can be easily collected, with low rates of morbidity and the high yield of MSCs per collection. Studies show that electro acupuncture (passing electricity through the acupuncture needles inserted into the skin) can have a healing effect on experimentally induced skin wounds by increasing the proliferation and migration of epithelial cells and connective tissue involved in wound repair. Thus, this study aims to evaluate the effect of therapy with ADSCs in the process of skin wound healing in rabbits that were experimentally induced. Moreover, to evaluate whether electro acupuncture (EA) is capable to causing effect on ADSCs therapy in the repair of experimental skin lesions. Therefore, it was used 32 rabbits divided into four groups: GCTAD (ADSCs), GCTADE (ADSCs associated with EA), GE (EA) and CG (control) the evaluation period of the lesions was 15 days. The surgically induced wounds were evaluated by clinical observations and histological analysis. The GCTAD animals showed an accelerated wound healing than the other groups until the fifth assessment. In the seventh evaluation GE replaced by the best healing rate than GCTAD ($p = 0.039$) and CG ($p = 0.05$). The GCTAD had the highest averages in the histological variables: vascular proliferation ($p = 0.059$), fibroblast proliferation ($p = 0.05$) and Ki67. Reepithelialization and collagen variables the averages were higher than other groups, but similar to GE and the presence of keratin, the same way, similar to GCTADE. The GCTADE stands by the presence of hair follicles ($p = 0.026$) and by the major averages found for the mononuclear and polymorph nuclear cells, but these values are not statistically significant. Through this experiment, we show that the GCTAD improves wound healing by accelerating the proliferation phase of healing. The combination of EA and ADSCs treatments were not considered superior to other treatments in assessing the presence of hair follicles. Perhaps the benefit of this association is more evident if the study is done for a period exceeding 15 days, during the remodeling phase of healing, it could be ascertained a more favorable cosmetic appearance of the scar.

Key words: mesenchymal stem cells, eletroacupuncture, wound healing, rabbits.

4.1.3 Introdução

A cicatrização de feridas cutâneas é um evento complexo que requer a integração de eventos biológicos e moleculares, como a migração e proliferação celular, deposição de matriz extracelular, angiogênese e remodelamento ou maturação. Contudo, essa ordem na sucessão de eventos pode ser alterada devido a doenças crônicas como a diabetes (LIM & YOO, 2010).

Durante as duas últimas décadas, têm ocorrido progressos substanciais a respeito do entendimento da fisiopatologia da cicatrização de feridas, e novas terapias tem sido desenvolvidas. Contudo, acelerar o processo de reparo continua sendo um desafio no

campo da cirurgia plástica reconstrutiva (BYDLOWSKI et al., 2009; NAMBU et al., 2009).

A fonte mais comum de células-tronco é a medula óssea. No entanto, a colheita de células da medula óssea é um processo doloroso para os doadores, requer anestesia geral ou raquidiana e ainda pode resultar em baixa produção de células (ZUK et al., 2001). Dessa forma, as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) ganharam recentemente uma atenção especial por ser uma potencial fonte alternativa às células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea (BMSCs). O tecido adiposo encontra vantagens incontestáveis como fonte de MSCs indiferenciadas por sua fácil aquisição (por meio de lipoaspiração ou lipectomia), baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento (TORRES et al., 2007; NAMBU et al., 2009). Pela colheita de tecido adiposo pode-se obter 2 a 3×10^8 células-tronco por 300 ml de material aspirado (ZUK et al., 2001), quando comparado com a medula óssea, que pode produzir uma células-tronco por 10^5 células estromais (TORRES et al., 2007).

As ADSCs e BMSCs foram estudadas em diversas áreas no que diz respeito ao efeito sobre a cicatrização de lesões e suas aplicações clínicas (ZUK et al., 2001; ZUK et al., 2002; NARDI, 2007; RIGOTTI et al., 2007; SÁNDOR & SUURONE, 2008). Wu et al. (2007) relatou que as BMSCs influenciam benéficamente a cicatrização de feridas, enquanto Lim & Yoo (2010) relataram que ADSCs também podem promover a cicatrização da ferida.

Estudos demonstraram que a eletroacupuntura (passagem de eletricidade através de agulhas de acupuntura inseridas na pele) pode exercer efeito cicatrizante em feridas cutâneas experimentalmente induzidas. É relatado nessas pesquisas que os animais tratados com eletroacupuntura apresentaram cicatrização completa, acelerada, sem contaminação e com tensão superior àquela dos animais controle (ABOLAFIA et al., 1985; SUMANO et al., 2001; BEHEREGARAY et al., 2009).

O modo com que a estimulação elétrica age para favorecer uma cicatrização mais rápida ou mais efetiva de feridas superficiais não está claro. Existem, porém, evidências de que a proliferação e a migração de células epiteliais e de tecido conjuntivo envolvidos no reparo de feridas podem ser aumentadas por um campo elétrico (LOW et al., 2001; ROBINSON, 2001).

Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia com ADSCs no processo da cicatrização de feridas cutâneas em coelhos induzidas experimentalmente. Além disso, avaliar se a eletroacupuntura é capaz de causar um efeito sobre a à terapia com MSCs no reparo de lesões cutâneas experimentais.

4.1.4 Materiais e Métodos

Foram utilizados 32 coelhos (fêmeas) da raça Chinchila, adultas com idade variando de 150 a 240 dias, híginas. Esses animais foram alojados em gaiolas individuais, onde receberam, como alimento, ração comercial para coelhos e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em quatro grupos contendo oito animais cada, e o período de análise das lesões foi de oito dias nas lesões da esquerda, e de 15 dias nas da direita. Esse experimento foi submetido ao comitê de ética no uso de animais do Hospital de clínicas de Porto Alegre e foi aceito sob o número de registro 10-0111.

Grupo Células-tronco Adiposo derivada (GCTAD): Os animais receberam ADSCs injetadas ao redor das feridas, em quatro pontos equidistantes na concentração de 7×10^5 diluídas em 60 μ l de PBS. No leito da lesão foram aplicadas 3×10^5 diluídas em 40 μ l de Matrigel (Basement Membrane Matrix, BD Biosciences) diluído 1:1 em meio de cultura DMEM.

Grupo Eletroacupuntura (GE): Esses animais foram tratados com eletroacupuntura. Após a indução das lesões foi aplicado 60 μ l de PBS em quatro pontos equidistantes e no leito da ferida 40 μ l de Matrigel. A eletroacupuntura teve início 24 horas após a indução das feridas e foi realizada a cada dois dias até o período final de observação. Para tanto, as agulhas de acupuntura foram aplicadas em dois pontos equidistantes da ferida, a uma distância de 0,5 cm da borda, acopladas ao aparelho de eletroacupuntura (Sikuro Dsc-100) a uma frequência de 60 Hz e uma corrente alternada assimétrica de aproximadamente 8 μ A durante 10 minutos.

Grupo Células-Tronco Adiposo derivada e Eletroacupuntura (GCTADE): Esses animais receberam ADSCs e tratamento com eletroacupuntura. Os animais receberam o mesmo protocolo de indução cirúrgica aplicado ao GCTAD e o tratamento pós-operatório igual ao do grupo GE.

Grupo Controle (GC): Os animais controle receberam o mesmo protocolo de indução cirúrgica aplicado ao GE.

Ao final do experimento todos os animais foram doados, conforme regulamentada a lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Cultivo e Caracterização de Células-tronco Mesenquimais

A cultura de MSCs originária do tecido adiposo foi fornecida pela equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do HCPA. O laboratório possui um projeto que visa isolar e caracterizar MSCs de medula óssea e tecido adiposo de coelhos para aplicação experimental em terapia celular. O procedimento de coleta foi realizado em um coelho macho, hígido, com quatro meses de idade. Após cuidados específicos de assepsia e antisepsia, em ambiente cirúrgico, foi realizada uma incisão longitudinal de 5 cm na linha dorsal, na região entre as escápulas. Após a localização da região de maior acúmulo de tecido adiposo procedeu-se à lipectomia em bloco de aproximadamente 3x3x1 cm³. Protocolo de coleta adaptado de Torres et al. (2007).

O segmento de tecido adiposo coletado foi primeiramente fragmentado e depois lavado com PBS 2 % estéril, e posteriormente transportado com essa mesma solução até o laboratório. Após a lavagem do tecido em um fluxo laminar, este material passou por processo enzimático de digestão celular. A solução de colagenase A (2 mg.ml⁻¹) em meio DMEM (Meio de Eagle e Dulbecco Modificado), contendo BSA (20 mg.ml⁻¹), além de penicilina e estreptomina, utilizada por grama de tecido para digestão tecidual durante 50 min, a 37 °C, em constante agitação. Após o período de incubação enzimática, o processo foi interrompido com a adição de FBS (Fetal Bovine Serum). A suspensão de células obtida foi centrifugada por 5 min à 2000 rpm, sendo desprezado o sobrenadante (fração adiposa), após a centrifugação e o *pellet* formado (fração estromal) foi ressuspensionado em meio DMEM já suplementado com 10 % de BFS. Protocolo segundo Torres et al. (2007). As células obtidas foram semeadas em uma concentração de 5 x 10⁶ células viáveis por ml e mantidas em cultivo em estufa umidificada com 5 % de CO₂ no ar, a 37° C. O tempo necessário para o isolamento e purificação das MSCs foi de duas semanas. Para a caracterização da cultura foram realizados os ensaios de diferenciação celular *in vitro* para tipos celulares: osteócitos, condrócitos e adipócitos segundo Hui et al., 2005. Foram utilizadas somente células até a quinta passagem.

Procedimento cirúrgico de indução da lesão cutânea

Os animais foram submetidos à anestesia geral, sendo utilizado como medicação pré-anestésica quetamina 20 mg.kg^{-1} , midazolam 2 mg.kg^{-1} e fentanil $0,015 \text{ mg.kg}^{-1}$, todos por via intramuscular. Com os animais sedados foi realizada tricotomia ampla na região do dorso. A anestesia geral foi induzida e mantida com isoflurano vaporizado em oxigênio administrados pelo uso da máscara. As lesões eram induzidas pela remoção de um segmento de pele de 10 mm, mediante o uso de *punch*, no lado direito e esquerdo, próximo à borda da escápula. As feridas dos dois lados receberam o mesmo tratamento conforme o grupo no qual o animal estava inserido. Os animais que pertenciam aos grupos GCTAD e GCTADE receberam ADSCs injetadas ao redor das feridas, em quatro pontos equidistantes, na concentração de 7×10^5 diluídas em 60 μl de PBS ou receberam somente o PBS. No leito da lesão foram aplicadas 3×10^5 diluídas em 40 μl de Matrigel. Nos grupos GC e GE procedeu-se da mesma maneira, porém não havia células diluídas no PBS e no Matrigel. Após a geleificação do Matrigel foi aplicado o curativo Tegaderm (3M Médico Hospitalar) sobre as lesões (Figura 1). Como curativo secundário foi utilizada malha tubular.

Procedimento pós-operatório

Os animais receberam no pós-operatório imediato de 2 mg.kg^{-1} de cloridrato de tramadol. As feridas ficaram cobertas com o curativo primário Tegaderm que foi trocado a cada sete dias até o final do período de observação, ou quando havia exsudato moderado para que se procedesse à limpeza com solução de NaCl 0,9 %. Todos os animais foram mantidos com um curativo secundário de malha tubular, trocado sempre que necessário.

Avaliação clínica da evolução cicatricial

As avaliações da evolução cicatricial, bem como o tratamento das lesões (somente daquelas que pertenciam aos grupos GE e GCTADE) foram realizados a cada dois dias. As lesões do lado direito foram avaliadas e tratadas sete vezes, totalizando quinze dias de observação. As do lado esquerdo foram avaliadas e tratadas quatro vezes, totalizando oito dias de avaliações.

Em cada avaliação as feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento pela menor largura, com auxílio de paquímetro digital. A área de contração da ferida (C) foi calculada subtraindo-se a área inicial (a_1), determinada no dia da primeira aferição da lesão, da área da lesão (a) nos tratamentos 2, 3, 4, 5, 6, 7

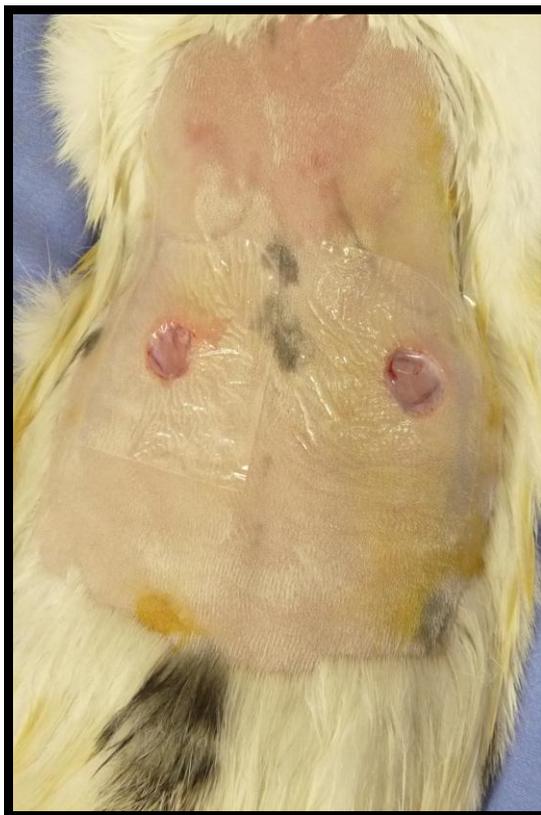


Figura1: Lesões cutâneas induzidas cirurgicamente com o uso de *punch* , na região dorsal dos animais, logo abaixo das escápulas e a dois centímetros da coluna vertebral. Logo após a indução e a aplicação do tratamento conforme o grupo, as lesões eram cobertas com curativo Tegaderm como mostra na figura.

para as feridas do lado direito, e nos tratamentos 2, 3, 4 para as da esquerda. Assim, $C = a1 - a$. A taxa de contração cicatricial (Tc) também foi avaliada a partir desses resultados ($Tc = C \times 100/a1$). Ainda foram feitos registros fotográficos durante as mensurações e os aspectos macroscópicos, como presença de tecido necrótico, granulação, sinais de infecção, presença de exsudato, dor, hiperemia, hiperpigmentação, edema, cianose e crosta quando observados foram anotados em fichas controle.

A presença do tecido de granulação foi avaliada atribuindo-se valores de zero a três, conforme a sua localização na lesão, de acordo com o seguinte: valor zero para ausência de tecido de granulação; valor um para tecido localizado nas margens; valor dois para tecido localizado na região central; e valor três para o caso de a granulação cobrir toda a lesão.

Biópsia

De todos os grupos foi removida cirurgicamente, para a avaliação histológica, 2 mm de pele saudável, em torno da lesão cutânea induzida. O protocolo anestésico para esse procedimento foi o mesmo utilizado no momento da indução cirúrgica das feridas. As lesões do lado esquerdo foram removidas no oitavo dia, sendo essa região suturada em contínua simples utilizando fio náilon 4-0. Após a biópsia, essa lesão não foi mais utilizada para observação. Aos quinze dias foi realizada a biópsia da ferida da direita para a avaliação histológica e, logo em seguida, suturada de maneira semelhante à anterior. As amostras coletadas para avaliação histológica foram imediatamente acondicionadas em formol tamponado a 10 %.

Avaliação Histológica

Os segmentos foram processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), para avaliação da qualidade cicatricial, e pelo Tricômico de Masson (TM), para analisar a presença de fibras colágenas existentes nos locais de fibrose do interstício. Na avaliação das características microscópicas da cicatrização foram consideradas: a proliferação vascular e fibroblástica, presença de células mononucleares e polimorfonucleares; colagenização; reepitelização; presença de folículos pilosos; e a queratinização. Para determinar o perfil proliferativo tanto de MSCs como das células endógenas foi realizada a técnica de imunohistoquímica com o anticorpo anti-Ki-67 de rato. Este marcador de proliferação celular é positivo em núcleos de células que se encontram no ciclo celular, isto é, que estão comprometidos a entrar em mitose. As observações foram feitas em microscópio óptico, sendo considerados três campos de grande aumento (400 vezes). Os critérios utilizados e os índices determinados pelo patologista foram baseados nas próprias amostras, estando descritos na Tabela 1. Ainda, vale ressaltar que a avaliação foi feita às cegas, ou seja, o profissional desconhecia o grupo a que pertencia cada amostra.

Análise Estatística

Avaliação estatística dos dados foi feita pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). As variáveis obtidas pelas avaliações clínicas foram analisadas mediante testes não-paramétricos, Métodos da diferença mínima significativa

(LSD) e Análise de variância (ANOVA). O nível de significância utilizado para rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5 % ($p < 0,05$).

4.1.5 Resultados

Tabela 1. Índice histológico utilizado como critério para avaliação da cicatrização de feridas com valores variando entre 0 e 3 baseado em valores de proliferação vascular, células mononucleares, células polimorfonucleares, proliferação fibroblástica, colagenização, reepitelização, folículos pilosos, queratina e Ki67.

	ÍNDICE HISTOLÓGICO			
	0	1	2	3
Proliferação vascular	0	1-5	5-15	>15
Células Mononucleares	0	<50	50-100	>100
Células Polimorfonucleares	0	<50	50-100	>100
Proliferação Fibroblástica	0	<50	50-100	>100
Colagenização^a	0	<10	10-30	>30
Reepitelização^b	0	<1	1-2	>2
Folículos Pilosos^c	0	<30 %	30-60 %	>60 %
Queratina^d	0	1x	2-3x	>3x
Ki67^e	0	1-12	12-24	>24

^aavaliação feita na região sublesional; ^brelação feita a partir da visualização de um campo de 400x; ^cporcentagem estabelecida em relação ao tamanho do bulbo do folículo piloso; ^dproporção feita em relação ao tamanho da lâmina basal do epitélio; ^econtagem feita na camada basal

Indução cirúrgica e pós-operatório

O protocolo de indução das lesões se mostrou adequado e de fácil execução, tanto para o procedimento cirúrgico como para o anestésico. Apesar de ter sido usado o mesmo tamanho de *punch*, pode-se observar que houve diferença entre os animais quanto ao tamanho das feridas no momento subjacente à realização da lesão; contudo, essa diferença não possui significância estatística ($p > 0,05$).

Tanto a aplicação das células diluídas em PBS como o PBS usado isoladamente, foi de fácil execução, apesar do pequeno volume a ser injetado nos quatro pontos de cada lesão. A aplicação do Matrigel, bem como o seu manuseio foi de simples execução; o único cuidado tomado foi o de matê-lo sob refrigeração até instantes antes da aplicação. O tempo esperado para geleificação foi de 15 minutos, sendo, logo após, aplicado sobre cada lesão o curativo primário Tegaderm.

No pós-operatório imediato, os animais não apresentaram sinais de desconforto à manipulação da ferida tampouco alterações comportamentais, o que poderiam ser indicativos de dor, caso estivessem presentes.

Avaliação clínica

Os indivíduos foram avaliados pela primeira vez no dia seguinte à indução da lesão e, a partir de então, a cada dois dias, totalizando sete avaliações na lesão da direita, e quatro na da esquerda. Os animais se mantiveram calmos durante as avaliações clínicas, bem como durante a aplicação da EA, tendo sido necessária somente a contenção física.

Pelas avaliações podemos observar que nenhum animal apresentou necrose na área das lesões e que somente dois animais apresentaram sinais de dor no primeiro dia de avaliação. Foi evidente a cianose nas margens da lesão em somente uma avaliação de um animal. A presença de crostas, hiperemia e exsudato estão descritas na tabela 2.

As lesões que apresentaram exsudato purulento em volume acentuado, foram coletados *swabs* da secreção e esses encaminhados para o laboratório de análises microbiológicas. Os resultados encontrados foram *Staphylococcus sp.* e *Pseudomonas sp.* Os animais que receberam esse diagnóstico foram tratados com enrofloxacin 10 mg.kg⁻¹/ SID/ 5 dias como antibioticoterapia.

Em relação ao curativo primário Tegaderm houve a necessidade de se efetuar a troca em 40 % das avaliações. Essas trocas, em 16 % dos casos, foram devido à má aderência do curativo, em 24 %, devido à necessidade de remover o curativo para efetuar a limpeza da lesão que estava exsudativa. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Os resultados da presença do tecido de granulação podem ser observados na Tabela 3, onde se verifica a diferença estatística significativa do grupo GE em relação

ao GCTAD e GCTADE no segundo dia de avaliação. Nas outras avaliações não há diferença significativa entre os grupos, porém as maiores médias são dos grupos GE e GCTAD.

Tabela 2. Distribuição entre os grupos dos seguintes aspectos encontrados na avaliação clínica: Crostas, hiperemia, exsudato purulento e seroso.

	GRUPOS			
	GCTAD	GCTADE	GE	GC
Crostas	17 %	34 %	28 %	21 %
Hiperemia	47 %	47 %	3 %	3 %
Exsudato Purulento	22,3 %	38,63 %	31,81 %	31,16 %
Exsudato Seroso	14,14 % ^a	17,04 % ^b	3,40 % ^{a, b}	6,5 %

GCTAD - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada; GCTADE - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada Eletroacupuntura; GE - Grupo Eletroacupuntura; GC - Grupo Controle. ^aDiferença estatística $p < 0,047$ do grupo GE em relação ao GCTADE; ^bDiferença estatística $p < 0,011$ do grupo GE em relação ao GCTADE;

A velocidade de cicatrização foi medida pela taxa de contração cicatricial, e os resultados estão detalhados na Tabela 4. Por meio dessa análise podemos afirmar que os animais do GCTAD apresentaram uma velocidade cicatricial superior à dos demais grupos até a quinta avaliação, com significância estatística nas avaliações três e cinco. Já na sétima avaliação o GE passa a ter a melhor taxa de contração cicatricial superando o GCTAD ($p = 0,039$) e o GC ($p = 0,05$), essa variação pode ser visualizada na Figura 2. As imagens representativas das lesões no 8° e 15° nos diferentes grupos podem ser analisadas na Figura 3.

Avaliação histológica

As variáveis histológicas avaliadas segundo os critérios descritos na Tabela 1 foram proliferação vascular e fibroblástica, Ki67, colagenização, reepitelização, presença de folículos pilosos e a queratinização.

Tabela 3. Média dos graus avaliados nos sete momentos classificados de zero a quatro: zero é a ausência de tecido de granulação; um é tecido de granulação marginal; dois é tecido de granulação na região central; três é a granulação cobrindo toda a lesão.

	AVALIAÇÕES						
	1	2	3	4	5	6	7
GCTAD	0	0,28 ^a	1,44	1,67	2,48	2,53	2,33
GCTADE	0	0,25 ^a	1,19	1,25	2,13	2,25	2,63
GE	0	0,69 ^a	0,88	1,94	1,81	2,52	2,38
GC	0	0,43	1,14	1,86	2,14	2,43	2,29
MEDIA GERAL	0	0,53	1,14	1,84	2,31	2,47	2,42

GCTAD - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada; GCTADE - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada Eletroacupuntura; GE - Grupo Eletroacupuntura; GC - Grupo Controle. ^aDiferença estatística $p < 0,05$ do grupo GE em relação ao GCTAD e GCTADE

Tabela 4. Média da taxa de contração cicatricial de cada grupo em cada um dos sete momentos de avaliações.

	AVALIAÇÕES						
	1	2	3	4	5	6	7
GCTAD	0	0,94	16,58 ^a	-8,72	31,99 ^b	38,74	54,04 ^c
GCTADE	0	-8,05	9,51	-10,05	20,89	42,75	70,06
GE	0	-16,98	-11,78 ^a	-25,31	-9,17 ^b	39,87	81,24 ^c
GC	0	0,53	-29,82 ^a	-5,32	0,83	32,19	49,17 ^c
MEDIA GERAL	0	-10,82	-3,01	-8,35	14,48	41,43	65,68

GCTAD - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada; GCTADE - Grupo Célula Tronco Adiposo Derivada Eletroacupuntura; GE - Grupo Eletroacupuntura; GC - Grupo Controle. ^aDiferença estatística $p < 0,035$ do grupo GCTAD em relação ao GE e GC; ^bDiferença estatística $p < 0,03$ do grupo GCTAD em relação ao GE; ^cDiferença estatística $p < 0,05$ do grupo GE em relação ao GCTAD e GC.

As imagens histológicas podem ser visualizadas na Figura 4. O GCTAD apresentou as maiores médias nas variáveis: proliferação vascular ($p = 0,059$), proliferação fibroblástica ($p = 0,05$) e Ki67. Nas variáveis reepitelização e

colagenização as médias foram maiores que a dos outros grupos, mas semelhantes ao GE e a presença de queratina, da mesma forma, semelhante ao GCTADE.

O GCTADE se destaca pela presença de folículos pilosos ($p = 0,026$) e pelas maiores médias encontradas para as células mononucleares e polimorfonucleares, mas esses valores não configuram diferença estatística significativa.

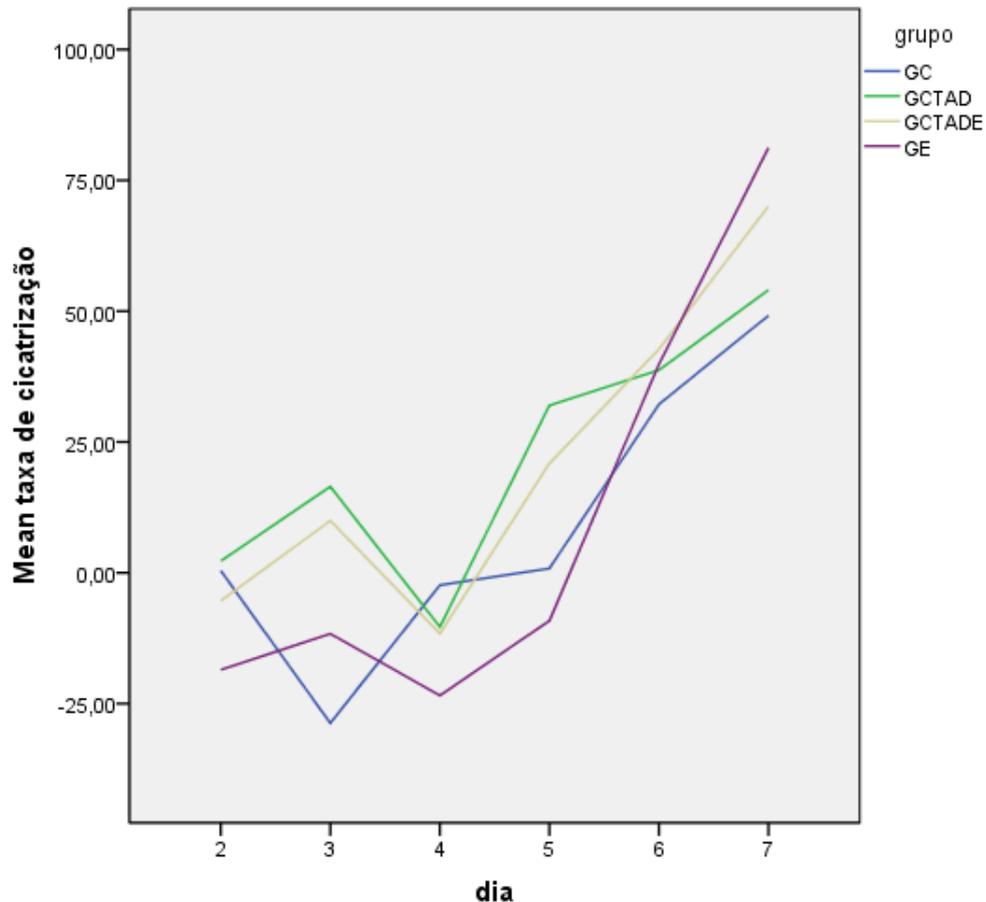


Figura 2: Taxa de contração cicatricial. Média da taxa de contração cicatricial dos grupos do 2º ao 7º dia de avaliações. O grupo tratado com células-tronco adiposo derivada evidenciou uma velocidade cicatricial superior aos outros grupos até a 5ª avaliação e o grupo eletroacupuntura apresenta velocidade cicatricial superior na 7ª avaliação.

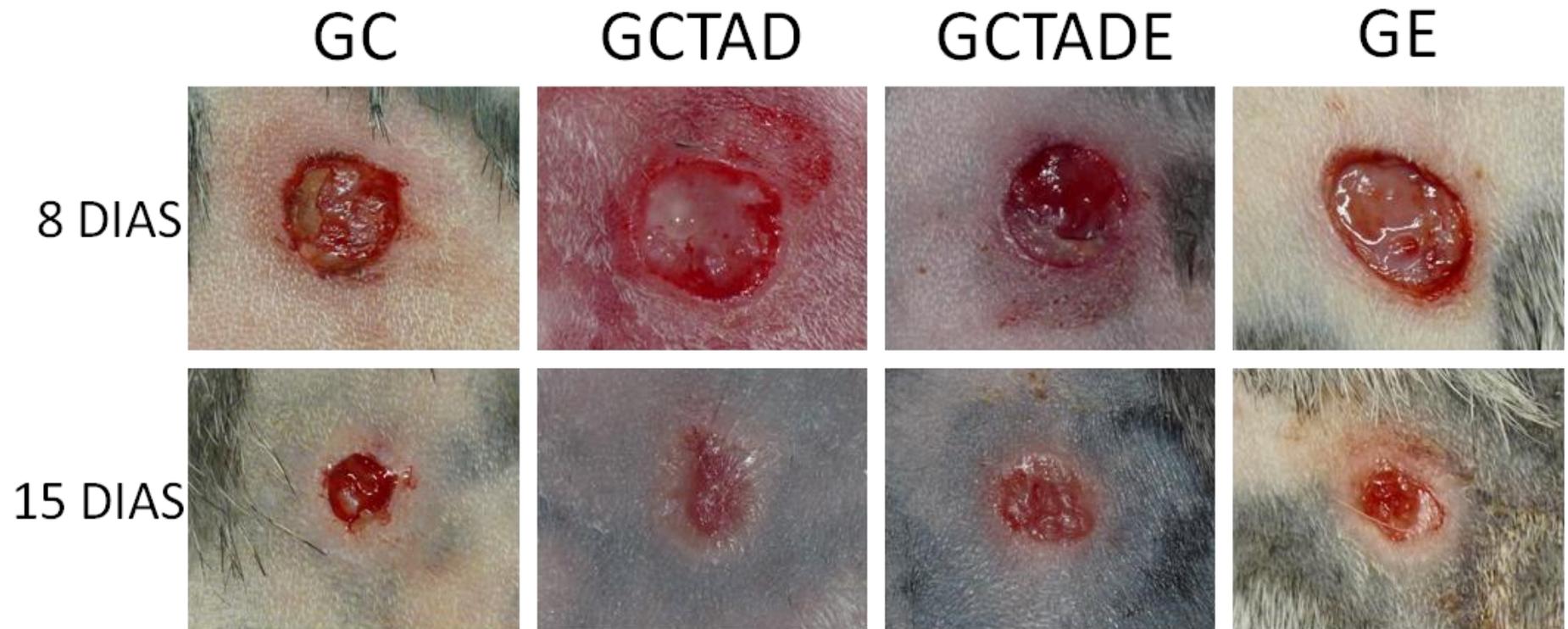


Figura 3: Efeito dos diferentes tratamentos sobre a cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos. Fotografias representativas das lesões no 8º e 15º dia nos grupos: controle (GC); células-tronco adiposo derivada (GCTAD); células-tronco adiposo derivada e eletroacupuntura (GCTADE) e eletroacupuntura (GE).

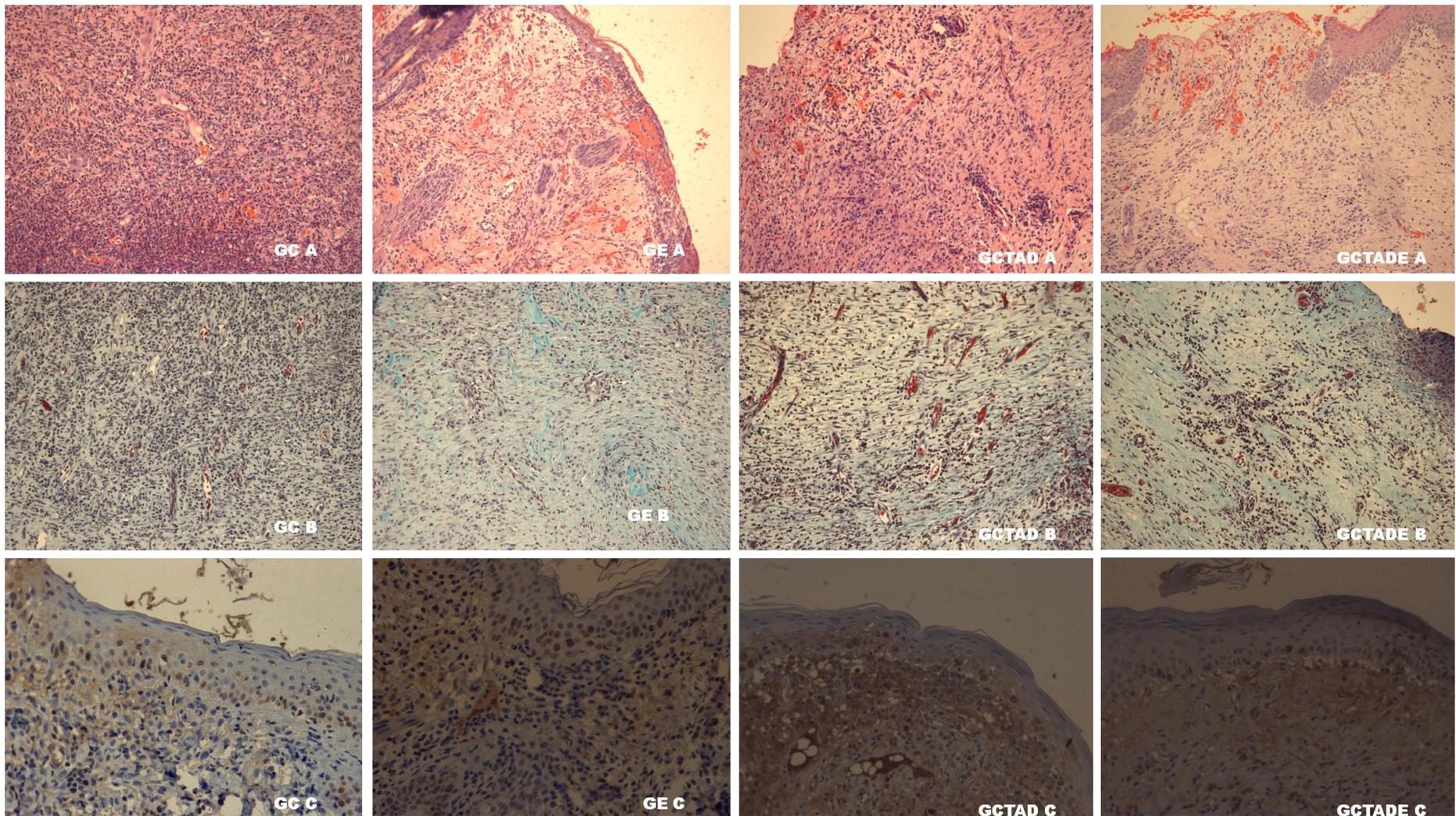


Figura 4: Imagens histológicas dos diferentes tratamentos sobre a cicatrização de feridas cutâneas experimentais em coelhos nos grupos: controle (GC); células-tronco adiposo derivada (GCTAD); células-tronco adiposo derivada e eletroacupuntura (GCTADE) e eletroacupuntura (GE) aos 15 dias.(A): Coloração de Hematoxilina e Eosina evidenciando a neoformação vascular (x200). (B) Coloração de Tricrômio de Masson evidenciando o processo de colegenização (x200). (C) Imunohistoquímica com anti-Ki67 corando de marrom escuro as células em processo de divisão celular (x400).

4.1.6 Discussão

As lesões cutâneas quando tardam a cicatrizar tornam-se crônicas, e o tratamento passa a ser um desafio para os profissionais do campo da cirurgia plástica reconstrutiva (BYDLOWSKI et al., 2009; NAMBU et al., 2009). O melhor tratamento disponível para feridas crônicas atinge apenas uma taxa de 50 % de cura e que, em muitas vezes, é temporária (WU et al., 2007). Tratamentos inovadores para melhorar a cicatrização e a regeneração cutânea são necessários. A partir desse experimento, pode ser evidenciado que o GCTAD melhora a cicatrização de feridas, acelerando a fase proliferativa da cicatrização.

A diferença encontrada quanto ao tamanho das feridas entre os animais no momento imediato à realização da lesão deve-se à influência que a elasticidade da pele promove, sendo essa, inerente a cada animal. Galiano et al. (2004) propõem um modelo de “tala” para ser colocada ao redor da lesão que impede a contração da pele e permite que os ferimentos cicatrizem por meio de granulação e reepitelização, resultando em um fechamento mais uniforme, devido à minimização das variações causadas pela contração da pele. Apesar de não ter sido usado esse modelo proposto por tais autores, optou-se pela realização de lesões circulares, que segundo Pavletic (2010), têm a força de contração diminuída e por isso tende a cicatrizar por reepitelização.

O protocolo de aplicação local das células foi baseado em trabalhos semelhantes que avaliaram o potencial das MSCs no reparo de lesões cutâneas (WU et al., 2007, CHEN et al., 2009) e em trabalhos anteriores, como o realizado por Mc Farlin et al. (2006), que haviam testado a aplicação de células tanto no local da ferida como por via hematogênica e obtiveram resultados semelhantes entre as duas vias de aplicação.

A medicação de escolha para o pós-operatório, pertencente à classe dos opióides, foi eficiente em promover analgesia, sem, contudo, apresentar características como ação antiinflamatória, o que poderia alterar os resultados do experimento, haja visto que a inflamação constitui parte do processo de cicatrização (CASAU BÓN & LÓPEZ 1991; SUMANO & CLIFFORD 2002; BALBINO et al., 2005).

O Tegaderm costuma ser o curativo de escolha para cobrir as lesões cutâneas induzidas experimentalmente por ser inerte, permitir a visualização do processo cicatricial e por ter boa aderência (WU et al., 2007; CHEN et al., 2009; LIM & YOO, 2010). Porém, esse curativo não é indicado para feridas que exsudam, como ocorreu

neste experimento, em que houve a necessidade de se efetuarem trocas frequentes desse curativo, já que em 42 % das avaliações foi observada a presença de exsudato. Os trabalhos publicados nessa área não costumam fornecer dados clínicos sobre a avaliação da cicatrização, restringindo-se normalmente à avaliação da área cicatricial por medições ou registros fotográficos e pelas características microscópicas (WU et al., 2007; CHEN et al., 2009; NAMBU et al., 2009; LIM & YOO, 2010). Tendo em vista que itens avaliados neste experimento, como a presença de exsudato, a hiperemia, a presença de crostas, o aspecto e a localização do tecido de granulação não aparecem avaliados por outros autores, não há subsídios para se fazer tal comparação até este momento. Os valores encontrados para exsudação podem representar uma característica da espécie utilizada, já que não foram encontradas diferenças significativas, a não ser na presença de exsudato seroso, em que o grupo GE apresentou diferença estatística significativa em relação aos grupos GCTAD e GCTADE. Como não há estudos prévios de outros autores, talvez neste caso, seja possível levantar a hipótese de que os grupos tratados com ADSCs aumentam a produção de exsudato seroso.

Vários estudos têm demonstrado o efeito benéfico do tratamento com MSCs sobre a velocidade cicatricial que elas promovem, tanto em experimentos utilizando BMSCs quanto ADSCs (NAMBU et al., 2009; LIM & YOO, 2010). Nesse experimento, pela análise da taxa de contração cicatricial pode-se afirmar que os animais do GCTAD apresentaram uma velocidade cicatricial superior à dos demais grupos até a quinta avaliação, com significância estatística nas avaliações três e cinco. Já na sétima avaliação o GE passa a ter a melhor taxa de contração cicatricial, superando o GCTAD ($p= 0,039$) e o GC ($p= 0,05$). Pode-se sugerir que as ADSCs promoveram uma aceleração do processo inflamatório inicial, o que explicaria aí também a presença de exsudato de seroso, e um incremento da fase proliferativa, confirmada pela análise histológica da proliferação fibroblástica ($p= 0,05$). A hipótese para que a taxa de contração cicatricial da sétima avaliação seja de que as ADSCs que foram aplicadas somente no momento da indução já tenham se exaurido e talvez fosse necessária uma nova aplicação de células entre a 5ª e a 6ª avaliação (entre o 10º e o 12º dia após a primeira aplicação). Nos casos clínicos apresentados por Badiavas & Falanga (2003), eles fizeram múltiplas aplicações de BMSCs em pacientes que possuíam feridas crônicas que não respondiam a tratamentos convencionais. Nesses casos, foi observada cicatrização completa das feridas após o tratamento com células-tronco. Mc Farlin et al.

(2006) compararam a eficiência de uma única aplicação local de BMSCs com a sistêmica pela aplicação venosa em 4 dias consecutivos. Nesse trabalho eles concluíram que os dois tratamentos são efetivos, porém eles não discutem a diferença no número de aplicações. Mesmo trabalhos mais recentes têm utilizado como tratamento uma única aplicação local de MSCs e tem obtido resultados favoráveis a essa terapia (CHEN et al, 2009; NAMBU et al., 2009; LIM & YOO, 2010).

O efeito da eletroacupuntura sobre as ADSCs parece só ocorrer na formação de folículos pilosos onde houve diferença significativa ($p= 0,026$) sobre os demais grupos. Ainda, o GCTADE se destaca pelas maiores médias de células mono e polimorfonucleares e queratina, porém esses valores não apresentam diferença estatística significativa. O aumento das células mono e polimorfonucleares podem estar correlacionados com a quantidade de exsudato purulento e seroso observados nos animais pertencentes a esse grupo durante as avaliações clínicas (Mc Farlin, 2006). A partir desses resultados, pode-se propor que o GCTADE tenha apresentado uma cicatrização com a fase inflamatória exacerbada. Talvez a associação desses tratamentos por eletroacupuntura e ADSCs seja mais evidente se a avaliação for feita por um período superior aos 15 dias, incluindo ou não uma nova aplicação de células, haja vista o aumento significativo na formação de folículos pilosos, podendo indicar que a futura cicatriz possa ter um aspecto cosmético mais favorável, com a presença de pelos no local. Não existem trabalhos científicos até o momento avaliando a atividade da EA sobre as MSCs na cicatrização de feridas cutâneas, porém Ding et al. (2009) utilizaram a combinação desses tratamentos em ratos com lesão medular induzida e observaram a provável regeneração axonal e a recuperação parcial da função locomotora desses animais.

A neovascularização é um passo crucial no processo de cicatrização de feridas, uma vez que é necessária para sustentar o tecido de granulação recém-formado e garantir a sobrevivência dos queratinócitos. Wu et al. (2007) demonstraram que as feridas tratadas com BMSC têm maior densidade capilar, e sugeriram que as BMSCs promovem a angiogênese. No presente estudo, as feridas tratados com ADSCs tiveram aumento da densidade capilar quando comparadas com os outros grupos, porém a diferença não foi estatisticamente significativa; contudo, o valor foi muito próximo ao significativo.

Em estudos recentes, foram relatados transplante de BMSCs ou ADSCs para ativar o processo de cura devido à sua capacidade em diferenciar em epiderme anexos cutâneos, mediando, assim, a regeneração dérmica (LIM & YOO, 2010). Nesse experimento, o GCTAD mostrou taxas significativamente mais rápidas de cicatrização da ferida e tiveram, na média, maiores índices histológicos do que os outros grupos. Por outro lado, as avaliações clínicas e histológicas utilizadas neste estudo podem não ser suficientemente sensíveis para detectar efeitos pequenos, e talvez por isso não se tenha encontrado maiores diferenças significativas, como no caso da avaliação da proliferação vascular.

A cicatrização de feridas é um processo que requer a interação de várias células da derme e epiderme e da liberação de substâncias químicas mediadores das células inflamatórias, fibroblastos e queratinócitos. A proliferação de células mesenquimais e capilares, bem como o influxo de macrófagos no tecido de granulação, servem para substituir o defeito cutâneo e para fornecer substratos e indutores de reepitelização (LIM & YOO, 2010). Pelos resultados deste experimento pode-se considerar que o tratamento com ADSCs promoveu essa proliferação celular necessária para a cicatrização. O mecanismo pelo qual isso ocorreu não foi avaliado neste experimento; contudo, outros pesquisadores da área relatam existir pelo menos duas possibilidades pelas quais as MSCs possam promover a cicatrização. Primeira, elas teriam a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. A segunda possibilidade estaria relacionada com a enorme plasticidade e habilidade das MSCs em se diferenciarem em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos. Portanto, elas facilitariam a cicatrização de feridas pela trans-diferenciação em mioblastos e queratinócitos depois de migrar para a lesão (Mc FARLIN et al., 2006; SASAKI et al., 2008). De maneira semelhante, a hipótese defendida por Wu et al. (2007) para a ação das MSCs na cicatrização de feridas é que ela ocorra por meio da diferenciação e da liberação de fatores pró-angiogênicos.

4.1.7 Conclusão

Pelos resultados deste experimento, pode-se constatar que o GCTAD melhora a cicatrização de feridas, acelerando a fase proliferativa do processo cicatricial.

A associação dos tratamentos EA e ADSCs só foi considerada superior aos outros tratamentos na avaliação da presença de folículos pilosos. Talvez, o benefício

dessa associação seja mais evidente se o estudo for feito por um período superior aos 15 dias, ou seja, durante a fase de remodelamento da cicatrização, em que se pode supor a verificação de um aspecto cosmético mais favorável da cicatriz.

4.1.8 Referências

ABOLAFIA, A.J.A. et al. Evaluación del efecto cicatrizante de la acupuntura. **Veterinaria Mexico**, v.16, p.27-31, 1985.

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

BEHEREGARAY W.K, et al. Tratamento de ferida por eletroacupuntura em uma gata. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.3, p.285-289, 2009.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p. 25-35, 2009.

CASAUBÓN, T.; LÓPEZ, H. S. Efecto de la electroestimulación sobre heridas que cicatrizan por segunda intención en ratas. **Veterinaria Mexico**, v.22, n.4, p. 284-289, 1991.

CHEN, L.; TREDGET, E. E.; WU, P. Y. G.; WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS ONE**, v.3, n.4, 2009.

DING Y. et al. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. **BMC Neuroscience**, v. 35, n.10, p.1-13, 2009.

GALIANO et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.12, p.485-492, 2004.

HUI et al. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 5/6, p. 904-912, 2005.

LIM, J. S. & YOO, J. G. Adipose-derived stromal cells and wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, p. 746-51, 2010.

LOW, Q. E. et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. **American Journal Pathology**, v. 159, p. 457-463, 2001.

Mc FARLIN et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 471-478, 2006.

NAMBU, M. et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Annals of Plastic Surgery**, v. 62, n.3, p. 317-321, 2009.

NARDI N. B. & MEIRELLES L.S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. **Verlag Berlin Heidelberg**, v. 174, p. 249-282, 2006.

- NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2007.
- PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery**. 3 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.679 p.
- RIGOTTI, G.; et al. clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 119, n. 5, p. 1409-1422, 2007.
- ROBINSON, A.J. & MACKLER, L. **Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed editora, 425p, 2001.
- SÁNDOR G. K. B. & SUURONE, R. Combining adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds and growth factors: An overview of tissue engineering. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 74, n. 2, p. 805-809, 2008.
- SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **The Journal of Immunology**, v.180, p. 2581-2587, 2008.
- SUMANO, H.; GOIZ, G.; CLIFFORD, V. Use of electrical stimulation for wound healing in dogs. Disponível em: < http://www.isrvma.org/article/57_1_7.htm>2002. Acesso em: Abril 2008.
- TORRES et al. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 31, p. 574-578, 2007.
- WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v.25, p.2648–2659, 2007.
- ZUK, P. A et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n.2, p. 211-228, 2001.
- ZUK, P. A. Et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.
- .

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- O uso de GCTAD melhora a cicatrização de feridas, acelerando a fase proliferativa do processo cicatricial.
- A associação dos tratamentos EA e ADSCs só foi considerada superior aos outros tratamentos na avaliação da presença de folículos pilosos.
- O protocolo de indução das lesões foi considerado adequado para a avaliação, já que se pôde observar que todas as lesões apresentaram formação de tecido de granulação, seguida por reepitelização.
- As avaliações clínicas realizadas foram de grande valia e trouxeram resultados instigantes, como a possibilidade de as ADSCs promoverem um aumento na exsudação das lesões.
- As avaliações microscópicas foram ferramentas fundamentais para a avaliação da evolução cicatricial nos diferentes grupos, determinando as diferenças na proliferação celular, obtidas pela imunohistoquímica utilizando o anti- Ki67. Além disso, permitiu a avaliação da presença de folículos pilosos, variável essa que permitiu visualizar o efeito da EA sobre as ADSCs.
- A espécie escolhida para este experimento foi adequada, permitindo as avaliações e tratamentos apenas com a contenção física e mínimo estresse dos animais. Ainda, não houve a necessidade de se realizar eutanásia nos animais, que foram todos doados ao final do experimento.
- Como perspectiva pode-se indicar que o estudo deva ser feito por um período superior aos 15 dias, ou seja, durante a fase de remodelamento da cicatrização, em que talvez possam ser melhor verificadas diferenças entre os grupos no aspecto cosmético da cicatriz.
- A utilização de outras ferramentas diagnósticas como a análise molecular poderão dar subsídios aos resultados encontrados. Além de possibilitarem a avaliação da enxertia das células.
- Talvez com uma nova aplicação de ADSCs entre o 10º e o 12º dia após a primeira possa-se determinar se as células-tronco têm um efeito benéfico

somente na fase inicial da cicatrização, ou se elas também poderão apresentar um efeito positivo na remodelação cicatricial se forem aplicadas novamente.

REFERÊNCIAS

- ABOLAFIA, A.J.A. et al. Evaluación del efecto cicatrizante de la acupuntura. **Veterinaria Mexico**, v.16, p.27-31, 1985.
- AMALSADVALA, T.; SWAIN, S.F. Management of hard-to-heal wounds. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 693-711, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 mar. 2010.
- ANDERSON, D. Wound management in small animal practice. **In Practice**, v. 18, n. 3, p. 115-129, 1996.
- ANDERSON, D. Practical approach to reconstruction of wounds in small animal practice. Part 1. **In Practice**, v. 19, n. 9, p. 463-471, 1997.
- Ando, Daisuke Inokuma and Hiroshi Shimizu
- BADIAVAS, E.V. & FALANGA, V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. **Archives of Dermatology**, v. 139, p.510-516, 2003.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, v.41, n.1, p. 27-51, 2005.
- BEHEREGARAY, W.K et al. Tratamento de ferida por eletroacupuntura em uma gata. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.3, p.285-289, 2009.
- BITTENCOURT, R.A.C. et al. Isolamento de células-tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, v. 14, n.1, p. 22-24, 2006.
- BLOW, N. In search of common ground. **Nature**, v. 451, n.14, p. 977-980, 2008.
- BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p. 25-35, 2009.
- CARVALHO, K.A. et al . Avaliação histopatológica do transplante de células-tronco mesenquimais versus células-tronco mononucleares no reparo da cicatriz do miocárdio pós-infarto em ratos. XI Congresso Brasileiro de Transplantes, Bahia, 2005.
- CASAUBÓN, T. & LÓPEZ, H. S. Efecto de la electroestimulación sobre heridas que cicatrizan por segunda intención en ratas. **Veterinaria Mexico**, v.22 , n.4, p. 284-289, 1991.
- CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS ONE**, v.3, n.4, 2009.
- CIRNE-LIMA, E. O. Stem cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p.66-73, 2007.
- COSTELLO, J. F. Stem cells: Tips for priming potency. **Nature**, v. 454, p. 45-46, 2008.
- CURY, C. C. Análise das células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos \wistar submetidos à criopreservação. 2005. 89f. Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de mestre em ciências da saúde. Curitiba, Paraná.
- DIETRICH, I. Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano. 2004. 90f. São Paulo; Tese Apresentada a Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.

Departamento de Cardio-Pneumologia. Disciplina de Cardiologia para obtenção do grau de Doutor. São Paulo, SP.

DING Y. et al. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats. **BMC Neuroscience**, v. 35, n.10, p.1-13, 2009.

DORNELES, D. et al. Efeito de aloe vera linné sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. **Visão Acadêmica**, v.4, n.1, p. 39-46, 2003.

DYSON, M. Advances in wound healing physiology: the comparative perspective. **Veterinary Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 227-233, dec. 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 26 mar. 2010.

GALIANO et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.12, p.485-492, 2004.

HANKS, J. & SPODNICK, G. Wound healing in veterinary rehabilitation patient. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 35, n. 6, p. 1453-1471, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 mar. 2010.

HEDLUND, C. S. Surgery of the Integumentary System. In: FOSSUM, T. W. **Small animal surgery**. 3. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. cap. 15, p. 161 – 259.

HOSGOOD, G. Stages of wound healing and their clinical relevance. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 mar. 2010.

HUI et al. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 5/6, p. 904-912, 2005.

JANSEN, G. et al Acupuncture and sensory neuropeptides increase cutaneous blood flow in rats. **Neuroscience Letters**, v.97, p.305-309, 1989.

KNAPP, D. Tratamento de ferimento aberto. In: BIRCHARD e SHERDING. **Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p.434-438, 1998.

LIM, J. S. & YOO, J. G. Adipose-derived stromal cells and wound healing. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, p. 746-51, 2010.

LIPTAK, J. M. An overview of the topical management of wounds. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 408-413, jun. 1997. Disponível em: <<http://animalcancersurgeon.com>>. Acesso em: 26 mar. 2010.

LIU, H. et al. The Immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. **The Journal of Immunology**, v.176, p. 2864-2871, 2006.

LOW, Q. E. et al. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. **American Journal Pathology**, v. 159, p. 457-463, 2001.

Mc FARLIN et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v. 14, p. 471-478, 2006.

MULLER-BORER, B. J. et al. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, n.9, 2007.

- NAMBU, M. et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Annals of Plastic Surgery**, v. 62, n.3, p. 317-321, 2009.
- NARDI N. B. & MEIRELLES L.S. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, *in vitro* expansion and characterization. **Verlag Berlin Heidelberg**, v. 174, p. 249–282, 2006.
- NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na escola**, v. 2, n. 2, p. 25-29, 2007.
- OKAMOTO, O. K. & CAMPOS, A.H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einstein**, v.2, n. 4, p. 355-358, 2004.
- PAVLETIC, M. M. **Atlas of Small Animal Reconstructive Surgery**. 3 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010.679 p.
- PLANKA, L. et al. Allogeneic and autogenous transplantations of MSCs in treatment of the physal bone bridge in rabbits. **BMC Biotechnology**, v.70, n.8, p. 1-9, 2008.
- RAISER, A.G. Regeneração tecidual In: **Patologia Cirúrgica Veterinária**. 1ªed., Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, v. 1, cap. 5, p. 115-134, 1995a.
- RAISER, A.G. Feridas In: **Patologia Cirúrgica Veterinária**. 1ª ed., Universidade Federal de Santa Maria: Centro de Ciências Rurais, v. 2, cap. 6, p. 137-156, 1995b.
- RIGOTTI, G.; et al. clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: A healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 119, n. 5, p. 1409-1422, 2007.
- RIVEROS, D. M. et al. Células madres y células troncoembrionarias: Diferencias biológicas. **Veterinária México**, v. 38, n.4, p. 477-501, 2007.
- ROBINSON, A.J.; MACKLER, L. **Eletrofisiologia clínica: eletroterapia e teste eletrofisiológico**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed editora, 425p, 2001.
- SÁNDOR G. K. B. & SUURONE, R. Combining adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds and growth factors: An overview of tissue engineering. **Journal of Canadian Dental Association**, v. 74, n. 2, p. 805-809, 2008.
- SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **The Journal of Immunology**, v.180, p. 2581-2587, 2008.
- SCHIWINDT, T.T., BARNABÉ G. T., MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 18, n. 1, p. 13-19, 2005.
- SCHOEN, A. M. **Acupuntura veterinária: da arte antiga à medicina moderna**. São Paulo: Roca, 603 p, 2006.
- SCHREMI, S. et al. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 4, p. 373–378, April 2010. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 26 mar. 2010.
- SOUZA, V. F. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista Ciência Médica biológica**, v. 2, n. 2, p. 251-256, 2003.

SUMANO, H.; GOIZ, G.; CLIFFORD, V. Use of electrical stimulation for wound healing in dogs. Disponível em: < http://www.isrvma.org/article/57_1_7.htm>2002. Acesso em: Abril 2008.

SWAIN, S. F.; Bandages and Topical Agents. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 20, n.1, p. 47-65, 1997.

THOMSON, R.G. Inflamação e Reparação. *Patologia Geral Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 4, p. 144-250, 1983.

TORRES et al. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 31, p. 574-578, 2007.

WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v.25, p.2648–2659, 2007.

XIE, H. & PREAST, V. **Acupuntura veterinária Xie**. São Paulo: MedVet, cap. 12, p.3 45-352, 2010

YOSHIMOTO, M. et al. Two different roles of purified CD45+c-Kit+Sca-1+Lin- Cells after transplantation in muscles. **Stem Cells**, v. 23, p. 610-618, 2005.

ZUK, P. A et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n.2, p. 211-228, 2001.

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.