

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS
WISTAR IMUNOSSUPRIMIDOS COM DEXAMETASONA**

ROBERTA DELESSA FARIA

VILA VELHA
SETEMBRO / 2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS
WISTAR IMUNOSSUPRIMIDOS COM DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ROBERTA DELESSA FARIA

VILA VELHA
SETEMBRO / 2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

F224e Faria, Roberta Delessa.

Efeitos da infusão de células tronco mesenquimais sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar imunossuprimidos com dexametasona / Roberta Delessa Faria. – 2013.

55 f.: il.

Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. Tecidos (Anatomia e fisiologia) – ferimentos e lesões. 2. Cicatrização de feridas. 3. Medicamentos – uso terapêutico. 4. Células-tronco. I. Monteiro, Betânia Souza. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

ROBERTA DELESSA FARIA

**EFEITOS DA INFUSÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS
WISTAR IMUNOSSUPRIMIDOS COM DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Aprovada em 24 de setembro de 2013

Banca Examinadora:



Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto (UFPI)



Dr. Vinicius Ricardo Cunha de Souza (UVV)



Dra. Betânia Souza Monteiro (UVV - Orientadora)

DEDICATÓRIA:

Dedico este trabalho ao meu pai, Derli da Silva Faria, por me tornar a cada dia uma pessoa melhor, onde mesmo diante das dificuldades e obstáculos, nunca deixou de acreditar em mim, e me apoiou do início ao fim dessa jornada, pelo amor incondicional de PAI que ele dedica e sempre dedicou a mim.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pela concessão da bolsa que viabilizou meus estudos, dedicação e ao apoio financeiro ao projeto.

À Universidade Vila Velha que proporcionou todo apoio na logística e execução do projeto de pesquisa.

À minha orientadora Betânia Souza Monteiro, por toda paciência e dedicação durante todo esse processo.

À todos os professores do programa de Mestrado em Ciência Animal, que contribuíram para a minha formação.

Ao colega Mário Sérgio Wanzeller, do Laboratório de Acompanhamento Experimental da UVV, pela ajuda, amizade e companhia agradável durante todo o meu projeto.

Às colegas, Noely Godoi Pianca e Emanuelle Pimentel Cruz que me ajudaram durante a realização do meu projeto. Muito obrigada meninas!!!

À minha amiga Alessandra, pela parceria de todas as horas, pelo companheirismo e paciência nos momentos compartilhados de alegrias, tristezas e dificuldades nesse longo percurso.

À aos meus pais que são minha base, meu alicerce, meu amor maior, que me tornaram a pessoa que hoje sou, tornando assim possível a realização deste mestrado.

À toda minha família (pais, irmão, tias, tios, primos e primas), pelo constante apoio sem o qual o que hoje sou não seria possível.

Aos meus grandes e valiosos amigos e amigas Evelyn Baptista de Bortoli, Soraya de Figueiredo Handere, Raphaela Haddad Tápias Bissoli e Fábio Macedo Pimentel, por entenderem minha ausência e por torcerem sempre por mim.

Ao meu querido, amado e saudoso avô Anísio Gomes Dilessa *in memoriam* que mesmo estando longe, sei que está sempre ao meu lado. Que com a pouca educação que teve criou e educou filhos e netos brilhantemente, que me ensinou a sempre respeitar ao próximo, a ser humilde, a fazer o bem sem olhar a quem, e a amar os animais. Vovô, muito obrigada por ter sido sempre muito presente na minha vida, a saudade é imensa!

Aos amigos do SHOP CÃO que sempre me apoiaram e souberam entender a minha ausência.

Ao colega Wagner Fiorio pelos ensinamentos de patologia neste projeto.

Ao colega e professor, Dominik Lenz por estar sempre disposto e pronto para ajudar.

À Mônica de Alvarenga Feijó Bianchi, que desde a minha graduação sempre me incentivou, sendo um exemplo incomparável de sabedoria, inteligência, profissionalismo e amor aos animais, ela é em quem me espelho “quando eu crescer quero ser igual a você”.

Ao Bud *in memoriam*, meu amigão de quatro patas, cachorro mais extraordinário que conheci, ele se doava inteiramente a qualquer pessoa que demonstrasse carinho a ele. Animal pelo qual eu busquei estudar mais, mais infelizmente não deu tempo de salvá-lo. Bud muito obrigada!!!

As minhas “meninas” Miryth, Mini e Lua, pelas quais eu tenho um amor incondicional.

E também não poderia deixar de agradecer aos animais que tornaram esse projeto possível, que Deus abençoe todas as criaturas.

Os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 – Corticoides	03
2.2 – Anatomia e fisiologia da pele	07
2.3 – Cicatrização cutânea	08
2.3.1 - Coagulação	09
2.3.2 – Inflamação	10
2.3.3 – Proliferação	11
2.3.4 – Contração da ferida	12
2.3.5 – Remodelação	12
2.3.6 – Considerações sobre o colágeno	14
2.4 – Células tronco mesenquimal	14
3 – OBJETIVOS	18
4 - MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1- Isolamento, caracterização e expansão de CTM	20
4.2- Procedimentos anestésicos, cirúrgicos e tratamentos	22
4.3- Plano cirúrgico	23
4.4- Tratamento	25
4.5- Avaliação clínica	27
4.6- Biópsias e procedimentos histológicos	28
4.7 - Avaliações estatísticas	30
5 – RESULTADOS	30

5.1- Cultura celular	30
5.2- Alterações clínicas	33
5.3- Alteração macroscópica	34
5.4- Alteração histopatológica	37
5.4.1 – Material coletado dos animais eutanasiados 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GC	37
5.4.2 – Material coletado dos animais eutanasiados 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD	38
5.4.3 – Material coletado dos animais eutanasiados 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM	40
5.4.4 – Material coletado dos animais eutanasiados 7 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD	41
5.4.5 – Material coletado dos animais eutanasiados 7 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM	42
5.4.6 – Material coletado dos animais eutanasiados 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GC	42
5.4.7 – Material coletado dos animais eutanasiados 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD	43
5.4.8 – Material coletado dos animais eutanasiados 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM	43
5.4.9 - Cellprofiler®	43
6 – DISCUSSÃO	47
7 – CONCLUSÃO	51
8 – REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da Pele e seus anexos.	08
Figura 2: Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imune-celular.	13
Figura 3: Animal do grupo GC recebendo anestesia geral por via IM.	23
Figura 4: Animal tricotomizado (A); Área padronizada demarcada na pele com tinta de carimbo (B); Área padronizada demarcada na pele com tinta de carimbo já com campo operatório (C); Ferida cirúrgica sem fixação de bordas (D).	24
Figura 5 – Organograma ilustrando os animais do experimento e como os mesmos foram divididos nos grupos de tratamento recebido.	26
Figura 6: Fotos ilustrativas dos animais recendo infusão de CTM 48 horas após a criação da ferida cirúrgica.	26
Figura 7: Imagem ilustrativa da mensuração da ARL nos dias 1, 5 e 10 após a criação da ferida cirúrgica, através do programa Image Pro Plus [®] , no qual os traços em amarelo demonstram o contorno da área da ferida.	27
Figura 8: Animais eutanasiados aos 3 (A), 7 (B) e 15 (C) dias respectivamente, após a criação da ferida cirúrgica. Em destaque ,(retângulo) a área de tecido coletada envolvendo a ferida cirúrgica e a pele intacta, que foi encaminhada à histopatologia.	29
Figura 9: Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais (CTM) oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) esta comparada com os isotipos controle (gráfico preto). O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo positivo quando as células ultrapassam 10 de células avaliadas durante o evento. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para o estudo (R1), que representou 43% de homogeneidade. As amostras da cultura revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 (B) e 93,89% de CD45 (C) e expressão positiva para 99,0% de CD90 (D) e 95,8% de CD 54 (E).	32
Figura 10: Animais apresentando secreção ocular escura (A e B); Áreas de hipotricose (C e D).	33
Figura 11 – Fotos dos animais dos grupos GC, GD e GDCTM nos dias 1, 5, 10 e 15 após a criação da ferida cirúrgica.	34

Figura 12 – Demonstração gráfica dos valores das médias das repetições para ARL dos grupos do experimento; GC em azul, GD em vermelho e GDCTM em verde. O eixo Y do gráfico representa o valor de ARL em cm, enquanto o eixo X representa as repetições DIA 0; DIA 1; DIA 3; DIA 5; DIA 10; DIA 12 e DIA 15.	35
Figura 13 – Demonstração gráfica ilustrando o TEC dos grupos: GC em azul; GD em vermelho e GDCTM em verde. No eixo Y representa o valor de TEC em dias, enquanto o eixo X representa os animais (1, 2, 3 e 4) avaliados para TEC.	36
Figura 14 – Neovascularização indicada com setas vermelhas (A); Demarcação da deposição do colágeno de forma mais discreta na área circulada e neovascularização indicada pela seta preta (B)	38
Figura 15 – Neovascularização indicada com a seta vermelha (A); Borda da Ferida marcada com as setas pretas (B); deposição de colágeno demarcado pelas áreas circulares e neovascularização indicada com a seta lilás (C e D).	40
Figura 16 – Vasodilatação indicadas pelas setas pretas (A); Evidenciação e maior número de fibras colágenas recém formadas destacada na área circular (B).	41
Figura 17 – Fibras colágenas menos evidentes em animal eutanasiado 7 dias após lesão do GD (A); Fibras colágenas mais espessas, logo mais evidentes em animal eutanasiado 7 dias após lesão do GDCTM.	42
Figura 18 – Imagem histopatológica original contendo fibras colágenas (A); Imagem histopatológica em preto e branco (B); Imagem corada em verde e vermelho, onde a coloração verde demarca as fibras colágenas (C).	45
Figura 19 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GC nos dias 3 e 15 após lesão.	45
Figura 20 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GD nos dias 3, 7 e 15 após lesão.	46
Figura 21 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GC nos dias 3, 7 e 15 após lesão.	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Apresenta a média em centímetros da área da lesão (ARL) dos animais dos grupos do experimento nos dias 1, 3, 5, 10, 12 e 15 após a criação da ferida. 35
- Tabela 2:** Médias dos valores encontrados para a variável *TEC* em ratos wistar submetidos aos tratamentos com imunossupressão com dexametasona (GD), com solução fisiológica (GC), e Imunossupressão por dexametasona com transplante de células-tronco mesenquimais (GDCTM) 36

LISTA DE ABREVIATURAS

CTM = Células tronco mesenquimais
MO = Medula óssea
SID = Uma vez ao dia
PBS = Tampão de fosfato salina
PSA = Penicilina, estreptomicina, anfotericina B
pH = Potencial hidrogeniônico
DMEM = Dulbeccos's modified eagle medium
SFB = Soro fetal bovino
°C = Graus celsius
CO₂ = Dióxido de carbono
HE = Hematoxilina e eosina
ACTH = Hormônio adrenocorticotrópico
CRH= Hormônio liberador de corticotropina
mg= Miligrama
Kg= Quilograma
ADH= Hormônio antidiurético
TNF= Fator de necrose tumoral
PDGF= Fator de crescimento derivado de plaqueta
CTS= Células tronco somáticas
EGF= Fator de crescimento vascular
CTGF= Fator de crescimento do tecido conectivo
FCF= Fator de crescimento fibroblástico
ICF= Fator de crescimento insulínico
EPGF= Fator de crescimento epidermal
IM= Intramuscular
IV= Intravenosa
SC= Subcutânea
FC= Frequência cardíaca
FR= Frequência respiratória

TR= Temperatura retal

FAPES= Fundação de apoio a pesquisa do Espírito Santo

UVV= Universidade Vila Velha

UFV= Universidade federal de Viçosa

UFMG= Universidade federal de Minas Gerais

g= Gramas

ml= Mililitro

mm = Milímetro

mm²= Milímetro quadrado

GC = Grupo controle

GD= Grupo dexametasona

GDCTM= Grupo dexametasona célula tronco mesenquimais

ARL= Área da lesão

TEC= Tempo de cicatrização

FIC= Fibras colágenas

ANOVA= Análise de variância

RESUMO

FARIA, Roberta Delessa, MSc., Universidade Vila Velha – ES, setembro de 2013.

Efeitos da infusão de células tronco mesenquimais sobre a cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar imunossuprimidos com dexametasona.

Orientadora: Betânia Souza Monteiro.

A cicatrização ocorre de forma dinâmica, restaurando o tecido lesionado ou substituindo-o por colágeno. Os corticoides interferem em todas as fases da cicatrização, a dexametasona é um glicocorticoide que possui atividade anti-inflamatória e imunossupressora elevada. Com o uso cada vez mais frequente desses fármacos na clínica veterinária e subsequentemente seus prejuízos, surge a possibilidade promissora da terapia com células tronco mesenquimais (CTM). As CTM são capazes de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo. Inúmeros estudos veem sido realizados testando a regeneração de lesões teciduais através do uso destas células. As CTM podem ser administradas no local da lesão ou por infusão intravenosa, e são atraídas por quimiotaxia para os locais de lesão. O presente trabalho visa analisar a resposta do processo cutâneo mediante o uso de CTM, que serão administradas por via intravenosa, em feridas cirúrgicas de ratos da linhagem Wistar medicados previamente com corticosteroides por 30 dias. Este experimento constituiu-se com 3 grupos: grupo controle (GC), onde os animais receberam 0,2ml de NaCl 0,9% SC/SID durante 30 dias, e uma única aplicação de 0,5ml de NaCl 0,9% IV 48 horas após a cirurgia; grupo dexametasona (GD) cujos animais receberam aplicações de corticoide durante 30 dias e após esse tempo foi realizada a ferida cirurgia, e o grupo dexametasona CTM (GDCTM) cujos animais receberam corticoide da mesma forma ao grupo anterior, no entanto, foram tratados com CTM 48 horas após a realização da ferida cirúrgica. As feridas cirúrgicas dos animais do GC fecharam em média 14,75 dias após a realização da lesão, os animais do GD tiveram suas feridas cirúrgicas fechadas em até 22 dias, já as feridas cirúrgicas dos animais do GDCTM foram fechadas em 14 dias. Verificou-se que os animais imunossuprimidos com dexametasona (GD) tiveram um processo de cicatrização em média com 8 dias a mais, quando comparados aos demais grupos e o tempo de cicatrização do GC e GDCTM apresentaram-se muito próximo e a escolha pela infusão por via intravenosa foi efetiva para ação das células no local da lesão.

Palavras-Chave: Reparação tecidual, corticoide, células-tronco.

ABSTRACT

FARIA, Roberta Delessa, MSc, University Vila Velha -. ES, September 2013. **Effects of infusion of mesenchymal stem cells on the healing of skin wounds in rats immunosuppressed with dexamethasone.** Adviser: Betânia Souza Monteiro.

Healing occurs dynamically, restoring damaged tissue and replacing it with collagen. Corticosteroids interfere at all stages of healing, Dexamethasone is a glucocorticoid that possess anti-inflammatory and high immunosuppressive activity. With the frequent use of these drugs in veterinary clinic and subsequently its losses, the promising possibility of therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) arises. MSCs are capable of maintaining and promoting the regeneration of multiple lineages of cells in the organisms. Numerous studies have been conducted testing the regeneration of tissue injury through the use of these cells. MSCs can be administered at the site of injury or by intravenous infusion, and are attracted by chemotaxis to sites of injury. This study aims to analyze the response of the cutaneous process through the use of MSC, which will be administered intravenously in surgical wounds in *Wistar* rats previously treated with corticosteroids for 30 days. This experiment consisted with 3 groups: control group (CG), where the animals received 0.2 ml of 0.9% NaCl SC / SID for 30 days and a single application of 0.5 ml of 0.9% NaCl IV 48 hours after surgery; dexamethasone group (GD) whose animals received corticosteroid applications for 30 days and after the wound was performed, and the dexamethasone group (GDCTM) whose animals received similarly to the previous group corticosteroids, were treated with MSC However 48 hours after the completion of the surgical wound . The surgical wounds of animals GC closed on average of 14.75 days after the completion of the lesion, the animals of GD had their surgical wounds closed within 22 days, since the surgical wounds of animals GDCTM were closed in 14 days. It was observed that immunosuppressed animals with dexamethasone (GD) had a 8 days of average healing process when compared with the other groups and the healing time of GC and GDCTM presented numbers in close proximity, the choice by infusion via intravenously was effective for the action of cells at the injury site.

Key words: Tissue Repair, corticosteroids, stem cells

1- INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade, o homem sempre têm buscado alternativas para o tratamento de suas feridas cutâneas. Diversos produtos, medicamentos e terapias vêm sendo empregados ao longo dos séculos com o objetivo de melhorar e acelerar a reparação cicatricial (CAMPOS, et al.,2007; DEALEY, 2008). Atualmente, muito se tem investido em pesquisas na compreensão dos fenômenos e processos envolvidos nas fases da reparação dos tecidos e, principalmente, no desenvolvimento de novos recursos e tecnologias objetivando impulsionar avanços no tratamento de feridas (GARCEZ, 2012).

O processo cicatricial é comum a todas as feridas, independentemente do agente causador, é sistêmico e dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo. A cicatrização de feridas consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (MANDELBAUM, et al., 2003; CAMPOS, et al.,2007).

A cicatrização é o processo biológico que restaura a continuidade do tecido após uma lesão. Consiste em uma combinação de eventos físicos, químicos e celulares que restaura um tecido lesionado ou o substitui por colágeno. As fases da cicatrização ocorrem simultaneamente, uma vez que a cicatrização é dinâmica. A cicatrização é influenciada por fatores do hospedeiro, características da ferida e outros fatores externos (MANDELBAUM et al., 2003). Alguns medicamentos retardam o processo de cicatrização, tais como os corticoides, estes deprimem todas as fases da cicatrização e aumentam as chances de infecção (CAMPOS et al., 2007). Os glicocorticoides são capazes de bloquear desde as manifestações mais precoces do processo inflamatório como dor, calor e rubor até as mais tardias como

reparação e proliferação tecidual além de apresentarem atividade imunossupressora (SPINOSA, 1999).

Acredita-se que os glicocorticoides prejudicam a cicatrização, diminuindo a proliferação celular na neovascularização e da produção de matriz celular. Em animais foi relatado retardo do afluxo de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Admite-se que os corticoides suprimam a fase inflamatória da cicatrização, visto que seu uso crônico possa influenciar a reepitelização, a neovascularização e a síntese do colágeno (AGUILAR-NASCIMENTO et al., 2000; TENIUS et al., 2007). A dexametasona é um glicocorticoide sintético extremamente potente e de longa duração, isto porque, possui uma ligação reduzida com proteínas plasmáticas, menor velocidade de excreção e maior afinidade com receptores. Tendo portanto, sua atividade anti-inflamatória e imunossupressora ampliadas (TENIUS et al., 2007; SPINOSA et al., 2011). Na tentativa de minimizar os prejuízos decorrentes da administração contínua de agentes anti-inflamatórios esteroides, surge a perspectiva promissora das terapias com células tronco mesenquimais (COLOMÉ et al., 2008).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes e com ampla plasticidade, capazes de promover a manutenção e regeneração de múltiplas linhagens de células do organismo (NAUTA & FIBBE 2007). Esse tipo celular tem sido utilizado em numerosos estudos clínicos com a finalidade de regenerar lesões teciduais, como por exemplo, cicatrização de feridas (KEATING, 2006). Atualmente sabe-se que as CTM podem ser aplicadas diretamente no local da lesão (intra-lesional) isoladas ou combinadas com biomateriais (SCHWINDT et al. 2005, OLIVEIRA et al.,2010) ou serem administradas ou por infusão intravenosa, pois são atraídas por quimiotaxia para os locais de lesão (COLOMÉ et al., 2008).

2-REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Corticoides

As glândulas adrenais, presentes em todos os animais vertebrados são pequenas estruturas ovaladas, bilaterais localizadas na parte anterior dos rins. Esta consiste em dois seguimentos endócrinos primários: um exterior, chamado córtex adrenal, responsável pela secreção de hormônios esteroides; e outro interno menor denominado medula interna, responsável pela secreção de catecolaminas, noradrenalina e adrenalina (ENGELKING, 2010; JERICÓ E MARCO, 2011; SPINOSA et al., 2011; SILVA et al., 2008).

O córtex adrenal é subdivido em três zonas, zona glomerulosa que é mais externa a qual produz mineralocorticoides, como principal exemplo a aldosterona que é responsável pela manutenção do equilíbrio hídrico e eletrolítico; zona fasciculada responsável pela produção de glicocorticoides, que afetam o metabolismo de carboidratos e proteínas, apresentando atividade anti-inflamatória e imunossupressora sendo os principais representantes a hidrocortisona (cortisol) e corticosterona; a zona reticulada é a mais interna, onde ocorre a produção de andrógenos ou esteroides sexuais (SAMUELSON, 2007; ENGELKING, 2010; SPINOSA et al., 2011.).

Os corticoides são sintetizados e liberados quando necessários não sendo liberados na células adrenais (JERICÓ E MARCO, 2011; ROMÃO, 2012). O principal regulador da atividade adrenocortical é o hormônio da hipófise anterior, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou corticotrofina. A secreção do ACTH é regulada

parcialmente pelo hormônio liberador de corticotropina (CRH) de origem hipotalâmica sendo a secreção do CRH controlada pelas concentrações sanguíneas dos glicocorticoides (ENGELKING, 2010; JERICÓ E MARCO, 2011; ROMÃO, 2012).

Segundo Jericó e Marco (2011) o colesterol é um intermediário obrigatório na síntese de corticoides. Nas espécies canina e felina a produção de cortisol em um período de vinte e quatro horas é de cerca de 1 mg/kg. O fígado é responsável por cerca de 70% do metabolismo dos corticoides. Em sua maioria estes compostos são excretados por via renal, uma parte dos corticoides são adicionados à bile e excretados pela rota intestinal (PEREIRA et al., 2007 e SAMUELSON, 2007).

Os hormônios glicocorticoides são agentes hiperglicemiantes tendo seu efeito de inibição da captação e da utilização periférica da glicose e promoção da gliconeogênese a partir de aminoácidos e ácidos graxos livres (JERICÓ E MARCO, 2011; CHAMUSCA, 2012). Além destes efeitos, interferem no metabolismo proteico, aumentando o catabolismo e diminuindo a síntese de proteínas, há uma transformação generalizada de proteína muscular em aminoácidos para gliconeogênese hepática (PAPICH, 2009; CHAMUSCA, 2012).

O cortisol e alguns glicocorticoides sintéticos como a dexametasona, em concentrações farmacológicas podem apresentar alguns efeitos mineralocorticoides promovendo a retenção de sódio, a excreção de potássio e expansão do volume extracelular. O cortisol também suprime a liberação do hormônio antidiurético (ADH) diminuindo o efeito deste sobre os túbulos coletores, portanto poliúria e polidipsia são evidentes (SILVA et al., 2008; PAPICH, 2009; JERICÓ E MARCO, 2011; SPINOSA et al., 2011).

Os glicocorticoides antagonizam as ações da insulina no metabolismo da glicose inibindo a captação da mesma pelos tecidos, sendo assim considerados

agentes hiperglicemiantes como anteriormente citado, onde promovem a polifagia (SAMUELSON, 2007; PAPICH, 2009; ROMÃO, 2012).

De acordo com Engelking (2010) o cortisol possui efeito inotrópico no músculo esquelético causando proteólise muscular e conseqüentemente redução da massa muscular e da força (principalmente fibras musculares tipo I). Este hormônio também aumenta a síntese de lipase de triglicerídeos adipócitos, elevando as ações de hormônios lipolíticos e diminuindo a captação de glicose nos adipócitos reduzindo assim a deposição de triglicerídeos, induzindo assim a redistribuição de gordura nas áreas centrípetas.

O metabolismo de cálcio também é afetado pelo uso de glicocorticoides através do aumento da excreção urinária do mesmo, causado pela reabsorção renal com conseqüente hipercalciúria e absorção intestinal de cálcio diminuída. Em excesso, os corticoides levam portanto, a uma diminuição da formação de ossos e aumento na reabsorção óssea (PEREIRA et al., 2007; ENGELKING, 2010).

O uso prolongado de corticoides pode levar a inibição da síntese de colágeno e atividade de fibroblastos, produzindo adelgaçamento da pele e das paredes dos capilares (SCOTT et al., 1996; TENIUS et al., 2007; ENGELKING, 2010).

O cortisol aumenta o número de eritrócitos circulantes uma vez que estimula a produção e diminui a destruição dos mesmos, aumenta também o número de plaquetas e neutrófilos circulantes, podendo causar portanto uma leucocitose. O uso de corticoide diminui o número de linfócitos, eosinófilos e basófilos circulantes quatro a seis horas após sua administração por meio da redistribuição dessas células para longe da periferia e não pelo aumento da sua destruição. Diminui a massa de tecido linfoide através da inibição direta da mitose, sendo por isso utilizado do tratamento de linfomas e leucemia linfocítica (PEREIRA et al., 2007). De acordo com Engelking

(2010) a involução de nódulos linfáticos e órgãos linfáticos como timo e baço, causa diminuição da produção de anticorpos, o que pode ajudar na redução de uma resposta imune de um órgão transplantado.

O uso crônico de glicocorticoides pode conduzir a um estado de hipercoagulabilidade sanguínea, isto se deve em parte ao aumento de fatores pró-coagulantes tais como II, V, VII, IX, X, XII e fibrogênio, e também a diminuição de um fator natural anticoagulante, a antitrombina (SCOTT et al., 1996; TENIUS et al., 2007; ENGELKING, 2010; CHAMUSCA, 2012).

Altos níveis de cortisol inibem a fosfolipase A₂ e a cicloxigenase reduzindo a biosíntese de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. A inibição da síntese de leucotrienos atrapalha a fagocitose de neutrófilos. Ocorre a interferência na elaboração de histamina, logo nas ações desta sobre a mediação da resposta inflamatória (hiperemia local e edema). O cortisol estabiliza as membranas lisossomais reduzindo a liberação de enzimas hidrolíticas após uma lesão a celular diminuindo a reação inflamatória (PEREIRA et al., 2007; ENGELKING, 2010; CHAMUSCA, 2012).

Embora os efeitos antiinflamatórios e imunossupressores dos glicocorticoides possam ser úteis no tratamento de diversos estados patológicos, quando os mesmos são administrados terapêuticamente por longos períodos podem levar a um aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas e virais, permitindo então, a disseminação desses microorganismos, atraso da cicatrização de feridas, agravar os sintomas de diabetes melito, osteoporose, distúrbios neurológicos, e levar ao hiperadrenocorticismos iatrogênico (TENIUS et al., 2007; ENGELKING, 2010; ROMÃO, 2012).

2.2 Anatomia e Fisiologia da Pele

A pele, ou tegumento, forma o revestimento e a principal barreira de proteção do organismo, e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger da ação de agentes externos, manter a temperatura corpórea, agir como órgão do sentido e participar da termorregulação (OLIVEIRA, 2010; GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

A pele é formada por duas camadas distintas, a epiderme e a derme, firmemente unidas entre si (Figura 1). A epiderme é a porção mais superficial, continuamente renovada e organizada em camadas (basal, granulosa, espinhosa, lúcida e queratinosa), apresentando três diferentes linhagens celulares com características e funções diferentes. Os queratinócitos, são as células mais abundantes e importantes da epiderme. Os melanócitos, que são células dendríticas, que produzem e secretam o pigmento melanina, que dá a coloração a pele e exerce também uma função protetora contra os raios violetas. As células de Langerhans, são células dendríticas apresentadoras de antígenos, atuando no sistema imunológico (DYCE et al.,1990; GARCEZ, 2012).

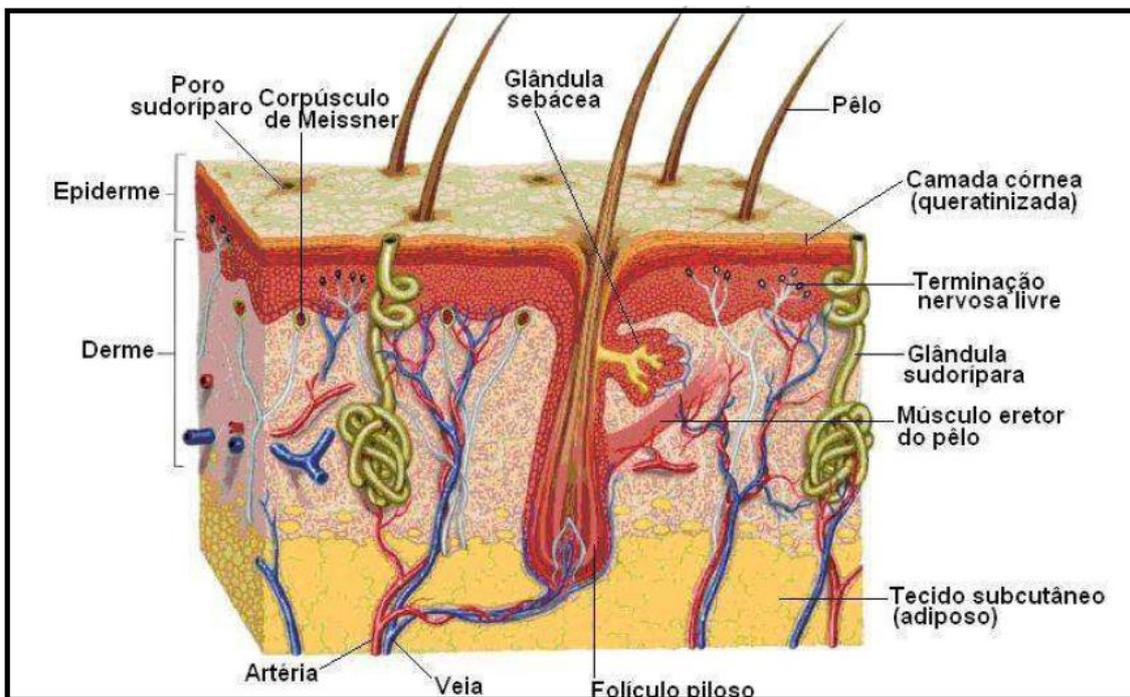


Figura 1 – Estrutura da Pele e seus anexos (FONTE: BEAR et al., 2008).

2.3 Cicatrização Cutânea

O processo de cicatrização é comum a todas as feridas, independentemente do agente que a causou, é sistêmico, dinâmico e está diretamente relacionado às condições gerais do organismo (MANDELBAUM et al., 2003; CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA, 2010; GARCEZ, 2012).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido (MANDELBAUM et al., 2003).

A regeneração ocorre mediante a perda tecidual e pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, alcançando o tecido celular subcutâneo (MANDELBAUM et al., 2003; CAMPOS et al., 2007; GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

Os mecanismos da cicatrização foram descritos por Carrel em 1910, e posteriormente foram divididos em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida (CAMPOS et al., 2007).

Existem autores que consideram três estágios no processo de cicatrização: iniciando com um estágio inflamatório, seguido por um estágio de proliferação e finalizado com o reparo em um estágio de remodelação (Figura 2). Outros autores classificam de uma forma mais completa, dividindo o processo em cinco fases principais (MANDELBAUM et al., 2003).

2.3.1 – Coagulação

O início é imediato após o surgimento da ferida, e depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. A formação do coágulo serve não somente para juntar as bordas da ferida, mas também para transpor a fibronectina, oferecendo assim uma matriz provisória, onde os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam dar entrada na ferida (MANDELBAUM et al., 2003; OLIVEIRA, 2010; GARCEZ, 2012).

2.3.2 – Inflamação

Extremamente ligada a fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos (MANDELBAUM et al., 2003; CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA, 2010; GIANOTTI, 2011).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, e permanecem por um período que varia de três a cinco dias. Os neutrófilos produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (CAMPOS et al., 2007; GARCEZ, 2012).

O macrófago é a célula inflamatória considerada a mais importante dessa fase. Este permanece do terceiro ao décimo dia, fagocitando bactérias, desbridando corpos estranhos e direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação. Sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (MANDELBAUM et al., 2003; GARCEZ, 2012).

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que tem importante influência sobre os macrófagos (MANDELBAUM et al., 2003; CAMPOS et al., 2007).

A fase inflamatória, além de ter os mediadores químicos e as células inflamatórias, conta também com a importante função da fibronectina. Esta é sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. A fibronectina adere, simultaneamente, à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o colágeno de fibrina,

as células e os componentes de matriz (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA, 2010; GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

2.3.3 – Proliferação

Dividida em quatro subfases (epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno), a proliferação é responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita (MANDELBAUM et al., 2003; GIANOTTI, 2011).

A primeira das fases da proliferação é a epitelização, onde ocorre a migração de queratinócitos não danificados das bordas das feridas e dos anexos epiteliais (CAMPOS et al., 2007).

A angiogênese, segunda fase da proliferação, é estimulada pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada (GARCEZ, 2012).

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para saírem de seu estado de repouso. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), em seguida é liberado o fator de necrose tumoral β (TNF- β), que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno

tipo I (início da deposição de colágeno) e a transformar-se em miofibroblastos, estes, promovem a contração da ferida (CAMPOS et al., 2007; DEL CARLO et al., 2008).

2.3.4 – Contração da Ferida

A contração de ferida consiste no movimento centrípeto das bordas da ferida, em sua espessura total. Uma ferida com espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida. Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície da lesão cutânea (MANDELBAUM et al., 2003).

2.3.5 – Remodelação

Esta é a última das fases, ocorre no colágeno e na matriz, pode durar meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas e reabsorção de água, são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (MANDELBAUM et al., 2003; TENIUS et al., 2007; GIANOTTI, 2011).

A neovascularização diminui, e posteriormente a cicatriz é considerada avascular (OLIVEIRA, 2010; GIANOTTI, 2011).

A característica mais importante dessa fase é a deposição de colágeno de maneira organizada, por isso é a mais importante clinicamente. Com o tempo, o colágeno inicial é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. A reorganização da nova matriz é um processo importante da cicatrização. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, havendo sucesso quando a deposição é maior (CAMPOS et al., 2007, TENIUS et al., 2007; SIMÕES et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

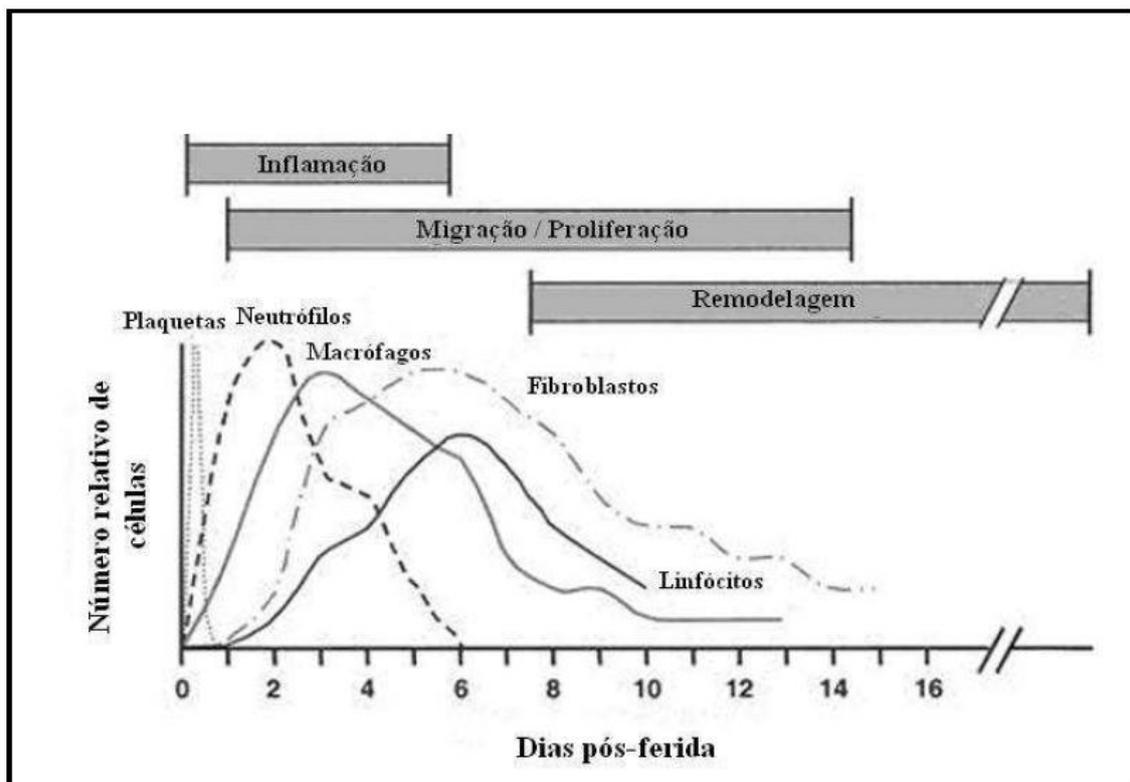


Figura 2 – Fases da cicatrização correlacionadas com a especificidade imunocelular. (Fonte: adaptado por GARCEZ, 2012).

2.3.6 – Considerações sobre o Colágeno

O colágeno é a proteína mais importante do tecido conectivo em processo de cicatrização. A degradação do colágeno se inicia precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório. A sua digestão ocorre no ambiente extracelular e é mediada por colagenases específicas. A atividade das colagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos. A formação da matriz extracelular é resultante da deposição (síntese) e degradação do colágeno. O colágeno é o principal componente da matriz extracelular dos tecidos, esta estrutura-se em rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção (CAMPOS et al., 2007; GIANOTTI, 2011).

2.3– Células tronco Mesenquimais (CTM)

Células tronco são células indiferenciadas, onde suas principais características que as tornam extremamente interessantes são: sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, ainda mais interessante, sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares. Desta forma, acredita-se que células tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão

ou injúria (CABRAL et al., 2008; DEL CARLO et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; PINTO FILHO et al., 2013).

As CTM são definidas como uma população de células tronco somáticas presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; PINTO FILHO et al., 2013).

A medula óssea (MO) constitui um dos principais sítios para a obtenção dessas células, assim como de células tronco hematopoiéticas e endoteliais (MONTEIRO et al., 2010; PINTO FILHO et al., 2013).

As CTM caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário em um processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras. Essas características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e pela manutenção de todos os tecidos do organismo (DEL CARLO et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010).

As CTM tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo devido ao fato de fornecer perspectivas clínicas promissoras para terapia celular (CABRAL et al., 2008; DEL CARLO et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; PINTO FILHO et al., 2013).

As CTM são uma população heterogênea de células que proliferam, *in vitro*, como células aderentes ao plástico, tendo morfologia semelhante ao fibroblasto, capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos (BYDLOWSKI et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010).

Dentre todas as linhagens de células tronco somáticas (CTS) estudadas até o presente momento, as CTM apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis. Essas células podem ser transplantadas para os sítios lesionais logo após a ocorrência da injúria tecidual e podem ser aplicadas na forma indiferenciada, recebendo o estímulo do meio para posteriormente se diferenciar, ou sofrer diferenciação em cultura antes da implantação (DEL CARLO et al., 2009).

No processo de cicatrização cutânea, o TGF- β , ativas, fator de crescimento vascular (EGF), PDGF, fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento insulínico (IGF) e o fator de crescimento epidermal (EPGF) contribuem para a organização do tecido conjuntivo e formação de queratinócitos (BYDLOWSKI et al., 2009).

À medida que o processo cicatricial avança, os estímulos mesenquimais são ultrapassados pelos estímulos ectodermis. O TGF- β , por exemplo, durante a fase aguda da inflamação, inibe a diferenciação de queratinócitos, entretanto, durante a fase de reepitelização, estimula a migração dos queratinócitos pela matriz de fibronectina neoformada. O EPGF, por outro lado, inibe a apoptose de queratinócitos e diminui a resposta celular ao estímulo do TGF- β e FGF (DEL CARLO et al., 2008).

Oliveira (2010) utilizou CTM em feridas ocasionadas por queimaduras em ratos e concluiu que estas foram efetivas ao promoverem uma melhora da cicatrização, bem como o fechamento mais rápido das feridas em relação aos animais do grupo controle da pesquisa.

Garcez (2012) analisou a associação de CTM e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas e concluiu que a terapia com

CTM promoveu cicatrizes esteticamente melhores na avaliação clínica quando comparado com os animais do grupo controle do experimento.

3 – OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Avaliar a contribuição terapêutica da infusão endovenosa de CTM para a cicatrização cutânea de feridas cirúrgicas em ratos Wistar imunossuprimidos com dexametasona.

Objetivos específicos:

1 – Aferir os efeitos da imunossupressão com dexametasona sobre as variáveis tempo de cicatrização (TEC) e área da lesão (ARL) de feridas cutâneas cirúrgicas de ratos;

2 – Quantificar histopatologicamente o percentual de deposição de colágenos das feridas cutâneas cirúrgicas de ratos imunossuprimidos com dexametasona tratados ou não com CTM;

3 – Identificar se há efeito do tratamento com CTM sobre a redução do tempo de cicatrização (TEC) e área de lesão (ARL) das feridas cutâneas de ratos imunossuprimidos com dexametasona.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

A realização do estudo obedeceu a lei federal 6.638 das normas do Colégio Brasileiro de Experiência Animal (Cobea). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação com Animais, da Universidade Vila Velha (UVV), protocolado sob-registro: 249/2013.

Foram utilizados 35 ratos fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, de dezesseis semanas de idade, pesando aproximadamente 300 gramas (g), oriundos do Laboratório de Acompanhamento Experimental do Campus Nossa Senhora da Penha da Universidade Vila Velha (UVV).

Os animais foram mantidos em um ambiente com controle de temperatura em 23°C, umidade relativa de 55%, e fotoperíodo de 12 horas, alojados em grupos de 5 animais em cada caixa de polipropileno de dimensões 414mm x 344mm x 168mm padronizadas para a espécie, todas as caixas eram higienizadas a cada 48 horas. Os animais tiveram acesso irrestrito a uma dieta padrão (ração comercial para roedores) e água filtrada.

Antes do início do experimento, todos os animais foram vermifugados com Ivermectina a 2% na dose de 0,4 mg/kg por via oral acrescidos em bebedouros de 700ml de água com repetição aos 10 dias anteriores ao procedimento cirúrgico.

4.1 Isolamento, caracterização e expansão de CTM

Para essa fase foram utilizados dois ratos Wistar filhotes, como doador de CTM, conforme metodologia descrita por Monteiro et al. (2012). Essa etapa foi realizada em parceria com colaboradores da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e do Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara anestésica, com inalação passiva, até a sobredosagem de isoflurano. Foi realizada tricotomia do abdômen e membros pélvicos e em seguida os animais foram transferidos para capela de fluxo horizontal. Foi realizada dissecação da musculatura do quadríceps e o fêmur do antímero direito e esquerdo foram retirados de forma asséptica. As epífases distais foram seccionadas e na epífase proximal foi acoplado uma agulha (23G) e uma seringa de 10 mL contendo meio de cultura DMEM completo (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco), acrescido de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (PSA) (Gibco, Paisley, UK) e apresentando pH 7,2, para lavar o canal medular.

As células foram plaqueadas inicialmente na concentração de 5×10^6 células em frascos de cultura celular de 75 mm² (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. O aumento do número de células foi acompanhado diariamente, com auxílio de microscópio invertido. Os meios de cultura foram trocados mediante a necessidade e as tripsinizações e passagens

realizadas quando visualizado 80% de expansão celular nas placas, até a quarta passagem.

Uma alíquota das células da quarta passagem foi caracterizada por citometria de fluxo através da análise de expressão de moléculas de superfície celular para CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54, utilizando citômetro de fluxo FACScan e software CellQuest®, obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada.

Outra alíquota de células de quarta passagem foi submetida a etapas de diferenciação osteogênica. As células aderentes foram desprendidas com tripsina, contadas e replaqueadas em placa de 6 poços, com lamínulas de 22 mm de diâmetro, com meio de cultura DMEN enriquecido com 10% de SFB, 10^{-8} mol/mL de dexametasona (Sigma, St Louis MO, USA), 5,0 µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e 10,0 mmol/L de β -glicerofosfato (Sigma, St Louis MO, USA) e incubado a 37°C por quatro semanas. No 30º dia após a colocação das células no meio osteogênico as lamínulas foram lavadas em PBS e coradas pelo método de Von Kossa para observar a deposição de cálcio.

Após a quarta passagem, as células foram tripsinizadas, observadas em microscopia óptica para a avaliação da viabilidade celular, submetidas a contagem em câmara de Neubauer e alíquotadas na concentração de 9×10^6 células/0,5 mL de PBS. Cada alíquota foi armazenada em seringa de 1,0 mL, acondicionada em caixa de isopor sem gelo, aguardando o momento do transplante.

4.2 Procedimentos anestésicos, cirúrgicos e tratamentos

Trinta dias antes do procedimento cirúrgico, 25 animais foram pesados individualmente, identificados com brincos de numeração na orelha esquerda e distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (Figura 3). Estes grupos foram diferenciados quanto ao tratamento conforme a lista abaixo e observados diariamente por 2 meses consecutivos:

- Grupo Controle (GC): formado por cinco (5) animais que receberam aplicações de 0,2 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%) a cada 24 horas por via subcutânea (SC) durante 30 dias consecutivos.
- Grupo Dexametasona (GD): formado por vinte animais (20) que receberam aplicações a cada 24 horas de dexametasona na dose de 0,1 mg/kg por via SC durante 30 dias consecutivos, conforme metodologia proposta por Tênius et al (2007).

Após o término de 30 dias da administração de dexametasona, antecedendo ao ato cirúrgico, todos os animais foram submetidos a anestesia por meio de injeção intramuscular (IM) de uma associação de cetamina 10% (20mg/kg), xilazina 2% (4mg/kg), midazolam 0,5% (2,5mg/kg) e morfina 1% (1,0 mg/kg) (Figura 4). Após a perda do reflexo de endireitamento foi realizado tricotomia da região dorsal (Figura 5A), seguida por anti-sepsia da área tricotomizada com solução de clorexidina degermante e álcool 70%.

O plano anestésico foi monitorado de acordo com a ausência de movimentos e perda do reflexo de pinçamento da cauda e dos dígitos, além da avaliação clínica

dos parâmetros relacionados a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR). Os animais receberam antibioticoterapia profilática com enrofloxacina 10% (10mg/kg) por via SC no trans-operatório.



Figura 3 – Animal do grupo GC recebendo anestesia geral por via IM.

4.3 Plano cirúrgico

Após a anti-sepsia, foi realizada a marcação da área da ferida cirúrgica com tinta de carimbo atóxica (Figura 4B), e posteriormente, delimitou-se o campo operatório com gaze estéril (Figura 4C). Foi confeccionada uma ferida cirúrgica circular de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, com remoção da pele na região

dorsal (Figura 4D). As bordas da lesão foram suturadas a musculatura circunvizinha, com fio monofilamentoso, não absorvível (Nylon 3.0) em pontos simples separados, visando minimizar o efeito de retração das bordas da lesão. As feridas cutâneas de todos os animais foram limpas diariamente, com gaze estéril umedecida em solução fisiológica.

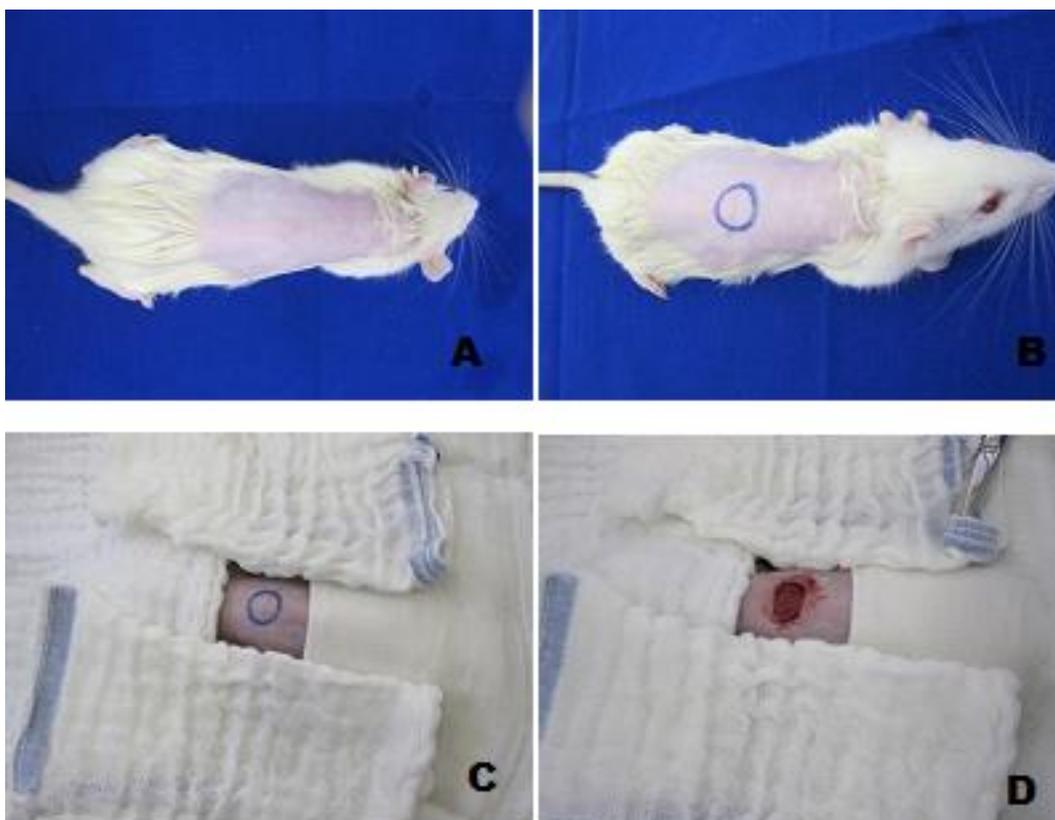


Figura 4 – Animal tricotomizado (A); Área padronizada demarcada na pele com tinta de carimbo (B); Área padronizada demarcada na pele com tinta de carimbo já com campo operatório (C); Ferida cirúrgica sem fixação das bordas (D).

4.4 Tratamento

Após o procedimento cirúrgico, os 20 animais do GD foram subdivididos aleatoriamente em dois grupos com 10 animais cada, que foram diferenciados quanto ao tratamento (Figura 3), com forme a lista abaixo:

- Grupo Dexametasona (GD): formado por quinze animais que receberam uma única aplicação de 0,5 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%) por via IV, 48 horas após a criação da ferida cirúrgica e acompanhados por mais 30 dias.
- Grupo Dexametasona Células Tronco Mesenquimais (GDCTM): formado por quinze animais que receberam o transplante de CTM, na concentração de 9×10^6 células/ml (volume final de 0,5 ml), em aplicação única, por via IV, 48 horas após a criação da ferida cirúrgica (Figura 6).

Os Animais do GC receberam uma única aplicação de 0,5 ml solução fisiológica (NaCl 0,9%) por via IV, 48 horas após a criação da ferida cirúrgica. O local de aplicação intravenosa, em todos os animais do estudo, foi a veia lateral da cauda.

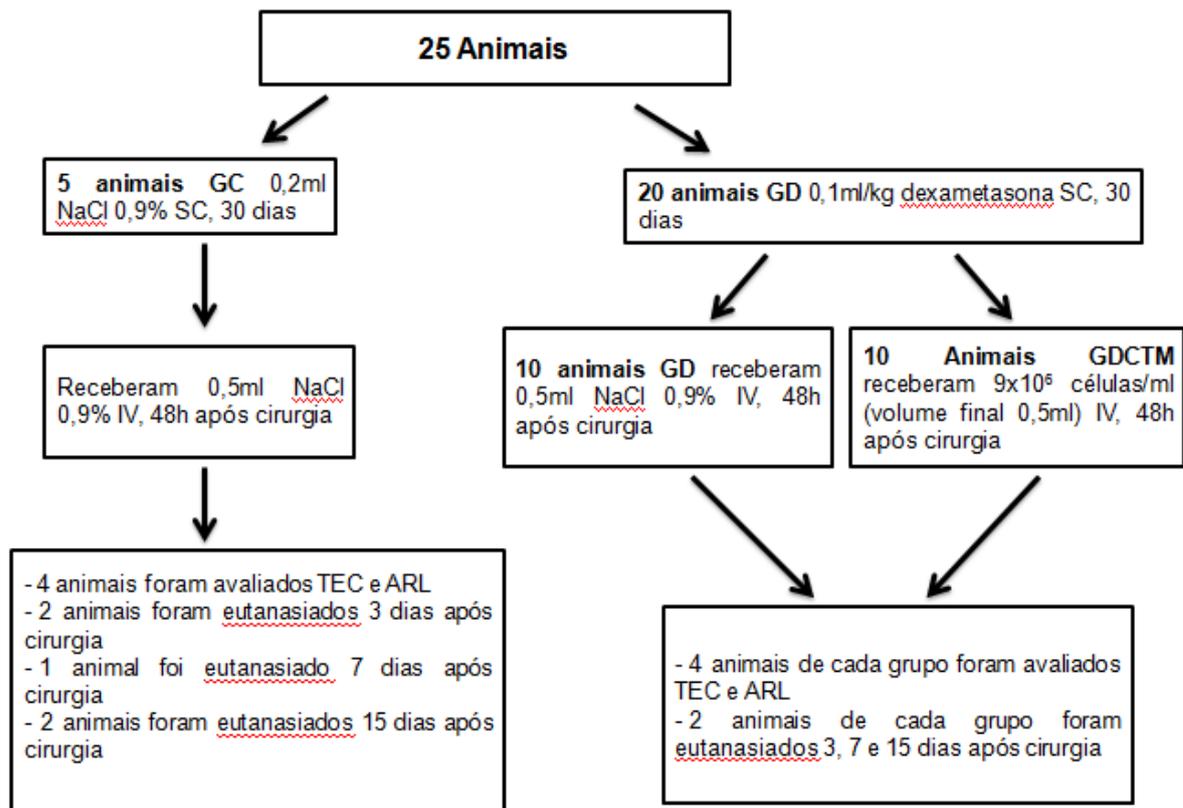


Figura 5 – Organograma ilustrando os animais do experimento e como os mesmos foram divididos nos grupos de tratamento recebido.



Figura 6 – Rato Wistar recebendo infusão de CTM, pela veia lateral da cauda, 48 horas após a criação da ferida cirúrgica.

4.5 Avaliação clínica

Em todos os animais foram acompanhados os parâmetros peso, ingestão hídrica e alimentar e inspeção das feridas uma vez ao dia até total cicatrização da lesão cutânea.

Em quatro animais de cada grupo, escolhidos de forma aleatória e mantidos durante todo o período de observação, as feridas foram fotografadas diariamente para a avaliação das variáveis área da lesão (ARL) e tempo de cicatrização (TEC), conforme metodologia proposta por Argôlo-Neto et al. (2012). Para isso, foram padronizados a intensidade de luz e altura da máquina fotográfica digital por meio de um suporte em acrílico. As imagens foram transferidas a um computador e avaliadas com programa específico de análise fotográfica, o Image Pro Plus®, para mensuração da área da ferida cirúrgica (Figura 7).

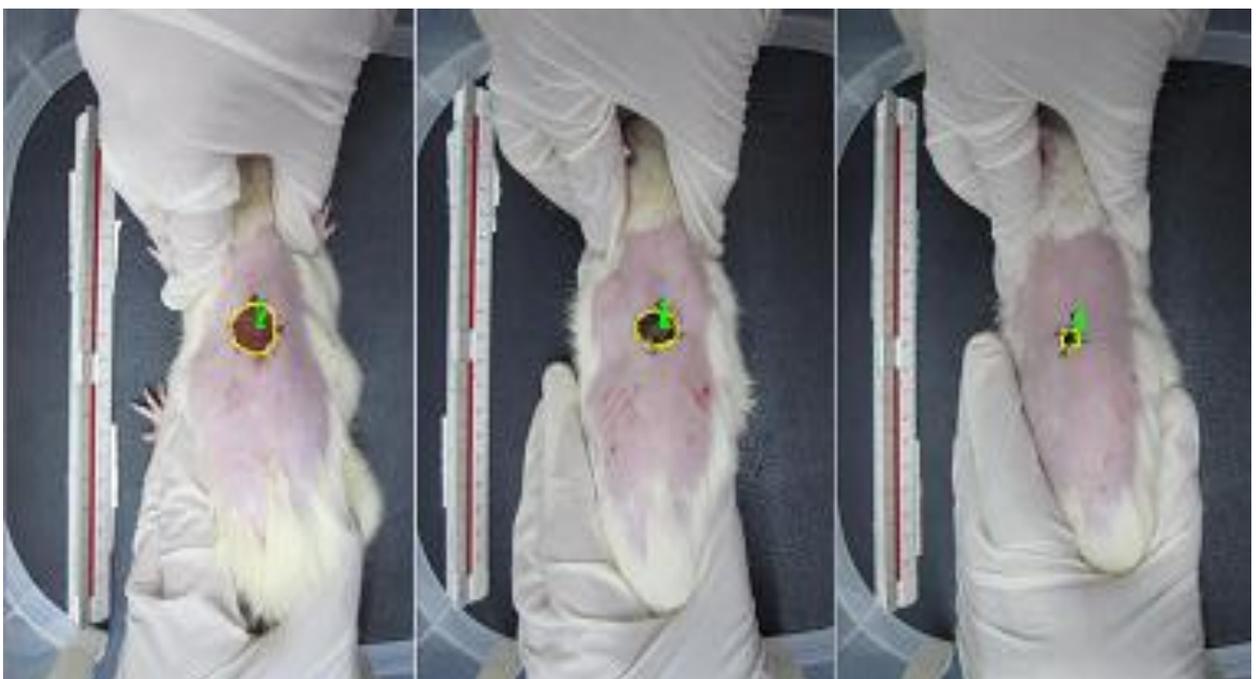


Figura 7 – Imagem ilustrativa da mensuração da ARL nos dias 1, 5 e 10 após a criação da ferida cirúrgica, através do programa Image Pro Plus[®], no qual os traços em amarelo demonstram o contorno da área da ferida.

De cada individuo foram obtidas médias dos valores encontrados para as variáveis área da lesão e tempo de cicatrização. A partir da média de cada variável para cada animal do grupo correspondente, foi obtida a média dos grupos.

4.6 Biópsia e procedimentos histológicos

Os demais 6 animais de cada grupo foram escolhidos de forma aleatória e submetidos a eutanásia por sobredosagem anestésica com isoflurano, nos dias 3, 7 e 15 após a intervenção cirúrgica (2 animais por dia). Em seguida, os ratos foram contidos em mesa cirúrgica para a realização de biópsia incisional onde coletou-se toda a área da ferida com uma pequena margem de pele íntegra (Figura 8).

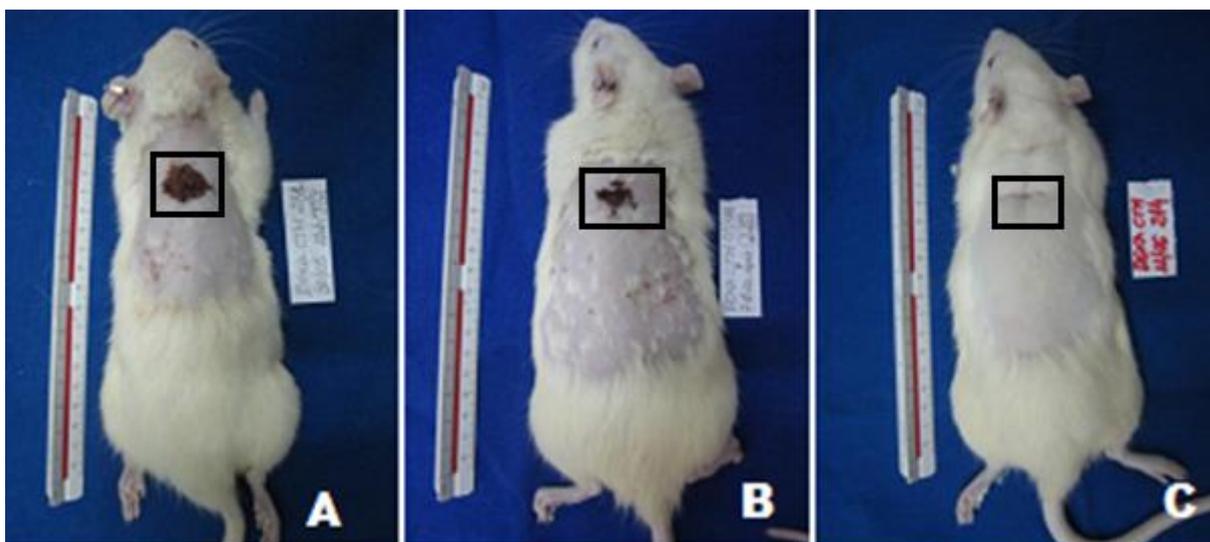


Figura 8 – Animais eutanasiados aos 3 (A), 7 (B) e 15 (C) dias respectivamente, após a criação da ferida cirúrgica. Em destaque ,(retângulo) a área de tecido coletada envolvendo a ferida cirúrgica e a pele intacta, que foi encaminhada à histopatologia.

As amostras de pele foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 10% por 24 horas e encaminhadas para exame histopatológico. As amostras de pele foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 10% por 24 horas e, em seguida, desidratadas em soluções de concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em xilol, incluídas em parafina histológica e seccionadas em micrótomo rotativo, ajustado para 4 μ m de espessura. Os cortes foram fixados em lâmina de vidro e corados com Tricrômio de Mallury para identificação e quantificação das fibras colágenas, (Ferrera et al., 2003) e hematoxilina e eosina.

Os cortes histopatológicos corados pelo método de Tricrômio de Mallury foram observados em microscópio óptico conectado a um microcomputador equipado com um software de captura de imagem. Para permitir a quantificação de fibras colágenas (FIC) foram registradas três imagens de três diferentes campos de cada parte dos cortes histológicos, utilizando-se objetiva de 10X. Depois de capturadas, as imagens foram analisadas por meio de um programa de análise de imagens, Cellprofiler® com o objetivo de avaliar a proporção de fibras colágenas

presentes na área pré-determinada. O programa foi calibrado para o estudo, padronizando a coloração das fibras colágenas a serem quantificadas na área de 1mm^2 e, a partir destas, calculada as médias dos grupos.

4.7 Avaliação estatística

A tabulação dos dados e avaliação estatística foi realizada com o auxílio de planilhas eletrônicas de Excel®.

Os valores mensurados para ARL e TEC, foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% para comparação da diferença mínima significativa das médias de cada tratamento.

5 - RESULTADOS

5.1- Cultura celular

A medula óssea foi capaz de propiciar uma cultura heterogênea, composta por células arredondadas, não aderentes e micelas lipídicas no

sobrenadante da cultura nas primeiras 24 horas. A partir do oitavo dia, a população celular apresentava-se mais homogênea, com predominância das células aderentes de morfologia fibroblastóide, organizada em colônias.

A citometria de fluxo foi realizada com uma amostra de cultura de quarta passagem de células e GFP demonstrou que cerca de 43% das células homogêneas revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 e 93,89% de CD45 e expressão positiva para 99,0% de CD90 e 93,89% de CD90 e 95,8% de CD54 (Figura 9). O conjunto de marcadores utilizados permitiu inferir que a população isolada e cultivada era homogênea com marcadores positivos para CTM e, claramente distinta da linhagem hematopoiética.

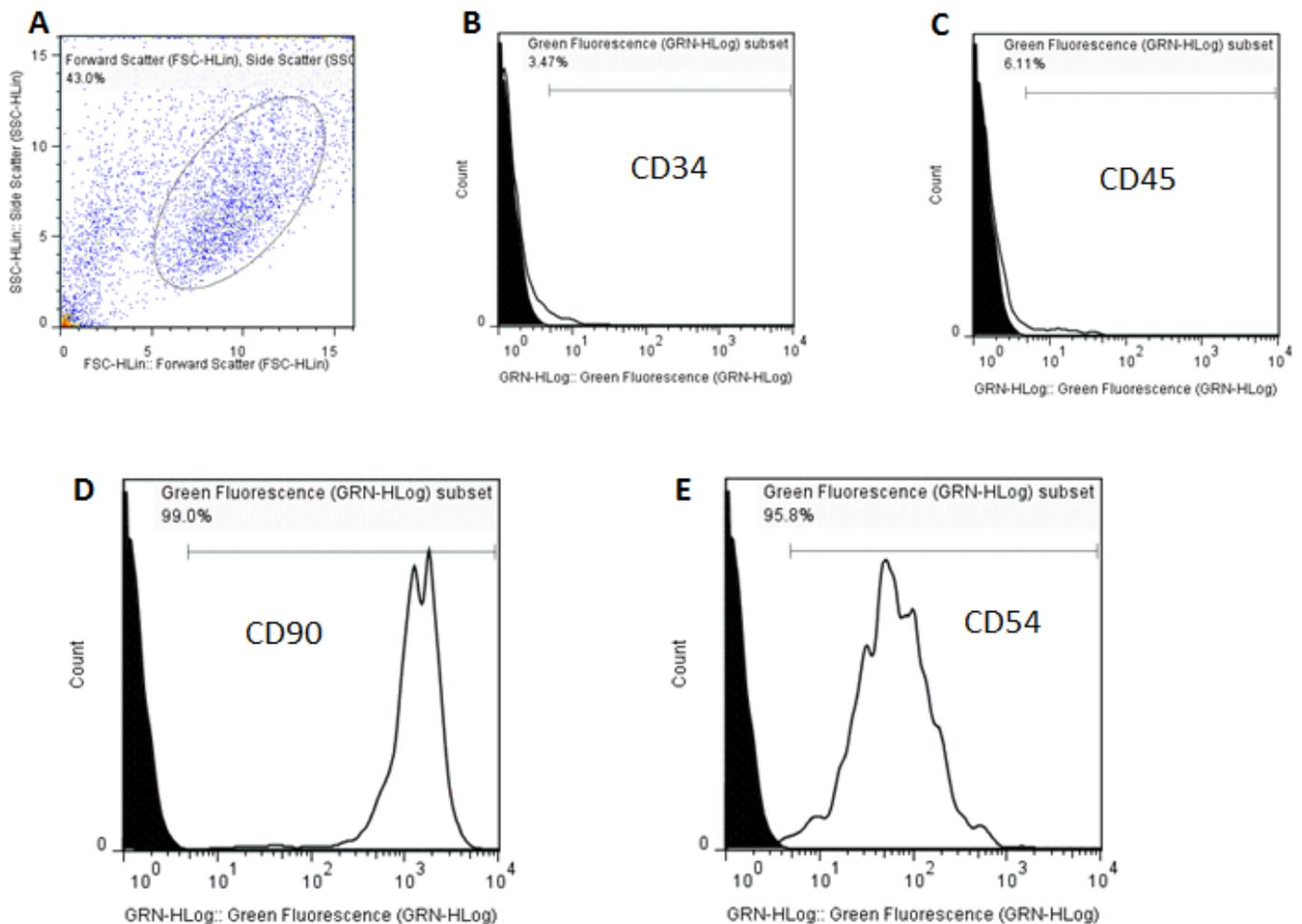


Figura 9 - Avaliação da frequência de CD 34, CD 45, CD 90 e CD 54 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais (CTM) oriundas da medula óssea de ratos Wistar. A intensidade de fluorescência de cada marcador de superfície nas CTM indiferenciadas (gráficos brancos ou abertos) esta comparada com os isotipos controle (gráfico preto). O eixo X representa a escala de fluorescência, sendo positivo quando as células ultrapassam 10 de células avaliadas durante o evento. A) Gráfico de pontos demonstrando a população celular selecionada para o estudo (R1), que representou 43% de homogeneidade. As amostras da cultura revelaram expressão negativa para 96,53% de CD34 (B) e 93,89% de CD45 (C) e expressão positiva para 99,0% de CD90 (D) e 95,8% de CD 54 (E).

5.2 – Alterações clínicas

Os animais do experimento que receberam aplicações SC de dexamentasona, apresentaram redução do peso corporal com 7 dias de aplicação do corticoide. Com 14 dias de aplicação do corticoide 8 animais apresentaram secreção ocular de coloração vermelho-amarronzada e regiões de hipotricose (Figura 10). No momento da cirurgia, apenas a hipotricose persistia. A partir de 7 dias após a cirurgia observou-se discreto ganho de peso em todos os animais.

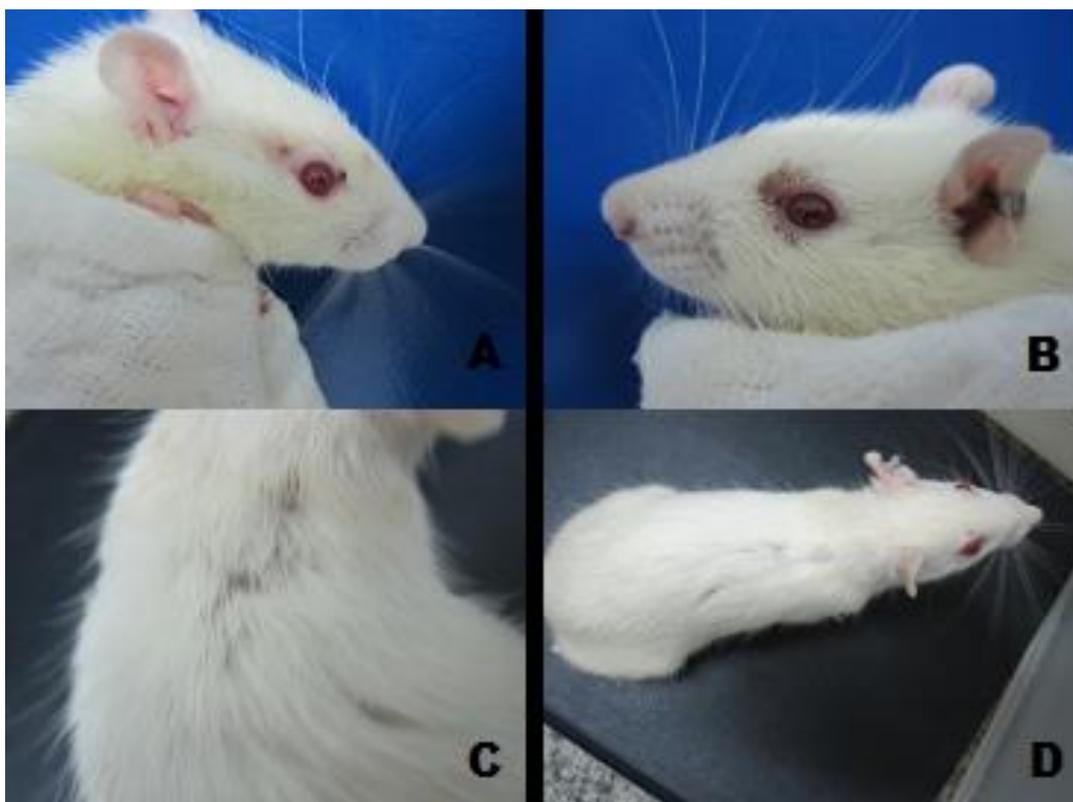


Figura 10 - Animais apresentando secreção ocular escura (A e B); Áreas de hipotricose (C e D).

5.3 – Avaliação macroscópica

Em todos os animais as feridas apresentaram-se ressecadas, eritemato crostosas e não exsudativas, que regrediram lentamente até a perda da crosta superficial e epitelização (Figura 11).

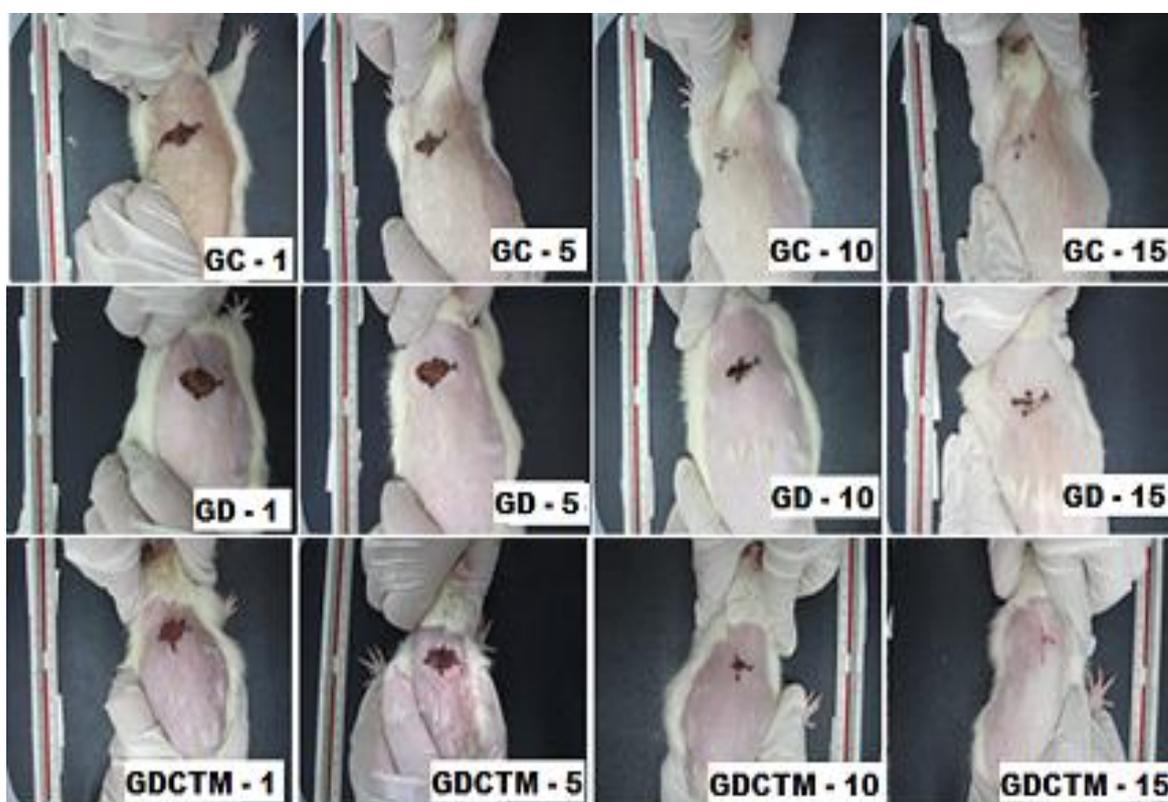


Figura 11 – Fotos dos animais dos grupos GC, GD e GDCTM nos dias 1, 5, 10 e 15 após a criação da ferida cirúrgica.

As imagens capturadas de 4 animais de cada grupo do experimento foram avaliadas para ARL pelo programa Image Pro Plus®, posteriormente foi realizada a média de cada grupo (Tabela 1) para realização da análise de variância e teste de

Tukey a 5% (Figura 12), onde constatou-se que não houve diferença de significância nos tratamentos.

Tabela 1 – Apresenta a média em centímetros da área da lesão (ARL) dos animais dos grupos do experimento nos dias 1, 3, 5, 10, 12 e 15 após a criação da ferida.

GRUPO	DIA 0	DIA 1	DIA 3	DIA 5	DIA 10	DIA 12	DIA 15
GC	3,337 ^a	2,229 ^a	1,780 ^a	1,543 ^a	0,542 ^a	0,093 ^a	0,000 ^a
GD	3,215 ^a	2,804 ^a	2,748 ^a	2,439 ^a	0,967 ^a	0,652 ^a	0,368 ^a
GDCTM	3,738 ^a	2,541 ^a	2,288 ^a	2,035 ^a	0,589 ^a	0,113 ^a	0,000 ^a

Pares de médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

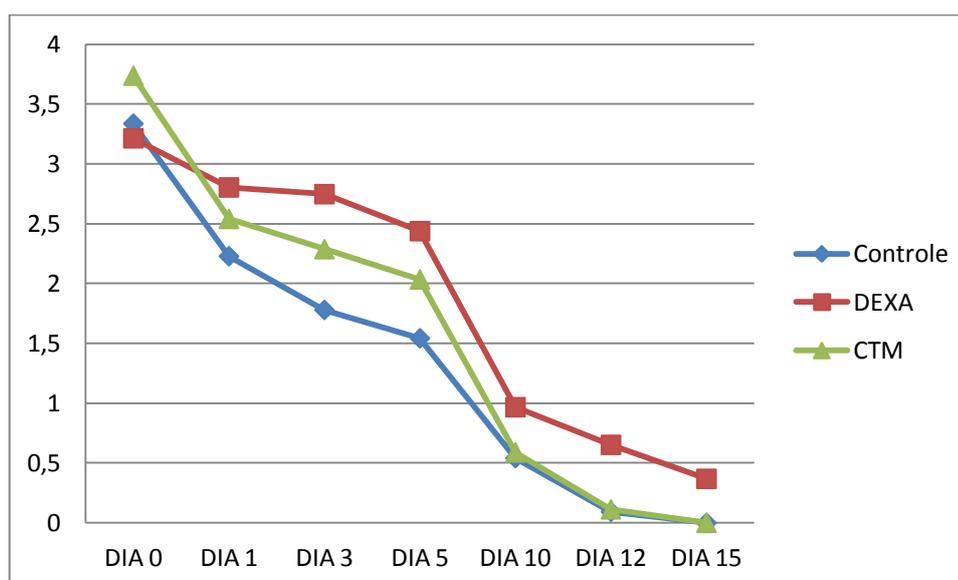


Figura 12 – Demonstração gráfica dos valores das médias das repetições para ARL dos grupos do experimento; GC em azul, GD em vermelho e GDCTM em verde. O eixo Y do gráfico representa o valor de ARL em cm, enquanto o eixo X representa as repetições DIA 0; DIA 1; DIA 3; DIA 5; DIA 10; DIA 12 e DIA 15.

O tempo de cicatrização (TEC) foi observado diariamente em quatro animais de cada grupo do experimento. Conforme pode ser observado na tabela 6, as feridas cirúrgicas dos animais do GC fecharam em até 15 dias após a realização da lesão.

Os animais do GD tiveram suas feridas cirúrgicas fechadas em até 22 dias, já as feridas cirúrgicas dos animais do GDCTM foram fechadas em até 14 dias.

Com base nos resultados do TEC dos grupos, realizou-se análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey à 5%, onde observou-se que houve diferença de significância entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 2 - Médias dos valores encontrados para a variável *TEC* em ratos wistar submetidos aos tratamentos com imunossupressão com dexametasona (GD), com solução fisiológica (GC), e Imunossupressão por dexametasona com transplante de células tronco mesenquimais (GDCTM)

TRATAMENTO	MÉDIAS (dias)
GD	21,25 ^a
GC	14,75 ^b
GDCTM	13,5 ^b

Pares de médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância; Pares de médias seguidas de letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

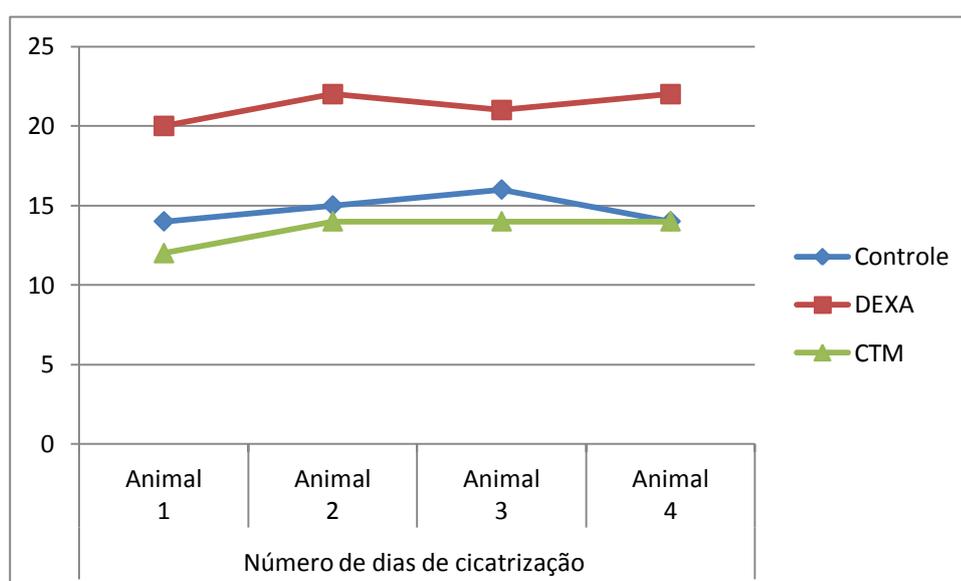


Figura 13 – Demonstração gráfica ilustrando o TEC dos grupos: GC em azul; GD em vermelho e GDCTM em verde. No eixo Y representa o valor de TEC em dias, enquanto o eixo X representa os animais (1, 2, 3 e 4) avaliados para TEC.

5.4 – Avaliação histopatológica

5.4.1 Material coletado dos animais eutanasiados 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GC:

Na lesão foi observada a presença de ferida extensa, compacta, recoberta por material fibrinoso e neutrófilos, em processo degenerativo ou em hipersegmentação.

O tecido conjuntivo abaixo mostrou-se edematoso, com formação de uma delicada trama fibrinosa e, exibiu também proliferação de fibroblastos imaturos, sendo ocasionalmente vistas figuras de mitose. Houve discreta hipertrofia de células endoteliais vasculares, os quais estiveram moderadamente dilatados em planos profundos (Figura 14).

A zona de proliferação endotelial foi discreta a partir de vasos congestos remanescentes.

Quanto ao colágeno, visualizou-se raríssimas fibras colágenas remanescentes, com presença de fibras colágenas inconspícuas (não facilmente perceptíveis) (Figura 14).

Borda da ferida e tecidos adjacentes: verificou-se processo de hiperplasia evidente do epitélio marginal, com nítida acantose (hipertrofia ou espessamento do

estrato germinativo da epiderme). Na derme pode-se verificar vasodilatação discreta, porém com evidente processo de congestão e dilatação vascular em planos. Houve intensa reatividade, com proliferação de fibroblastos localizados na periferia do tecido muscular, acompanhada por discreto processo inflamatório supurativo. Células imaturas foram notadas em quantidade moderada.

Além da margem da ferida evidenciou-se também congestão, dilatação vascular e infiltrado inflamatório mononuclear difuso moderado.

Quanto ao colágeno, houve deposição colágena perimísial discreta.

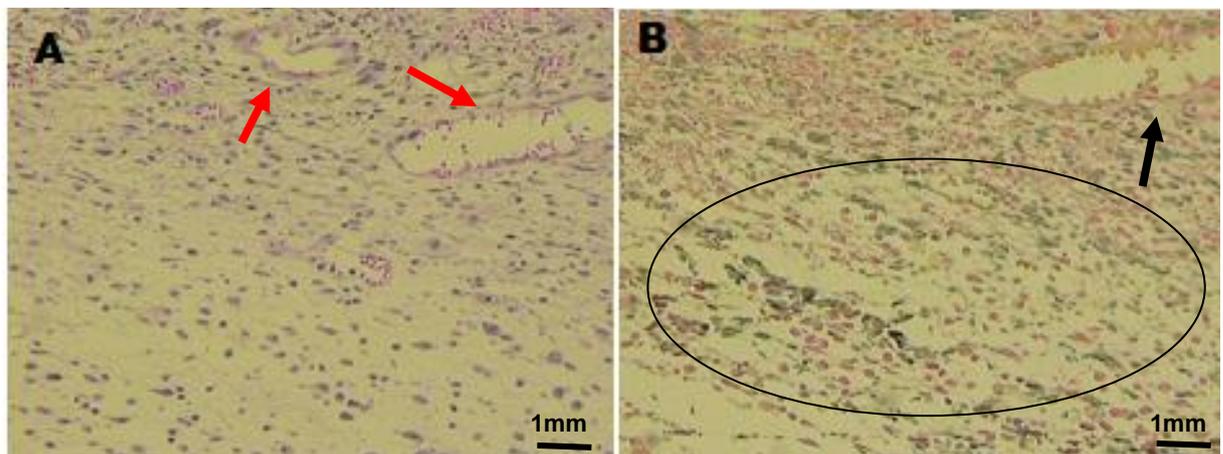


Figura 14 – Neovascularização indicada com setas vermelhas (A); Demarcação da deposição do colágeno, corado em verde pelo Tricrômio de Mavly, de forma mais discreta, na área circulada, e neovascularização indicada pela seta preta (B)

5.4.2 - Material coletado de animal eutanasiado 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD:

Na lesão observou-se presença de crosta pio-serosa e fibrinosa mais frouxa em relação ao GC, com a mesma qualidade celular. O tecido conjuntivo abaixo apresentou edema difuso, com delicada trama fibrinosa, porém com vasos mais evidentes e com vasos neoformados (Figura 15A). Houve proliferação intersticial mais evidente ao GC. Marginação de polimorfonucleares foi evidente.

Borda da Ferida e tecido adjacentes: verificou-se processo de menor hiperplasia do epitélio marginal (Figura 15B). Na derme pode-se verificar vaso dilatação evidente, congestão e dilatação vascular em planos além do músculo cutâneo. Houve intensa reatividade, com proliferação de fibroblastos perimisiais, acompanhada por processo proliferativo de células mesenquimais pouco diferenciadas.

Colágeno: visualizou-se raríssimas fibras colágenas remanescentes, com presença de fibras colágenas inconspícuas. Deposição colágena perimísial mais evidente (Figura 15C).

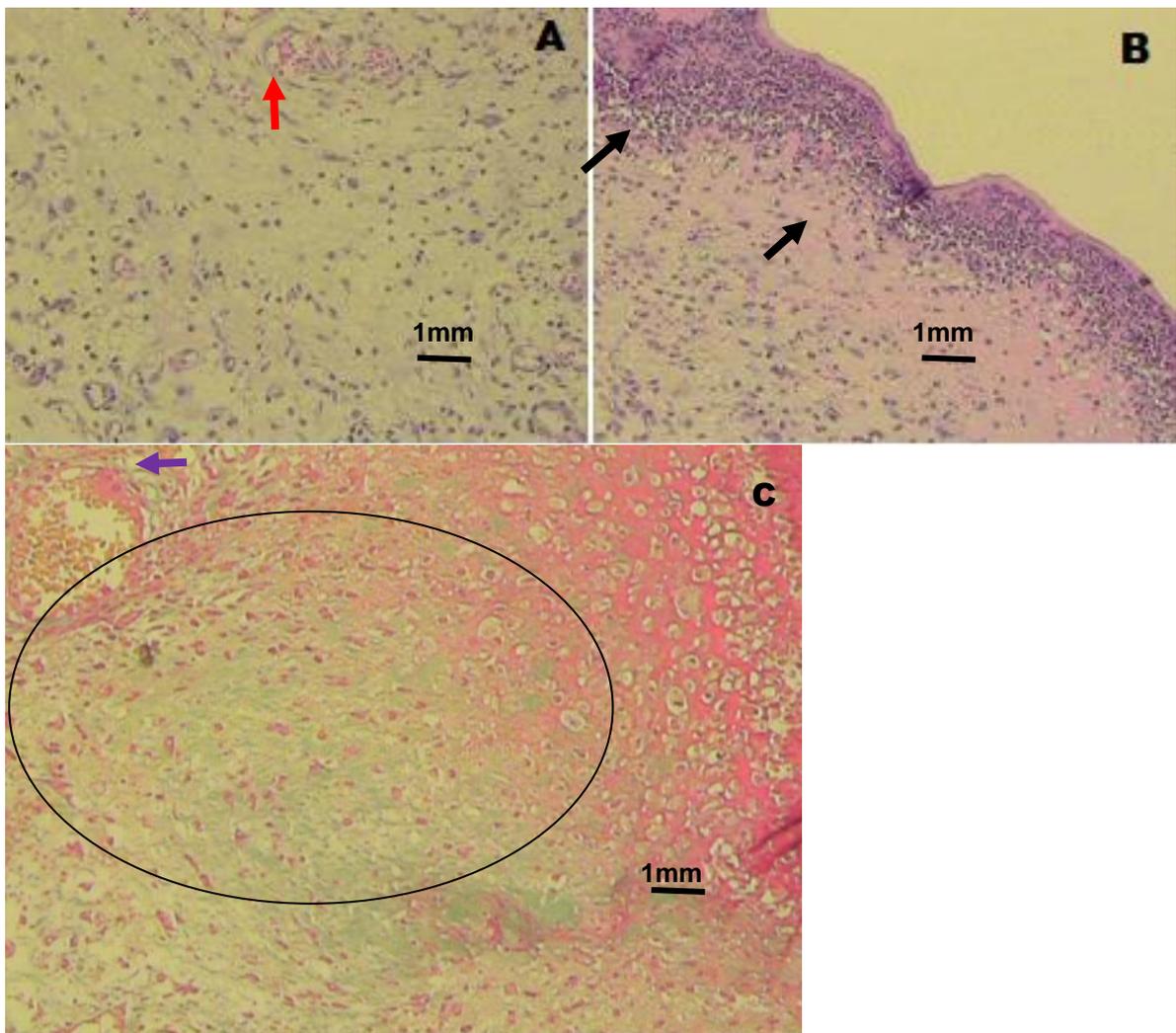


Figura 15 – Neovascularização indicada com a seta vermelha(A); Borda da Ferida marcada com as setas pretas (B); deposição de colágeno, corado em verde, demarcado pelas áreas circulares e neovascularização indicada com a seta lilás (C).

5.4.3 - Material coletado de animal eutanasiado 3 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM:

Lesão: Presença de crosta semelhante ao GD. A trama vascular mostrou aspecto mais ramificado, com formação de inúmeros brotos vasculares, zona proliferativa nítida com discreta formação de capilares, além de evidente hiperplasia do endotélio vascular (Figura 16A). O tecido conjuntivo em plano profundo, apresentou-se com maior celularidade, em relação aos grupos anteriores, por células mesenquimais imaturas, porém com aspecto fibroblástico.

Colágeno: evidenciação de fibras colágenas (em discreta quantidade) maior que os grupos anteriores (Figura 16B).

Borda da ferida e tecido adjacentes: verificou-se processo de menor hiperplasia do epitélio marginal em relação ao GC, porém maior em relação ao GD, com discreta acantose. Na derme pode-se verificar vaso dilatação evidente, congestão e dilatação vascular em planos além do músculo cutâneo. Houve discreta reatividade, com proliferação de fibroblastos perimisiais. Além da margem da ferida evidenciou-se também congestão, dilatação vascular e infiltrado inflamatório mononuclear difuso moderado em menor intensidade que o GD.

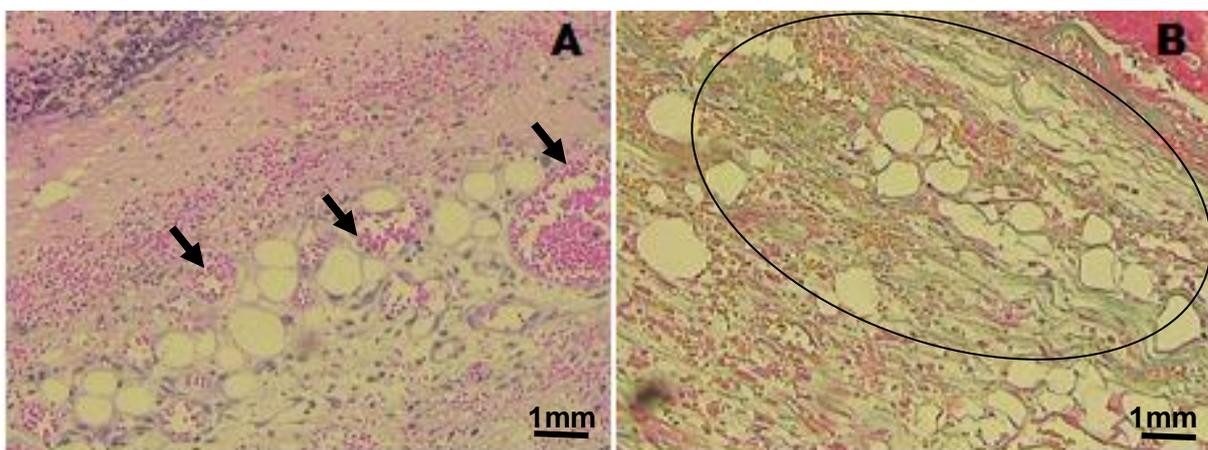


Figura 16 – Vasodilatação indicadas pelas setas pretas (A); Evidenciação e maior número de fibras colágenas recém formadas destacada na área circular (B). Estruturas esverdeadas representam as fibras colágenas em maior quantidade que nos GC e GD.

5.4.4 - Material coletado de animal eutanasiado 7 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD:

Preenchimento do leito da ferida por tecido de granulação evidente. Edema difuso moderado. Epitelização desenvolvendo de forma adequada, sendo presenciada ainda fibras colágenas delgadas, separadas por células mesenquimais alongadas em grande quantidade.

5.4.5 - Material coletado de animal eutanasiado 7 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM:

Em relação ao GD 7 dias, apresenta fibras colágenas com aspecto mais espesso, de forma mais compacta (Figura 17A). Neste grupo (GDCTM), o aspecto do tecido de granulação é mais maduro (com menor espessura) (Figura 17B). Processo de epiteliação mais acentuado, ou seja, cobre mais o leito lesionado. Há presença de células alongadas multinucleadas, junto a extremidade remanescente da musculatura esquelética, o que não ocorreu no GD 7 dias.

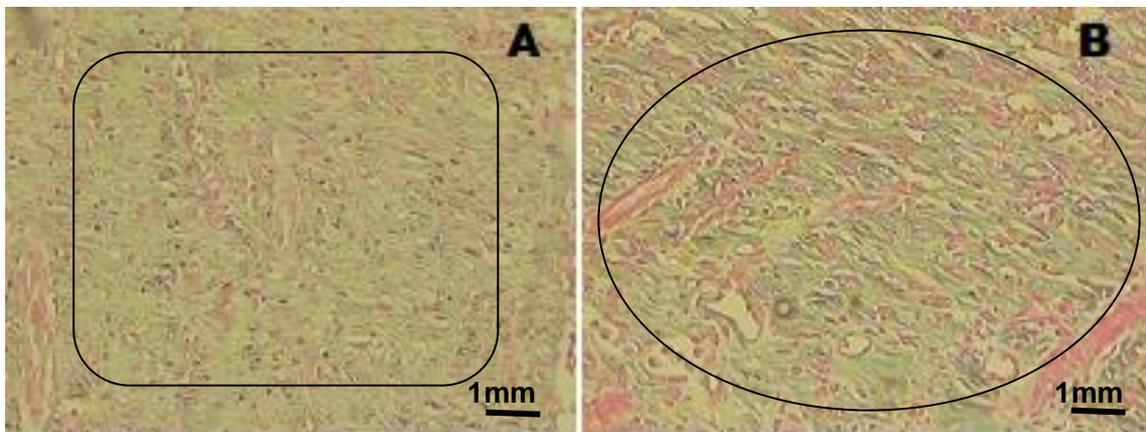


Figura 17 – Fibras colágenas menos evidentes e/ou menos definidas destacadas na área retângular em animal eutanasiado 7 dias após lesão do GD (A); Fibras colágenas mais espessas, logo bem mais evidentes, destacadas na área circular, em animal eutanasiado 7 dias após lesão do GDCTM.

5.4.6 - Material coletado de animal eutanasiado 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GC:

Epitelizado com tecido cicatricial em formação, apresentando fibras colágenas delicadas. Há reatividade de células musculares esqueléticas.

5.4.7 - Material coletado de animal eutanasiado 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GD:

Epitelização em avanço, sem recobrir a ferida. Nota-se grande número de células alongadas por entre as fibras colágenas, as quais apresentam padrão mais delicado em relação do GC. Presença de discreto infiltrado inflamatório linfocitário associado ao epitélio formado.

5.4.8 - *Material coletado de animal eutanasiado 15 dias após a realização da ferida cirúrgica do GDCTM:*

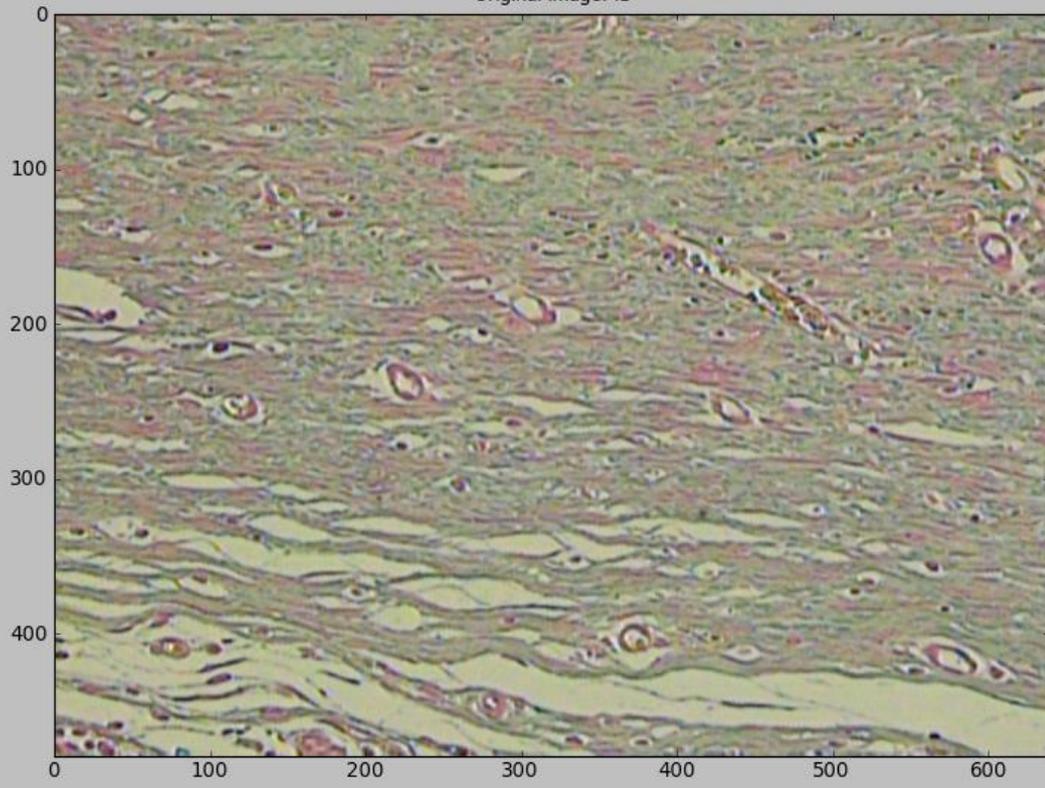
Epitelizado, com tecido cicatricial apresentando fibras colágenas mais espessas e contendo menor quantidade de células alongadas em relação ao GC e GD. Núcleos de células musculares esqueléticas muito reativas e em processo de multinucleação. Já se evidencia formação de papilas dérmicas, evidente hiperplasia com hipertrofia dos anexos cutâneos adjacentes, comparado ao GD. Presença de moderado infiltrado inflamatório linfocitário associado ao epitélio formado.

5.4.9 - *Cellprofiler®*

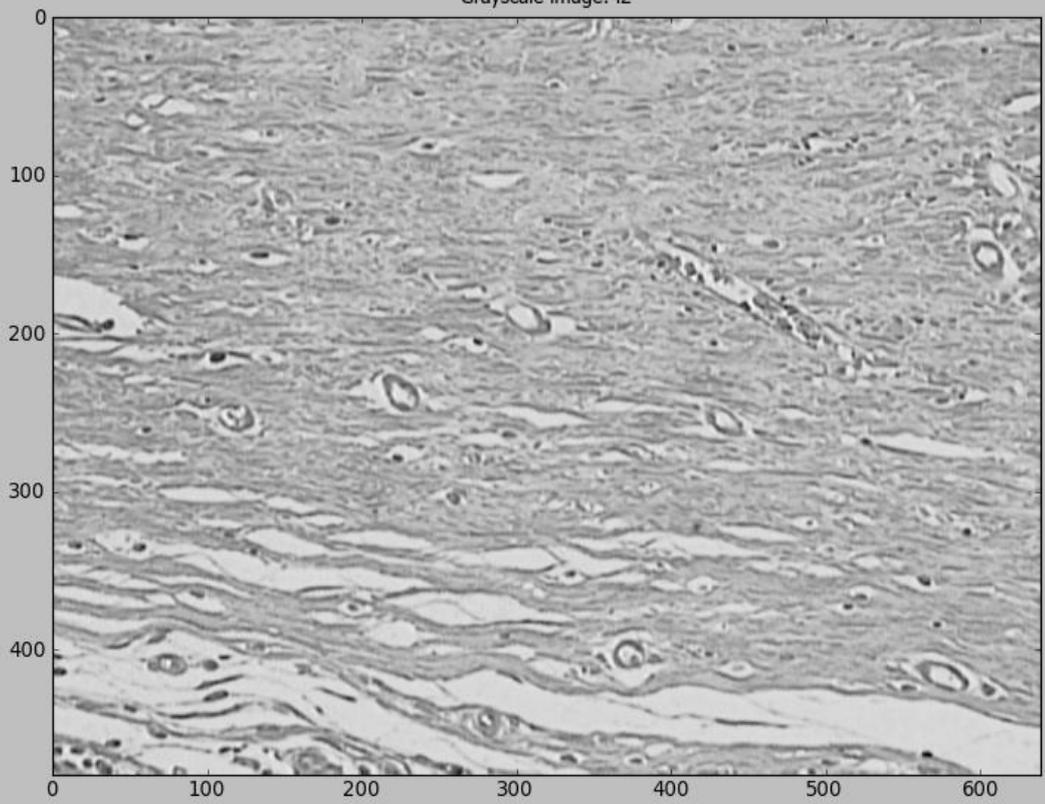
As imagens foram analisadas pelo programa Cellprofiler®, onde as fibras colágenas foram coradas em verde, já as em vermelho e amarelo, não foram identificadas como fibras, logo estas foram excluídas (Figura 18). Os valores médios de fibras colágenas quantificadas aos 15 dias de observação foram 14,3 fibras no GC, 7,3 fibras no GD e 12,7 fibras no GDCTM aos 15 dias de observação, numa área de 5mm².

A

Original image: i1

**B**

Grayscale image: i2



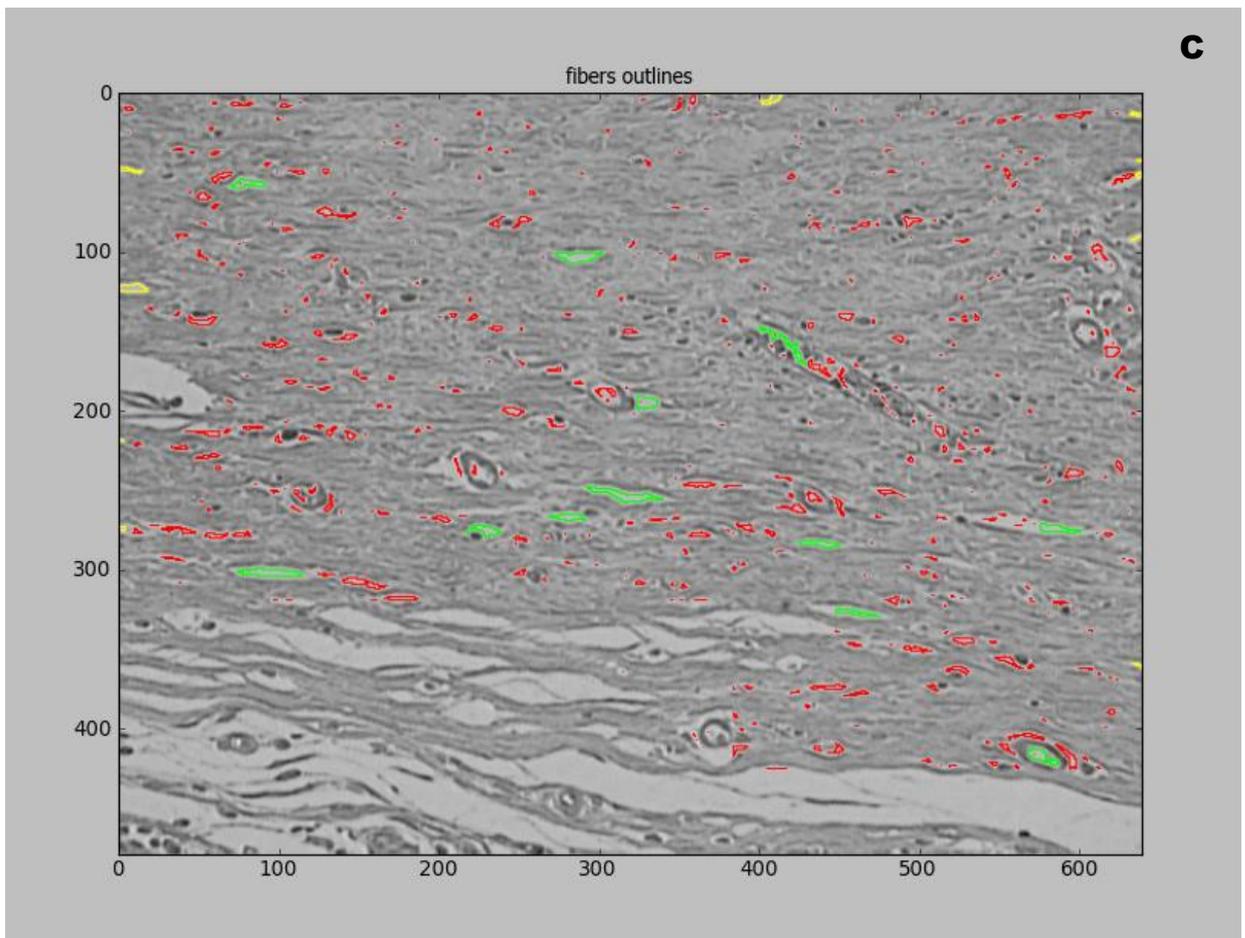


Figura 18 – Imagem histopatológica original contendo fibras colágenas (A) de animal do GDCTM aos 15 dias; Imagem histopatológica em preto e branco (B); Imagem corada em verde e vermelho, onde a coloração verde demarca as fibras colágenas (C).

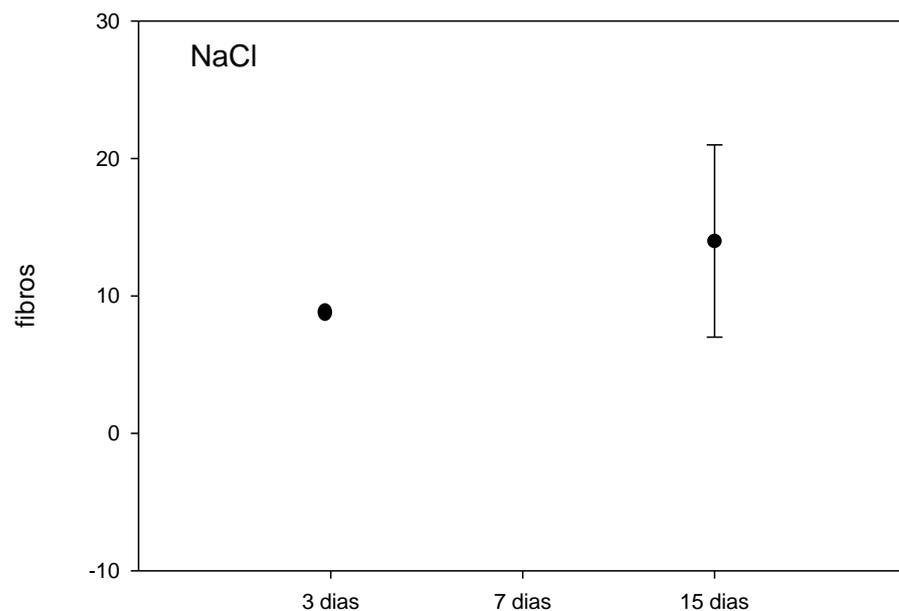


Figura 19 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GC nos dias 3 e 15 após lesão.

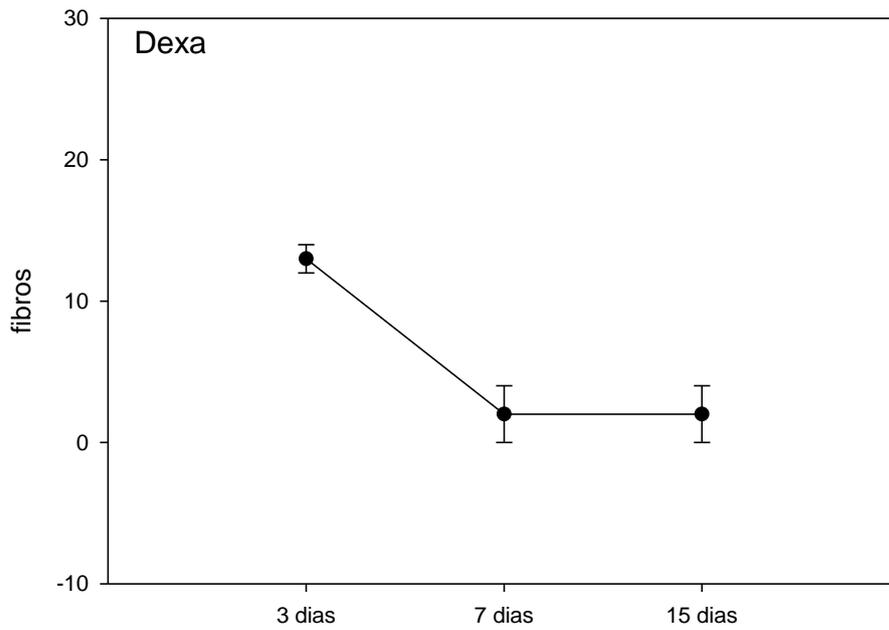


Figura 20 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GD nos dias 3, 7 e 15 após lesão.

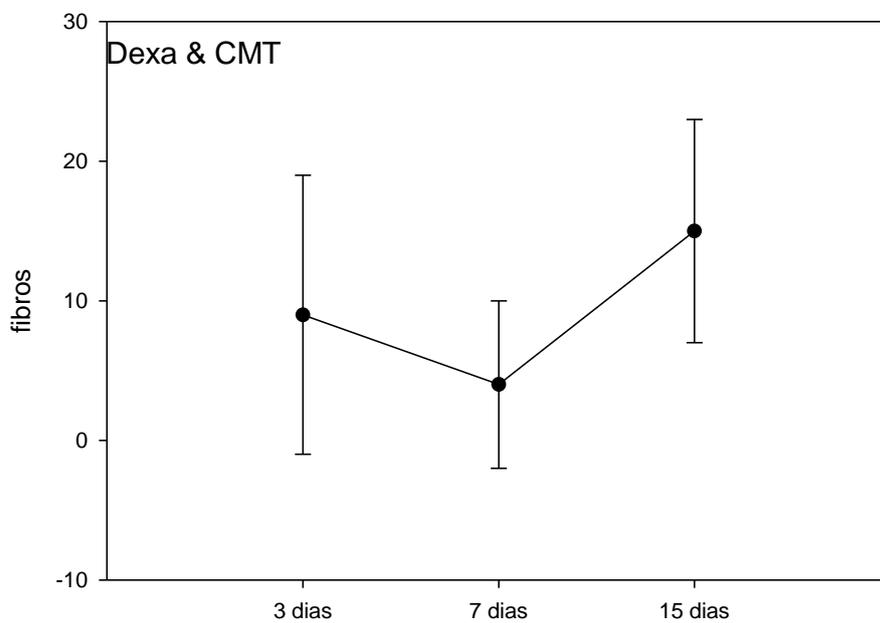


Figura 21 – Demonstração gráfica da quantidade de fibras colágenas presentes no GDCTM nos dias 3, 7 e 15 após lesão.

6 – DISCUSSÃO

A cicatrização é um processo complexo, que começou a ser entendido em maior amplitude nos últimos anos. Contudo ainda há necessidade de se continuar estudando seus mecanismos, visto que grande parte dele ainda é desconhecida (CAMPOS et al., 2007; GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

O futuro é promissor em medidas preventivas e curativas mais eficientes e que possam estar a disposição dos cirurgiões, diminuindo assim a possibilidade de complicações no manuseio dos doentes que necessitam agressão cirúrgica para a cura dos seus males (CAMPOS et al., 2007). Pacientes que fazem uso crônico de corticoides, quando submetidos a procedimento cirúrgico, apresentam pele com comportamento distinto dos demais doentes e respondem ao processo regenerativo de forma diferente (TENIUS et al., 2007). O que pode ser visualizado nos animais do grupo GD deste presente estudo, visto que os mesmos demoraram em média 8 dias a mais para obter cicatrização total quando comparado com os outros grupos (GC e GDCTM).

A imunossupressão experimental deve ser realizada apenas mediante avaliação constante do paciente, visto que pacientes muito deprimidos podem apresentar complicações como aplasia medular, infecções e determinados tipos de neoplasias (TEIXEIRA & REZENDE, 2004). No presente estudo as alterações clínicas observadas foram a presença de secreção ocular escura e áreas de hipotricose nos animais após 14 dias de aplicação de dexametasona.

Os corticoides são bastante utilizados na prática médica, especialmente pelo seu excelente efeito antiinflamatório. No entanto, alguns efeitos adversos na cicatrização de feridas tais como, redução da formação de tecido colágeno e tardio aparecimento de fibrose, têm sido relatados (AGUILAR-NASCIMENTO et al., 2000; TENIUS et al., 2007). Não é a quantidade do colágeno, mas sua organização espacial, que proporciona resistência à ferida (TENIUS et al., 2007). No grupo GC foi observado presença de fibras colágenas inconspícuas, ou seja, pouco perceptíveis nos animais eutanasiados no terceiro dia após a criação da ferida cirúrgica.

A redução da reação inflamatória é efeito já descrito na literatura, tanto que os corticóides são também conhecidos como antiinflamatórios hormonais (AGUILAR-NASCIMENTO et al., 2000; TENIUS et al., 2007).

Tenius et al (2007) relataram que a medida das células inflamatórias esteve diminuída no grupo que recebeu dexametasona em todos os momentos da avaliação e significativamente no terceiro e sétimo dias, caracterizando a ação da dexametasona na fase inflamatória da cicatrização. Neste estudo foi observado redução de infiltrado inflamatório nos grupos que receberam dexametasona.

A partir de 1999, os estudos com células tronco tomaram conhecimento público pelo seu potencial terapêutico. Muito se alardou sobre o uso de células tronco em diversas doenças. Houve enfoque em células tronco embrionárias, uma vez que possuem capacidade de pluripotência. Mas, com os estudos sobre a plasticidade e ausência de respostas imunológicas as CTM se tornaram atrativas para fins terapêuticos (SEMEDO et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

As CTM encontram-se atualmente como a nova promessa na terapia contra diversos tipos de doença, sejam elas congênitas e/ou hereditárias ou adquiridas, em

animais e seres humanos. Os resultados obtidos de pesquisas realizadas, utilizando as frações totais de CTM da medula óssea e tecido adiposo, demonstraram a possibilidade de utilização de células de diferentes tecidos, uma vez que essas células são passíveis de adaptação ao cultivo, expansão e armazenagem (OLIVEIRA, 2010; GARCEZ, 2012; PINTO FILHO et al., 2013). ‘

O protocolo de aplicação das CTM neste experimento foi baseado em trabalhos semelhantes que avaliaram o potencial terapêutico desse grupo celular em lesões cutâneas (OLIVEIRA, 2010; ARGOLO-NETO et al, 2012; GARCEZ, 2012). Estudo recente descreve a utilização alógena e autógena das CTM para a reparação de diversos tecidos (MONTEIRO et al., 2010), no entanto, a capacidade destas células em restaurar o tecido cutâneo ainda não é bem esclarecida (MEIRELLES et al, 2008).

Mesmo não realizando o transplante de células tronco *in situ*, diretamente sobre o tecido cutâneo, e optando pela aplicação intravenosa, pela veia da cauda do rato, observamos no GDCTM que houve presença em maior quantidade de fibras colágenas, e estas aos 15 dias encontram-se mais espessas que nos outros grupos experimentais (MONTEIRO et al., 2010).

Neste trabalho pretendeu-se à avaliação da variáveis dependentes ARL e TEC, por serem dados importantes sobre o processo de evolução de uma lesão. Foi clinicamente relevante a aparência da cicatriz obtida com o tratamento com as CTM, onde pode-se perceber uma maior qualidade cosmética nos grupos os quais foram utilizadas. Estes achados foram também descritos por autores que relatam que as CTM além de acelerar o processo cicatricial podem produzir uma cicatriz de melhor qualidade estética e funcional (GARCEZ, 2012).

A cicatrização das feridas foi considerada quando do encontro das margens, resultando na inibição da contração pelo contato. Os animais do GC obtiveram cicatrização completa com média de 14,75 dias, já os indivíduos do GD, apresentaram cicatrização total em média de 21,25 dias, e os animais do GDCTM tiveram o processo de cicatrização finalizado em média de 13,5 dias. Tendo em vista a constatação clínica de uma possível melhora no processo cicatricial das feridas nos animais que receberam CTM, acredita-se que os benefícios referentes à qualidade da cicatrização provenientes da utilização das CTM possam ser melhor evidenciadas em avaliações superiores aos 15 dias, onde a produção de uma cicatriz de melhor qualidade cosmética poderia ser analisada pela organização da deposição de colágeno (GIANOTTI, 2011; GARCEZ, 2012).

É sabido que as CTM indiferenciadas, fibroblastos e macrófagos iniciam a formação do tecido e que a proliferação, diferenciação, modulação e coordenação destas células ocorrem pela interação de vários fatores de crescimento, coordenando a mitose celular e a síntese proteica (DEL CARLO et al., 2008; MONTEIRO et al., 2010). A terapia celular com CTM foi efetiva em nosso estudo, acelerando o processo cicatricial e incrementado a formação de fibras colágenas. Os mecanismos envolvidos nesse processo não foram elucidados durante o estudo, assim sendo, maiores investigações mostram-se necessárias a fim de confirmar essa hipótese.

7- CONCLUSÃO

Sobre as condições que foram realizadas este experimento constata-se:

- que a dose de 0,1mg/kg SID SC de dexametasona, durante 30 dias, foi capaz de inibir a formação do colágeno presente no processo de cicatrização epitelial dos animais do GD comparando-se ao GC;
- As CTM contribuíram com a cicatrização cutânea, reduzindo o tempo de cicatrização tanto quanto nos animais saudáveis, denotando mínima interferência da dexametasona;
- que o transplante de CTM derivadas de MO contribui de maneira positiva na variável TEC para a cicatrização de feridas cutâneas em animais imunossuprimidos com dexametasona;
- a escolha pela infusão por via intravenosa foi efetiva para ação das células no local da lesão.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; DA SILVA, L.R.F.; TEIXEIRA, R.L.; DE OLIVEIRA, A.F. Deflazacort e cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 46, n. 3, p. 218-223, 2000.

ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B. S.; NARDI, N. B.; CHAGASTELLES, P. C.; DE BRITO, A. F. S.; REIS, A. M. S. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 37, p. 544–553, 2012.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. *Neurociências: desvendando o sistema nervosa*. 3.ed. Artmed, Porto Alegre. 857p, 2008.

BYDLOWSKI, S. P. ; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F. ; JANZ, F. L. Características biológicas das Células Tronco Mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemotec.* v.31, p.25-35, 2009.

CABRAL, A.C.V.; ÂNGELO, P.C.; LEITE, H.V.; PEREIRA, A.K.; LOPES, A.P.B.M.; DE OLIVEIRA, M.B.;BORGES, K.B.G.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células tronco de líquido amniótico. *Rev. Ass. Med. Brasil*, v. 54, n. 6, p. 489-493, 2008.

CARREL, A. *The treatment of wounds*. JAMA, p. 2148,1910.

CHAMUSCA, F.V. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório em terapias fotobiomoduladoras: Uma revisão de literatura. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.11, n.1, p.70-78, Jan./Abr., 2012.

COLOMÉ, L.M.; GOMES, C.; CROSIGNANI, N.; PAZ, A.H.; LUGO, A.A.; GUIMARÃES, K.M.; FOERSTROW, L.P.; TESSARI, J.P.; COLOMÉ, L.M.; GRAÇA, D.L.; MCURER, L.; PASSOS, E.P.; PIPPI, N.L.; CONTESINI, E.A.; LIMA, E.O.C. Utilização de células tronco autólogas de medula óssea na regeneração do nervo tibial de coelhos mediante técnica de tubulização com prótese de silicone. *Ciência Rural*, v. 38, n. 9, p. 2529-2534, 2008.

DEALEY, C. Case study methodology in tissue viability. Part 2: A study to determine the levels os knowledge of nurse providing care for patients with leg ulcers in an acute hospital setting. *J Tissue Viability*, v. 11, n. 1, p. 28-34, 2001.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. Avanços no estudo de células tronco no Brasil e suas implicações. *Revista Ceres*.v. 56, n. 4, p. 446-450, 2009.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. Células tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. *Ciênc. Vet. Tróp.*,v. 11, p. 167-169, 2008.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koongan, 1990.

ENGELKING, L.R. *Fisiologia Endócrina e Metabólica em Medicina Veterinária*. São Paulo: Roca, 2010, p.72-79.

JERICÓ, M.M.; MARCO, V. Anti-inflamatórios Esteroidais. In_____.*Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p.261-271.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Ganabara koogan, 11 ed. 2008.

GARCEZ, T.N.A. *Células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas como adjuvantes da cicatrização de lesões cutâneas experimentais em coelhos Nova Zelândia*. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2012. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

GIANOTTI, A.W.K.B. *Células tronco mesenquimais e eletroacupuntura na cicatrização de lesões cutâneas em coelhos*. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2011. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. *Current opinion in hematology*, v.13, p.419-425, 2006.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *Anais Brasileiros Dermatologia*, Rio de Janeiro, v.78, p.393-410, 2003.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.26, p.2287-2299, 2008.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO,R.J. Células-tronco Mesenquimais. *Ciência Rural*. v. 40, n.1, p. 238-245, 2010.

MONTEIRO, B.S.; ARGÔLO-NETO, N.M.; NARDI, N.B.; CHAGASTELLES, P.C.; CARVALHO, P.H.; BONFÁ, L.P.; FILGUEIRAS, R.R.; REIS, A.S.; DEL CARLO, R.J. Treatment of critical defects produced in calvaria of mice with mesenchymal stem cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. V.84, p.841-851, 2012.

NAUTA, A.J. FIBBRE, W.E. Immunomodulatory properties of mesencgymal stroma cells. *Blood*, v.110, p. 3499-3506, 2007.

OLIVEIRA,C.C. *Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais em feridas ocasionadas por queimaduras em ratos*. Ribeirão Preto, SP: FCFRP/USP, 2010. Dissertação (Mestrado em ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, G.K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F.Z.; MARINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN,L. Células tronco mononucleares autólogas e

proteína óssea morfogênica na cicatrização de defeitos tibiais experimentais induzidos em cães. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

PAPICH, M.G. *Manual Saunders Terapêutico Veterinário*, 2ªed, São Paulo: MedVet, 2009.

PAPICH, M.G. *Manual Saunders: Terapêutica Veterinária*.2.ed. São Paulo: MedVet, 2009 p.202-206.

PEREIRA, A.L.C.; BOLZANI, F.C.B.; STEFANI, M.; CHARLÍN, R. Uso sistêmico de corticosteroides:revisão de literatura. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-America*. v.2, n.35, p.35-50, 2007.

PINTO FILHO, S,T,L; TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURU JUNIOR, J.S.; ROSA, M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Veterinária e Zootecnia*. v.20, p.49-59, 2013.

ROMÃO, F.G.; ANTUNES, M.I. Hipoadrenocorticismo em cães: Revisão. *Veterinaria e Zootecnia*, v.1, n.19, p. 044-054, mar., 2012.

SAMUELSON, D.A. *Tratado de Histologia*. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007. p.398-402.

SCOTT, D.; MILLER, W.; GRIFFIN, C. Muller & Kirk. *Dermatologia de pequenos animais*.Rio de Janeiro:Interlivros, p. 1130, 1996.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. proliferar ou diferenciar? perspectivas de destinos das células tronco. *J.Bras.Neurocirurg*. v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SEMEDO P, COSTA MC, CENEDEZE MA, MALHEIROS DMAC, SHIMIZU MHM, SEGURO AC, PACHECO-SILVA, A, CÂMARA, NOS, et al. Papel imunossupressor e remodelador das células tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. *Einstein*. 2009;7(4):469-79.

SILVA, R.; ALMEIDA JÚNIOR, G. S., CURY, J. R. M., AMARAL, J. B., PERENHA, R. A., LOCATELLI, L.; MATIAS, V.; SACCO, S. R. Leucograma de estresse. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. ano. VI, n.11, jul., 2008.

SIMÕES, J.C.; BATTAGLIN, F.S.; OUTI, D.N.E. Aplicação tópica de glicocorticoides e avaliação de aderências intraperitoneais em ratos. *Rev.Med.Res*. v. 12, n. 3 e 4, p. 118-123, 2010.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SPINOSA, S. H. *Farmacologia aplicada a Medicina veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro. 1999.

TEIXEIRA MW, REZENDE CMF. Imunossupressão e transplantes: perspectivas atuais e futuras. *Medvop: Rev Cient Med Vet Pequenos Anim Anim Estim*. 2004;2(7):205-10.

TENIUS, F.P.; BIONDO-SIMÕES, M.L.; IOSHII, S.O. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.2, n.82, p.141-149, 2007.