

JOSÉ DA CONCEIÇÃO CARVALHO JÚNIOR

**FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL ASSOCIADA À
MATRIZ DÉRMICA ACELULAR NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
COELHOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para a obtenção do Título de Doutor em Ciência.

SÃO PAULO

2020

JOSÉ DA CONCEIÇÃO CARVALHO JÚNIOR

**FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL ASSOCIADA À
MATRIZ DÉRMICA ACELULAR NA
CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
COELHOS**

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. LYDIA MASA KO FERREIRA

COORIENTADORES: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE

Prof^ª. FABIANA ZANATA

SÃO PAULO

2020

Carvalho Júnior, José da Conceição

Fração Estromal Vascular associada à Matriz Dérmica Acelular na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos/ José da Conceição Carvalho Júnior. -- São Paulo, 2020. XIV, 123 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Stromal Vascular Fraction associated with Acellular Dermal Matrix on the skin wounds healing in rabbits

1. Ferimentos e lesões
2. Ferida cirúrgica
3. Transplante de tecidos
4. Derme acelular
5. Cicatrização



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIRURGIA TRANSLACIONAL



Coordenação: Prof^a Dr^a Lydia Masako Ferreira

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORIENTADORES: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE

Prof^a. FABIANA ZANATA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carvalho e Maria Angélica,
meus alicerces

À minha irmã Lêda, amiga e companheira
de todas as horas

À minha esposa Jaqueline, pela paciência e companheirismo
em mais essa jornada

À minha pequena Ísis que já inspira todo meu amor

À Deus, que permitiu que todos os acima fizessem parte da minha vida

AGRADECIMENTO

À **PROF^a. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, Pesquisadora CNPq 1A, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP/EPM, Coordenadora do Laboratório de Cultura de Célula e Engenharia Tecidual UNIFESP/EPM, por todos os conselhos, advertências, lições, cobranças e pelo amor em orientar, pela maestria em tutorear e pelo aprendizado indescritível que tive desde a Residência em Cirurgia Plástica e por tanto a mais que tenho a aprender.

Ao **PROF. ANTONIO CARLOS ALOISE**, Professor Afiliado do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, Coordenador do Mestrado Profissional em Ciência, Tecnologia e Gestão Aplicadas à Regeneração Tecidual pelo companheirismo, pelos conselhos e correções durante toda orientação e pela disposição em ajudar sempre.

À **PROF^a. FABIANA ZANATA**, Professora Afiliado do Departamento de Cirurgia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, pelo estímulo constante, pelo esforço em passar seu conhecimento, pelo otimismo e ânimo inabalável e pela disposição incansável em ajudar.

Ao **PROF. RENAN CAVALHEIRO** Pós-Doutorando do Departamento de Bioquímica/Disciplina de Biologia Molecular pela Escola Paulista de Medicina – UNIFESP pelo seu apoio perene e pela ajuda preciosa na imunohistoquímica e análise das lâminas histológicas.

Ao Sr. **PAULO FRANCO**, técnico do Laboratório de Histologia da UNIFESP pela ajuda valiosa na preparação das lâminas histológicas.

Ao **DR. MAURÍCIO TROTTA** Vice-Coordenador e Médico Veterinário Responsável Técnico do CEDEME - Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia pela ajuda em todas as etapas de cuidados e orientações na manipulação dos animais.

Ao Srs. **IVALDO CABRAL E EMANUEL CABRAL**, técnicos do Canil do CEDEME- UNIFESP pela inestimável contribuição durante as cirurgias e nos cuidados pós operatórios dos coelhos e pelo amor dedicado aos animais.

Aos colegas do Laboratório de Cultura de Células e Engenharia Tecidual Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, **MATEUS ABREU, FERNANDO CHIANTIA, ANDREA BAPTISTA e FABIO SIMÕES** pela colaboração e apoio.

Aos alunos da graduação **ANNA CAROLINA ZAMPERLINI, PEDRO HENRIQUE CAVALCANTE E KARINA MAEBAYASHI** pela ajuda valiosa na realização dos experimentos.

A todos os demais Docentes da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP, pelos ensinamentos e apoio desde a minha Residência em Cirurgia Plástica.

À **MARTA REIS, SANDRA DA SILVA, e SILVANA APARECIDA ASSIS**, secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Escola Paulista de Medicina – Unifesp, pela atenção, suporte, incentivo e amizade desde a minha Residência em Cirurgia Plástica.

À empresa **PROMEDOM** pela generosa doação de uma unidade de matriz dérmica utilizada nesse estudo.

“o real não está
na saída nem na chegada:
ele se dispõe pra gente
é no meio da travessia,
”

João Guimarães Rosa. *Grande sertão: Veredas* (1954)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	II
AGRADECIMENTOS.....	III
EPÍGRAFE.....	V
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA.....	10
4. MÉTODO.....	20
5. RESULTADOS.....	39
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÃO.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79
FONTES CONSULTADAS.....	90
NORMAS ADOTADAS.....	92
APÊNDICE.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Demarcação dos pontos de referência das feridas cirúrgicas (A,B, C) e da gordura interescapular.....	25
Figura 2 – Ferida cutânea de espessura total.....	24
Figura 3 – Incisão sagital posterior de 30 mm de comprimento distando 50 mm da região occipital. Gordura interescapular dissecada.....	25
Figura 4 – Gordura interescapular do coelho dissecada.....	25
Figura 5 – Processo de obtenção da FVE (Fração Vascular Estromal).....	27
Figura 6 – MDA de 20x20 mm sobre a ferida cirúrgica e fixada à pele com 8 pontos separados.....	30
Figura 7 - Infiltração intradérmica da FVE a 2 mm da margem da ferida em oito pontos (dois pontos em cada margem).....	29
Figura 8 - Variação de peso dos animais antes e ao término da pesquisa.....	40
Figura 9 - Grupo Controle: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias.....	41
Figura 10 - Grupo Matriz Dérmica Acelular: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias	42
Figura 11 - Grupo Fração Vascular Estromal: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias	43
Figura 12 - Grupo Matriz Dérmica Acelular e Fração Vascular Estromal: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias.....	44
Figura 13 - Comparação da taxa de cicatrização das feridas nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE. Não houve diferença entre os grupos durante todo o experimento..	46
Figura 14 - Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.....	47

Figura 15 - Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.....	47
Figura 16 - Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.....	48
Figura 17 - Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.....	49
Figura 18 - Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE.....	50
Figura 19 - Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.....	50
Figura 20 - Espessura da derme e epiderme nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE, nos dias 3, 14 e 21. Nota-se uma espessura aumentada no grupo MDA/FVE (Coloração H&E, aumento de 10 X)	51
Figura 21 - Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.....	52
Figura 22 - Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.....	53
Figura 23 - Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.....	53
Figura 24 - Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.....	54
Figura 25 - Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.....	55
Figura 26 - Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.....	55
Figura 27 - Distribuição de fibras colágenas do tipo I (vermelho) e do tipo III (verde, amarelo) nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE nos dias 3, 14 e 21. Notar aumento de fibras colágenas do tipo I e III no grupo MDA/FVE (coloração picrusirius, aumento de 10X).....	56
Figura 28 - Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.....	58
Figura 29 - Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia. Predomínio de microvasos no grupo MDA no dia 3.....	59

Figura 30 - Predomínio de microvasos nos grupos MDA e FVE comparado aos grupos controle e MDA/FVE no dia 3, denotando aumento de neovascularização. Setas brancas indicando microvasos. Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50µm.....	60
Figura 31 - Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.....	60
Figura 32 – Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia. Predomínio de vasos de maior calibre no grupo MDA/FVE no dia 14.....	61
Figura 33 - Seta indicando o lúmen dos vasos sanguíneos. Presença de vasos com diâmetros maiores no grupo MDA/FVE comparado aos grupos controle, MDA e FVE . Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50.....	62
Figura 34 - Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.....	62
Figura 35 - Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia. Predomínio de vasos de maior calibre no grupo MDA/FVE no dia 21.....	63
Figura 36 - Presença de maior quantidade de vasos sanguíneos no grupo MDA/FVE quando comparado ao grupo controle, MDA e FVE no dia 21. Seta branca indicando vaso sanguíneo. Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50µm.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (μm) das feridas dos coelhos no dia 3.....	47
Tabela 2 - Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (μm) das feridas dos coelhos no dia 14.....	48
Tabela 3 - Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (μm) das feridas dos coelhos no dia 21.....	48
Tabela 4 - Médias e desvio padrão da espessura da derme (μm) das feridas dos coelhos no dia 3.....	49
Tabela 5 - Médias e desvio padrão da espessura da derme (μm) das feridas dos coelhos no dia 14.....	50
Tabela 6 - Médias e desvio padrão da espessura da derme (μm) das feridas dos coelhos no dia 21.....	51
Tabela 7 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 3.....	52
Tabela 8 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 14.....	53
Tabela 9 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 21.....	54
Tabela 10 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 3.....	54
Tabela 11 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 14.....	55
Tabela 12 - Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 21.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>Ad libitum</i>	à vontade
ANG	Angiogenina
BD	Becton-Dickinson
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
Ca²⁺	Íon cálcio
CGA	Campo de grande aumento
Capex	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CTTA	Células-tronco de tecido adiposo
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ERG	<i>Ets-Related Gene</i>
FVE	Fração Vascular Estromal
G	Força da gravidade
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGFB	<i>platelet-derived growth factor subunit B</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milímetro
®	Marca registrada

RESUMO

Introdução: Diversos métodos vêm sendo estudados para otimizar o uso da Matriz Dérmica Acelular (MDA) na cicatrização de feridas cutâneas sendo uma nova opção a Fração Vascular Estromal (FVE). **Objetivo:** Avaliar os efeitos da Fração Estromal Vascular associada à Matriz Dérmica Acelular na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos. **Método:** 24 coelhos foram distribuídos em quatro grupos (n = 6). Três feridas cutâneas de 20 x 20 mm, foram realizadas no dorso dos animais, sendo o único procedimento realizado no Grupo Controle. No grupo MDA as feridas foram cobertas com MDA. No grupo FVE foram injetadas 2×10^6 células de FVE autólogas nas margens das feridas e no grupo MDA/FVE foram injetadas células de FVE e as feridas cobertas com MDA. As feridas foram fotografadas durante 21 dias e realizada biopsias em 3, 14 e 21 dias para avaliar espessura da pele, quantificar colágeno, avaliar formação e o diâmetro dos vasos sanguíneos. **Resultados:** Não houve diferença no tempo de cicatrização entre os grupos. O grupo MDA/FVE apresentou maior espessura da derme e epiderme, maior quantidade de colágeno tipo I e III e maior número e diâmetro de vasos sanguíneos quando comparado aos grupos controle, MDA e FVE isoladamente. **Conclusão:** Fração Vascular Estromal associada à Matriz Dérmica Acelular, aumentou a vascularização, a quantidade de colágeno e a espessura da pele, durante a cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, sem alterar o tempo de fechamento das feridas.

ABSTRACT

Introduction: Several methods have been studied to optimize the use of the Acellular Dermal Matrix (ADM) in the healing of skin wounds, with a new option being the Stromal Vascular Fraction (SVF). **Objective:** To evaluate the effects of the Stromal Vascular Fraction associated with the Acellular Dermal Matrix on the healing of skin wounds in rabbits. **Method:** 24 rabbits were divided into four groups (n = 6). Three 20 x 20 mm skin wounds were performed on the animals' backs, the only procedure being performed in the Control Group. In the ADM group the wounds were covered with ADM. In the SVF group 2×10^6 autologous SVF cells were injected into the wound margins and in the ADM/SVF group, SVF cells were injected and the wounds covered with ADM. The wounds were photographed for 21 days and biopsies were performed on 3, 14 and 21 days to assess skin thickness, quantify collagen, to evaluate the formation and diameter of new vessels. **Results:** There was no difference in healing time between groups. The ADM/SVF group showed greater thickness of the dermis and epidermis, a greater amount of type I and III collagen and a greater number and diameter of blood vessels when compared to the control group, ADM and SVF alone. **Conclusion:** Stromal Vascular Fraction associated with the Acellular Dermal Matrix, increased vascularization, the amount of collagen and the thickness of the skin, during the healing of cutaneous wounds in rabbits, without changing the time of wound closure.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A pele desempenha papel importante na homeostase, proteção contra infecções, regulação térmica e balanço hídrico (CLARK, 1993). Lesões na pele afetam todas essas funções, sendo, portanto, importante para o corpo a rápida e efetiva cicatrização cutânea (YOUNG & MCNAUGHT, 2011; JESCHKE *et al.*, 2015).

A perda da integridade da pele tem sido um problema frequente e oneroso para o sistema público de saúde (NUSSBAUM *et al.*, 2018). Para a reparação funcional e estética em casos de cicatrizes patológicas, queimaduras e após perda cutânea por causas hereditárias, traumáticas ou oncológicas, existe um arsenal de procedimentos cirúrgicos incluindo transplantes autógenos, alógenos e xenógenos, bem como implantação de materiais aloplásticos. Nos últimos anos vem aumentando o interesse no campo da engenharia tecidual focado na substituição da derme, epiderme ou de toda a pele por matrizes biológicas e sintéticas (MACHENS *et al.*, 2000).

A matriz dérmica acelular (MDA) tem sido considerada um bom substituto dérmico por reproduzir muitas das características da pele, incluindo a elasticidade, resistência e barreira contra micro-organismos nas feridas (CASTAGNOLI *et al.*, 2010).

Dois tipos de substitutos dérmicos temporários têm sido mais utilizados: os de camada única, que podem ser epidérmicos ou dérmico; e os de duas camadas, que mimetizam tanto a derme quanto a epiderme. A derme presente nas matrizes pode ter origem variada, como derme humana (AlloDerm®, Cymetra®, Neoform®, DermaMatrix®, Glyaderm®), derme

porcina (Collamend®, Pemacol®, Strattice®) e derme bovina (Surgimend®, Integra®, Matriderm®, Pelnac®). No Integra® (Integra Life Sciences Corporation, Plainsboro, NJ, EUA), uma matriz de camada dupla, a membrana de colágeno bovino funciona como arcabouço para que as células migrem para seu interior e depositem uma matriz extracelular, de maneira similar a uma derme humana normal, chamada de neoderme. A camada externa constituída de uma membrana de silicone, mimetiza a epiderme humana e funciona como barreira de proteção contra a perda de líquidos e invasão bacteriana (BALASUBRAMANI, KUMAR, BABU, 2001; PHAM *et al.*, 2007).

Entretanto, o benefício clínico das matrizes dérmicas acelulares pode não ser tão efetivo quanto o esperado. Segundo EGAÑA *et al.* (2009) a baixa vascularização do leito receptor limita o fornecimento de nutrientes, de células do sistema imunológico e de oxigênio à área da ferida, dificultando assim sua integração (EGANÃ *et al.*, 2009). Autores como LIU *et al.* (2011) consideram que o baixo suprimento sanguíneo leva à diminuição da capacidade regenerativa tendo como consequência, alto índice de infecção, reação de corpo estranho e formação de cicatrizes hipertróficas.

Dado que a angiogênese tem sido considerada um componente crítico na cicatrização de feridas, estratégias têm sido empregadas para aumentar a capacidade de vascularização das matrizes dérmicas. A incorporação de fatores de crescimento angiogênicos a essas matrizes, tais como *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (YAO *et al.*, 2006), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (PIEPER *et al.*, 2002) e Angiogenina (SHI *et al.*, 2008) têm sido amplamente estudada *in vitro* e *in vivo*. No entanto, a sensibilidade de fatores de crescimento ao processamento térmico, exposição a solventes químicos e sua meia-vida curta limitam o seu uso quando testada *in vivo*. Além disso, a maioria dos estudos utilizaram esses fatores de forma isolada,

o que pode não ser suficiente para gerar efeito sobre a angiogênese (MUROHARA, SHINTANI, KONDO, 2009).

Células-tronco associadas à matriz dérmica apresentam-se como uma alternativa para otimizar a epitelização e cicatrização de feridas (SALEM *et al.*, 2009; DOORNAERT *et al.*, 2019). Porém, mais estudos pré-clínicos de segurança são necessários para sua ampla aplicação em seres humanos (LIU *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012; DOORNAERT *et al.*, 2019).

A Fração Vascular Estromal (FVE) é obtida pelo processamento com digestão enzimática do tecido adiposo, sendo uma rica fonte de células-tronco de tecido adiposo (CTTA). CTTA possuem capacidade de diferenciação em células de linhagens mesodérmicas como adipócitos, osteoblastos, condrócitos (ZUK *et al.*, 2002) e apresentam propriedades antiapoptóticas (REHMAN *et al.*, 2004), anti-oxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (KIM *et al.*, 2008). As CTTA apresentam também função angiogênica por meio da regulação da expressão dos genes angiogênicos, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *platelet-derived growth factor subunit B* (PDGFB) e *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (NAKAGAMI *et al.*, 2005). As CTTA também podem acelerar a cicatrização de feridas por meio do estímulo à síntese de colágeno pelos fibroblastos (ATALAY, CORUH, DENIZ, 2014; DOORNAERT *et al.*, 2019).

A FVE inclui células do sistema imunológico, pericitos, fibroblastos, células endoteliais e células estromais precursoras (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010; ZIMMERLIN *et al.*, 2010; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; MCINTOSH *et al.*, 2013). Recentemente foi demonstrado aumento da capacidade anti-inflamatória e pró angiogênica *in vitro* das células da FVE quando em comparação com as células expandidas

em cultura (THIRUMALA, GIMBLE, DEVIREDDY, 2010; PACHÓN-PEÑA *et al.*, 2011; BOURIN *et al.*, 2013; SHAH *et al.*, 2013). Portanto estas células têm gerado interesse devido à sua menor manipulação quando comparado à necessária para a obtenção de CTTA, já que não é necessário aguardar a expansão em cultura.

Não foi encontrado na literatura, até o momento, estudo utilizando a FVE como adjuvante da MDA. Diante da característica de estímulo angiogênico da FVE e da propriedade da MDA em facilitar a migração celular, foi idealizado a associação de ambos à fim de obter um efeito sinérgico de estímulo à vascularização otimizando, assim, o processo de cicatrização de feridas cutâneas em coelhos.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar associação da Fração Vascular Estromal e Matriz Dérmica Acelular na cicatrização de feridas cutâneas em coelhos.

LITERATURA

3. LITERATURA

YANNAS & BURKE (1980) publicaram o primeiro trabalho detalhando a metodologia de confecção de um substituto dérmico e a aplicação *in vivo*. Os autores descreveram as características físicas, químicas e mecânicas que formam a base do entendimento para produzir uma Matriz Dérmica Acelular (MDA) que são: rigidez à flexão, energia de superfície, taxa de fluxo de umidade, compatibilidade sanguínea, resistência à tração, taxa de biodegradabilidade, concentração dos metabólitos tóxicos, antigenicidade, tamanho médio dos poros e espessura. No estudo foi utilizado um *crosslinking* de colágeno e glicosaminoglicano e testado em feridas cutâneas de espessura total com dimensões de 5x6 cm localizado no dorso de 10 porcos da índia. Foi observado por avaliação visual simples que as membranas protegeram as feridas contra infecção e perda de líquidos por 25 dias, não apresentaram reação em nenhum animal e não foram necessárias trocas ou outro tipo de manipulação invasiva.

CROSS *et al.* (1995) utilizaram 34 ratos Lister e 12 porcos da índia com o objetivo de estabelecerem modelos experimentais reprodutíveis para a avaliação dinâmica da contração de feridas cutâneas. Foram estudadas feridas com dimensões de 15x15mm e 20x20mm no dorso dos animais. O cálculo da contração das feridas foi realizado por mensurações diárias das áreas em cicatrização pelo método de planimetria. Como resultado os 22 ratos Lister fêmeas, sendo 12 adultos e 10 jovens, tiveram um coeficiente de contração da ferida de 0.129 (20x20mm) enquanto os 12 ratos Lister machos, sendo 6 adultos e 6 machos, tiveram taxa de 0.103 (20x20mm) não havendo diferença estatística ($p>0.05$) entre o sexo dos animais. Comparando os resultados de ratos adultos (n=18) e jovens (n=16) esses últimos tiveram uma

taxa de contração da ferida mais lenta em comparação com ratos adultos ($p=0.0027$). Com relação ao tamanho da ferida não houve diferença na taxa de contração entre a ferida de 20x20 mm (0.129) e 15x15mm (0.128) e nos dois grupos o fechamento completo se deu em 15 dias. Os resultados com porcos da Índia quanto ao sexo, idade e tamanho das feridas seguiram o mesmo padrão encontrado com os ratos Lister. O estudo sugere que o modelo de cicatrização cutânea representada por feridas no dorso de 15x15 mm em animais como hamsters e ratos e de 20x20mm para animais como coelhos seriam um modelo reprodutível, sensível e quantificável para o estudo de contração de feridas cutâneas.

PIEPER *et al.* (2002) iniciaram os estudos de incorporação de fatores de crescimento às MDAs com objetivo de aumentar o estímulo à neovascularização das feridas cutâneas. Os autores utilizaram matrizes constituídas de colágeno bovino e heparin sulfato de 6 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura, e foram incubados por 15 min em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7.4) a 20°C. Posteriormente, 6 matrizes foram incubadas em 3 ml de PBS (pH 7.4) contendo 7µg de bFGF/ml durante 1 hora a 20°C e lavado com PBS (3 vezes por 5 min). Foram utilizados 3 ratos Oxford albinos em cada grupo, sendo um grupo controle com implante de matriz sem bFGF e outro grupo com adição de bFGF. Em cada um deles foram realizadas três incisões de espessura total no dorso dos animais distantes 1 cm à esquerda e 1 cm à direita da linha média. Punch 6 mm das matrizes foram implantadas dentro das incisões (6 implantes /rato). Implantes com tecido circundante foram colhidos no dia 2 e em 1, 2, 4, e 10 semanas após a implantação. As lâminas dos tecidos foram coradas com azul de toluidina e avaliadas por microscopia de luz. Como critério de

mensuração foi estabelecido uma graduação do número de vasos em esporádico, leve, moderado e abundante. O grupo em que foi incorporado o bFGF apresentou vascularização abundante durante todo os períodos da avaliação, já o grupo controle apresentou vascularização leve no mesmo período.

SHI *et al.* (2008) estudaram a ação da Angiogenina (ANG) quando associado à matriz porosa de colágeno e quitosana. As matrizes com diâmetro de 6 mm e a espessura de 1 mm foram incorporadas com 160ng/ml de ANG recombinante humana R&D System (Minneapolis, MN, EUA). Foram utilizados 20 coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia e realizadas duas dissecções subcutâneas em cada orelha de cada coelho. Matrizes experimentais carregadas com ANG e matrizes controles sem ANG foram implantadas em cada uma das orelhas. Cada orelha continha um pedaço de matriz experimental e um pedaço de matriz controle. Um total de 80 matrizes foram implantados. As biópsias das matrizes foram realizadas com 7, 14, 21 e 28 dias após o implante. Em cada período 5 coelhos foram eutanasiados e as amostras fixadas e coradas com hematoxilina e eosina. Em cada seção, três campos da amostra da matriz foram selecionados aleatoriamente e fotografados. Cada imagem representava aproximadamente 870 µm de largura e 695 µm de altura, e o número de vasos maduros em cada imagem foram contados. Os dados foram então analisados por microscopia de luz e apresentados como densidade do vaso (capilares/mm²). Durante todo período avaliado, o grupo experimental apresentou aumento significativo da densidade de vasos quando comparado com grupo controle. Aos 7 dias foi observado 14.9 vs 1.4 capilares/mm² (p<0.001); aos 14 dias 39.1 vs 22.2 capilares/mm² (p<0.001); aos 21 dias 59.5 vs 41.9 capilares/mm² (p<0.001) e aos 28 dias 63.4 vs 57.8 capilares/mm² (p<0.02).

SUN *et al.* (2010) utilizaram fator de crescimento nervoso (NGF) associado a uma matriz de colágeno no tratamento de úlcera isquêmica em coelhos. Foram utilizados 16 coelhos adultos machos da raça Nova Zelândia distribuídos em dois grupos sendo um controle com a utilização de matriz de colágeno e um grupo experimental utilizando NGF incorporado à matriz. Foi utilizado modelo isquêmico de lesão por meio da ligadura das artérias marginal e central da orelha dos coelhos preservando as três veias e a artéria caudal. Foram realizadas duas feridas cirúrgicas de 8 mm de diâmetro, por meio de punch até atingir a cartilagem. Em ambos os grupos, as feridas foram cobertas com matriz de colágeno (8mm de diâmetro e 0.5mm de espessura) tendo o grupo experimental, administrado 0.54 nmol de NGF por matriz. Foram feitas análises quanto ao grau de reepitelização e quanto ao número de vasos formados. Biópsias foram feitas com 3, 7, 14 e 21 dias após procedimentos e as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina. O comprimento do *gap* do epitélio foi medido usando um micrômetro de lente (Nikon Kogaku, Tóquio, Japão). O grau de reepitelização recebeu um valor percentual: 0% foi equivalente a nenhum fechamento e 100% foi equivalente ao fechamento completo da ferida. Os vasos foram contados em corte transversal das lâminas com magnificação de 200 X no microscópio de luz. Não houve diferença ($p > 0.05$) entre os grupos no dia 3, quanto ao grau de reepitelização e o número de vasos formados. No dia 7, o grupo experimental apresentou maior grau de reepitelização (33,44% vs 17,90%, $p < 0,05$) e maior formação de novos vasos (23.8 vs 10.0, $p < 0.01$). No dia 14 o grupo experimental manteve a tendência de maior grau e reepitelização (39.54% vs 28.29%, $p < 0.050$) e maior formação e vasos (80.0 vs 11.8, $p < 0.01$). Com 21 dias a análise estatística revelou aumento significativo no grau de reepitelização no grupo experimental (81.35% vs 48.96%, $p < 0.05$). Concluíram que o uso de NGF associado à matriz acelerou a reepitelização dérmica e a formação de novos vasos sanguíneos.

MAZZETTI *et al.* (2010) estudaram coelhos como modelo experimental na obtenção de gordura, para extração de células tronco de tecido adiposo (CTTA). Utilizaram 10 coelhos machos, adultos com peso médio de 3,5 Kg da raça Nova Zelândia. Foram removidos os panículos adiposos da região interescapular por lipectomia. Os panículos foram fragmentados e lavados com PBS e, posteriormente, dissociados enzimaticamente com tripsina/ EDTA. As células extraídas do pânículo adiposo foram incubadas em meio de cultura DMEM e após 20 dias, foi realizada uma análise quantitativa da adesão de primeira e segunda passagem das células mesênquimais em garrafas de cultura. Foram extraídas $1,62 \times 10^6$ células/ml células totais de gordura com 98% de viabilidade. As células foram cultivadas e após 20 dias, foi realizada a primeira passagem sendo quantificadas $2,88 \times 10^6$ CTTA/ml. Na segunda passagem foi obtido $4,28 \times 10^6$ CTTA/ml. Concluíram que o tecido adiposo da região interescapular do coelho obtido por lipectomia foi fonte de CTTA.

LIU *et al.* (2011) estudaram o efeito de CTTA associadas a MDA em feridas cutâneas de ratos. Foram utilizados 14 ratos fêmeas C5BL/6 submetidos a ferida de espessura total com punch de 10 mm de diâmetro na região dorsal, sendo um grupo coberto por MDA e o outro MDA associado a CTTA. As CTTA foram extraídas da gordura inguinal dos ratos e foram caracterizadas por análise de citometria de fluxo. Foram implantadas 2×10^4 células/cm² nas MDA do grupo experimental. Para avaliar a taxa de cicatrização da ferida foram realizados registros fotográficos com câmera digital no dia da cirurgia e após 1, 2 e 3 semanas, as imagens foram analisadas pelo programa Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). Para a mensuração da densidade de microvasos foi utilizado microscopia confocal

e feita análise por imunofluorescência de células endoteliais marcadas com anticorpo anti-CD31. Com relação à taxa de cicatrização houve diferença estatística na primeira semana sendo maior no grupo CTTA/MDA ($p < 0.05$) porém na segunda e terceira semanas não houve diferença entre os grupos ($p > 0.05$). Na terceira semana o grupo experimental apresentou maior densidade de microvasos por campo de grande aumento (17.5 vs 7.5 $p < 0.01$). Concluiu-se que CTTA pode ser usada como uma fonte de células para aumentar a vascularização de feridas cutâneas tratadas com MDA.

NIE *et al.* (2015) avaliaram o potencial da MDA como meio de transporte para CTTA e seus efeitos terapêuticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. Foram utilizados 36 ratos Sprague-Dawley com peso médio de 200-250 g e realizado indução diabética com injeção intraperitoneal de Streptozotocin (STZ; Sigma, St. Louis, MO, USA). Para a preparação do composto MDA/CTTA foram utilizados punch de 8 mm para obtenção de MDA de mesmo tamanho e em seguida foram adicionados 1×10^6 CTTA suspensas em 1 mL de DMEM e deixados em cultura por 48 horas. Foram realizadas 2 feridas de 8 mm no dorso de cada animal e na sequência os 36 ratos foram divididos em três grupos; grupo controle, grupo MDA e grupo MDA/CTTA. Para avaliar a taxa de cicatrização foram realizadas fotografias digitais nos dias 0, 3, 7, 10, 14, 21 e 28 e as imagens foram analisadas e as áreas calculadas pelo programa Sigma Scan Pro Image (NJ, USA). Para determinar a densidade capilar foram utilizadas biópsias do dia 7 e 14 e realizado marcação por imunofluorescência com anticorpo anti-CD31. Com relação à cicatrização o grupo MDA/CTTA apresentou diferença estatística ($p < 0.05$) com relação ao grupo controle e ao grupo MDA e teve a cicatrização acelerada nos dias 7, 10 e 14. O tempo médio de cicatrização completo das feridas foram: grupo MDA/CTTA (13 +/- 0.37 dias), grupo MDA (20 +/- 0.71 dias) e no grupo controle (27 +/- 0.44 dias).

Com relação à densidade capilar, houve aumento significativo ($p < 0.05$) no grupo MDA/CTTA quando comparado ao grupo controle e ao grupo MDA, embora não tenha sido detectado diferença entre esses últimos dois grupos. Os autores concluíram que a administração de CTTA em MDA acelerou a cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos.

SUN *et al.* (2017) avaliaram os efeitos terapêuticos de um gel constituído de fração vascular estromal e matriz extracelular injetável (MEC/FVE-gel) para cicatrização de feridas cutâneas em camundongos. A gordura foi obtida de uma paciente por meio de lipoaspiração abdominal com cânula multi-perfurada de 3 mm e a seguir centrifugada por 3 min a 1200 g. Após, foi realizado a emulsificação mecânica por alternância entre duas seringas de 10 ml conectadas por um conector fêmea Luer-Lok com diâmetro interno de 2,4 mm por 1 min (10 ml/s). Obtido o emulsificado, a amostra foi novamente centrifugada a 2000 g por 3 min e então obtido o MEC/FVE-gel. Foram utilizados 56 ratos nude e duas feridas de espessura total foram realizadas com punch de 6 mm no dorso de cada um dos animais. Os animais foram divididos em grupo tratado com MEC/FVE (injeção de do MEC/FVE-gel nos quatro quadrantes da lesão, $n=18$), grupo tratado com FVE ($n=18$) e grupo controle (injeção de PBS, $n=18$). A injeção local de MEC/FVE e da suspensão celular da FVE continham o mesmo número de células (2×10^4). A área da ferida foi fotografada com uma câmera digital e quantificada usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Foram realizadas biópsias das lesões nos dias 2, 4, 7, 10 e 14 e as amostras embebidas em parafina para coloração de H&E. A vascularização da pele foi avaliada por contagem de capilares em 8 campos por lâmina. Foram feitas análises séricas nos animais do grupo MEC/FVE e FVE nos mesmos períodos quantificando a expressão de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *basic fibroblast growth factor* (bFGF). A cicatrização das feridas foi significativamente mais rápida

com a injeção de MEC/FVE-gel comparada com a suspensão de células de FVE e o controle com PBS no dia 7 ($p < 0.05$). No dia 14, o MEC/FVE-gel alcançou a cicatrização completa, o que não foi alcançado pelos outros grupos ($p < 0.05$). O nível de expressão do VEGF atingiu o pico no dia 7 e foi maior no tratamento com MEC/FVE-gel do que no grupo tratado com FVE em todos os períodos avaliados. A expressão do bFGF atingiu pico no dia 4 no grupo tratado com MEC/FVE-gel e foi maior do que no grupo tratado com FVE entre os dias 2 e 10 ($p < 0.05$) não apresentando diferença no dia 14 ($p > 0.05$). O estudo concluiu que o efeito terapêutico do MEC/FVE-gel é atribuído à secreção de fatores angiogênicos e ao estímulo à vascularização.

KARAGERGOU *et al.* (2018) investigaram o efeito direto de FVE injetado por via intradérmica em feridas cutâneas de espessura total em modelo murino. 18 ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (A, B e C) de acordo com o dia da eutanásia (7, 16 e 21 dias). Foi utilizada gordura inguinal unilateral de cada animal e a FVE extraída enzimaticamente. Foram realizadas 2 feridas cutâneas de espessura total de 1 cm de diâmetro em cada um dos lados no dorso dos animais; A FVE foi injetada intradérmicamente em 8 pontos na periferia das lesões do lado tratado enquanto a ferida contralateral serviu como controle recebendo solução salina isotônica. No pós-operatório, a avaliação da cicatrização foi realizada por planimetria (porcentagens de contração da ferida, epitelização e cicatrização total das feridas) nos dias 0, 3, 5, 7, 10, 13, 16 e 21 e a histologia e imuno-histoquímica (índice de infiltração celular, índice de produção de colágeno, neoangiogênese e espessura epitelial) nos dias 7, 16 e 21. Apesar da alta taxa de contração da ferida, foi significativamente menor nas feridas tratadas com FVE no dia 21 ($p = 0.037$). Nos dias 13, 16 e 21, as porcentagens de epitelização foram maiores nas feridas tratadas com FVE em comparação

com as feridas controle ($p = 0.026$, $p = 0.048$ e $p = 0,05$, respectivamente) e a taxa de cicatrização final no 21 dia não houve diferença entre os grupos. Histologicamente, o número de novos vasos foi significativamente maior nas feridas tratadas com FVE nos dias 7 ($p = 0.028$) e 16 ($p = 0.027$), porém no dia 21 não houve diferença estatística ($p = 0.08$). Esses resultados foram confirmados por imuno-histoquímica. Não foram encontradas diferenças significativas entre feridas tratadas e controle em relação ao índice de infiltração celular, índice de produção de colágeno e espessura epitelial. O estudo conclui que a FVE injetada na derme aumenta a angiogênese e melhora a epitelização em feridas cutâneas de espessura total em ratos.

DOORNAERT *et al.* (2019) avaliaram a compatibilidade do enxerto de CTTA xenógenas de origem humana implantados em MDA humana Glyaderm® (Euro Skin Bank, Beverwijk, Holanda) quando aplicada em feridas cutâneas de camundongos. A amostra de gordura foi obtida por lipoaspiração abdominal de uma única paciente utilizando cânula de 3 mm. As células estromais foram isoladas e cultivadas e os discos de Glyaderm® medindo 8 mm receberam cada um a implantação de 10^5 CTTA, as quais permaneceram por 5 dias nos discos antes das cirurgias. Foram utilizados 15 camundongos nude (BALB/c-nude; Envigo, Huntingdon, Reino Unido) e em cada animal foram realizadas duas feridas cutâneas de espessura total utilizando punch de 8 mm. A lesão à esquerda foi coberta com Glyaderm® e a lesão da direita com Glyaderm® associada à CTTA com o lado das células voltado para a ferida. Para avaliar a cicatrização, os animais foram eutanasiados no dia 3 ($n=5$), dia 7 ($n=5$) e dia 12 ($n=5$) e as lesões foram biopsiadas. As amostras foram coradas com H&E e avaliadas com microscópio de luz. Para avaliar o grau de reepitelização foram captadas imagens das feridas por microscopia digital e feita a medição e planimetria

da área da ferida utilizando o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). Para avaliar a formação de novos vasos foi utilizado marcação imunohistoquímica com *Ets-Related Gene* (ERG). O número de vasos sanguíneos foi quantificado em 4 áreas de campo de grande aumento (CGA) não consecutivas para cada ferida. No terceiro dia pós-operatório não houve diferença de reepitelização entre os grupos (30.6 ± 15.6 vs. $20 \pm 7\%$; $p = 0.068$). No dia 7, a área reepitelizada no lado direito foi maior (43.8 ± 5 vs. $34.2 \pm 2.3\%$; $p = 0.0039$). No dia 12, a reepitelização no lado direito voltou a aumentar significativamente (87.7 ± 1.5 vs. $75.5 \pm 5.5\%$; $p = 0.0046$). Com relação à formação de novos vasos houve um número significativamente maior sob a MDA no lado direito comparado com o esquerdo no dia 3 (5.5 ± 0.15 vs. 2.34 ± 0.89 por CGA; $p = 0.043$) e no dia 7 (21.1 ± 25.3 vs. 7.3 ± 0.29 por CGA; $p = 0,043$). No dia 12, não houve diferença estatística, sendo observado uma tendência à maior vascularização do lado esquerdo (11.6 ± 3.1 vs. 16.7 ± 0.14 por CGA; $P = 0.066$). O estudo conclui que o Glyaderm® mostrou-se um transportador eficaz para CTTA e que no modelo murino imunodeficiente a combinação de MDA e CTTA acelerou a reepitelização da ferida cutânea em ratos.

MÉTODO

4. MÉTODO

4.1 DESENHO DE PESQUISA

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro* e *in vivo*, primário, intervencional, analítico, prospectivo, longitudinal, comparativo e realizado em centro único no Laboratório de Cultura de Células e Engenharia Tecidual- UNIFESP, coordenado pela Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UNIFESP sob número 9824290116 (Apêndice 1) e obedeceu ao *check list* do *Guideline The ARRIVE* (KILKENNY *et al.* 2012) para estudos em animais bem como os critérios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 AMOSTRA

4.2.1 Animais

Foram utilizados 24 coelhos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), machos, adultos, com peso variando entre 2.700 e 3.250 g, oriundos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente com temperatura controlada entre 18° e 20°C, com ciclo de claro e escuro de 12 horas e foram alimentados *ad libidum*, conforme

especificações do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UNIFESP. Todos os animais foram pesados antes e ao término da pesquisa (Fig. 8)

4.2.2 Tamanho da amostra

Para realizar o cálculo amostral foi necessário obter os valores do desvio padrão, baseado no desfecho primário do estudo, além do valor de α e o poder do teste desejado. Utilizou-se como desfecho primário, a velocidade de cicatrização da ferida e com base em estudos prévios utilizando a mesma metodologia estimou-se que o desvio padrão do percentual de cicatrização cutânea em coelhos fosse de 10% (TAMRI, HEMMATI, BOROUJERDIA, 2014). Foi utilizado teste para avaliações múltiplas ANOVA e através do *software* SPSS considerando um nível de significância de 0.05 e um poder de teste de 80% estimou-se que seriam necessários seis animais em cada grupo, totalizando 24 animais.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos, contendo seis animais cada:

Grupo Controle: feridas sem nenhuma intervenção;

Grupo MDA: feridas cobertas com MDA;

Grupo FVE: feridas e administração de FVE

Grupo MDA e FVE: Feridas e administração de FVE e coberta com MDA.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

4.3.1 Feridas cutâneas

Em todos os procedimentos operatórios, os animais foram colocados em bancada cirúrgica em decúbito ventral. A indução de anestesia geral foi realizada com administração de solução contendo 80% de cetamina (40

mg/kg) e 20% de xylazina (5mg/kg) via intramuscular em região posterior da coxa.

Após a tricotomia do dorso com tricótomo elétrico Philips Multigroom QG3339, três feridas cutâneas de espessura total foram feitas nos animais, de acordo com o método de CROSS *et al* (1995). Uma placa metálica de 20 x 20 mm foi utilizada como molde padrão para a realização das marcações, nos locais onde seriam feitas lesões. Duas marcações foram realizadas na região dorsal, 20 mm caudal ao ângulo da escápula e 20 mm lateral à linha sagital mediana (feridas A e B) (Figura 1). A terceira marcação distava 40 mm caudal à ferida da esquerda do animal e 20 mm lateral à linha sagital dorsal (ferida C) (Figura 1).

Foram colocados campos estéreis após antissepsia com clorhexidina alcoólica a 2%. A seguir foi realizada anestesia local com Lidocaína 2% no plano subcutâneo em toda a área de incisão e confeccionadas três feridas (A, B e C) quadrangulares de 20 x 20 mm por meio de excisão da pele em sua espessura total até o plano subcutâneo com bisturi lâmina número 15, seguida de hemostasia utilizando gazes estéreis ou pinça Kelly curva quando necessário (Figura 2). O controle trans-operatório dos animais se deu por observação clínica dos movimentos respiratórios, pela expansão torácica e da reação motora dos mesmos, sendo acompanhado por médico veterinário em todo período.

Foi realizado o curativo oclusivo com adesivo transparente Tegaderm (3 M, St.Paul, MN, EUA) e permaneceu nas primeiras 24 horas. No pós operatório imediato os animais receberam analgésico via subcutânea (Tramadol – 2 mg/Kg dose única) e antibiótico via intramuscular (Enrofloxacina – 5mg/kg dose única).

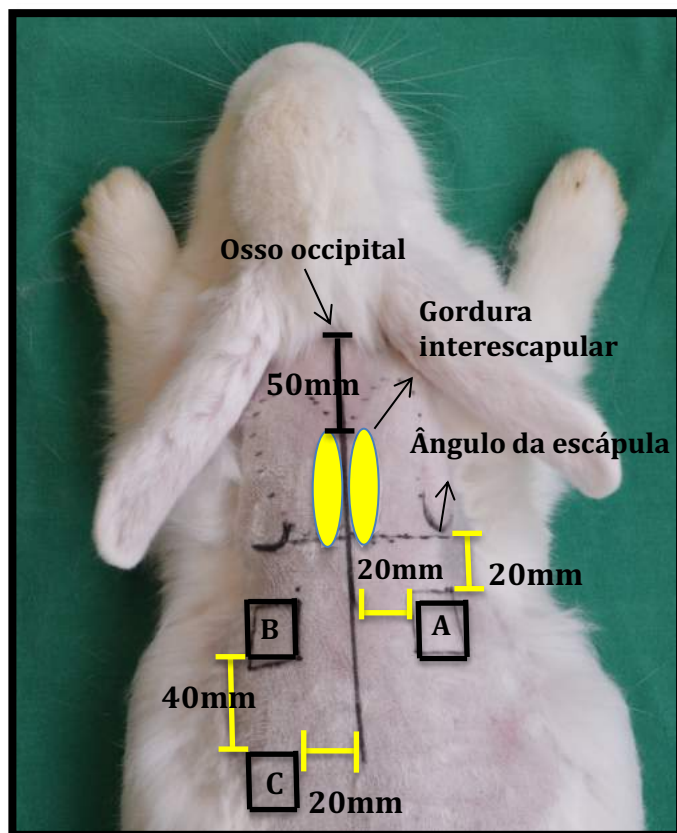


Figura 1 – Demarcação dos pontos de referência das feridas cirúrgicas (A, B e C) e da gordura interescapular.



Figura 2 – Ferida cutânea de espessura total

4.3.2 Obtenção do tecido adiposo

O tecido adiposo interescapular foi retirado dos animais de todos os grupos e acessado por meio de uma incisão longitudinal de 30 mm localizada na linha sagital mediana entre os dois compartimentos da gordura interescapular estando 50mm caudal ao osso occipital, em todos os animais (Figura 3). A seguir foi realizada a dissecação da gordura com pinça de Adson com dente e tesoura de íris, hemostasia e retirada de todo tecido (Figura 4). A incisão da pele foi suturada com nylon 4-0 com cinco pontos separados distando 6 mm entre os mesmos, distribuídos ao longo da incisão. Toda gordura retirada foi pesada em Balança de precisão (Shimadzu, AYU 224, Tokyo, JPN) e seus dados tabulados (Apêndice 3).

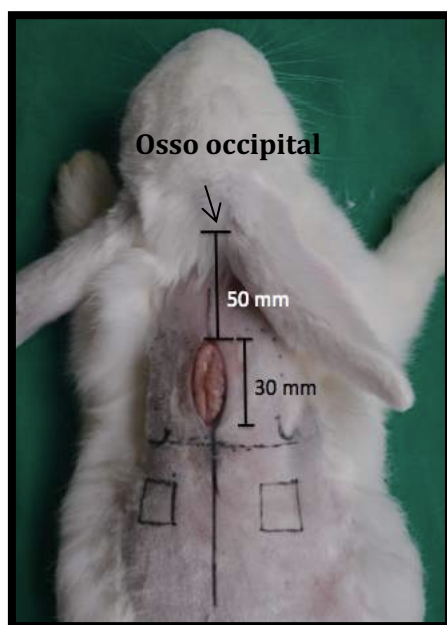


Figura 3- Incisão sagital posterior de 30 mm de comprimento distando 50 mm da região occipital. Gordura interescapular dissecada.



Figura 4- Gordura interescapular do coelho dissecada

4.4 ISOLAMENTO DA FVE

Apenas nos grupos FVE e MDA/FVE a gordura interescapular ressecada foi processada. A obtenção da FVE seguiu o Protocolo de Processamento do Tecido Adiposo para Obtenção da FVE (Apêndice 4) e (Figura 5). A gordura obtida foi transferida em tubo cônico (Corning®, NY, EUA) estéril de 15ml para o laboratório para pesagem em balança de precisão (Shimadzu, AX 200, Tokyo, Japão). A seguir foi realizada lavagem da amostra com solução pré-aquecida a 37⁰C de solução de PBS na proporção de 2:1 e levada para manipulação de forma estéril em cabine de fluxo laminar (Class IIA B3, Forma Scientific, MN, EUA). A gordura lavada foi colocada sobre a placa de petri e realizada fragmentação mecânica da mesma com tesoura de íris. Para a digestão enzimática foi utilizada colagenase tipo I a 0,1% preparada no momento do processamento (1mg de

colagenase tipo I para 1ml de tecido) e colocado em incubadora/agitadora (Tecnal, TE-420, SP, Brasil) a 37°C por 30min. Após esse período, o material digerido foi centrifugado a 1300rpm (Centrífuga Excelsa II – Fanem - 206BL, GRU, Brasil) por 5 minutos. Após, a solução foi ressuspensa e movimentada na agitadora (Vortex-Genie 2 – *Scientific Industries*, NY, EUA) e repetida a centrifugação com semelhante rotação e tempo. A seguir foi realizada a aspiração do sobrenadante e coletada a FVE, representada pelo precipitado celular, que foi removida e resuspendida em 5 ml de PBS passado através de um filtro celular de poros de 100 µm (Corning; Corning, NY, EUA). O número de células da FVE (células/ml) foi determinado por contador automático (Contess – Thermo Scientific, FL, EUA) (Apêndice 5), após técnica de exclusão por Azul de Tripán (10µl suspensão celular com 10µl azul de tripan).

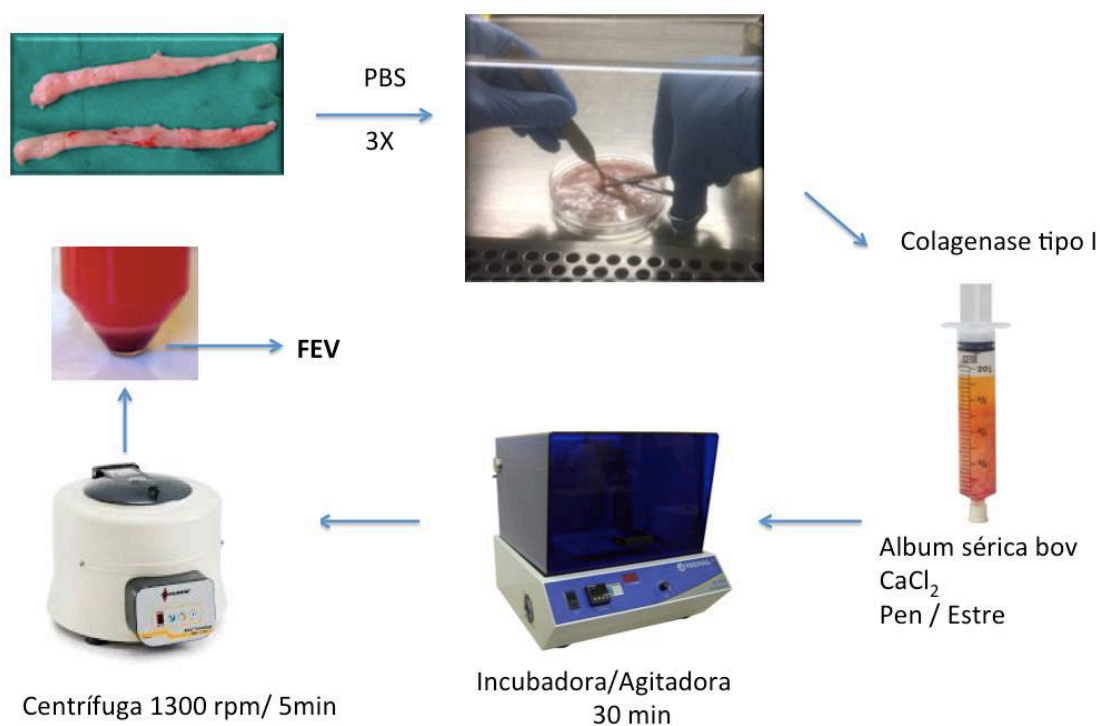


Figura 5 – Processo de obtenção da FVE (Fração Vascular Estromal).

4.5 GRUPOS DO ESTUDO

GRUPO CONTROLE

Após realizados os procedimentos cirúrgicos conforme item 4.3.1 as feridas dos animais não sofreram nenhuma intervenção sendo observado a cicatrização por segunda intenção (Figura 2). Foi realizado o curativo oclusivo com adesivo transparente Tegaderm (3 M, St.Paul, MN, EUA) que permaneceu por um dia. No pós-operatório imediato os animais receberam analgésico via subcutânea (Tramadol – 2 mg/Kg dose única) e antibiótico via intramuscular (Enrofloxacina – 5mg/kg dose única.)

GRUPO MDA

Após realização das feridas cirúrgicas conforme item 4.3.1, as mesmas foram cobertas com MDA Integra® (Integra Life Sciences Corporation, Plainsboro, NJ, EUA). Uma MDA de 10 x 25 cm foi imersa em solução fisiológica 0,9% estéril por dez minutos para reidratação. Após esse período, um fragmento quadrangular de MDA de 400mm² foi cortado com tesoura estéril e colocado na área receptora (ferida). A seguir, a MDA foi fixada às margens da ferida por meio de pontos separados de nylon 4.0 distribuídos nos pontos médios dos quatro lados e nos quatro ângulos totalizando oito pontos de fixação (Figura 6). Foi realizado o curativo oclusivo com adesivo transparente Tegaderm (3 M, St.paul, MN, EUA) que permaneceu por um dia. No pós-operatório imediato os animais receberam analgésico via subcutânea (Tramadol – 2 mg/Kg dose única) e antibiótico via intramuscular (Enrofloxacina – 5mg/kg dose única).

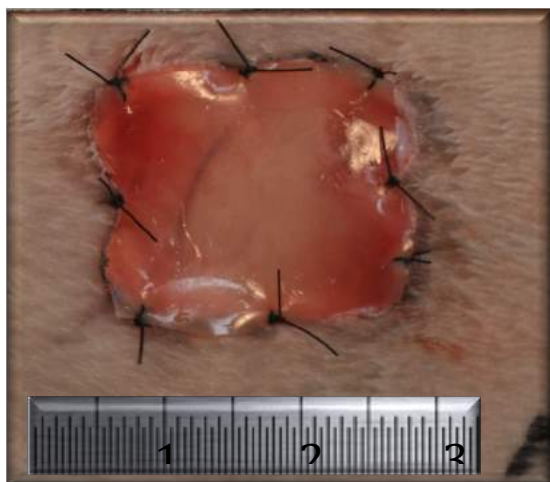


Figura 6 – MDA de 20x20 mm sobre a ferida cirúrgica e fixada à pele com 8 pontos separados

GRUPO FVE

Após coleta do tecido adiposo interescapular e extração da FVE autóloga (protocolo no item 4.4) essa foi diluída em solução de PBS e colocada em seringa de 1 ml acoplado a uma agulha hipodérmica 13x0,45mm (26Gx1/2). A injeção intradérmica de 1 ml de FVE (média de 2×10^6 células) por ferida foi realizada e distribuída em oito pontos (dois pontos por lado do quadrado) a 2 mm das margens da ferida (Figura 7).

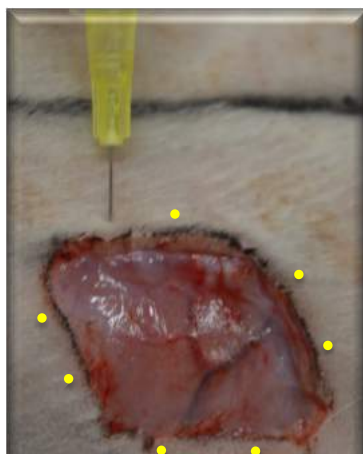


Figura 7 – Infiltração intradérmica da FVE a 2 mm da margem da ferida em oito pontos (dois pontos em cada margem).

Foi realizado o curativo oclusivo com adesivo transparente Tegaderm (3 M, St.paul, MN, EUA) que permaneceu por um dia. No pós operatório imediato os animais receberam analgésico via subcutânea (Tramadol – 2 mg/Kg dose única) e antibiótico (Enrofloxacina – 5mg/kg dose única).

GRUPO MDA e FVE

Após coleta do tecido adiposo interescapular e extração da FVE (protocolo no item 4.4) a mesma foi diluída em solução de PBS e colocada em seringa de 1 ml acoplado a uma agulha hipodérmica 13x0,45mm (26Gx1/2). A injeção intradérmica de 1 ml de FVE (média de 2×10^6 células nucleadas viáveis) foi realizada e distribuídas em oito pontos (dois pontos por lado do quadrado) a 2 mm da margem da ferida (Figura 7).

Após a infiltração de FVE as feridas dos animais foram cobertas com MDA Integra® (Life Sciences Corporation, Plainsboro, NJ, EUA). Uma MDA de 10 x 25 cm foi imersa em solução fisiológica 0,9% estéril por dez

minutos para reidratação. Após esse período, um fragmento quadrangular de MDA de 400mm² foi colocado na área receptora e fixado à margem da ferida por meio de pontos separados de nylon 4.0 distribuídos nos pontos médios dos quatro lados e nos quatro ângulos totalizando oito pontos de fixação (Figura 6) Foi realizado o curativo oclusivo com adesivo transparente Tegaderm (3 M, St.Paul, MN, USA) que permaneceu por um dia. No pós-operatório imediato os animais receberam analgésico via subcutânea (Tramadol – 2 mg/Kg dose única) e antibiótico via intramuscular (Enrofloxacin – 5mg/kg dose única).

4.6 TAXA DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA

Diariamente, o registro fotográfico da ferida C (Figura 1) de cada animal foi realizado com Câmera digital Nikon D3200 fixada por um tripé articulado, posicionada a 35 cm das mesmas e com iluminação por Flash em modo automático. Todas as imagens foram obtidas com uma régua milimetrada adjacente à ferida para calibração de proporção e padronização permitindo, assim, as análises quantitativas subsequentes. As imagens foram enviadas ao programa Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) e a aferição da área da ferida, caracterizada pela área cruenta, foi realizada por um avaliador independente e cego com relação ao grupo. A medida final da área em cada dia era determinada pela média aritmética de cinco aferições.

Foi utilizado o seguinte cálculo para estimar a taxa de cicatrização da ferida:

$$\frac{\text{Área inicial da ferida} - \text{Área da ferida no dia}}{\text{Área inicial da ferida}} \times 100$$

4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Foram realizadas, sequencialmente, em cada animal, biópsias excisionais com margem de 2 mm obedecendo à seguinte ordem: Após 3 dias do início do experimento, a ferida A de todos os animais foram excisadas e biopsiadas e a seguir realizado fechamento primário com nylon 4.0. Após 14 dias a ferida B de todos os animais foram excisadas e biopsiadas e a seguir realizado fechamento primário com nylon 4.0. E após 21 dias foi realizado a eutanásia dos animais e a seguir excisadas e biopsiadas as lesões C de cada animal. A parte da amostra coletada escolhida para análise foi a região periférica e caudal das feridas, sendo suas amostras encaminhadas ao Laboratório de Histologia da UNIFESP e para o INFAR - Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular da UNIFESP para preparo das peças e as análises dos parâmetros de cicatrização e angiogênese. Em todos os procedimentos os animais foram anestesiados conforme protocolo de anestesia (semelhante ao item 4.3). Logo após a retirada das amostras as mesmas foram divididas transversalmente em dois fragmentos de forma aleatória: Fragmento 1 – fixados com Formaldeído 10% para estudo da histologia e Fragmento 2- fixado com Formaldeído a 4% para análise imuno-histoquímica.

4.7.1 HISTOLOGIA

Foi utilizada a microscopia de luz (Nikon Ti-U, Nikon Instruments INC, NY, EUA) para avaliação histomorfométrica com hematoxilina e eosina (H&E). Para a quantificação de colágeno tipo I e tipo III, foi utilizado o corante picrosirius. As amostras foram analisadas por um observador

independente e cego quanto ao grupo usando o software AxioVision 4.2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemanha).

4.7.1.1 PREPARAÇÃO PARA COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA (H&E) e PÍCRO-SÍRIUS

Os fragmentos 1 de cada amostra de cada coelho, após a fixação em Formaldeído a 10% foram lavadas em água corrente para, em seguida, serem desidratadas em soluções crescentes de álcool etílico a 70% e 90%, por uma hora em cada solução. Em seguida, passaram por seis banhos de uma hora cada na solução de álcool absoluto. As amostras foram diafanizadas passando por duas imersões de xilol puro, sendo a duração de cada imersão de uma hora cada.

As amostras foram retiradas do xilol e passaram por dois banhos de parafina líquida (60⁰C) de uma hora cada. Durante a segunda imersão de parafina, as peças foram levadas para a central de inclusão para o material ser incluído em parafina. Após a inclusão, os blocos estavam prontos para os cortes histológicos.

As amostras inclusas nos blocos de parafina foram cortados longitudinalmente em cortes de 5 µm utilizando micrótomo (Leica, RM2125, NC, Alemanha)

Cada lâmina histológica foi montada com uma série de três cortes consecutivos de amostra e cada grupo de animais foi representado por seis lâminas histológicas.

Os cortes foram montados em lâminas histológicas sem cobertura por lamínulas ou coloração. Após serem montadas, todas as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas novamente.

As lâminas com cortes de 5 μm encaminhadas para coloração histoquímica foram previamente desparafinizadas com xilol em três banhos de cinco minutos e hidratadas com concentrações decrescentes de álcool 100%, 95%, 80%, 70% e água.

Para a coloração em H&E, as lâminas permaneceram 20 minutos imersas em Hematoxilina de Harry's; em seguida foram lavadas em água corrente. Após, foram lavadas por cinco segundos com diferenciador para hematoxilina, novamente em água corrente por duas vezes em solução amoniacal por um minuto e em água corrente.

Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em Eosina 1% em álcool 95% por cinco a sete minutos. Foi realizada bateria de montagem: duas vezes em álcool 95%, três vezes em álcool 100% e três vezes em xilol. A montagem foi efetuada em meio permanente Ervmount.

Para a coloração em Picrosirius após hidratação, as lâminas foram colocadas em ácido pícrico saturado por 15 min, sendo lavadas em água corrente e recebendo um banho de água destilada. Na sequência deste processo, foram imersas em solução de picrosirius por um período de uma hora.

Novamente hidratadas, as lâminas passaram por quatro banhos de álcool e quatro banhos de xilol e por fim a montagem foi efetuada em meio permanente Ervmount.

4.7.1.2 HISTOMORFOMETRIA

A espessura das secções coradas com H&E foram medidas por meio de imagens obtidas com equipamento de captura de imagem. As imagens foram obtidas com uma câmera de alta resolução (AxioCam - Carl Zeiss) acoplada a um microscópio Zeiss E200 LED (Carl Zeiss) que transmitiu as

imagens para um computador Pentium 4 (Microsoft, NY, EUA) com 502 megabytes de memória RAM trabalhando na plataforma Windows XP Professional. O software AxioVision Rel 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemanha) foi utilizado para as medições da espessura da pele. Foi padronizado com uma escala milimetrada (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) para os diversos fins utilizados (4, 10, 40X). Este procedimento foi realizado e utilizado a média das cinco medidas epidérmicas de cada peça limitada pela face inferior da camada basal e a face mais externa do estrato granuloso em diferentes seções da mesma placa.

O mesmo procedimento foi realizado para determinar a espessura dérmica. O limite superior foi a face inferior da camada basal e o limite inferior foi o tecido adiposo.

4.7.1.3 QUANTIFICAÇÃO DO COLÁGENO

O tecido corado em picrosirius foi analisado em microscopia de luz polarizada (Nikon, Eclipse E800, Melville, NY, EUA), quanto a presença de fibras colágenas tipo III (finas), polarização em verde, e tipo I (espessas), polarização em vermelho. Em todas as lâminas, foram quantificadas as fibras colágenas em áreas iguais por corte histológico, obtida pela digitalização da imagem de 10 campos de área.

As áreas correspondentes a cada polarização foram somadas por lâmina e calculada a densidade de cada tipo de polarização em relação à área total analisada. A análise foi realizada com auxílio de sistema de análise de imagens Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os resultados foram expressos em densidade média dos dois diferentes tipos de fibras colágenas.

4.7.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os fragmentos 2 de cada amostra de cada coelho, foram imersos em solução fixadora de paraformaldeído 4% por 12 horas a 4°C.

No dia seguinte, os tecidos foram lavados com PBS e emblocados em solução de Tissue-Tek (Tissue Tek, Sakura Finetek Inc, Alphen Rijn, Holanda) e armazenados no freezer a -80°C. Para obtenção dos cortes histológicos, os blocos contendo os tecidos foram previamente aquecidos a -20°C, dentro do equipamento criostato. A seguir os cortes histológicos foram seccionados com 8 µm de espessura neste mesmo equipamento e coletados em lâminas silanizadas.

Para a marcação do ácido hialurônico, colágeno e versicam, pelo método de imunofluorescência, as lâminas contendo os cortes foram previamente lavadas com PBS para retirada do Tissue-Tek, e os mesmos submetidos às incubações seguintes. Os tecidos foram incubados por 10 minutos com uma solução de glicina (PBS contendo 0,1M de glicina) e mantidos por uma hora em temperatura ambiente com a solução bloqueadora (PBS contendo 0,02% de saponina e 5% de soro fetal bovino). Após este período, os tecidos foram incubados (12 horas) a 4°C com os anticorpos primários anti-versicam (Santa Cruz Biothechnology, Dallas, EUA), e com a proteína de ligação conjugada com biotina (produzido no laboratório de biologia molecular, INFAR) para detecção de ácido hialurônico nas amostras. Os anticorpos e a proteína de ligação com afinidade para o ácido hialurônico, foram diluídos (1:100) numa solução de PBS contendo 0,02% de saponina e 1% de albumina de soro bovino.

No dia seguinte, os tecidos foram lavados três vezes com a solução de PBS e incubados por uma hora e meia com os respectivos anticorpos secundários. Para detecção de versicam foi utilizado anti-rabbit Alexa flúor

594 (Abcam, NJ, EUA) e para detecção de ácido hialurônico foi utilizado streptoadivina conjugada com fluoróforo 594. Em seguida, os tecidos foram lavados duas vezes com PBS, e o núcleo das células marcados com DAPI por 30 minutos em temperatura ambiente (diluído 1:10000 em PBS contendo 0,02% de saponina).

Por fim, os tecidos foram lavados uma vez com PBS, embebidos com o meio de montagem não fluorescente (Fluoromount G - Electron Microscopy Sciences, NY, EUA) e as lâminas foram então seladas com lamínulas finas de vidro.

As imagens foram capturadas utilizando o microscópio confocal (Leica TCS SP8, Cologne, Alemanha) equipado com uma objetiva plana-apocromática de 40x com imersão em óleo. As imagens foram representadas na intensidade máxima de projeção correspondendo à soma dos planos das imagens confocais (*z-series*).

A partir das imagens obtidas pela microscopia confocal, foi realizada a contagem do número e do diâmetro dos vasos sanguíneos. Foi considerado microvascularização, os vasos com diâmetro menor que 0.05 mm ou 0.002 polegadas. A contagem foi obtida por meio de 20 imagens de cada lâmina. Utilizou-se o software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA) após montagem das imagens utilizando o Photoshop CS6.

4.8 MORTE INDOLOR INDUZIDA

No último procedimento com 21 dias, antes de se retirar as amostras, os animais foram eutanasiados de forma indolor. O procedimento foi realizado de acordo com as normas do Protocolo de Eutanásia do Laboratório

de Cultura de Células e Engenharia Tecidual da Cirurgia Plástica – UNIFESP e especificações do CEP/CEUA da UNIFESP, bem como as diretrizes do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Foi realizada injeção intra-cardíaca de xylazina na dose de 15mg/kg após sedação dos animais de forma semelhante à da anestesia geral. A confirmação da morte do animal foi realizada por meio de exame físico específico, onde foram avaliados movimentos respiratórios da caixa torácica, ausência de sinais de respiração, perda de movimentos músculo-esqueléticos, ausência de batimentos cardíacos, perda de coloração das membranas mucosas, perda do reflexo corneano e umidade da córnea.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

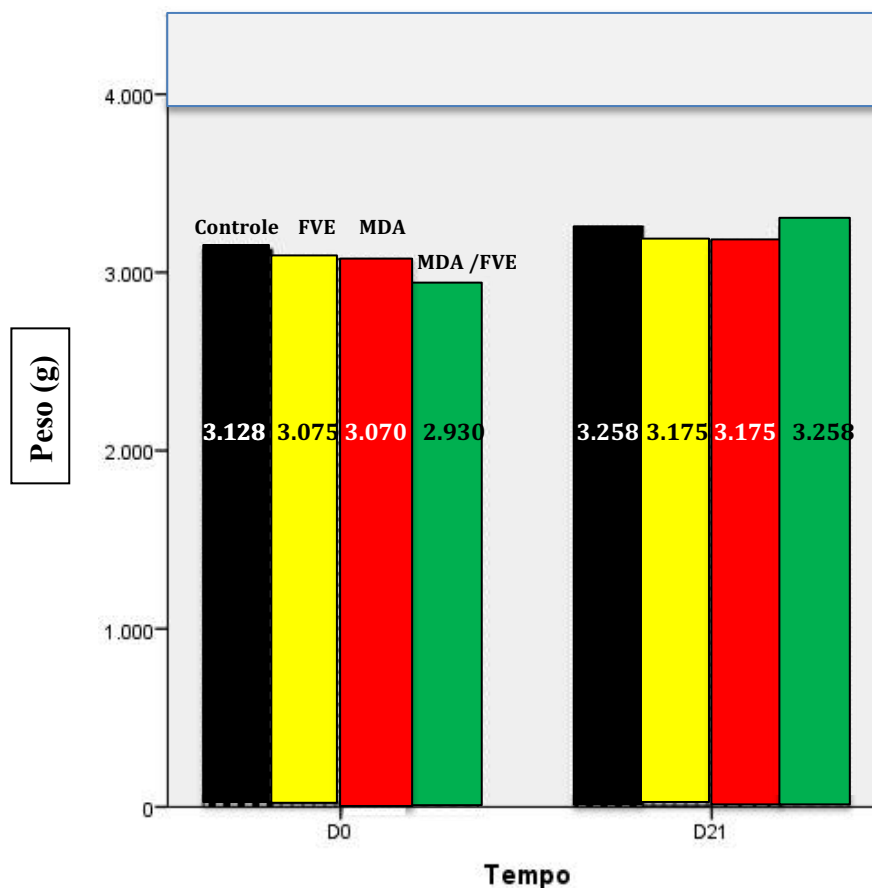
Para detectar diferença entre os grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA), onde a interação entre tempo e tratamento foi investigado. Para identificar as diferenças entre os grupos a cada período foi utilizado teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas no software estatístico SPSS (versão 23.0, IBM-SPSS Science, EUA). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) e a significância foi determinada em $p < 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 PESO DOS ANIMAIS

O peso dos animais foi aferido antes de iniciar os experimentos e ao final da pesquisa. Houve aumento do peso dos animais em todos os grupos, porém sem diferença estatística. Não houve perdas de animais durante todo o estudo.



$p > 0,641$

Figura 8 – Variação de peso dos animais antes e ao término da pesquisa.

5.2 TAXA DE CICATRIZAÇÃO DA FERIDA

Em todos os grupos a cicatrização completa das feridas completou-se em 20 dias e não houve diferença estatística em nenhum período durante a avaliação ($p > 0.05$). (Figuras 9, 10, 11, 12, 13) (Quadro1)

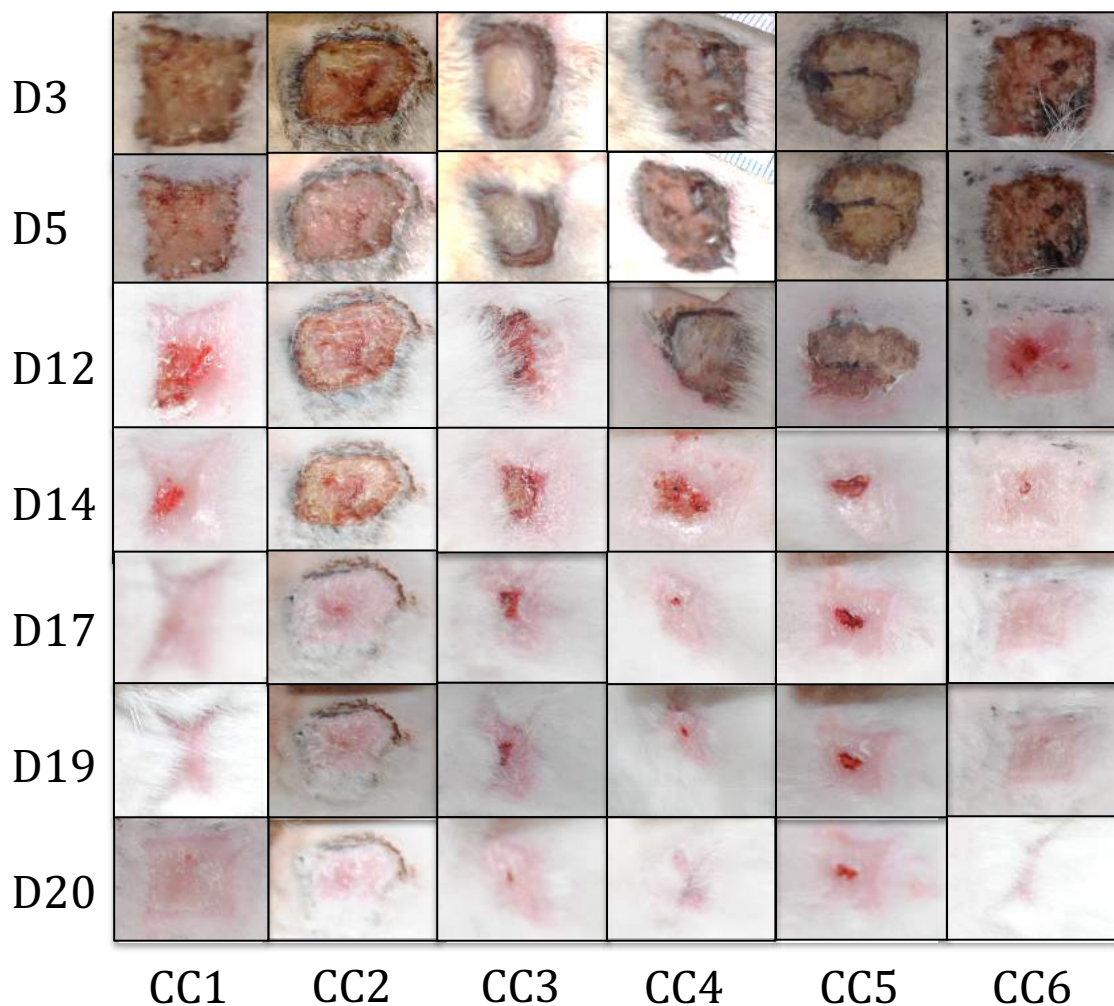


Figura 9. Grupo Controle: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias

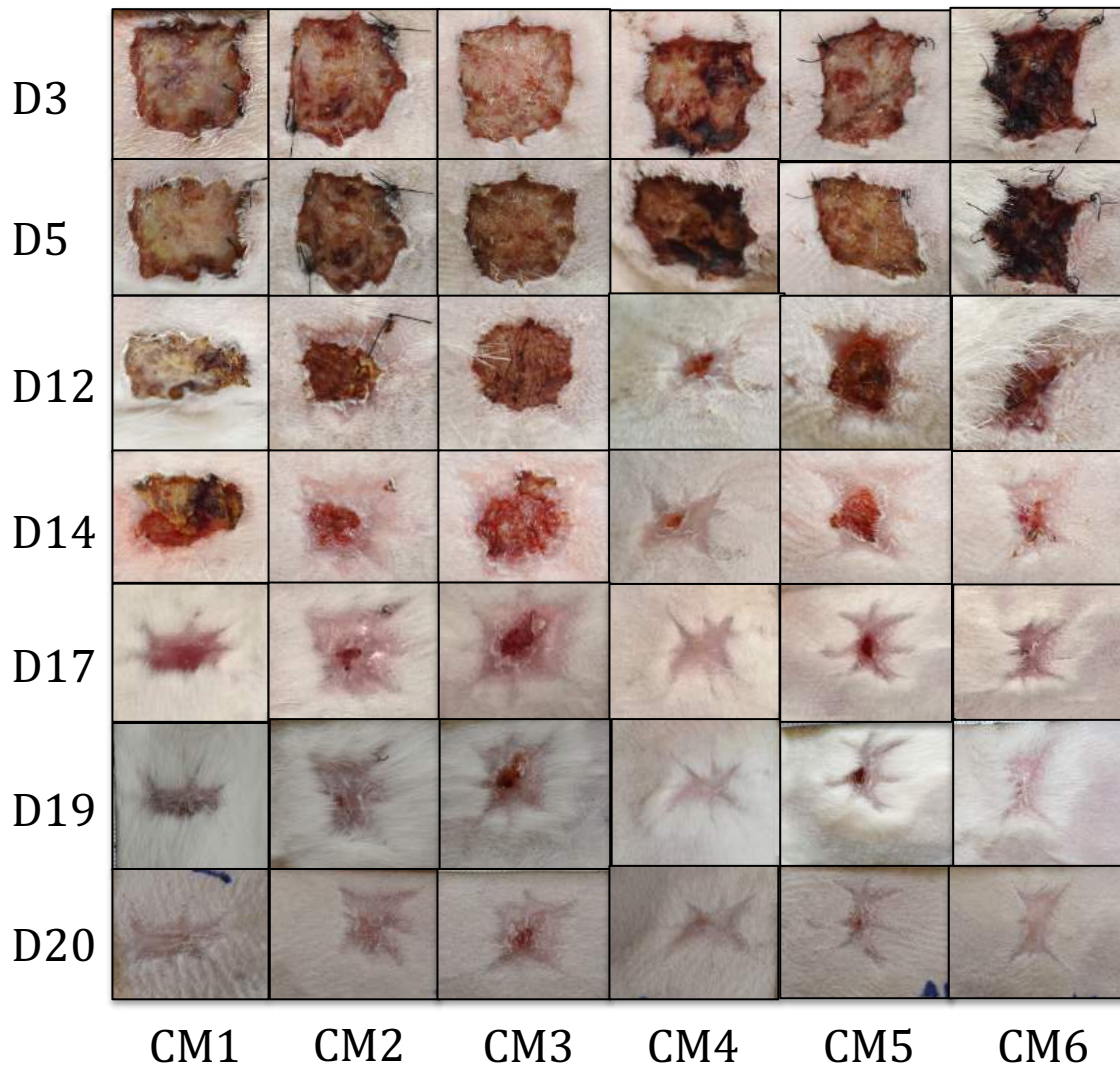


Figura 10 - Grupo Matriz Dérmica Acelular: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias

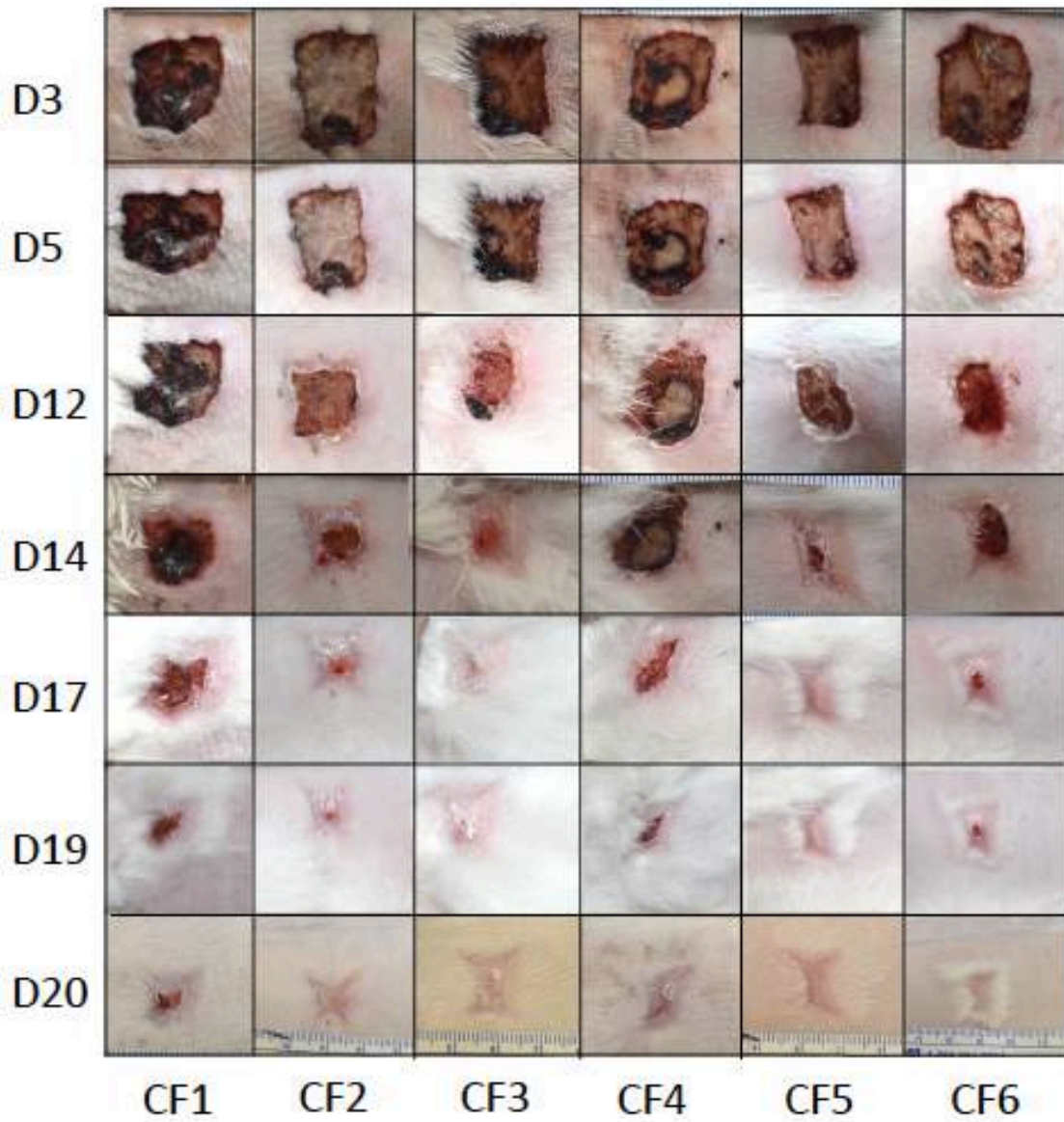


Figura 11 - Grupo Fração Vascular Estromal: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias

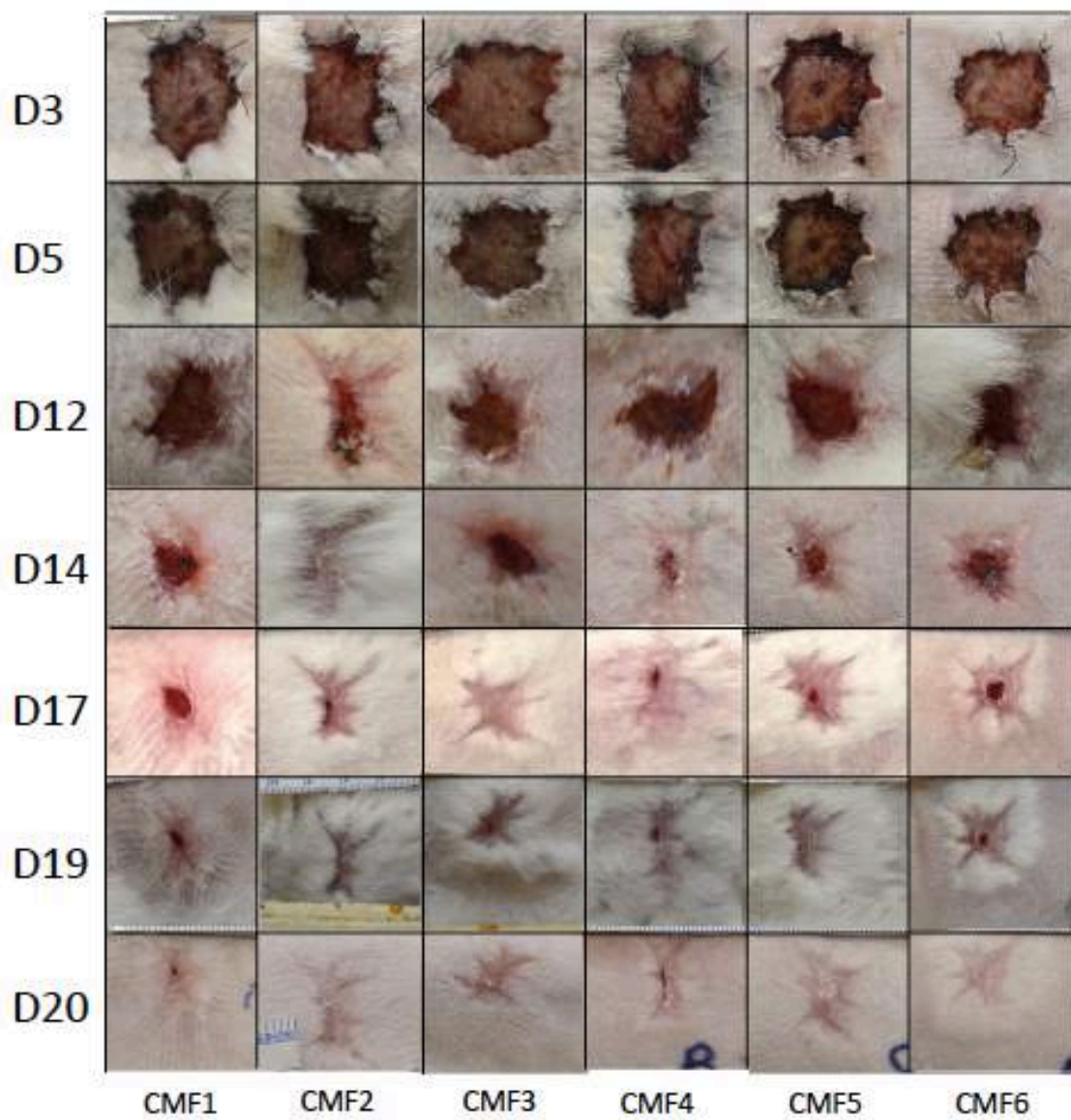


Figura 12 - Grupo Matriz Dérmica Acelular e Fração Vascular Estromal: Registro fotográfico sequencial das feridas em cicatrização de cada coelho. Notar cicatrização completa com 20 dias.

Resultados

Quadro 1 – Taxa de cicatrização das feridas nos grupos no período de 21 dias

GRUPO CONTROLE								
	D3	D5	D12	D14	D17	D19	D20	D21
COELHO 1 (CC1)	32,11%	41,66%	91,22%	96,97%	99,09%	100%	100%	100%
COELHO 2 (CC2)	17,52%	21,44%	42,03%	43,52%	99,76%	100%	100%	100%
COELHO 3 (CC3)	47,90%	53,58%	85,75%	93,67%	98,05%	99,01%	100%	100%
COELHO 4 (CC4)	28,66%	30,24%	89,14%	93,32%	99,50%	99,37%	100%	100%
COELHO 5 (CC5)	41,09%	44,21%	76,56%	97,80%	98,33%	99,21%	100%	100%
COELHO 6 (CC6)	22,12%	25,77%	94,10%	98,81%	100%	100%	100%	100%

GRUPO MDA								
	D3	D5	D12	D14	D17	D19	D20	D21
COELHO 1 (CM1)	39,52%	43,68	72,24%	89,30%	100%	100%	100%	100%
COELHO 2 (CM2)	18,78%	29,31%	83,27%	92,12%	98,26%	99,68%	100%	100%
COELHO 3 (CM3)	43,57%	50,28%	74,05%	89,02%	96,09%	96,14%	100%	100%
COELHO 4 (CM4)	54,27%	68,70%	97,94%	99,31%	100%	100%	100%	100%
COELHO 5 (CM5)	35,60%	38,52%	89,96%	92,09%	98,30%	98,63%	100%	100%
COELHO 6 (CM6)	46,48%	53,25%	93,34%	97,05%	100%	100%	100%	100%

GRUPO FEV								
	D3	D5	D12	D14	D17	D19	D20	D21
COELHO 1 (CF1)	20,40%	37,62%	41,13%	60,31%	87,95%	92,49%	100%	100%
COELHO 2 (CF2)	43,77%	48,14%	79,06%	92,48%	100%	100%	100%	100%
COELHO 3 (CF3)	34,71%	47,67%	83,70%	100%	100%	100%	100%	100%
COELHO 4 (CF4)	19,57%	41,88%	70,99%	80,48%	94,83%	95,53%	100%	100%
COELHO 5 (CF5)	50,95%	56,75%	89,56%	97,98%	100%	100%	100%	100%
COELHO 6 (CF6)	40,09%	49,64%	91,44%	95,24%	98,23%	98,71%	100%	100%

GRUPO MDA/FEV								
	D3	D5	D12	D14	D17	D19	D20	D21
COELHO 1 (CMF1)	34,45%	50,20%	89,35%	94,43%	96,75%	98,65%	100%	100%
COELHO 2 (CMF2)	37,39%	53,77%	81,62%	90,85%	100%	100%	100%	100%
COELHO 3 (CMF3)	32,80%	49,22%	85,25%	88,28%	100%	100%	100%	100%
COELHO 4 (CMF4)	33,35%	40,18%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
COELHO 5 (CMF5)	21,93%	29,35%	86,17%	94,35%	99,24%	100%	100%	100%
COELHO 6 (CMF6)	28,06%	52,02%	87,22%	92,56%	96,93%	99%	100%	100%

Taxa de cicatrização entre os grupos

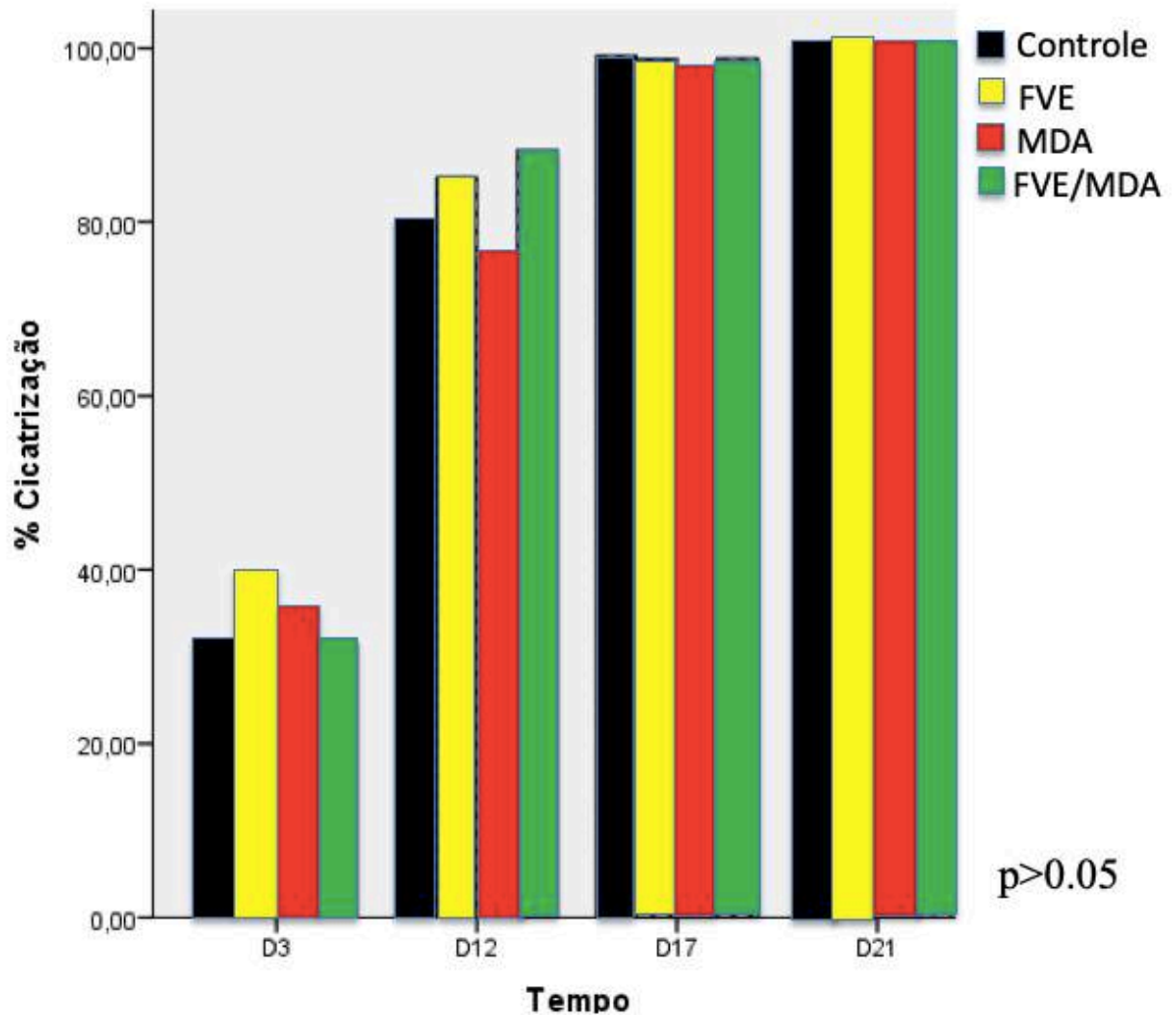
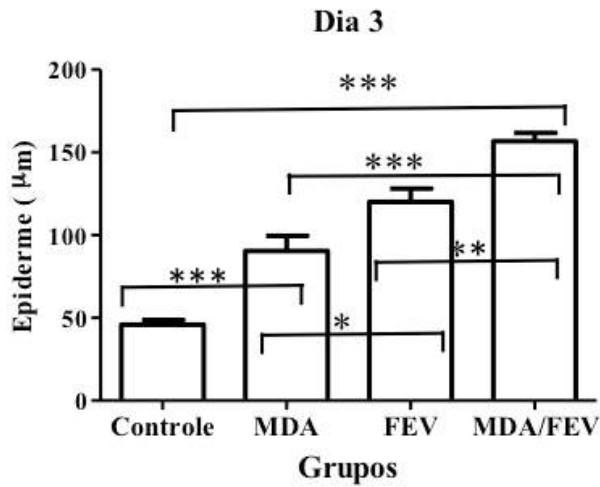


Figura 13. Comparação da taxa de cicatrização das feridas nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE. Não houve diferença entre os grupos durante todo o experimento.

5.3 HISTOLOGIA

5.3.1 EPIDERME

O grupo MDA/FVE apresentou maior espessura da epiderme quando comparado aos grupos controle, MDA e FVE, nos dias 3 e 14 (Figuras 14, 15, 16 e 20) (Tabelas 1, 2 e 3).



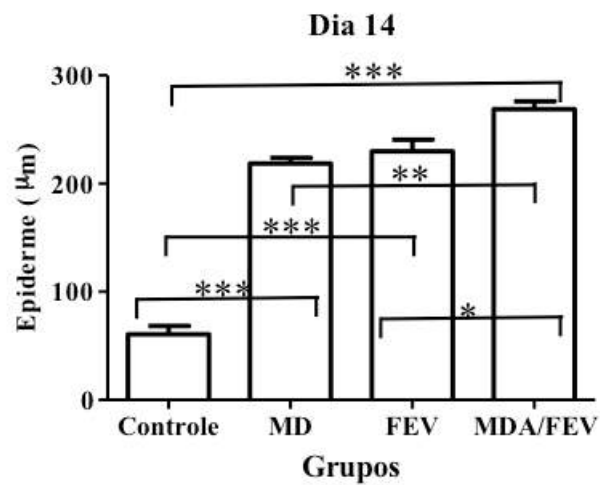
*p < 0.05 ** p<0.01 ***p < 0.001

Figura 14 – Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.

DIA 3

GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
EPIDERME (µM)	48,83±3,47	99,5±4,13	127,45±1,24	158,45±1,21

Tabela 1 – Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (µm) das feridas dos coelhos no dia 3.



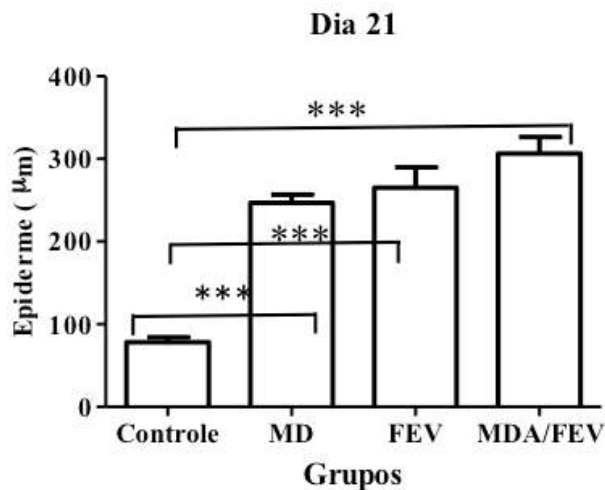
*p < 0.05 ** p<0.01 ***p < 0.001

Resultados

Figura 15 – Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia

DIA 14				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
EPIDERME (μM)	69,33±4,31	215,8±3,59	244,23±1,79	295,35±2,17

Tabela 2 – Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (μm) das feridas dos coelhos no dia 14.



*p < 0.05 ***p < 0.001

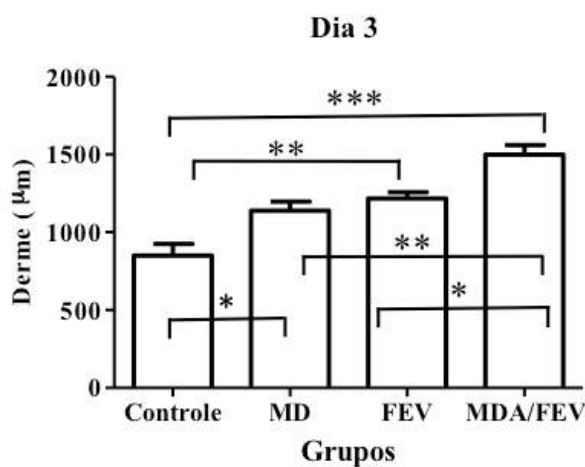
Figura 16 – Comparação da espessura da epiderme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia

DIA 21				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
EPIDERME (μM)	89,7±4,73	257,7±5,55	268,23±1,43	304,23±1,34

Tabela 3 – Médias e desvio padrão da espessura da epiderme (μm) das feridas dos coelhos no dia 21.

5.3.2 DERME

O grupo MDA/FVE apresentou maior espessura da derme quando comparado com os grupos controle, MDA e FVE durante os dias 3 e 14. No dia 21 não houve diferença estatística entre os grupos FVE e MDA/FVE (Figuras 17, 18, 19 e 20) (Tabelas 4, 5 e 6).

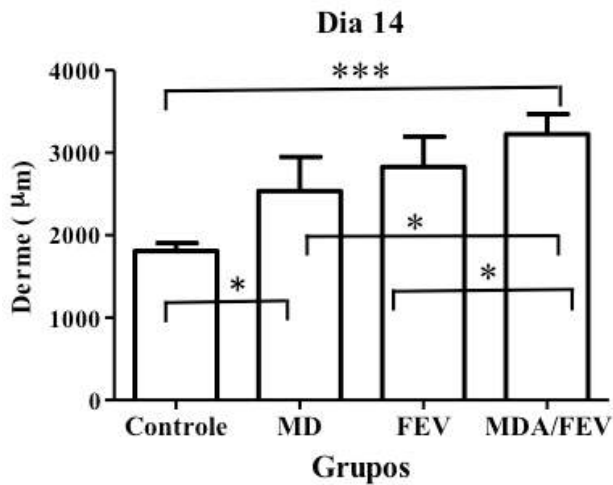


*p < 0.05 ** p < 0.01 ***p < 0.001

Figura 17 – Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia

DIA 3				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
DERME (µM)	709,6±1,22	1231,4±1,16	1220,90±6,42	1475,50±1,03

Tabela 4 – Médias e desvio padrão da espessura da derme (µm) das feridas dos coelhos no dia 3.

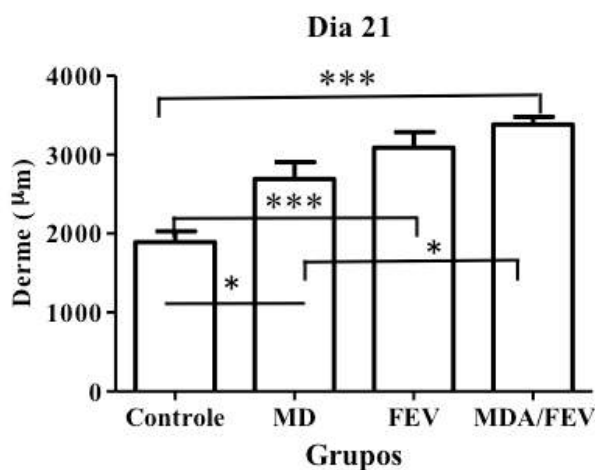


*p < 0.05 ***p < 0.001

Figura 18 – Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia

DIA 14				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
DERME (µM)	1808,2±1,22	2536,6±1,12	2676,57±9,96	3115,14±5,87

Tabela 5 – Médias e desvio padrão da espessura da derme (µm) das feridas dos coelhos no dia 14.



*p < 0.05 ***p < 0.001

Figura 19 – Comparação da espessura da derme entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia

DIA 21				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
DERME (μM)	1892,4 \pm 2,21	2696,4 \pm 1,32	3221,57 \pm 1,23	3381,42 \pm 2,38

Tabela 6 – Médias e desvio padrão da espessura da derme (μm) das feridas dos coelhos no dia 21.

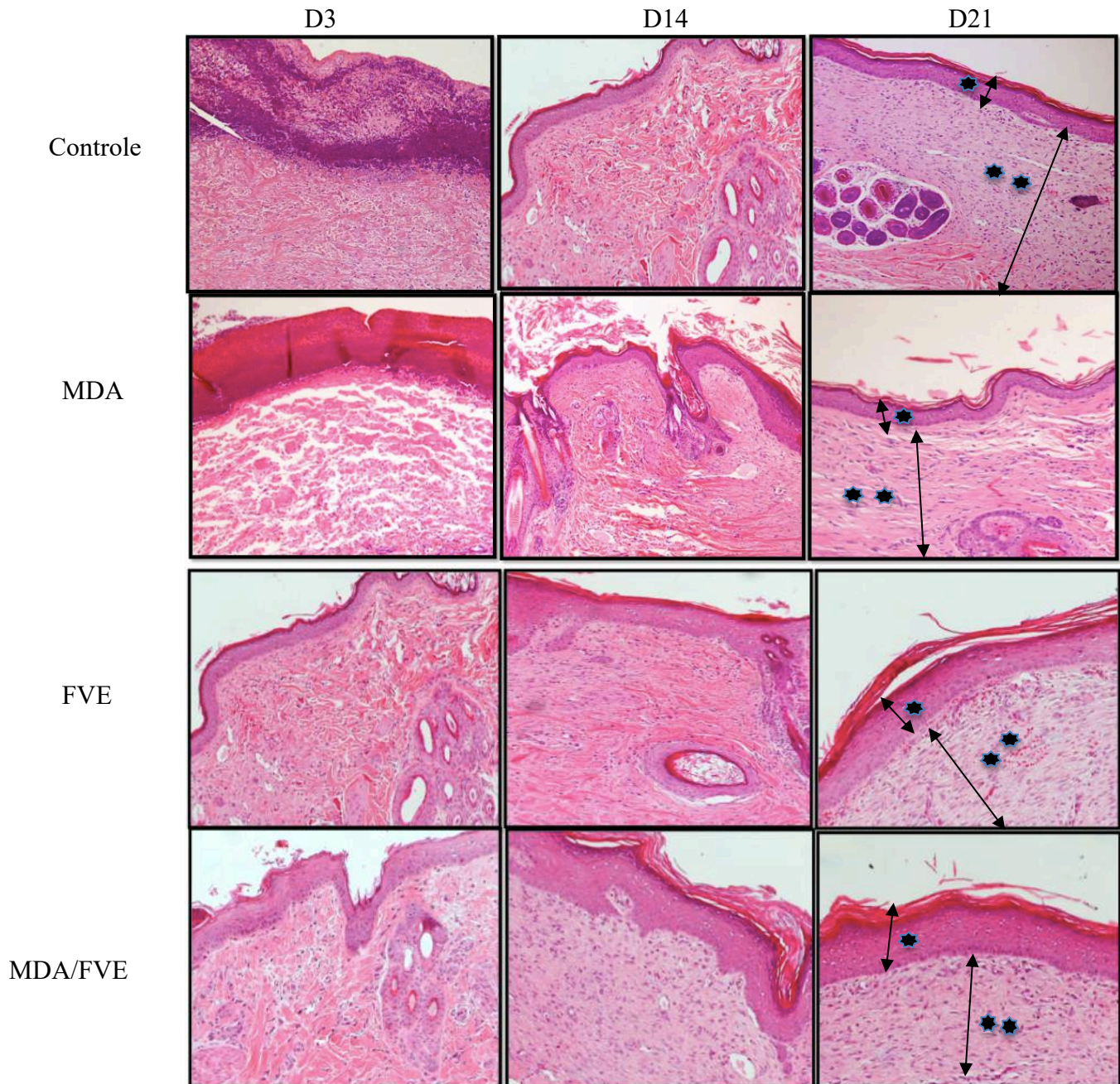
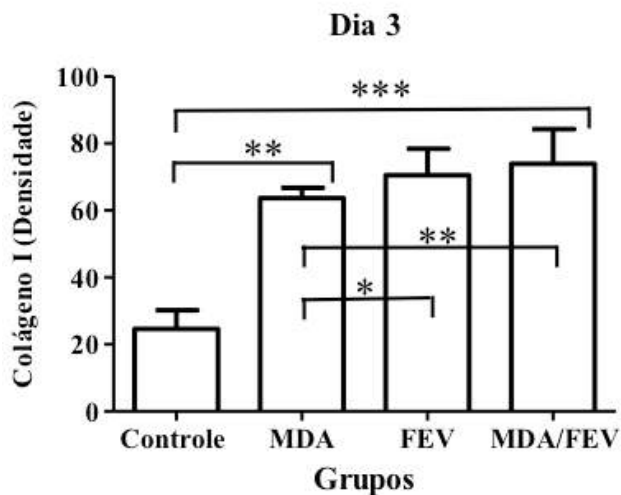


Figura 20- Espessura da derme e epiderme nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE, nos dias 3, 14 e 21. Nota-se uma espessura aumentada no grupo MDA/FVE (Coloração H&E, aumento de 10 X) **Derme * Epiderme

5.3.3 COLÁGENO TIPO I E TIPO III

O grupo MDA/FVE apresentou maior densidade de colágeno tipo I e tipo III quando comparado aos grupos controle, MDA, FVE nos dias 3, 14 e 21 (Figuras 21, 22, 23, 24, 25 e 26).

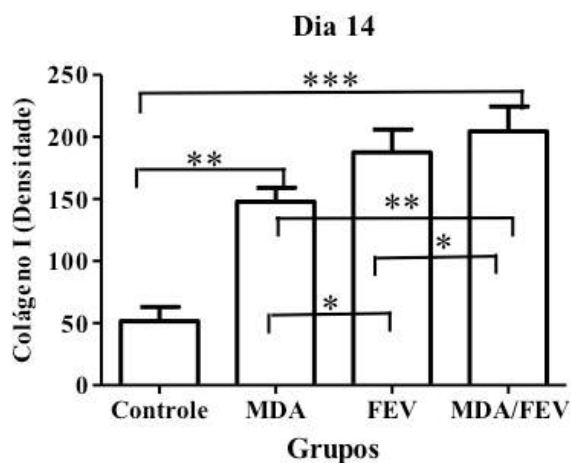


*p < 0.05 ** p<0.01 ***p < 0.001

Figura 21 – Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.

DIA 3				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo I (densidade média)	19,5 ± 1,83	66,83±1,12	78,42±1,65	84,23±1,35

Tabela 7 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 3.

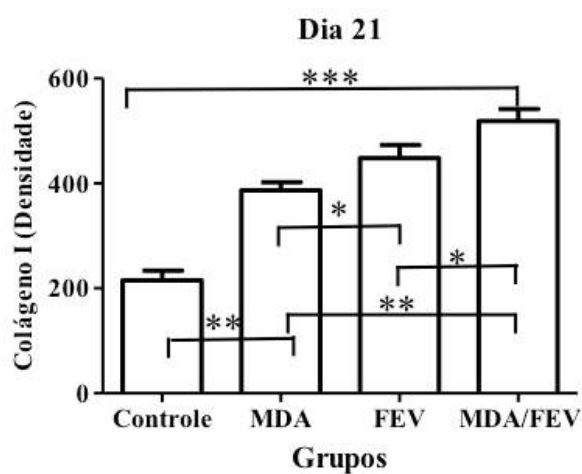


*p < 0.05 ** p<0.01 ***p < 0.001

Figura 22 – Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.

DIA 14				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo I (Densidade média)	40,16 ± 1,15	159,1±1,14	169,1±1,35	184,32±1,25

Tabela 8 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 14.

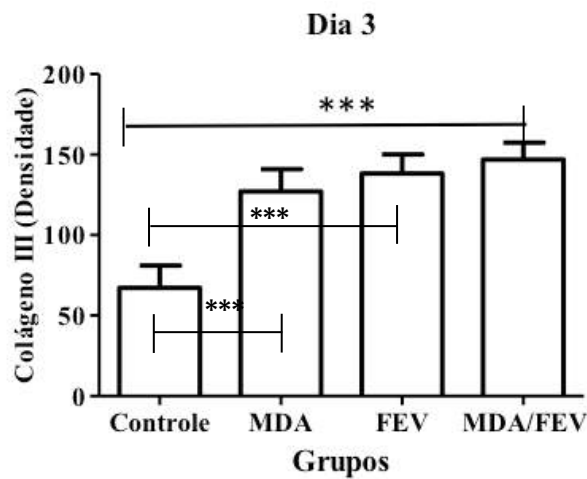


*p < 0.05 **p<0.01 ***p < 0.001

Figura 23 – Densidade de colágeno tipo I entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.

DIA 21				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo I	196,8 ± 1,45	371,6±1,27	423,7±1,54	495,5±2,54

Tabela 9 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo I das feridas dos coelhos no dia 21.

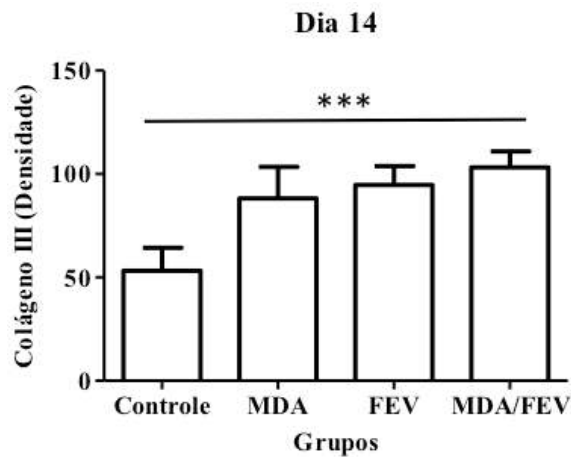


*p < 0.05 ***p < 0.001

Figura 24 – Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.

DIA 3				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo III (Densidade média)	53,5 ± 1,24	113,3±1,16	126,21±2,48	136,41±1,27

Tabela 10 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 3

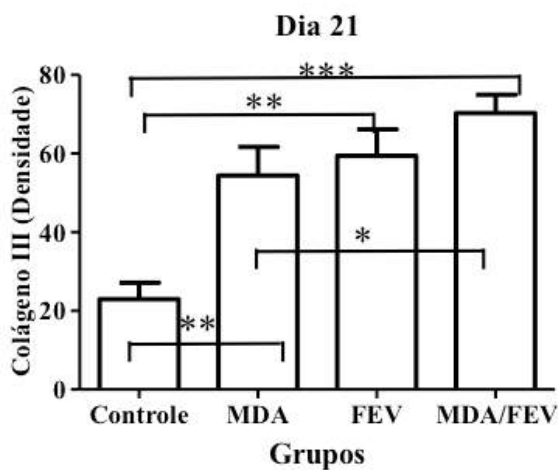


* $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

Figura 25– Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.

DIA 14				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo III (Densidade média)	42,12 ± 1,17	72,83±2,12	85,42±1,78	95,32±2,15

Tabela 11 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 14



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figura 26– Densidade de colágeno tipo III entre os grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.

DIA 21				
GRUPOS	Controle	MDA	FVE	MDA/FVE
Colágeno tipo III (Densidade média)	18,8 ± 1,23	47,16±1,32	52,68±1,89	65,72±1,26

Tabela 12 – Médias e desvio padrão da densidade de colágeno tipo III das feridas dos coelhos no dia 21

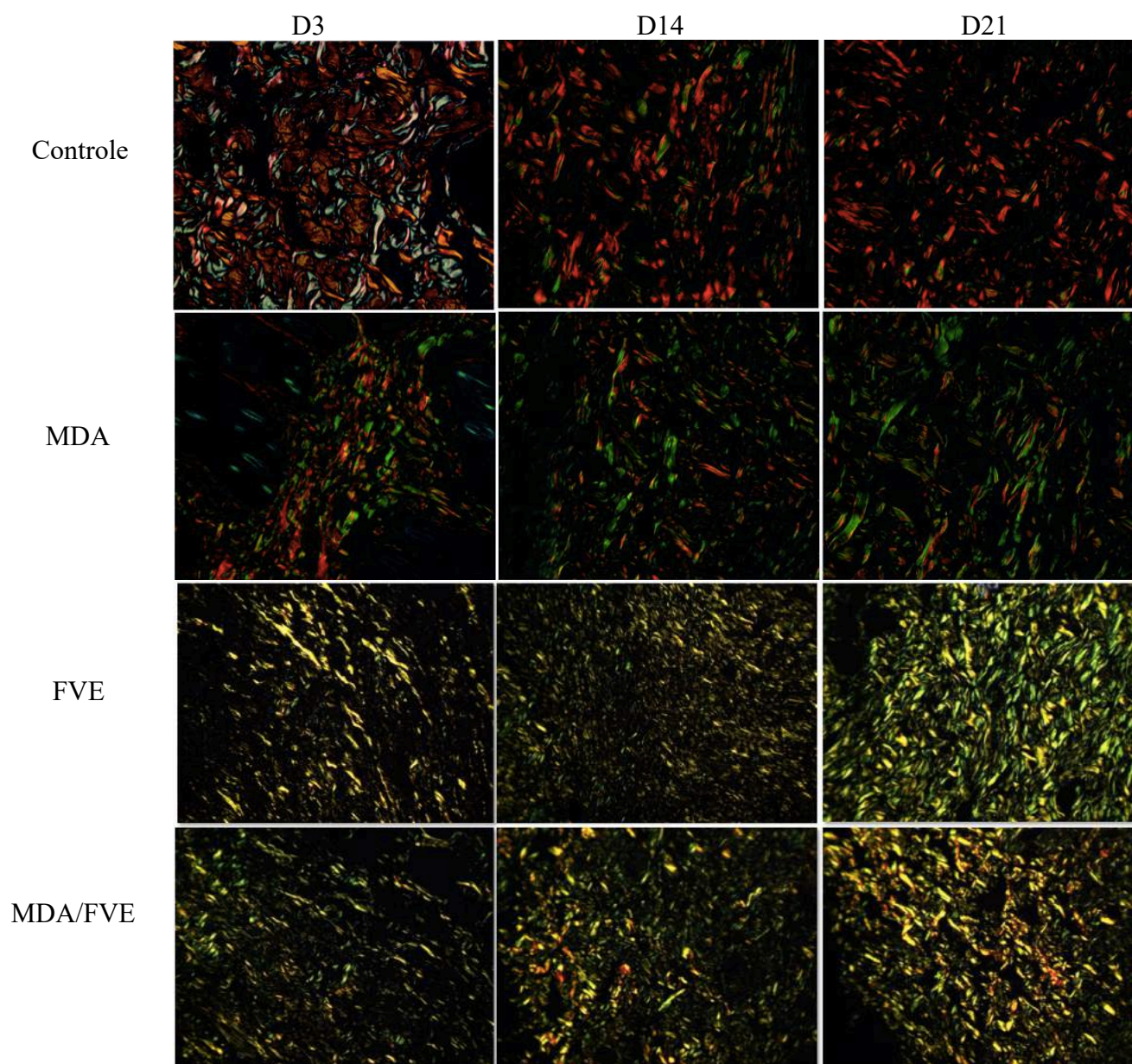
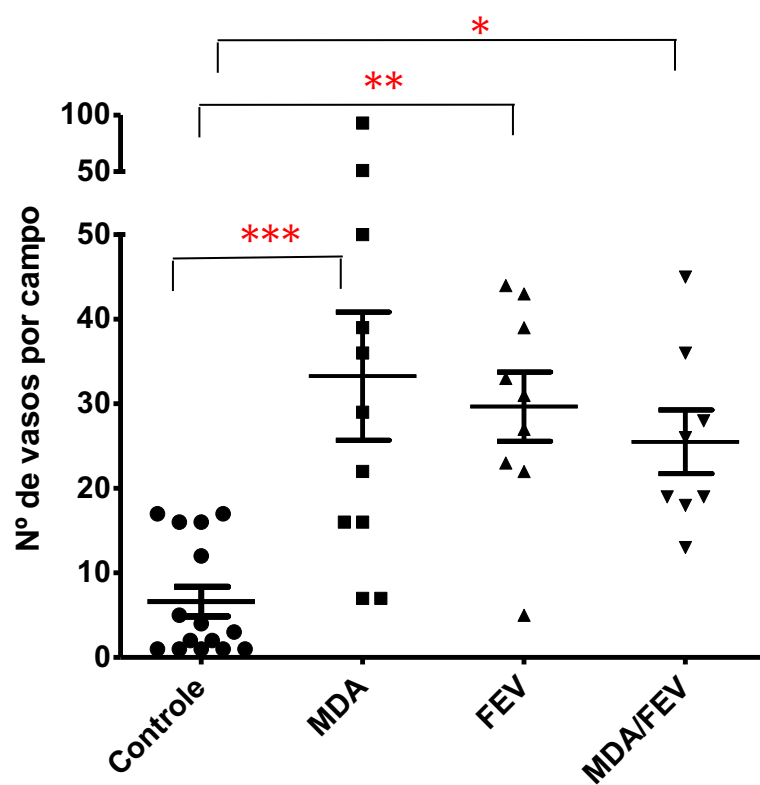


Figura 27 - Distribuição de fibras colágenas do tipo I (vermelho) e do tipo III (verde, amarelo) nos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE nos dias 3, 14 e 21. Notar aumento de fibras colágenas do tipo I e III no grupo MDA/FVE (coloração picrusirius, aumento de 10X)

5.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

5.4.1 VASOS SANGUÍNEOS

A quantidade de vasos sanguíneos encontrada foi maior nos grupos em que foram feitas intervenções (MDA, FVE e MDA/FVE) quando comparado ao grupo controle, porém não houve diferença entre estes grupos MDA, FVE e MDA/FVE no dia três (Figura 28). No dia 14 o grupo MDA/FVE apresentou maior número de vasos comparado ao grupo controle (Figura 31) e no dia 21 o grupo MDA/FVE apresentou maior número de vasos quando comparado a todos os outros grupos (Figura 34). Com relação ao diâmetro dos vasos, observou-se um maior número de microvasos (vasos menores que 0.002 polegadas) no grupo MDA quando comparado aos grupos controle, FVE e MDA/FVE, no dia 3 (Figuras 29 e 30). Nos dias 14 e 21 foram constatados vasos de maior calibre no grupo MDA/FVE quando comparado aos outros grupos controle, MDA e FVE (Figuras 32, 33, 35 e 36)



*p < 0.05 **p < 0.01 ***p < 0.001

Figura 28 – Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia.

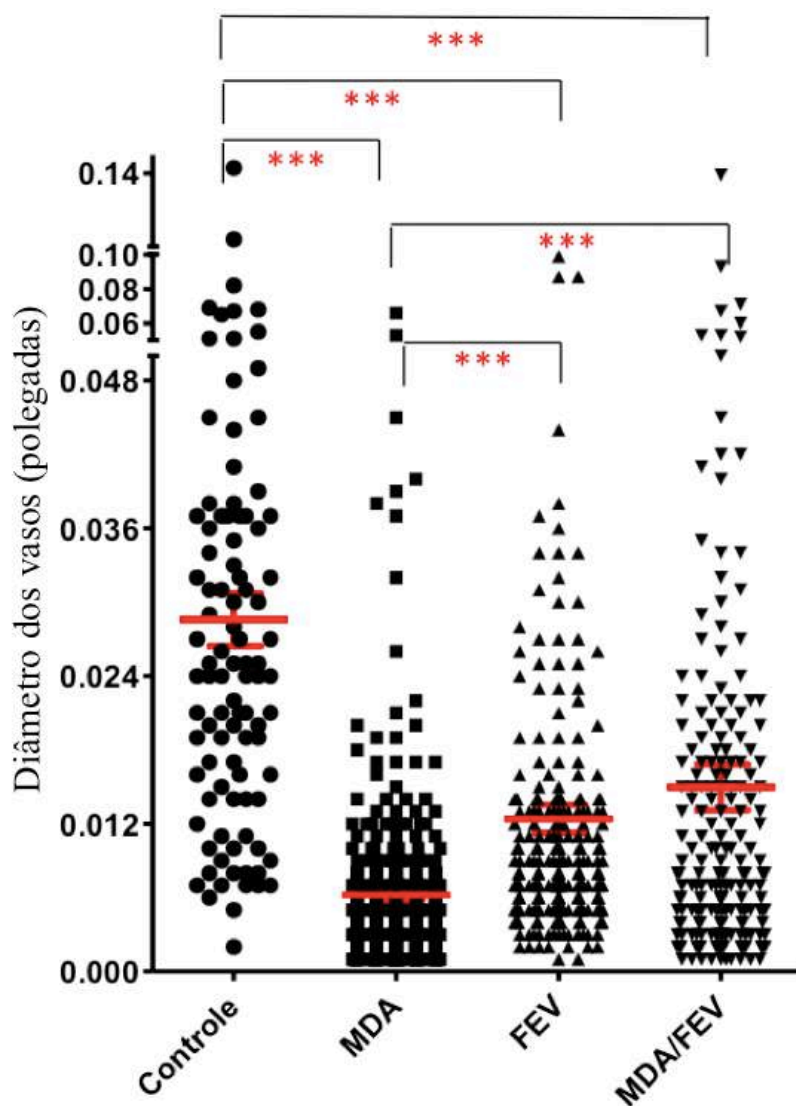


Figura 29 – Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 3 pós cirurgia. Predomínio de microvasos no grupo MDA no dia 3.

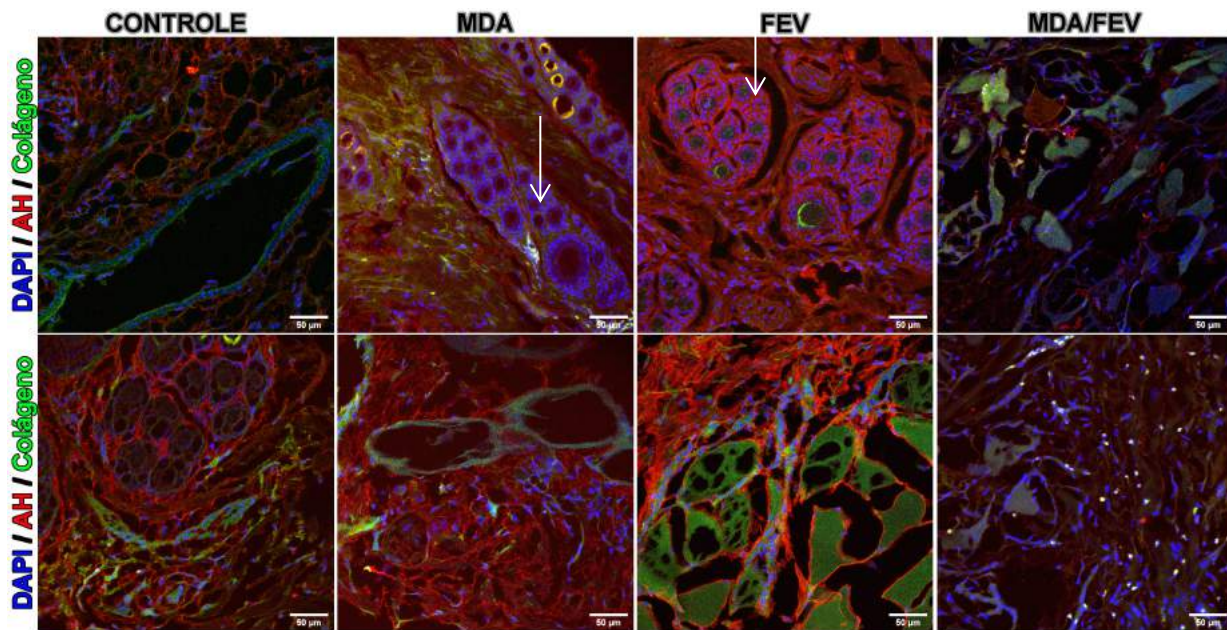
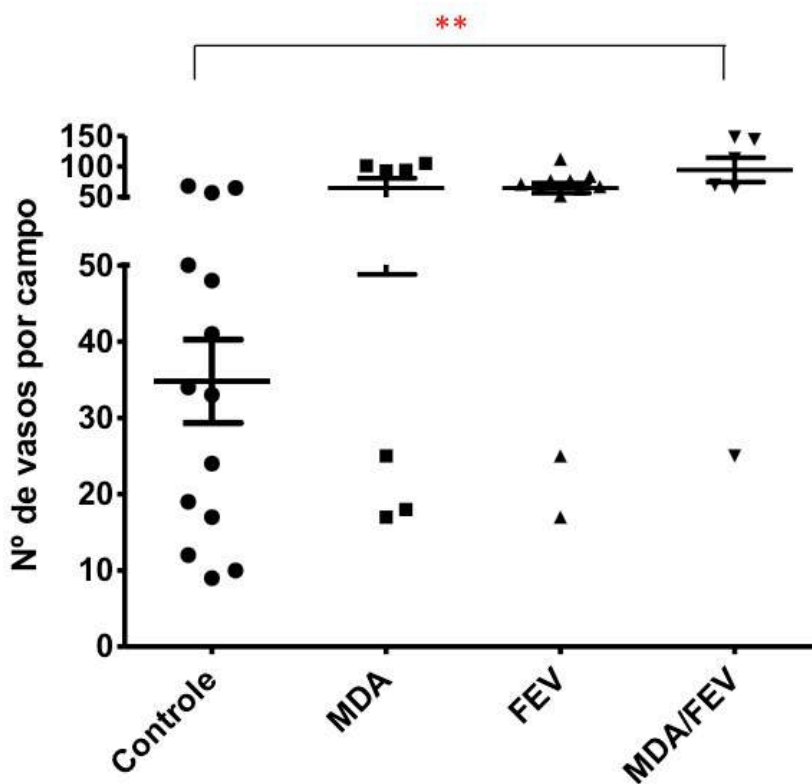


Figura 30 – Predomínio de microvasos nos grupos MDA e FVE comparado aos grupos controle e MDA/FVE no dia 3, denotando aumento de neovascularização. Setas brancas indicando microvasos. Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50 μ m



**p<0.01

Figura 31 – Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia.

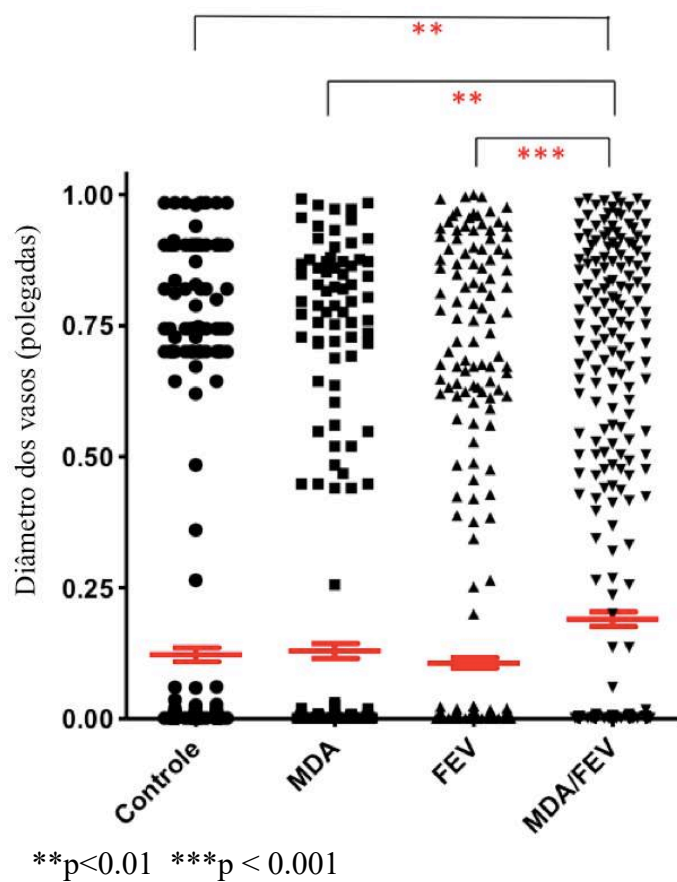


Figura 32 – Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 14 pós cirurgia. Predomínio de vasos de maior calibre no grupo MDA/FVE no dia 14.

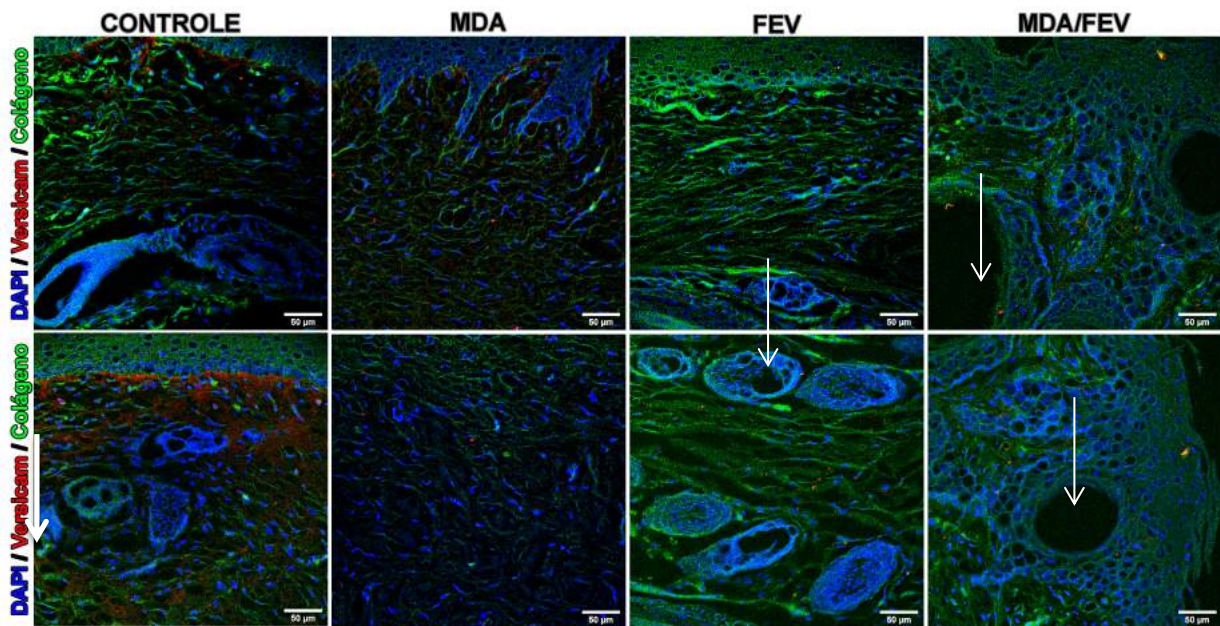
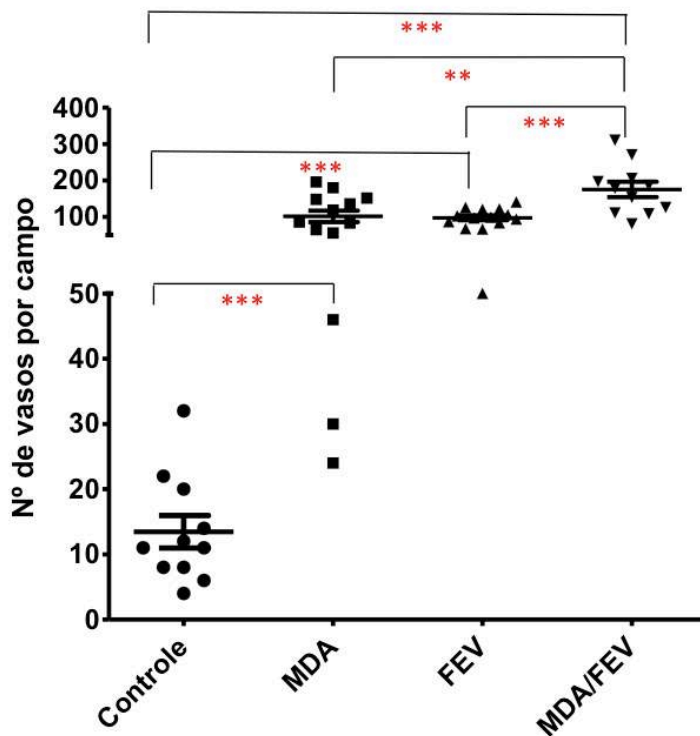


Figura 33 – Seta indicando o lúmen dos vasos sanguíneos. Presença de vasos com diâmetros maiores no grupo MDA/FVE comparado aos grupos controle, MDA e FVE . Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50 μ m



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figura 34- Quantificação dos vasos sanguíneos presentes nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia.

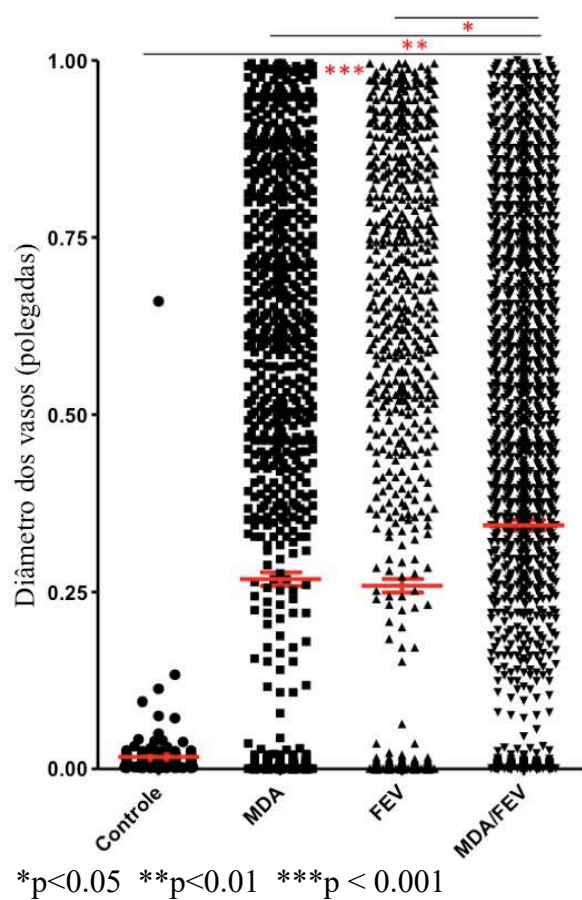


Figura 35 – Diâmetro médio dos vasos sanguíneos identificados nas feridas dos coelhos dos grupos controle, MDA, FVE e MDA/FVE no dia 21 pós cirurgia. Predomínio de vasos de maior calibre no grupo MDA/FVE no dia 21.

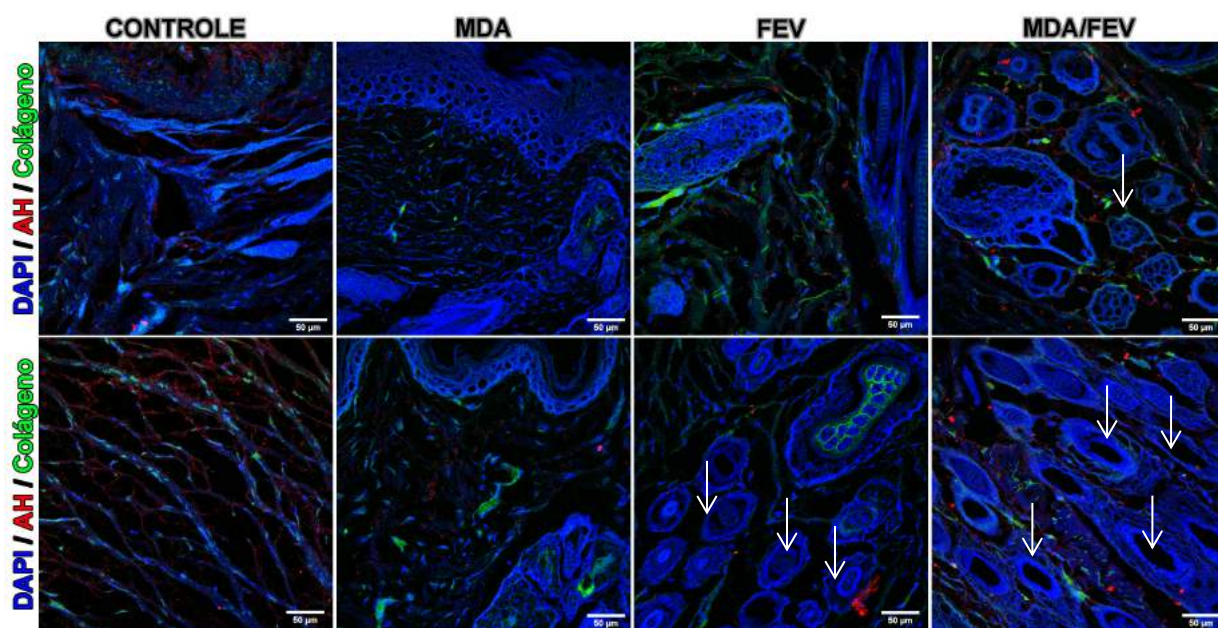


Figura 36 – Presença de maior quantidade de vasos sanguíneos no grupo MDA/FVE quando comparado ao grupo controle, MDA e FVE no dia 21. Seta branca indicando vaso sanguíneo. Marcação por imunofluorescência. Barra de escala – 50µm

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As grandes perdas cutâneas causadas por traumas, lesões térmicas ou avulsões, e, por grandes ressecções tumorais, permanecem um desafio dentro das cirurgias reparadoras. A pele desempenha papel importante na proteção contra infecções, na regulação térmica e no balanço hídrico, por isso é crucial para o corpo a rápida e efetiva cicatrização cutânea (YOUNG & MCNAUGHT, 2011; JESCHKE *et al.*, 2015). Neste cenário surge a engenharia tecidual com os substitutos dérmicos, que vem se tornando, a cada dia, mais frequentes no uso clínico, como ferramenta adicional no tratamento das diversas perdas cutâneas (HUANG *et al.*, 2012).

A Matriz Dérmica Acelular (MDA) já passou por diversos aperfeiçoamentos desde a publicação original de YANNAS & BURKE (1980) sendo considerado um adequado substituto dérmico por reproduzir muitas das características da pele, incluindo a elasticidade, resistência e barreira contra microrganismos no leito das feridas (CASTAGNOLI *et al.*, 2010; NIE *et al.*, 2015; BANDIOLI *et al.*, 2019; DOORNAERT *et al.*, 2019). Porém, devido à baixa vascularização do leito receptor de alguns tipos de feridas, foram constatados alto índice de infecção, reação de corpo estranho e formação de cicatrizes hipertróficas (EGANÃ *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2011).

Na última década, aumentaram as publicações demonstrando um alto potencial de estímulo neo-angiogênico das células da Fração vascular estromal (FVE) para aplicações no campo da engenharia tecidual e medicina regenerativa (MIZUNO, TOBITA, UYSAL, 2012; BOURIN *et al.*, 2013). Essas células heterogêneas isoladas podem ser obtidas pelo processamento

do tecido adiposo por digestão enzimática sem qualquer separação celular complexa ou etapas de cultura, tornando-as ideais para procedimentos operatórios em tempo único (SPÄTER *et al.*, 2018). Apesar de recente e, portanto, serem escassos os trabalhos envolvendo FVE e cicatrização cutânea, essa abordagem conjunta se apresenta como campo promissor na medicina regenerativa, devido a praticidade de seu uso associado a seu potencial neo-angiogênico. Assim, buscou-se avaliar a influência que a FVE teria na cicatrização cutânea de coelhos quando injetada em uma ferida coberta com MDA.

A escolha do coelho como modelo experimental desse estudo foi determinada por algumas características inerentes a esse animal. O modelo de ferida realizada no dorso dos animais com as dimensões de 20x20 mm (CROSS *et al.*, 1995; TAMRI *et al.*, 2014) apresenta tempo de cicatrização semelhante ao do ser humano, que é em torno de 21 dias. Como o estudo envolvia a análise da cicatrização sob influência da FVE seria necessário um modelo que também apresentasse uma fonte de tecido adiposo de fácil dissecação, abundante e que trouxesse pouca morbidade ao animal. O coelho possui duas regiões de acúmulo de tecido adiposo, interescapular e inguinal. Foi optado pelo acesso à gordura interescapular conforme ZIMMERMANN *et al.* (2015), dentro da Linha de Pesquisa de célula-tronco de gordura do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Unifesp. Essa escolha foi devido à facilidade de acesso a esse tecido, não necessitando de mudança de decúbito do animal durante a cirurgia, e ao menor risco de infecção do sítio cirúrgico quando comparado ao acesso inguinal. Ademais, este estudo acompanha coerência da Linha de Pesquisa anteriormente citada. MAZZETTI *et al.* (2010) demonstraram que a obtenção da gordura interescapular no coelho por lipectomia é um método satisfatório por ser de fácil acesso e baixa morbidade.

Todos os animais, mesmo os do grupo controle e os do grupo matriz foram submetidos à lipectomia, ainda que suas amostras não fossem processadas. Essa decisão foi tomada para evitar um viés que sofreriam o grupo FVE e grupo MDA/FVE pela resposta inflamatória ao trauma advinda da lipectomia.

Foi realizado autotransplante de tecido adiposo nos animais à semelhança dos estudos de ATALAY *et al* (2014) e KARAGERGOU *et al* (2018), dispensando, assim, a necessidade de imunossupressão dos animais, procedimento necessário em estudos experimentais que utilizaram tecido adiposo humano (BRETT *et al.*, 2017; CHAE *et al.*, 2017., SUN *et al.*, 2017; BI *et al.*, 2019).

O processamento do tecido adiposo seguiu o protocolo previamente descrito (GIMBLE & GUILAK, 2003; YU *et al.*, 2011; ZANATA *et al.*, 2017), por meio de digestão enzimática em solução de colagenase tipo I e também utilizado por diferentes autores (PU *et al.*, 2004; MOSCATELLO *et al.*, 2005). GIMBLE & GUILAK (2003) e ZANATA *et al.* (2017) já haviam demonstrado, utilizando tecido adiposo humano e o mesmo protocolo, um rendimento celular adequado, resultando em $2,5 \times 10^5$ a $3,75 \times 10^5$ células viáveis por mililitro de tecido processado. Além disso, demonstraram a manutenção da capacidade de aderência, proliferação e diferenciação dessas células (YU *et al.*, 2011). Para a quantificação do número de células viáveis após o processamento da gordura foi utilizado o método de Azul de tripan, no qual pode-se identificar a integridade da parede celular, conseqüentemente detectando as células viáveis. Na sequência foi utilizado contador automático assim como KASIBHATLA *et al.* (2006) e MOSCATELLO *et al.* (2005).

Nos estudos experimentais envolvendo FVE em cicatrização o número de células utilizadas tem sido variável. BRETT *et al.* (2017) injetaram

2,5x10⁵ células por lesão, CHAE *et al.* (2017) usaram 1x10⁶ células e Bi *et al.* (2019) utilizaram 1,5x10⁵ células. No presente estudo, diferentemente destes autores, foram utilizados uma média de 2,3x10⁶ células nucleadas de FVE por ferida distribuídas em 1 ml de solução de PBS. Não havia na literatura uma padronização do número de células de FVE a serem utilizadas, e até o momento, nenhum trabalho envolvendo FVE e MDA. Dessa forma, foi optado pela injeção da quantidade de FVE obtida pelo processamento do tecido adiposo de cada Coelho, que foi, então, diluído em 1 ml de PBS para se chegar a uma quantidade próxima à descrita na literatura.

Para avaliar a FVE associado à MDA na cicatrização cutânea foi utilizado como método a injeção intradérmica de FVE na periferia das lesões assim como CHAE *et al.* (2017), KARAGERGOU *et al.* (2018) e DENG *et al.* (2019) diferindo do método de BI *et al.* (2019) que optou pela injeção intralesional nos quatro quadrantes. A escolha do método de injeção intradérmica perilesional seguiu a opção da maioria dos autores CHAE *et al.* (2017), KARAGERGOU *et al.* (2018) e DENG *et al.* (2019)

Foi levado em consideração o entendimento da fisiologia da cicatrização que determina um processo de fechamento centrípeto promovido pelas células da periferia da ferida por meio da contração e da epitelização (SNOWDEN, 1984).

O presente estudo usou 24 coelhos com três feridas em cada um deles totalizando 24 amostras para cada período analisado (3, 14 e 21 dias). Para realizar o cálculo amostral foi utilizado, como desfecho primário, a taxa de cicatrização de feridas. Para obter o valor do desvio padrão (10%), utilizou-se os dados do estudo de TAMRI, HEMMATI, BOROUJERDIA (2014). Considerando um α de 0.05 e um poder de teste de 80% o cálculo apontou a necessidade de ter pelo menos 6 animais por grupo. Esse tamanho amostral está de acordo com o número de animais utilizados em estudos com metodologia semelhante (LIU *et al.*, 2011; TAMRI, HEMMATI,

BOROUJERDNIA, 2014; KARAGERGOU *et al.*, 2018; DOORNAERT *et al.*, 2019). Não houve perdas durante o estudo e constatou-se aumento do peso de todos os coelhos, que é um dos critérios utilizados por KILKENNY *et al.* (2012) para se comprovar as boas condições de tratamento e conforto dos animais durante a pesquisa.

A periodicidade de realização das biópsias e das análises histológicas em estudos envolvendo o processo de cicatrização é diversa na literatura, variando de 7, 14, 21 e 28 (SHI *et al.*, 2007); 3, 7, 14 e 21 (SUN *et al.*, 2010); 2, 7 e 14 (TAMRI, HEMMATI, BOROUJERDNIA, 2014); 7, 14, 21 (LIU *et al.*, 2011); 7, 16 e 21 (KARAGERGOU *et al.*, 2018) e 3, 7, 12 (DOORNAERT *et al.*, 2019). Foi optado neste estudo por realizar as biópsias nos dias 3, 14 e 21 por serem marcos didáticos importantes no processo de cicatrização. O terceiro dia após o ferimento é quando há o início da neoangiogênese, no 14^o dia ocorre o pico da produção de colágeno pelos fibroblastos e no 21^o dia há a estabilização entre a colagenogênese e a colagenólise (FOSNOT, KOVACH, SERLETTI, 2001).

Para o cálculo da taxa de cicatrização das feridas foi utilizado o método de registro fotográfico e análise das imagens com posterior aferição da área da ferida pelo software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA), mesmo método usado por outros estudos (LIU *et al.*, 2011; CHAE *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2017; DOORNAERT *et al.*, 2019). Segundo CHAN *et al.*, (2011) o método fotográfico é a técnica mais apropriada para aferição de feridas limpas, pois além de sua acurácia evita-se o contato com o leito da ferida, diminui o risco de contaminação da ferida, danos no leito da ferida e desconforto ao animal dispensando, assim, a necessidade de anestésias seriadas para realizar as aferições.

Não houve diferença no tempo de cicatrização das feridas cutâneas entre o grupo controle e o grupo MDA neste estudo. Esses resultados corroboram os achados de CASTAGNOLI *et al.* (2010) e LEI *et al.* (2019)

ao demonstrar que a presença isolada da MDA não consegue acelerar o processo de cicatrização. Ressalta-se que nos trabalhos citados assim como no presente estudo não foi utilizado suporte rígido de fixação peri lesional cuja função é de neutralizar a contração da ferida, dessa forma a cicatrização avaliada nesses estudos ocorreu pela ação sinérgica da reepitelização e da contração da ferida. Diferente do estudo de NIE *et al.* (2015) que avaliou somente reepitelização, por meio de fixação de um suporte rígido ao redor das feridas, neutralizando a contração, e mostrou superioridade no tempo de fechamento das feridas cobertas com MDA quando comparado ao controle. Esse dado é relevante pois segundo CROSS *et al.* (1994) a epitelização na cicatrização cutânea do coelho tem papel secundário sendo a contração promovida pelos miofibroblastos o agente de maior influência no fechamento das feridas, fato que pode esclarecer os diferentes resultados.

O tempo de fechamento da ferida não foi alterado pela associação da FVE quando comparado ao grupo controle. Este resultado corrobora os achados de KARAGERGOU *et al.* (2018) que mostraram que a taxa de contração da ferida foi menor no grupo tratado com FVE no dia 21 ($p = 0.037$), porém apresentou porcentagens de epitelização maiores nas feridas tratadas com FVE ($p = 0.048$) não havendo, ao final de 21 dias, diferença na taxa de cicatrização entre os grupos. No entanto, difere dos achados de BI *et al.* (2019) que demonstraram superioridade na taxa de cicatrização de feridas cutâneas após nove dias da lesão inicial ($p < 0.05$) em modelos de ratos diabéticos que utilizaram FVE. Porém, os resultados apresentados por BI *et al.* (2019) correspondem a um período ainda precoce dentro do processo de cicatrização sendo necessário uma avaliação mais tardia para endossar seus achados. Pode-se aventar como possível causa desse melhor desempenho da FVE o fato de se tratar de um modelo diabético, em que as células presentes em um ambiente com cicatrização prejudicada pela hiperglicemia podem responder de forma mais intensa à presença da FVE.

No presente estudo não houve diferença no tempo de cicatrização entre o grupo controle, o grupo MDA e o grupo em que foi utilizado FVE e MDA. LIU *et al.* (2011) estudaram o efeito de CTTA associadas a MDA em feridas cutâneas de ratos. Foram implantadas 2×10^4 células/cm² nas MDA do grupo experimental e houve diferença estatística na taxa de cicatrização das feridas na primeira semana sendo maior no grupo CTTA/MDA ($p < 0,05$), porém na segunda e terceira semana não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$). O'LOUGHLIN *et al.* (2013) fizeram o transplante de 1×10^6 CTTA em MDA resultando em um aumento da porcentagem de fechamento da ferida após uma semana $p < 0,05$. NIE *et al.* (2015) adicionaram 1×10^6 CTTA associada a MDA e avaliaram seus efeitos terapêuticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. O grupo MDA/CTTA apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) com relação ao grupo controle e ao grupo MDA e teve a cicatrização acelerada nos dias 7, 10 e 14. O tempo médio de fechamento completo das feridas foram: grupo MDA/CTTA (13 +/- 0,37 dias), grupo MDA (20 +/- 0,71 dias) e no grupo controle (27 +/- 0,44 dias).

No presente estudo observou-se um aumento da espessura da epiderme no grupo MDA/FVE durante o terceiro e o décimo quarto dia quando comparado aos outros grupos, sendo igualado pelos grupos MDA e grupo FVE no vigésimo primeiro dia. Ao comparar o grupo FVE com o grupo controle notou-se um aumento da epiderme durante todo o período ($p < 0,001$) o que corrobora os achados do trabalho de BI *et al.* (2019) que comprovaram um aumento da espessura da epiderme nos primeiros nove dias ($p < 0,001$) ao utilizar FVE na ferida. KARAGERGOU *et al.* (2018) também demonstraram um aumento na espessura da epiderme das feridas que receberam injeções intradérmicas perilesionais de FVE após 16 e 21 dias ($P < 0,003$).

A associação e FVE e MDA levou a um aumento da espessura da derme quando comparado aos outros grupos. Esse resultado é semelhante ao encontrado por HUANG *et al.* (2012) que utilizaram 1×10^5 CTTA junto à MDA em feridas cutâneas em ratos. Nesse estudo foi observado um aumento da espessura da derme no grupo submetido à associação de MDA e CTTA quando comparado ao grupo MDA ($p < 0.05$). Esse resultado assemelha-se ao do presente estudo que, ao comparar especificamente o grupo MDA/FVE com o grupo MDA, observou um aumento da espessura em todo período ($p < 0.05$).

Matrizes acelulares podem simular a matriz extracelular do tecido nativo, fornecendo uma estrutura porosa e um ambiente favorável ao crescimento, proliferação, diferenciação e migração celular (DOBOS *et al.*, 2018). Os fibroblastos são as células mais abundantes na derme e sintetizam a maioria dos componentes da matriz extracelular nativa, em especial o colágeno (SUH *et al.*, 2012). Partindo desse conhecimento, aliado às propriedades da FVE, entre elas a de estimular a expressão de FGFb (SUN *et al.*, 2017), o desfecho esperado no presente estudo era aumentar a produção global de colágeno no grupo MDA/FVE. Ao comparar o grupo MDA com o grupo controle foi constatado um aumento significativo da quantidade, tanto de colágeno tipo I quanto tipo III. Esse dado foi confirmado pelos resultados encontrados por O'LOUGHLIN *et al.* (2013), que demonstraram aumento da quantidade de colágeno em comparação ao controle após sete dias. BROSIUS *et al.* (2014) também demonstraram um aumento da quantidade de colágeno tipo I quando comparado ao controle ($612.5\% \pm 98.0$ vs. $312.9\% \pm 82.7$, $p < 0.05$).

Ao avaliar o efeito isolado da FVE na cicatrização, notou-se um aumento significativo da quantidade de colágeno tipo I e III comparado ao grupo controle, dado que corrobora os achados de BI *et al.* (2019) em que foi constatado um aumento de 400% na quantidade de colágeno da ferida

tratada com FVE quando comparada ao grupo controle ($p < 0.005$). Resultados esses que diferem dos encontrados por KARAGERGOU *et al.* (2018) que utilizaram injeção intradérmica de FVE em feridas cutâneas de ratos Wistar e não foi detectado diferença na produção de colágeno no grupo tratado com FVE quando comparado ao grupo controle. No presente estudo foi demonstrado um efeito aditivo entre as propriedades de estímulo à produção de colágeno da MDA e da FVE sendo constatado um aumento da quantidade de colágeno tipo I e III no grupo MDA/FVE quando comparado aos outros grupos durante todo o período do estudo.

Na pele hígida, a proporção entre colágeno I/III é de 3,5:1. O colágeno tipo I é responsável pela resistência à tração, continuidade e função protetora da pele. No processo de remodelação e maturação é esperado que o colágeno tipo III diminua em comparação ao colágeno tipo I, tentando reverter à proporção da pele normal (CHENG *et al.*, 2011) Além disso, a diminuição do colágeno tipo I e o aumento do colágeno tipo III estão associados a fibras de colágeno mais finas e mais flexíveis, levando à redução da resistência à tração (ERIKSEN *et al.*, 2002). No presente estudo foi observado um aumento da quantidade de colágeno tipo I e III no grupo MDA/FVE. A densidade de colágeno tipo III no grupo MDA/FVE apresentou níveis decrescentes ao longo do tempo, porém se mantendo sempre maiores em relação aos outros grupos. Já o colágeno tipo I apresentou aumento progressivo dos seus níveis, sendo esses sempre mais elevados que os outros grupos.

EGANÃ *et al.* (2009) e LIU *et al.* (2011) atribuíram os casos de insucesso no uso de MDA em feridas cutâneas à vascularização deficiente do leito receptor das feridas. Assim, a avaliação dos vasos sanguíneos foi um dado de investigação relevante. A MDA como já referenciado por DOBOS *et al.* (2018), fornece um arcabouço favorável ao crescimento e à migração celular, incluindo as células endoteliais. Essa característica foi confirmada

no presente estudo ao constatar uma proliferação mais acentuada de microvasos no grupo MDA no dia três quando comparada aos outros grupos, período inicial da neoangiogênese. Nas avaliações dos dias 14 e 21 notou-se um aumento significativo do número de vasos e do diâmetro dos vasos sanguíneos no grupo MDA/FVE, comportamento não encontrado no estudo de O'LOUGHLIN *et al.* (2013) que utilizou 1×10^6 CTTA cultivadas em MDA para a cobertura de úlceras em coelhos diabéticos e não constatou diferença no diâmetro dos vasos, entre o grupo controle e o que recebeu CCTA e MDA, após sete dias. Pode-se aventar a hipótese de uma sub resposta à ação de estímulo neoangiogênico das CTTA pela própria fisiopatologia do diabetes que envolve uma microangiopatia.

A FVE apresenta potencial angiogênico, existem estudos que comprovaram o aumento da expressão de fatores de crescimento pró angiogênicos como VEGF (ATALAY *et al.*, 2014) e FGFb (SUN *et al.*, 2017) quando utilizado a FVE em cicatrização de ferida cutânea. No presente estudo notou-se um aumento significativo do número de vasos no grupo FVE quando comparado ao grupo controle, resultado que corrobora os achados de CHAE *et al.* (2017) que demonstraram superioridade estatística no número de novos vasos sanguíneos no grupo que utilizou FVE na ferida cutânea quando comparado ao controle e ao grupo que recebeu CTTA. Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de BRETT *et al.* (2017), KARAGERGOU *et al.* (2018) demonstrando o potencial neo-angiogênico da FVE.

Ao avaliar o grupo MDA observou-se um aumento significativo no número de vasos sanguíneos quando comparado ao grupo controle. Esse dado diverge dos resultados obtidos por NIE *et al.* (2015) que não constataram diferença entre o grupo que utilizou MDA e o grupo controle com relação ao número de vasos sanguíneos detectado nas biópsias das feridas cutâneas realizadas em ratos diabéticos. Essa divergência talvez

possa ser explicada pela microangiopatia característica do diabetes. No presente estudo todos os grupos intervencionais obtiveram aumento do número de vasos sanguíneos e no dia 21 foi constatado um aumento significativo na vascularização do grupo MDA/FVE quando comparado ao grupo controle ($p < 0.001$), FVE ($p < 0.001$) e ao grupo MDA ($p < 0.01$). Este resultado demonstrou o efeito aditivo pró angiogênico da associação entre a FVE e a MDA. Embora não haja, até o momento, publicação de estudo envolvendo a associação de FVE e MDA em feridas cutâneas, alguns estudos semelhantes envolvendo CTTA e MDA demonstraram resultados similares com o incremento da vascularização nas feridas cutâneas (LIU *et al.*, 2011; O'LOUGHLIN *et al.*, 2013; DOONAERT *et al.*, 2019).

Novos estudos para o entendimento bioquímico, genético e celular da FVE poderão auxiliar na compreensão da interação, a nível molecular, da FVE na cicatrização cutânea à fim de construir uma base conceitual confiável, fundamental para seu avanço translacional, seja de forma isolada ou em associação a matrizes ou outros adjuvantes da regeneração tecidual. Além disso, novos estudos comparando os efeitos da FVE e da CTTA na associação com MDA seria fundamental para avaliar o estímulo neoangiogênico e colagenogênico de um grupo de células, representado pela FVE quando comparado às CTTA isoladas.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Fração Vascular Estromal associada à Matriz Dérmica Acelular, aumentou a vascularização, a quantidade de colágeno e a espessura da pele, durante a cicatrização de feridas cutâneas em coelhos, sem alterar o tempo de fechamento das feridas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns*. 2014;40(7):1375-83.

Balasubramani M, Kumar TR, Babu M. Skin substitutes: a review. *Burns*. 2001 Aug;27(5):534-44.

Bi H, Li H, Zhang C, Mao Y, Nie F, Xing Y, Sha W, Wang X, Irwin DM, Tan H. Stromal vascular fraction promotes migration of fibroblasts and angiogenesis through regulation of extracellular matrix in the skin wound healing process. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Oct;10(1):302-6.

Bondioli E, Purpura V, Orlandi C, Carboni A, Minghetti P, Cenacchi G, De Luca G, Capirossi D, Nigrisoli E, Melandri D. The use of an acellular matrix derived from human dermis for the treatment of full-thickness skin wounds. *Cell Tissue Bank*. 2019 Jun;20(2):183-192.

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15:641-8.

Brett E, Zielins ER, Chin M, Januszyk M, Blackshear CP, Findlay M, Momeni A, Gurtner GC, Longaker MT, Wan DC. Isolation of CD248-expressing stromal vascular fraction for targeted improvement of wound healing. *Wound Repair Regen*. 2017 May;25(3):414-22.

Brosious JP, Wong N, Fowler G, Stephenson LL, Wang WZ, Zamboni WA, Taghipour-Khiabani K. Evaluation of AlloMax acellular dermal matrix for objective collagen deposition. *J Reconstr Microsurg*. 2014 Jan;30(1):31-4.

Castagnoli C, Fumagalli M, Alotto D, Cambieri I, Casarin S, Ostorero A, Casimiri R, Germano P, Pezzuto C, Stella M. Preparation and characterization of a novel skin substitute. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 22(1). 347-53

Chae DS, Han S, Son M, Kim SW. Stromal vascular fraction shows robust wound healing through high chemotactic and epithelialization property. *Cytotherapy*. 2017;19(4):543-54.

Cheng W, Yan-Hua R, Fang-Gang N, et al. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. *Afr J Biotechnol* 2011;10:2524-9.

Clark RA. Basics of cutaneous wound repair. *J Dermatol Surg Oncol*. 1993 Aug;19(8):693-706.

Cross SE, Naylor IL, Coleman RA, Teo TC. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. *Br J Plast Surg*. 1995;48(4):189-97

Deng C, He Y, Feng J, Dong Z, Yao Y, Lu F. Conditioned medium from 3D culture system of stromal vascular fraction cells accelerates wound healing in diabetic rats. *Regen Med*. 2019;14(10):925-37

- Dobos A, Grandhi TSP, Godeshala S, Meldrum DR, Rege K. Parallel fabrication of macroporous scaffolds. *Biotechnol Bioeng*. 2018;115(7):1729-42.
- Doornaert M, Depypere B, Creytens D, Declercq H, Rinau J, Lemeire K, Monstrey S, Berx G, Blondeel P. Human decellularized dermal matrix seeded with adipose-derived stem cells enhances wound healing in a murine model: Experimental study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2019;46(2):4-11.
- Eganã JT, Danner S, Kremer M, Rapoport DH, Lohmeyer JA, Dye JF, Hopfner U, Lavandero S, Kruse C, and Machens HG. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. *Biomaterials*. 2009a;30(30):5918-26.
- Eganã JT, Fierro FA, Kruger S, Bornhauser M, Huss R, Lavandero S, and Machens HG. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2009b;15(5):1191-200.
- Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, et al. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthopaed Res* 2002;20:1352-7.
- Fosnot J, Kovach SJ 3rd, Serletti JM. Acellular dermal matrix: general principles for the plastic surgeon. *Aesthet Surg J*. 2011;31(7):5-12.
- Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy*. 2003a Jan;5(5):362-369.

- Huang HP, Hsu CC, Chang SC, Wang CH, Deng SC, Dai NT, Chen TM, Chan JYH, Chen SG, Huang SM. Adipose-Derived Stem Cells Seeded on Acellular Dermal Matrix Grafts Enhance Wound Healing in a Murine Model of a Full-Thickness Defect. *Ann Plast Surg*. 2012;69:656-62.
- Jeschke MG, Patsouris D, Stanojcic M, Abdullahi A, Rehou S. Pathophysiologic Response to burns in the elderly. *EBioMedicine*. 2015;2:1536-48
- Karagergou E, Dionyssopoulos A, Karayannopoulou M, Psalla D, Theodoridis A, Demiri E, Koliakos G. Adipose-derived stromal vascular fraction aids epithelialisation and angiogenesis in an animal model. *J Wound Care*. 2018 Oct;27(10):637-44.
- Kasibhatla S, Amarante-Mendes GP, Finucane D, Brunner T, Bossy-Wetzel E, Green DR. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. *CSH Protoc*. 2006 Aug;21(2):230-43
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Apr;20(4):256-60.
- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2007 Oct;48(1):15-24.

- Lei X, Yang Y, Shan G, Pan Y, Cheng B. Preparation of ADM/PRP freeze-dried dressing and effect of mice full-thickness skin defect model. *Biomed Mater*. 2019 Mar;14(3):345-57
- Liu S, Zhang H, Zhang X, Lu W, Huang X, Xie H, Zhou J, Wang W, Zhang Y, Liu Y, Deng Z, Jin Y. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(6):725-39.
- Lolli P, Malleo G, Rigotti G. Treatment of chronic anal fissures and associated stenosis by autologous adipose tissue transplant: a pilot study. *Dis Colon Rectum*. 2010;53:460–6.
- Machens HG, Berger AC, Mailaender P. Bioartificial skin. *Cells Tissues Organs*. 2000;167(3):88-94
- Mazzetti MP, Oliveira IS, Miranda-Ferreira R, Fauaz G, Ribeiro CN, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, Eça LP. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. *Acta Cir Bras*. 2010 Feb;25(1):24-7.
- McIntosh KR, Frazier T, Rowan BG, Gimble JM. Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol* 2013 Feb;9(2):175-84
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30:804–10.

Moscatello DK, Dougherty M, Narins RS, Lawrence N.

Cryopreservation of human fat for soft tissue augmentation: viability requires use of cryoprotectant and controlled freezing and storage.

Dermatol Surg. 2005 Nov;31(11 Pt 2):1506-10.

Murohara, T., Shintani, S., and Kondo, K. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Des* 15, 2784, 2009.

Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Dec;25(12):2542-7.

Ni Y, He X, Yuan Z, Liu M, Du H, Zhong X. Effect of fat particle-to-SVF ratio on graft survival rates in rabbits. *Ann Plast Surg.* 2015 May;74(5):609-14.

Nie C, Zhang G, Yang D, Liu T, Liu D, Xu J, Zhang J. Targeted delivery of adipose-derived stem cells via acellular dermal matrix enhances wound repair in diabetic rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Mar;9(3):224-35.

Nussbaum SR, Carter MJ, Fife CE, DaVanzo J, Haught R, Nusgart M, Cartwright D. An Economic Evaluation of the Impact, Cost, and Medicare Policy Implications of Chronic Nonhealing Wounds. *Value Health.* 2018 Jan;21(1):27-32.

O'Loughlin A, Kulkarni M, Creane M, Vaughan EE, Mooney E, Shaw G, Murphy M, Dockery P, Pandit A, O'Brien T. Topical administration of allogeneic mesenchymal stromal cells seeded in a collagen scaffold augments wound healing and increases angiogenesis in the diabetic rabbit ulcer. *Diabetes*. 2013 Jul;62(7):2588-94.

Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, Gimble JM. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *J Cell Physiol*. 2011 Mar;226(3):843-51.

Pham C, Greenwood J, Cleland H, Woodruff P, Maddern G. Bioengineered skin substitutes for the management of burns: a systematic review. *Burns*. 2007 Dec;33(8):946-57.

Pieper JS, Hafmans T, van Wachem PB, van Luyn MJ, Brouwer LA, Veerkamp JH, and van Kuppevelt TH. Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *J Biomed Mater Res*. 2002;62(2):185-94.

Pu LL, Cui X, Fink BF, Cibull ML, Gao D. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthet Surg J*. 2004 Nov- Dec;24(6):536-41.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cell. *Circulation*. 2004;109(10):1292-8.

- Salem H, Ciba P, Rapoport DH, Egana JT, Reithmayer K, Kadry M, Machens HG, and Kruse, C. The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration. *Biomaterials*. 2009;30(5):789-96.
- Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytherapy*. 2013 Aug;15(8):979-85.
- Shi H, Han C, Mao Z, Ma L, and Gao C. Enhanced angiogenesis in porous collagen-chitosan scaffolds loaded with angiogenin. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(11):1775-85.
- Snowden JM. Wound closure: an analysis of the relative contributions of contraction and epithelialization. *J Surg Res*. 1984 Dec;37(6):453-63.
- Später T, Frueh FS, Nickels RM, Menger MD, Laschke MW. Prevascularization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds: stromal vascular fraction versus adipose tissue-derived microvascular fragments. *J Biol Eng*. 2018 Nov;12(4):24-33.
- Suh EJ, Remillard MY, Legesse-Miller A, Johnson EL, Lemons JM, Chapman TR, et al. A microRNA network regulates proliferative timing and extracellular matrix synthesis during cellular quiescence in fibroblasts. *Genome Biol* 2012;13(12):121-34.
- Sun W, Lin H, Chen B, Zhao W, Zhao Y, Xiao Z, Dai J. Collagen scaffolds loaded with collagen-binding NGF-beta accelerate ulcer healing. *J Biomed Mater Res A*. 2010 Mar;92(3):887-95

Sun M, He Y, Zhou T, Zhang P, Gao J, Lu F. Adipose Extracellular Matrix/Stromal Vascular Fraction Gel Secretes Angiogenic Factors and Enhances Skin Wound Healing in a Murine Model. *Biomed Res Int.* 2017;14:310-17.

Tamri P, Hemmati A, Boroujerdnia MG. Wound healing properties of quince seed mucilage: In vivo evaluation in rabbit full-thickness wound model. *Int J Surg.* 2014;12:843-7.

Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010 Mar;4(3):224-32.

Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *J Biomed Mater Res.* 1980 Jan;14(1):65-81.

Yao C, Roderfeld M, Rath T, Roeb E, Bernhagen J, and Steffens G. The impact of proteinase-induced matrix degradation on the release of VEGF from heparinized collagen matrices. *Biomaterials.* 2006;27(8):1608-16.

Young A, McNaught CE. The physiology of wound healing. *Surgery.* 2011;29(10):475-9.

Yu G, Floyd ZE, Wu X, Halvorsen YD, Gimble JM. Isolation of human adipose-derived stem cells from lipoaspirates. *Methods Mol Biol.* 2011;702:17-27.

Zanata F, Bowles A, Frazier T, Curley JL, Bunnell BA, Wu X, Wade J, Devireddy R, Gimble JM, Ferreira LM. Effect of Cryopreservation on Human Adipose Tissue and Isolated Stromal Vascular Fraction Cells: In Vitro and In Vivo Analyses. *Plast Reconstr Surg.* 2018 Feb;141(2):232e-243e.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A.* 2010 Jan;77(1):22-30.

Zimmermann A, Pelegri AA, Peruzzo D, Martinez EF, de Mello e Oliveira R, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015 Nov-Dec;30(6):1415-22.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95

Fontes consultadas

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

An Introduction to Medical Statistics. M. Bland, 4^a.ed. Oxford University Press, 2015

Curso de Manipulação de Animais de Laboratório [Internet]. Salvador (BA): Fundação Oswaldo Cruz. 2005 - [citado 2018 Jan 03]. Disponível em http://www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf

HOUAISS A. Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa. 1^a ed. Objetiva, 2009

Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. Acta Cir Bras. 2005;20(Supl 2):19-25

Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. Acta Cir Bras. 2005;20(Supl 2):2-9

MICHAELIS A. Dicionário inglês-português. 2^a ed. São Paulo: Melhoramentos,

Princípios Éticos no uso de animais de laboratório [Internet]. Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório - Colégio Brasileiro de Experimentação Aniaml (SBCAL-COBEA). Disponível em http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article%id=102&Itemid=1

NORMAS ADOTADAS

1. Ferreira LM. PROJETOS, ORIENTAÇÕES e TESES Orientação Normativa. São Paulo: Editora RED Publicações; 2017.
2. Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde.
Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/>
3. Patrias K. Citing medicine: the NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet]. 2 ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007 –. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>
4. Sistema Internacional de Unidades – SI. 9ª ed. Rio de Janeiro; 2012.
Disponível no endereço eletrônico:
<http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes.asp>
5. COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>

APÊNDICE 1

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



, 18 de julho de 2016
CEUA N 9824290116

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Jose Da Conceicao Carvalho Junior

Depto/Disc: Cirurgia Plástica

Pesquisadores associados: Antonio Carlos Aloise (unifesp); Mariana De Freitas Silva (unifesp); Lydia Masako Ferreira (orientador)

Título do projeto: "FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL E ENXERTO DE GORDURA ASSOCIADA A MATRIZ DÉRMICA ACELULAR EM FERIDAS DE ESPESSURA TOTAL EM COELHOS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP/HSP

Introdução: A cobertura de grandes defeitos cutâneos permanecem um desafio constante dentro das cirurgias reparadoras. A engenharia tecidual através dos substitutos cutâneos como a matriz dérmica acelular (MDA) vem se tornando cada dia mais populares. Estratégias têm sido empregadas para aumentar a capacidade de vascularização das matrizes, sendo uma delas o uso de Fração vascular estromal (FEV) Objetivo: Avaliar a influência da FVE e do enxerto de gordura quando associadas a matriz dérmica acelular na cicatrização de feridas cutâneas de espessura total em coelhos. Método: Serão utilizados 18 coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia, pesando entre 3-4kg. Serão realizadas duas feridas de espessura total no formato quadrangular (20 mm) na pele do dorso de todos os animais. Na sequência os animais serão distribuídos em três grupos: o primeiro, denominado grupo controle (GC) (n=6), onde as duas feridas serão cobertas por uma matriz dérmica acelular. O segundo, denominado grupo experimental 1(GE1) (n=6) onde as feridas serão cobertas com uma matriz dérmica acelular associada ao enxerto de gordura autólogo. O terceiro, denominado grupo experimental 2 (GE2) (n=6) onde as feridas serão cobertas com uma matriz dérmica acelular associada a FEV. Amostras das lesões se darão com 10 e 21 dias sendo realizados estudos histológicos e imunohistoquímicos. Serão analisados, formação de colágeno, número de vasos neoformados, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF). Resultados esperados: Espera-se mensurar o efeito angiogênico bem como o processo de cicatrização promovida pela FVE junto à matriz dérmica e compará-lo ao efeito induzido pelo enxerto de gordura junto à matriz-dérmica

ANIMAIS:

Serão utilizados

18 coelhos Nova Zelândia, machos, 3-4 Kg, 2 anos

Procedência: CEDEME

Manutenção: CEDEME

Cronograma: Início previsto para: julho/2016 com término previsto para: dezembro/2016

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 17/06/2016, **ANALISOU** e **APROVOU** todos os procedimentos apresentados neste protocolo.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 13 de dezembro de 2018
CEUA N 9824290116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: José Da Conceição Carvalho Júnior
Área: Cirurgia Plástica/cirurgia

Título da proposta: "FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL E ENXERTO DE GORDURA ASSOCIADA A MATRIZ DÉRMICA ACELULAR EM FERIDAS DE ESPESSURA TOTAL EM COELHOS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UNIFESP (ID 004093)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 06/dezembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A emenda em questão se refere à solicitação do acréscimo de mais um grupo de coelhos ao trabalho. Até o momento já realizamos as cirurgias dos 18 coelhos inicialmente solicitados tendo como grupos: Grupo Controle, Grupo Matriz Dermal e Grupo Matriz Dermal mais Fração Estromal Vascular. Porém, a partir das análises iniciais estamos convictos que precisaríamos de mais um grupo de 6 coelhos para avaliar a influência isolada da Fração Vascular Estromal pois não está claro se o desfecho final do nosso trabalho (tempo de cicatrização) se alterou devido à ação isolada da Fração Estromal ou à ação da própria Matriz Dermal. Portanto, para responder a essa dúvida precisamos dos resultados comparativos de um grupo em que a intervenção seja somente da Fração Estromal."

Comentário da CEUA: "APROVADO - EMENDA APROVADA. Devem ser adicionados ao projeto: Espécie: Coelhos Gênero: Machos Peso: 3 e 4 kg Idade: 2 anos N: 6".

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

APÊNDICE 2

The ARRIVE Guidelines Checklist

Animal Research: Reporting In Vivo Experiments

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK.

	ITEM	RECOMMENDATION	Section/ Paragraph
Title	1	Provide as accurate and concise a description of the content of the article as possible.	
Abstract	2	Provide an accurate summary of the background, research objectives, including details of the species or strain of animal used, key methods, principal findings and conclusions of the study.	
INTRODUCTION			
Background	3	<p>a. Include sufficient scientific background (including relevant references to previous work) to understand the motivation and context for the study, and explain the experimental approach and rationale.</p> <p>b. Explain how and why the animal species and model being used can address the scientific objectives and, where appropriate, the study's relevance to human biology.</p>	
Objectives	4	Clearly describe the primary and any secondary objectives of the study, or specific hypotheses being tested.	
METHODS			
Ethical statement	5	Indicate the nature of the ethical review permissions, relevant licences (e.g. Animal [Scientific Procedures] Act 1986), and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research.	
Study design	6	<p>For each experiment, give brief details of the study design including:</p> <p>a. The number of experimental and control groups.</p> <p>b. Any steps taken to minimise the effects of subjective bias when allocating animals to treatment (e.g. randomisation procedure) and when assessing results (e.g. if done, describe who was blinded and when).</p> <p>c. The experimental unit (e.g. a single animal, group or cage of animals).</p> <p>A time-line diagram or flow chart can be useful to illustrate how complex study designs were carried out.</p>	
Experimental procedures	7	<p>For each experiment and each experimental group, including controls, provide precise details of all procedures carried out. For example:</p> <p>a. How (e.g. drug formulation and dose, site and route of administration, anaesthesia and analgesia used [including monitoring], surgical procedure, method of euthanasia). Provide details of any specialist equipment used, including supplier(s).</p> <p>b. When (e.g. time of day).</p> <p>c. Where (e.g. home cage, laboratory, water maze).</p> <p>d. Why (e.g. rationale for choice of specific anaesthetic, route of administration, drug dose used).</p>	
Experimental animals	8	<p>a. Provide details of the animals used, including species, strain, sex, developmental stage (e.g. mean or median age plus age range) and weight (e.g. mean or median weight plus weight range).</p> <p>b. Provide further relevant information such as the source of animals, international strain nomenclature, genetic modification status (e.g. knock-out or transgenic), genotype, health/immune status, drug or test naïve, previous procedures, etc.</p>	

Housing and husbandry	9	Provide details of: a. Housing (type of facility e.g. specific pathogen free [SPF]; type of cage or housing; bedding material; number of cage companions; tank shape and material etc. for fish). b. Husbandry conditions (e.g. breeding programme, light/dark cycle, temperature, quality of water etc for fish, type of food, access to food and water, environmental enrichment). c. Welfare-related assessments and interventions that were carried out prior to, during, or after the experiment.	
Sample size	10	a. Specify the total number of animals used in each experiment, and the number of animals in each experimental group. b. Explain how the number of animals was arrived at. Provide details of any sample size calculation used. c. Indicate the number of independent replications of each experiment, if relevant.	
Allocating animals to experimental groups	11	a. Give full details of how animals were allocated to experimental groups, including randomisation or matching if done. b. Describe the order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed.	
Experimental outcomes	12	Clearly define the primary and secondary experimental outcomes assessed (e.g. cell death, molecular markers, behavioural changes).	
Statistical methods	13	a. Provide details of the statistical methods used for each analysis. b. Specify the unit of analysis for each dataset (e.g. single animal, group of animals, single neuron). c. Describe any methods used to assess whether the data met the assumptions of the statistical approach.	
RESULTS			
Baseline data	14	For each experimental group, report relevant characteristics and health status of animals (e.g. weight, microbiological status, and drug or test naïve) prior to treatment or testing. (This information can often be tabulated).	
Numbers analysed	15	a. Report the number of animals in each group included in each analysis. Report absolute numbers (e.g. 10/20, not 50% ²). b. If any animals or data were not included in the analysis, explain why.	
Outcomes and estimation	16	Report the results for each analysis carried out, with a measure of precision (e.g. standard error or confidence interval).	
Adverse events	17	a. Give details of all important adverse events in each experimental group. b. Describe any modifications to the experimental protocols made to reduce adverse events.	
DISCUSSION			
Interpretation/scientific implications	18	a. Interpret the results, taking into account the study objectives and hypotheses, current theory and other relevant studies in the literature. b. Comment on the study limitations including any potential sources of bias, any limitations of the animal model, and the imprecision associated with the results ² . c. Describe any implications of your experimental methods or findings for the replacement, refinement or reduction (the 3Rs) of the use of animals in research.	
Generalisability/translation	19	Comment on whether, and how, the findings of this study are likely to translate to other species or systems, including any relevance to human biology.	
Funding	20	List all funding sources (including grant number) and the role of the funder(s) in the study.	

APÊNDICE 3

PESO DA GORDURA INTERESCAPULAR DE CADA ANIMAL

Grupo Controle	
Coelhos	Peso (g)
CC1	10,99
CC2	18,75
CC3	22,05
CC4	10,94
CC5	31,52
CC6	15,75

Grupo MDA	
Coelhos	Peso (g)
CM1	12,34
CM2	16,30
CM3	21,70
CM4	10,80
CM5	18,93
CM6	11,78

Grupo FVE	
Coelhos	Peso (g)
CF1	10,06
CF2	17,17
CF3	13,55
CF4	16,21
CF5	16,20
CF6	13,58

Grupo MDA/FVE	
Coelhos	Peso (g)
CMF1	11,89
CMF2	15,05
CMF3	19,89
CMF4	16,12
CMF5	10,09
CMF6	13,34

APÊNDICE 4

Protocolo de Processamento do Tecido Adiposo para Obtenção da FVE

Data: Hora: N^o do Animal:

Volume retirado:

Peso da gordura:

Transferir tecido de gordura para tubo de 15 ml

Adicionar Solução de PBS estéril pré-aquecido 37°C para lavagem do tecido (2x o volume da gordura)

Lavar 3x

Transferir para placa de petri para fragmentação (tesoura de íris)

Aspirar tecido fragmentado com pipeta Pasteur com bulbo e transferir para tubo de 50 ml

Preparar solução de colagenase para digestão enzimática do tecido restante; anotar volume: ___ ml

Pesar Colagenase tipo I (1mg/ml de tecido); anotar peso: ___ mg

Em cabine de fluxo dissolver Colagenase tipo I em Solução de Albumina Sérica Bovina (10 mg/1mg colagenase) e CaCl₂ (2M)

(1ul/ml) 0,1 ml de Solução a 1% de Penicilina + Estreptomicina para cada 1mg de colagenase

Adicionar solução de colagenase filtrada ao tecido adiposo em igual volume; anotar hora: ____

Transportar tubo fechado para agitadora/incubadora 80-120rpm 37°C por 30min

Centrifugar tubo 300G (1300 rpm)/5min, ressuspender precipitado agitando delicadamente e repetir

Aspirar sobrenadante e manter o precipitado intacto pipetando cuidadosamente

Ressuspender precipitado em 5ml de PBS

Passar solução através de filtro celular de poros de 100 μ m

Proceder contagem de FVE para injeção nos animais do grupo correspondente: ressuspender 25 μ l suspensão celular com 75 μ l azul de tripan (diluição 1:4) e transferir para contador automático

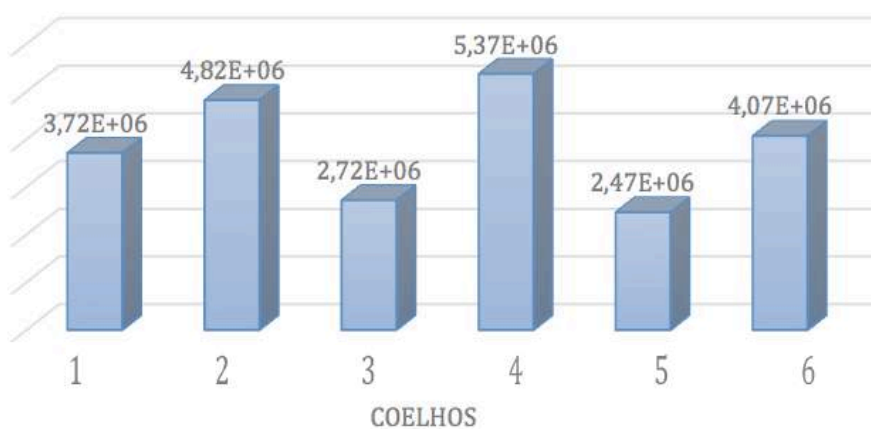
N⁰ de células viáveis/tecido:

N⁰ de células viáveis/ml:

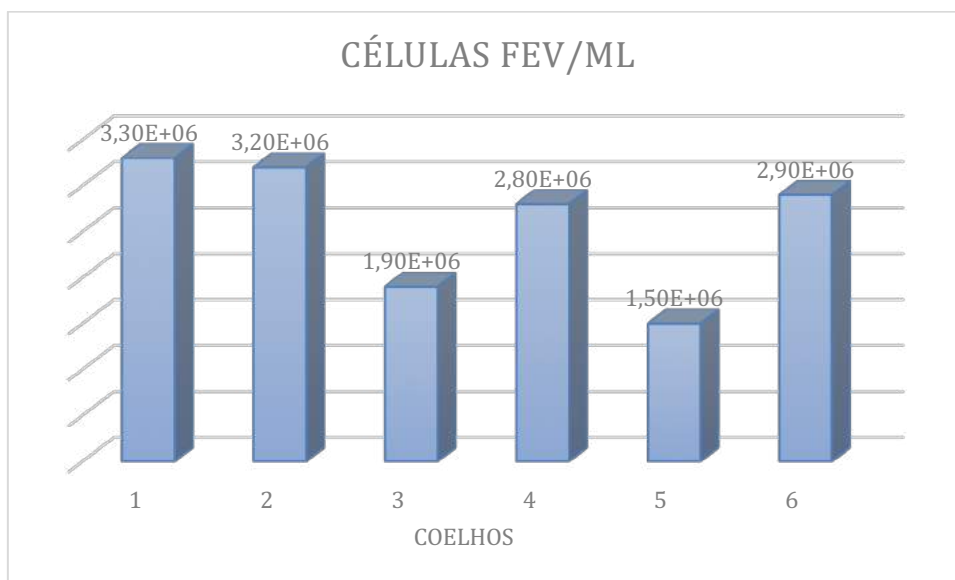
APÊNDICE 5

Número de células de FVE por tecido (g) e por ml obtido de cada coelho do grupo FVE. Viabilidade média de 97% após o teste do Azul de Tripán.

CÉLULAS/TECIDO (g)



CÉLULAS FEV/ML



APÊNDICE 6

Número de células de FVE por tecido (g) e por ml obtido de cada coelho do grupo MDA/FVE. Viabilidade média de 97% após o teste do Azul de Tripán.

