

**ALINE SILVESTRINI DA SILVA**

**MATRIZ AUTÓLOGA E TERAPIA CELULAR NA REPARAÇÃO DE  
FERIDAS DE PELE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Emily Correna Carlo Reis

Coorientadores: Fabrício Luciani Valente  
Ricardo Seiti Yamatogi  
Andrea Pacheco Batista  
Borges

**VIÇOSA - MINAS GERAIS**

**2019**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

S586m  
2019 Silva, Aline Silvestrini da, 1989-  
Matriz autóloga e terapia celular na reparação de feridas de pele /  
Aline Silvestrini da Silva. - Viçosa, MG, 2019.  
59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Emily Correna Carlo Reis.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 54-59.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Plaquetas (Sangue). 3.  
Fibrina. 4. Plasma sanguíneo. 5. Regeneração tecidual guiada. I.  
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08965

ALINE SILVESTRINI DA SILVA


**MATRIZ AUTÓLOGA E TERAPIA CELULAR NA REPARAÇÃO DE FERIDAS  
DE PELE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2019.

Assentimento:

  
Aline Silvestrini da Silva  
Autora

  
Emily Correia Carlo Reis  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a minha querida orientadora, professora Emily, pelo suporte e atenção durante todo o desenvolvimento do trabalho, pela paciência e compreensão quando as coisas não caminhavam como esperávamos, muito obrigada por todo ensinamento passado.

Agradeço a minha mãe, irmãos e irmãs, pelo apoio incondicional, e por entender minha ausência, compreender que nem sempre pude estar por perto durante esse tempo, e por continuarem me motivando e acreditando em mim.

Agradeço a minha amiga e irmã Fernanda, por todo envolvimento, suporte e principalmente amizade durante toda essa fase. Ter sua presença foi fundamental para que tudo ocorresse. Considero essa conquista de nós duas, por igual.

Agradeço a Dayana, por manter meus coelhos vivos, por perder final de semana e feriado me ensinando a cortar bloco de parafina ao som de Alcione, e principalmente pela amizade que eu ganhei.

Agradeço a minhas queridas amigas nojentas Pollyanna e Juliana por estarem comigo nessa fase.

Agradeço ao Wellington, coração, por ser essa pessoa incrível, por acreditar em mim, me apoiar e me incentivar sempre, mesmo estando longe.

Agradeço aos professores que forneceram suporte para a realização do projeto: professora Simone Eliza Facioni Guimarães, professor Leandro Licursi de Oliveira, professor Ricardo Seiti Yamatogi, professor José Eduardo Serrão, ao professor Fabricio Luciani Valente e à Fabrícia Hallack Loures pelo apoio nas análises histológicas.

## RESUMO

SILVESTRINI, Aline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Matriz autóloga e terapia celular na reparação de feridas de pele.** Orientador: Emily Correna Carlo Reis. Coorientadores: Andrea Pacheco Batista Borges, Fabrício Luciani Valente e Ricardo Seiti Yamatogi.

As feridas cutâneas são classificadas como uma co-morbidade ou secundária a outras condições clínicas e são um problema de saúde pública. As células estromais mesenquimais (MSCs) e as membranas autólogas tem sido estudadas para favorecer a regeneração tecidual. Objetivou-se com esse trabalho entender o processo de reparação da pele quando utilizamos terapia celular e matrizes autólogas e, para tal, foram utilizadas duas abordagens, uma revisão sistemática e um trabalho experimental. Nas bases de dados PubMed e BVS foram selecionados estudos experimentais que avaliassem a associação da terapia celular e membranas autólogas em feridas de pele de coelhos e roedores. Cinco estudos preencheram os critérios de inclusão e foram selecionados na revisão sistemática. A associação da terapia celular com as matrizes autólogas, nas suas diferentes formas de produção, teve um importante papel em relação aos parâmetros envolvidos no reparo tecidual, como organização do tecido, reepitelização, deposição de colágeno e angiogênese. Devido a heterogenicidade dos estudos, não foi possível realizar meta-análise nessa revisão. Propõe-se que seja elaborado um consenso sobre características e critérios de avaliação para realização de pesquisas no tratamento de feridas cutâneas, objetivando a padronização e conseqüente possibilidade de melhor comparação entre tratamentos. Em seguida, foi realizado um estudo experimental. Objetivou-se com esse trabalho avaliar a influência das células tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) no reparo de feridas, usando a fibrina rica em plaquetas (PRF) para favorecer a adesão celular no leito da ferida, bem como discutir sobre os principais componentes do processo de reparo e como as MSCs podem influenciar suas ações. Neste estudo, as ASCs foram associadas a PRF para o tratamento de feridas cutâneas induzidas experimentalmente, medindo 8mm de diâmetro no dorso de coelhos, com seis amostras por grupo: controle (solução salina), PRF

apenas e ASC associadas a PRF. Suas ações foram avaliadas por análise macroscópica e histopatológica. Os resultados mostraram que as ASCs associadas com PRF permaneceram na ferida até o dia 14. E foram capazes de aumentar angiogênese e maturação do colágeno na transição da fase inflamatória para a proliferativa, embora não tenham influenciado o tempo de fechamento das feridas em comparação aos demais grupos. Após a realização da revisão sistemática e do estudo experimental, acredita-se que a associação dessa terapia é promissora e sugerem-se novos estudos com feridas complexas e tamanho maior, a fim de conseguir uma melhor avaliação na diferença entre os tratamentos.

Palavras-chave: MSCs. Plaqueta. Fibrina. Plasma. Reparo.

## **ABSTRACT**

SILVESTRINI, Aline, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Autologous matrix and cellular therapy in repair of skin wound.** Adviser: Emily Correna Carlo Reis. Co-advisers: Andrea Pacheco Batista Borges, Fabrício Luciani Valente and Ricardo Seiti Yamatogi.

Skin wounds are classified as comorbidities or secondary to other clinical conditions and are a public health problem. Mesenchymal stromal cells (MSCs) and autologous membranes have been studied to favor tissue regeneration. The objective of this work is to understand the process of skin repair when using cell therapy and autologous matrices and, for this, two approaches, a systematic review and an experimental work were used. In the PubMed and BVS databases, experimental studies were selected that evaluated an association of cell therapy and autologous membranes in rabbit and rodent skin wounds. Five studies were selected for inclusion and selected in the systematic review. The association of cell therapy with autologous matrices, in their different forms of production, played an important role in relation to variations applied in technical repair, such as tissue organization, reepithelization, image deposition and angiogenesis. To determine the heterogeneity of the studies, it was not possible to perform the meta-analysis in this review. It is proposed that a consensus be developed on the characteristics and used to evaluate research on the treatment of skin wounds, aiming at standardization and consequent possibility of better comparison between applications. Then, an experimental study was performed. The aim of this study was to evaluate the influence of adipose-derived stem cells (ASCs) on wound repair, using a platelet-rich fibrin (PRF) to promote cell connection in the wound bed, as well as to discuss the main repair process components and how MSCs can influence their actions. In this study, ASCs were associated with PRF for the treatment of experimentally induced cutaneous wounds, measuring 8mm in diameter on the back of rabbits, with six samples per group: control (saline), PRF only, and PRF associated ASC. Their actions were evaluated by macroscopic and histopathological analysis. Results shown as ASCs recorded with PRF remain in the wound until day 14. And they were able to increase

angiogenesis and collagen maturation in the transition from inflammatory to proliferative phase, although they were not influenced or the time of wound closure compared to the other groups. Following the systematic review and experimental study, it is believed that the association of this therapy is promising and further studies with larger and complex wounds are suggested, in order to better evaluate the difference between the tests.

Keywords: MSCs. Platelet. Fibrin. Plasma. Repair.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASCs: células tronco derivadas de tecido adiposo

BVS: Biblioteca Virtual em Saúde

cDNA: ácido desoxirribonucléico complementar

CEUA: Comissão de Ética para Uso de Animais

CRMV-MG: Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GFP: green fluorescent protein

H&E: Hematoxilina-Eosina

IGF: fator de crescimento semelhante a insulina

IL-6: interleucina 6

IM: intramuscular

kg: quilograma

mg: miligrama

ml: mililitros

mm<sup>2</sup>: milímetros quadrados

MSCs: células estromais mesenquimais

NaCl: cloreto de sódio

NFSC: nanofat-derived stem cells

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PECAM: platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1

PICOS: População, Intervenção, Comparação, Resultados

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRCR: lisado de coágulo rico em plaquetas

PRF: fibrina rica em plaquetas

PRGF: Plasma rico em fatores de crescimento

PRP: plasma rico em plaquetas

qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

vWF: Fator de von Willebrand

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1:** Organograma da revisão sistemática realizada nas bases de dados PubMed e BVS.

**Figura 2:** Processo de isolamento.

**Figura 3:** Obtenção da membrana autóloga de PRF.

**Figura 4:** Aplicação dos tratamentos e confecção do curativo.

**Figura 5:** Fotografia das feridas com a régua para mensuração da área.

**Figura 6:** Medidas para avaliação da porcentagem de contração das feridas nos grupos controle, fibrina rica em plaquetas (PRF) e associação entre PRF e células-tronco derivadas do tecido adiposo nos dias 0, 7 e 14.

**Figura 7:** Imagens de microscopia óptica (20x) das amostras de pele coradas com H&E dos grupos tratados nos dias 7 e 14.

**Figura 8:** Relação entre a porcentagem de colágeno tipo I e tipo III nos grupos (A). Imagem obtida no microscópio de luz polarizada na avaliação histomorfométrica de amostra de ferida do grupo PRF+ASCs no dia 14 (B).

**Figura 9:** Imagens obtidas através de microscopia confocal de campo escuro com fluorescência e campo claro 14 dias após aplicação das ASCs ao leito da ferida.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Informações sobre os estudos incluídos na revisão sistemática.

**Tabela 2:** Principais resultados que foram avaliados em cada estudo incluído na revisão sistemática.

**Tabela 3:** Porcentagem da contração das feridas em cada grupo tratado.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
CAPÍTULO I.....	17
RESUMO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
METODOLOGIA.....	21
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	35
CAPÍTULO II.....	36
RESUMO.....	37
INTRODUÇÃO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	45
DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	51
AGRADECIMENTOS.....	52
CONCLUSÕES GERAIS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## INTRODUÇÃO

As feridas cutâneas são classificadas como uma co-morbidade ou secundária a outras condições clínicas. Não existe um treinamento específico dentre as especialidades médicas quanto à conduta clínica e tratamento de feridas. Do ponto de vista político e de saúde pública, a responsabilidade fragmentada levou à falta de priorização de recursos e capacidades em torno do tratamento de feridas. Embora o tratamento de feridas seja um problema mundial, nos EUA as feridas afetam cerca de 5,7 milhões de pessoas a um custo anual estimado de US\$ 20 bilhões (FRYKBERG; BANKS, 2015; WALKER et al., 2002).

Uma ferida cutânea pode ser definida como uma descontinuidade do tecido epitelial onde as funções básicas de proteção conferidas pela pele são comprometidas (SANTOS et al., 2011). O reparo do tecido cutâneo é um processo fisiológico essencial no qual ocorre a coordenação de muitos tipos celulares e seus produtos, podendo ocorrer de duas formas distintas: a cicatrização e a regeneração tecidual. A regeneração é a substituição do tecido lesionado por um tecido semelhante, funcional e estruturalmente, àquele que foi perdido, restabelecendo seu estado normal. Já a cicatrização é o processo pelos quais os defeitos tissulares são substituídos por uma cicatriz não funcional através da deposição de tecido conjuntivo (KRAFTS, 2010; SHAW; MARTIN, 2009).

Após uma lesão tecidual, um conjunto de eventos bioquímicos se estabelece para reparar o dano (PAGANELA et al., 2009). Os eventos que desencadeiam a reparação são descritos em três fases fundamentais, a inflamatória, a proliferativa e a remodelação, sendo intercedidos e sustentados por mediadores bioquímicos (LIMA et al., 2012). Quando as lesões atingem somente a camada da epiderme, ocorre a regeneração tecidual, com retorno da integridade morfofuncional do tecido lesionado. Porém, quando o dano se entende até a camada da derme, acometendo estruturas mais profundas, o processo resulta em cicatrização. Nesse caso a atividade morfofuncional do tecido encontra-se comprometida, pois a região

lesionada é substituída integral ou parcialmente por tecido fibroso (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O processo de reparação envolve uma sequência de eventos, iniciado com lesão do endotélio, onde as plaquetas formam um trombo que tampona provisoriamente a lesão endotelial. Esse trombo é rapidamente infiltrado por fibrina que, por meio da adesão dos eritrócitos, forma outro trombo de coloração avermelhada, principal responsável pela oclusão do vaso rompido. A formação do coágulo serve para coaptar as bordas da ferida, como também, para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, na qual os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos podem ingressar na ferida e promover a reparação pelos eventos de angiogênese, fibroplasia e epitelização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Cada um desses eventos sequenciais e simultâneos pode sofrer interferência de fatores como diabetes, idade avançada, tamanho, local e profundidade da ferida, levando à dificuldade de reparação. (TILLMANN; FELIX; MUNDSTOK, 2015; (DA ROSA SILVA et al., 2017).

As células estromais mesenquimais (MSCs) estão ganhando espaço dentre as possibilidades terapêuticas também para feridas cutâneas devido a sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos e suas propriedades imunomoduladora, citoprotetora e angiogênica. As MSCs derivadas de tecido adiposo (ASCs) são definidas como uma população de células progenitoras multipotentes, indiferenciadas e auto-renováveis (WOO; HWANG; SHIM, 2016; ZUK et al., 2002). As ASCs são facilmente obtidas devido à grande disponibilidade de tecido adiposo. O procedimento de isolamento é simples e a qualidade dessas células, assim como sua capacidade proliferativa pouco diminui com a idade do paciente. Portanto, devido a esses fatores, constituem uma boa fonte de células tronco para aplicações clínicas (BEANE et al., 2014; ZUK et al., 2001).

Tanto as MSCs como as ASCs são uma excelente opção de tratamento para o reparo de feridas cutâneas, pois apresentam potencial de diferenciação em células epiteliais, levando a uma reepitelização acelerada além de capacidade de diferenciação em células endoteliais e secreção de fatores de crescimento que contribuem para o aumento da angiogênese (NIE et al., 2011).

A principal perspectiva encontra-se na utilização de matrizes de fibrina como carreadoras das MSCs, pois pode fornecer um microambiente mais adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (HU et al., 2018; TARTARINI; MELE, 2016). Pesquisadores têm trabalhado para desenvolver matrizes que mantenham as células no leito da ferida e proporcionem o meio adequado para sua atuação. Estudos com MSCs derivadas de cordão umbilical humano, aplicadas em ferida cutânea de camundongos já demonstram acelerar a regeneração e representam uma fonte reconhecida na engenharia de tecidos. Contudo, percebeu-se que a aplicação clínica da matriz utilizada no artigo experimental é de difícil aquisição, tanto pelo custo quanto pelos procedimentos necessários para importação no Brasil (ZEBARDAST; LICKORISH; DAVIES, 2010).

Nas matrizes autólogas podemos encontrar diferentes concentrações de plaquetas. As plaquetas contem uma grande quantidade de fatores de crescimento, substâncias capazes de estimular a proliferação celular, remodelamento da matriz extracelular e angiogênese. As principais matrizes autólogas são: PRP (Plasma rico em plaquetas), PPP (Plasma pobre em plaquetas) e PRF (Fibrina rica em plaquetas) (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

A PRF apresenta características para favorecer o processo de reparação, possivelmente capaz de orientar a migração das células epiteliais por sua superfície e desenvolvimento da micro-vascularização, uma vez que ela fornece o ambiente inicial do processo de reparação: a malha de fibrina e os fatores bioquímicos (DOHAN et al., 2006a). Ela é considerada uma segunda geração das matrizes autólogas com concentrado de plaquetas, e possui potencial para utilização no reparo de feridas. Em relação ao PRP, a principal matriz hoje utilizada, a PRF não requer a utilização de aditivos para induzir a polimerização da fibrina (BAI et al., 2017; LANDESBURG et al., 2005), não necessita de nenhum manejo bioquímico do sangue, o processo de obtenção é simples e econômico, tendo demonstrado ações mais eficientes no favorecimento da migração e proliferação celular (TOFFLER et al., 2009). A diferença mais marcante entre PRP e PRF é, que a PRF é considerada completamente autóloga sem qualquer aditivo. O não uso de

anticoagulantes no seu preparo causa ativação plaquetária fisiológica auxiliando também na hemostasia (DOHAN et al., 2006a).

De acordo com os resultados de um estudo realizado por (LIANG et al., 2018) a PRF liberou consistentemente fatores de crescimento estimulando a proliferação e a função parácrina de uma subcategoria das ASCs in vitro. Também observou aumento significativo na concentração de fatores de crescimento, que podem promover a proliferação de fibroblastos e a geração de colágeno, além de possivelmente influenciar a diferenciação de células tronco em células endoteliais vasculares, aumentando a angiogênese tecidual. Segundo (DOHAN et al., 2006b) o mecanismo fisiológico da polimerização da PRF, cria uma estrutura única de fibrina que permite a melhor migração celular e liberação mais lenta dos fatores de crescimento.

Devido a essas características, com o presente estudo propõe a utilização da matriz autóloga de PRF como agente carreador das ASCs na reparação de feridas de pele. Nesse sentido, a PRF não apenas forneceria fatores de crescimento importantes no processo de reparação, mas também promoveria melhor adesão das ASCs ao leito da ferida, que agiriam tanto pelo efeito parácrino de modulação do processo como pela diferenciação. Será assim possível avaliar a eficácia da terapia celular associada a essa matriz autóloga na reparação de feridas cutâneas e determinar uma possibilidade de tratamento não só na medicina veterinária, mas também na medicina humana.

## **CAPÍTULO I**

### **Uso de membranas autólogas associadas à terapia celular no tratamento de feridas cutâneas - Revisão sistemática**

Aline Silvestrini et al.

## **Uso de membranas autólogas associadas à terapia celular no tratamento de feridas cutâneas - Revisão sistemática**

**Resumo:** O objetivo com o presente estudo foi revisar sistematicamente a literatura atual sobre o uso tópico das membranas autólogas; plasma rico em plaquetas (PRP); plasma pobre em plaquetas (PPP) e fibrina rica em plaquetas (PRF), associadas à terapia celular em feridas de pele de espessura total induzidas experimentalmente em modelos animais (coelhos e roedores). A literatura relata uma gama de estudos com o uso dessa combinação de tratamentos no reparo de outros tipos de tecido (como ossos, cartilagem e tendões), porém, essa associação é pouco descrita para o reparo de tecido cutâneo, seja para feridas simples ou complicadas, em relação a extensão da lesão ou co-morbidades associadas. Uma busca eletrônica foi realizada nas seguintes bases de dados: PubMed e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Foi aplicada restrição de busca em relação ao idioma, somente estudos em inglês. Não foram aplicados critérios de exclusão quanto ao ano de publicação. Estudos clínicos randomizados comparando o uso de matrizes autólogas associados a terapia celular com tratamentos controle foram incluídos. Treze estudos clínicos randomizados controlados foram incluídos na revisão sistemática. Após rigorosa avaliação, cinco estudos foram selecionados na revisão sistemática. Observou-se que a associação da terapia celular com as matrizes autólogas, nas suas diferentes formas de produção, teve um importante papel em relação aos parâmetros envolvidos no reparo tecidual, como: organização do tecido, reepitelização, deposição de colágeno e angiogênese. Com estudos muito heterogêneos, não foi possível realizar meta-análise nessa revisão, dificultando a comparação entre tratamentos propostos. Propõe-se que seja elaborado um consenso sobre características e critérios de avaliação para realização de pesquisas no tratamento de feridas cutâneas, objetivando a padronização e conseqüente possibilidade de melhor comparação entre tratamentos.

**Palavras-chave:** MSCs, Plaqueta, Fibrina, Plasma, reparo tecidual

## INTRODUÇÃO

As células estromais mesenquimais (MSCs) estão ganhando espaço dentre as possibilidades terapêuticas, devido sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos e suas propriedades imunomoduladoras, citoprotetora e angiogênica. As MSCs são consideradas com excelente potencial para o tratamento de feridas cutâneas, pois diferenciam em células epiteliais favorecendo a reepitelização e têm capacidade de diferenciação em células endoteliais (NIE et al., 2011). Além disso e de forma mais preponderante, sua ação está relacionada ao efeito parácrino sob as células locais pela liberação de citocinas e fatores de crescimento, acelerando o fechamento da ferida, promovendo a angiogênese e a formação de tecido de granulação, regulando o remodelamento da matriz extracelular e o aumentando a reepitelização (LEE et al., 2012).

As MSC podem ser isoladas de uma variedade de tecidos, incluindo a medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo, músculo, placenta, âmnion e cordão umbilical, sendo consideradas relativamente fáceis de isolar e se expandir sob condições de cultura padrão (KLINGEMANN; MATZILEVICH; MARCHAND, 2008).

Sabe-se que as MSCs precisam de um agente carreador que facilite sua adesão ao leito receptor de uma ferida, isso porque a injeção direta ou administração tópica de MSCs por meio de matrizes de gel pode ser prejudicial para a sobrevivência das células. A utilização de matrizes de fibrina como carreadoras das MSCs pode fornecer um microambiente mais adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (HU et al., 2018; TARTARINI; MELE, 2016). Algumas matrizes já foram utilizadas com esse objetivo, incluindo matrizes de gel (CAPPUZZELLO et al., 2016), sintéticas (ZEBARDAST; LICKORISH; DAVIES, 2010) e autólogas (SAMBERG et al., 2019).

As matrizes autólogas são reconhecidas por apresentarem plaquetas em diferentes concentrações. As plaquetas são fontes de fatores de crescimento indispensáveis ao leito receptor, promovendo maior concentração desses aos tecidos a serem regenerados. Os fatores de crescimento são substâncias capazes de estimular a proliferação celular,

remodelamento da matriz extracelular e angiogênese e estão presentes nas matrizes autólogas em diferentes proporções, são elas: PRP (plasma rico em plaquetas), PPP (plasma pobre em plaquetas) e PRF (fibrina rica em plaquetas) (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009).

O PRP, o mais estudado deles, é um derivado sanguíneo autólogo e contém uma alta concentração de plaquetas e leucócitos, em um pequeno volume de plasma, sendo obtido por centrifugação do sangue total que separa o plasma, os leucócitos e as plaquetas das hemácias (BIELECKI et al., 2012). Mais recentemente, devido às limitações do PRP, como a necessidade da adição de substâncias que ativem o processo de coagulação, a complexidade e conflitos de literatura a respeito do seu método de obtenção, têm se aprofundado os estudos do PPP e da PRF. O PPP é uma matriz que pode ser produzida por meio da utilização do sobrenadante resultante do processo de obtenção tanto do PRP quanto do PRF. O PPP pode conter alguns fatores de crescimento em sua composição e parece promover a função celular associada à reparação de feridas, como a melhora na migração e a proliferação celular (HATAKEYAMA et al., 2014; MARTÍNEZ et al., 2016). Já a PRF pode ser definida como um biomaterial concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo (CHOUKROUN et al., 2006). A molécula de fibrina suporta o processo de reparação por meio da orientação da migração das células epiteliais para a sua superfície e desenvolvimento da microvascularização (DOHAN et al., 2006a; LI et al., 2013). Na PRF, as plaquetas e fatores de crescimento ficam aprisionados em um coágulo de fibrina. Esses fatores de crescimento se encontram em concentrações significativamente superiores aos níveis séricos e podem estimular a regeneração tecidos (CIVININI et al., 2011).

Devido à capacidade regenerativa das MSCs na reparação de feridas e considerando o potencial das membranas autólogas como carreador dessas células no leito da ferida e contendo fatores bioquímicos moduladores da regeneração, esse trabalho buscou revisar os dados sobre a associação dessas terapias. Com isso, pretende-se responder o seguinte questionamento: na regeneração de feridas experimentais não complicadas, existem diferenças no processo de reparo tecidual quando utilizamos a

associação dessas terapias em relação ao controle sem qualquer terapia? O objetivo é entender se os estudos até hoje realizados podem demonstrar diferenças no processo de regeneração e em um segundo momento, se a associação dessas terapias traria mais benefícios do que uma delas isoladamente.

## **METODOLOGIA**

### **Critérios de elegibilidade dos estudos**

Para definir os critérios de inclusão de cada estudo primário nesta revisão sistemática, foi utilizada a abordagem estruturada PICOS (População, Intervenção, Comparação, Resultados). As principais características para inclusão e exclusão foram:

- Ensaios clínicos controlados randomizados que compararam a associação de membranas autólogas e terapia celular de forma tópica com tratamentos controle ou placebo.
- A população do estudo consistiu-se de modelos animais, sendo considerados apenas coelhos e roedores, nos quais feridas cutâneas de espessura total foram induzidas experimentalmente e deixadas para cicatrização por segunda intenção, com ou sem co-morbidades associadas (ex: diabetes, queimadura).
- Apenas estudos *in vivo* foram incluídos.
- Foram incluídos apenas estudos em inglês
- Apenas estudos publicados em periódicos indexados e revisados por pares foram considerados.
- Não foram aplicados critérios de exclusão em relação à data das publicações.
- Estudos que utilizaram a terapia celular de forma sistêmica não foram elegíveis para esta revisão sistemática.
- Estudos que utilizassem a associação da terapia celular associada às membranas autólogas para o reparo de outros tecidos que não fosse para o reparo do tecido cutâneo não

foram incluídos. Numerosos estudos utilizam esse tipo de tratamento para afecções ósseas, articulares, odontológicas ou em cirurgias plásticas, além do tratamento para úlceras crônicas em humanos.

### **Métodos de pesquisa para identificação de estudos**

A busca da literatura foi realizada de forma eletrônica nas seguintes bases de dados: PubMed e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Nessas bases de dados, a pesquisa foi feita usando as seguintes palavras-chave:

- Skin OR Wound
- AND Plasma OR Fibrin OR Autologous
- AND Mesenchymal Stem
- AND NOT equine
- AND NOT case report
- ((((((skin) OR wound) AND fibrin) OR plasma) OR autologous) AND mesenchymal stem) NOT equine) NOT case report

### **Coleta e análise de dados para seleção dos estudos**

A triagem dos estudos foi realizada por dois revisores independentes, sendo que todos os estudos identificados foram avaliados pelos critérios de inclusão/exclusão iniciais. Duplicatas de uma ou mais estratégias de busca nos bancos de dados foram excluídas.

Inicialmente foram selecionados por meio de uma abordagem em duas etapas, primeiro foi analisado o título, seguido da análise do resumo (com identificação do número de estudos que foram excluídos). Após, seguiu-se para análise do texto completo (com identificação do número de artigos em texto integral avaliado para elegibilidade). O motivo da exclusão foi especificado para cada uma das referências excluídas.

Finalmente, os estudos identificados foram classificados como incluídos na revisão sistemática (cinco estudos).

### **Extração e gerenciamento de dados**

Foram extraídos e registrados em um formulário de extração de dados, as seguintes informações de cada estudo primário incluído:

- Características do estudo (nome, país);
- Características de publicação (ano, tipo);
- Características dos participantes (número, espécie);
- Características de lesões induzidas (tamanho e número de feridas, modo de indução);
- Características de intervenção (técnica de produção das membranas, fonte de obtenção das células);
- Protocolo de tratamento (divisão em grupos e descrição de grupos, randomização, número de aplicações do tratamento, curativo, quantidade de células aplicadas nas feridas);
- Avaliações realizadas em estudos primários (quais métodos de avaliação do tratamento);
- Principais resultados dos estudos primários.

## **RESULTADOS**

Foram identificados 5225 trabalhos nas bases de dados escolhidas para a pesquisa, desses foram eliminadas 266 duplicatas. Foram selecionados 177 estudos pelo conteúdo informado no título, dos quais prosseguiu-se para avaliação dos resumos. Foram selecionados oito artigos primários para avaliação crítica que consistiu na leitura do estudo na íntegra e, em seguida, o preenchimento dos instrumentos de coleta de dados. A identificação, seleção e eleição dos trabalhos está esquematizada na figura 1.



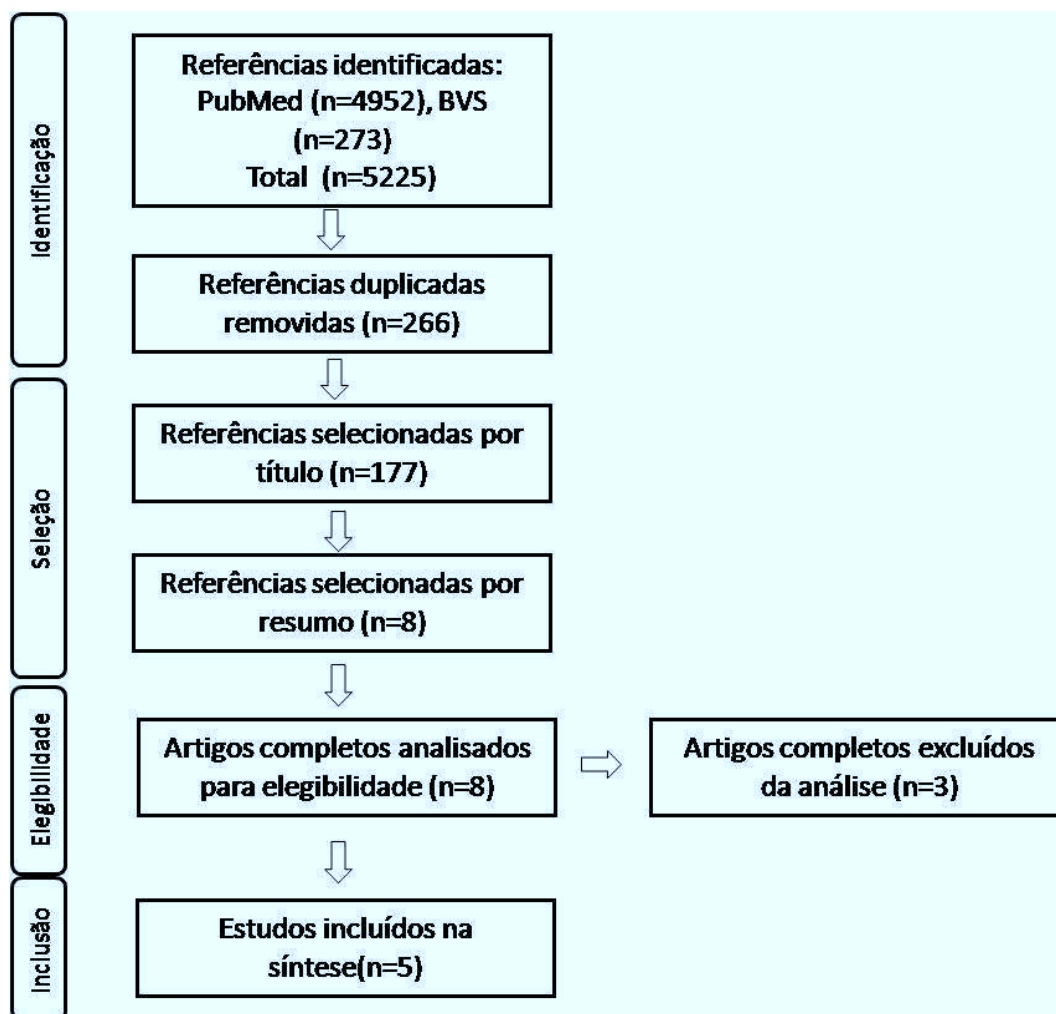


Figura 1: Organograma da revisão sistemática realizada nas bases de dados PubMed e BVS.

Os estudos incluídos na revisão sistemática foram rigorosamente avaliados e após extração dos dados, essas informações foram organizadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Informações sobre os estudos incluídos na revisão sistemática.

	<b>Modelo animal e N por tratamento</b>	<b>Etiologia das feridas</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Avaliações realizadas</b>
Argôlo Neto et al., 2012	Ratos diabéticos N=3 para histomorfometria e PCR  N=7 Área da lesão e aparência clínica  Total N=10 para cada grupo	1 ferida incisional 15mm de diâmetro	MSCs de medula óssea de ratos ( $1,87 \times 10^5$ células/mm <sup>2</sup> ) PRP de ratos	Área da lesão Aparência clínica Histomorfometria PCR
Lian et al., 2014	Ratos diabéticos N=12 para cada grupo	2 feridas incisionais 2cm <sup>2</sup> de área	MSCs de medula óssea de ratos ( $3 \times 10^5$ células/mm <sup>2</sup> ) PRP humano	Área da lesão Histologia Histomorfometria Imunohistoquímica Western blotting
Ozpur et al., 2016	Ratos N= 6 para cada grupo	1 ferida incisional 20mm de diâmetro	ASCs de ratos Scaffold de fibrina *	Área da lesão Histologia Imunohistoquímica Microscopia de fluorescência
Montanucci et al., 2017	Ratos N=3 para cada tempo avaliado (dia 7, 14, 21, 36 e 42)	1 ferida incisional 15mm de diâmetro	MSCs de cordão umbilical humano Scaffold de fibrina ( $2,2 \times 10^5$ células/ml*) Dermalequivalent ( $6 \times 10^5$ células/ml*)	Área da lesão Histologia Histomorfometria Microscopia de fluorescência
Samberg et al., 2019	Ratos atímicos N=8 por grupo	1 ferida incisional 15mm de diâmetro	ASCs humanas PRP e PPP humanos ( $1 \times 10^5$ células*)	Área da ferida Histomorfometria Imunohistoquímica

\*Esse valor não se refere ao número de MSCs aplicadas na ferida e sim à quantidade de células que foram cultivadas nas membranas durante determinados intervalos de tempo, antes do tratamento ser aplicado.

Os resultados extraídos de cada estudo incluídos na revisão foram organizados na tabela 2, e o critério de formulação da tabela foi de acordo

com as principais informações que são obtidas em comum nas avaliações de feridas de pele.

Dos oito estudos primários selecionados para avaliação, três deles foram excluídos da revisão sistemática, devido às razões que serão apresentadas a seguir.

O estudo realizado por (CHICHARRO et al., 2018) avaliou a associação de um plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) e ASCs, no tratamento de feridas de pele em coelhos. Na metodologia do trabalho foram realizadas duas feridas no dorso de cada animal, de modo que uma delas recebeu o tratamento com PRGF+ASCs e a outra ferida recebeu solução salina, sendo considerada como tratamento controle. O trabalho foi excluído da revisão sistemática pois, sabe-se que as MSCs podem migrar para outros locais, como foi demonstrado no trabalho realizado por (KANAZAWA et al., 2018). Dessa forma, tem-se dúvidas quanto à possibilidade da migração das células para a ferida usada para avaliação do controle e influenciado o resultado por meio da modulação do processo inflamatório.

No trabalho realizado por (YANG et al., 2017) foi avaliado a associação da terapia do PPP associado a MSCs de cordão umbilical humano cobertas com membrana amniótica acelular funcionando como um curativo. O trabalho foi excluído da revisão sistemática por utilizar um anel de silicone fixando as bordas da ferida com suturas interrompidas de modo a impedir a contração do tecido. Uma vez que esse anel impede a contração da ferida, acredita-se que o processo de reparação do tecido foi diferente do processo presente nos demais estudos incluídos.

(PENG et al., 2013) avaliaram o efeito de um lisado de coágulo rico em plaquetas (PRCR) na sobrevivência e ação regenerativa das MSCs de medula óssea em feridas de ratos. Porém, o PRCR foi adicionado ao meio de cultura nas células, como um componente extra desse meio de condicionamento das MSCs, não tendo a presença física da membrana autóloga como liberador de fatores de crescimento e carreador das MSCs no leito da ferida, como é o objetivo dessa revisão.

**Tabela 2:** Principais resultados que foram avaliados em cada estudo incluído na revisão sistemática.

	<b>Argôlo Neto et al., 2012</b>	<b>Lian et al., 2014</b>	<b>Ozpur et al., 2016</b>	<b>Montanucci et al., 2017</b>	<b>Samberg et al., 2019</b>
<b>Tempo de avaliação</b>	Dia 12	Dias 7, 14 e 28	Dia 21	Dias 7, 14, 21, 36 e 42	Dias 8 e 12
<b>Organização do tecido novo</b>	Não descreve	Descreve	Descreve	Descreve	Descreve
<b>Colágeno</b>	Identificação e quantificação de colágeno tipo I e III	Identificação, quantificação e organização das fibras.	Identificação	Identificação, quantificação e organização das fibras.	Identificação e quantificação.
<b>Reepitelização</b>	Avaliação macroscópica	Avaliação macroscópica e microscópica	Avaliação macroscópica e microscópica	Avaliação microscópica	Avaliação macroscópica e microscópica
<b>Vascularização</b>	Não descreve	Densidade de vasos. Quantificação de PECAM (platelet/ endothelial cell adhesion molecule 1) por imunohistoquímica	Tamanho dos vasos Identificação de CD31 abaixo do epitélio e acima da camada fascial	Não descreve	Imunohistoquímica para detectar a presença de von Willebrand Factor (vWF)
<b>Identificação das MSC no leito da ferida</b>	PCR para identificar GFP (green fluorescent protein)	Não realizou.	Não realizou.	Não realizou.	Não realizou.

Segundo (ARGÔLO NETO et al., 2012) as MSCs sozinhas ou associadas ao PRP estimularam a reepitelização de feridas em animais diabéticos e ambos tratamentos foram considerados melhores que o grupo controle com solução salina sem curativo ou o grupo sem tratamento mas com curativo. Também foi evidenciado uma maior deposição de colágenos tipo I e tipo III nos grupos tratados com MSC e MSC+PRP. MSCs associada ao PRP não aumentou a reepitelização das feridas quando comparado com MSCs de forma isolada. A presença do curativo também manteve as MSCs no leito da ferida, e a identificação por PCR do gene GFP das MSCs no tecido cutâneo reepitelizado nos grupos MSC e MSC+PRP indica que as MSCs (diferenciadas ou não) estavam presentes no tecido.

(LIAN et al., 2014) relatam que o fechamento de feridas aumentou significativamente no grupo tratado com MSCs+PRP em comparação com o PRP e MSCs de forma isolada. Os autores sugerem que no grupo MSCs+PRP houve elhor regeneração tecidual devido aos achados histológicos de maior espessura epidérmica e estruturas semelhantes à glândulas sudoríparas em comparação com o grupo controle. Os resultados sugerem que tanto as MSCs quanto o PRP podem induzir uma resposta angiogênica no reparo de feridas em animais diabéticos, mas as feridas tratadas com MSCs+PRP tiveram mais vasos sanguíneos do que aquelas em animais tratados apenas com PRP ou MSCs. O tratamento combinado com MSCs e PRP pode aumentar a quantidade de fibroblastos e queratinócitos no tecido da ferida que promove a reepitelização durante o processo de cicatrização. Esse aumento foi demonstrado por meio de imunohistoquímica e *western blot* para expressão e quantificação de *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). Os resultados mostraram que o tratamento combinado de MSCs+PRP acelera a reparação de feridas aumentando a angiogênese e aumentando a proliferação celular.

(OZPUR et al., 2016) relatam que o uso de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASCs) e matrizes de fibrina acelulares resultou no aumento significativo da reparação de feridas e na proliferação endotelial microvascular. No estudo, o aumento do colágeno foi maior nos grupos tratados apenas com a malha de fibrina e ASCs+malha de fibrina em comparação com o controle. Os autores acreditam que esse

aumento tenha sido causado pela diferenciação fibroblástica das ASCs e seus efeitos parácrinos. A epitelização das bordas da ferida ocorreu mais rapidamente no grupo tratado com as ASCs. Os autores demonstraram que as ASCs se diferenciaram em células endoteliais e essa diferenciação provavelmente explica a diferença significativa no volume de vasos presente no grupo tratado com ASCs+malha de fibrina, conforme determinado por imunohistoquímica (utilizando marcador CD31). Os pesquisadores do estudo concluem que as ASCs suportam a regeneração da pele com diferenciação espontânea e efeitos parácrinos.

(MONTANUCCI et al., 2017) descrevem que o reparo tecidual nas feridas tratadas com equivalente dermal pareciam ocorrer de forma mais lenta quando comparadas às dos grupos tratados com malha de fibrina e controle, embora o resultado final tivesse aparência muito melhor. O grupo tratado com a malha de fibrina foi associado com a formação de pele fina, estando ausente a camada da hipoderme. Os dados obtidos no estudo sugerem que o processo de reparação tecidual é diferente nos grupos, a ferida não tratada cicatriza rapidamente, mas de forma desordenada devido à contração que ocorre, já a ferida tratada com o equivalente dermal, o processo ocorre de forma lenta, o que permite a regeneração das camadas da pele de forma homogênea, o que pode retardar o processo de reparação tecidual e o fechamento da ferida. Não houve diferença significativa entre a porcentagem de colágeno nas feridas tratadas com o equivalente dermal e no grupo controle, confirmando que a principal diferença entre os dois tipos de reparação é qualitativa e não quantitativa. Os autores concluem que o equivalente dermal é altamente biocompatível, estimula a regeneração de anexos dérmicos e é capaz de melhorar a reparação de feridas sem formação de cicatriz.

(SAMBERG et al., 2019) descreveram, baseados na histomorfometria, que ocorreu menor formação de tecido de granulação em feridas tratadas com PRP+ASC em comparação com o grupo controle, além da reepitelização que parecia ocorrer a taxas semelhantes entre todos os grupos de tratamento, com espessura epidérmica semelhante. Um exame mais detalhado dessas seções mostrou que os vasos estavam presentes, apareceram mais cedo e em maior abundância no grupo tratado com

PRP+ASCs em relação ao controle no dia 8, porém, no dia 12, não foi significativamente diferente dos demais grupos. Os autores afirmam que o dia 12 é muito cedo para observar diferenças na maturação de colágeno depositado no novo tecido. No estudo, através do uso de PRP, os autores procuraram fornecer um reservatório de fatores de crescimento e proteínas para as ASC iniciarem a neoangiogênese. A formação aumentada de vasos sanguíneos nas feridas tratadas com PRP+ASC pode ser atribuída ao aumento da produção de VEGF pelas ASC, semelhante aos resultados que foram obtidos *in vitro*. Enquanto a combinação PRP+ASCs induziu uma resposta angiogênica, melhoras em outros parâmetros de reparação de feridas (espessura da epiderme, epitelização e remodelação do colágeno) não foram observadas. O estudo afirma que esses achados são justificáveis pelo baixo número de animais por grupo e por tempo investigado, pela curta duração do estudo (apenas 12 dias) além do uso de ratos atímicos com um sistema imunológico limitado. Os autores concluem que a aplicação de ASCs melhora a reparação de feridas, no entanto, os resultados indicam que para que esse efeito ocorra, outros fatores podem ser necessários, porque quando os ASCs foram combinados com o PPP, melhora mínima foi observada, e quando associadas ao PRP melhoraram significativamente, pelo menos no início da avaliação.

## **DISCUSSÃO**

Essa revisão sistemática verificou as informações já existentes sobre a reparação de feridas, buscando entender o que é necessário para a utilização terapêutica das MSCs, sem restrição quanto à sua fonte de obtenção, associadas as membranas autólogas no tratamento tópico de feridas cutâneas de espessura total.

Em relação à organização do novo tecido formado, (LIAN et al., 2014) observou um aumento significativo da espessura epidérmica média nos grupos tratados com MSC+PRP, além da presença aumentada de anexos cutâneos como glândulas sudoríparas. Esses achados não corroboram com os dados obtidos no estudo realizado por (OZPUR et al., 2016), onde não foi

detectada a presença de anexos cutâneos em nenhum dos grupos até o final do estudo. Foi observado ainda menor contratatura, mais reepitelização e ulceração mínima no grupo MSC+malha de fibrina em relação ao grupo malha de fibrina e grupo controle. Já no trabalho de (MONTANUCCI et al., 2017), o grupo tratado com a malha de fibrina contendo MSCs foi associado à geração de uma pele fina sem a camada da hipoderme. No grupo que recebeu o tratamento do equivalente dermal, foi observado que houve regeneração da derme de forma homogênea com desenvolvimento de anexos cutâneos. (SAMBERG et al., 2019) relata que ocorreu uma menor formação de tecido de granulação em feridas tratadas com gel de PRP+ASC em comparação com o grupo controle. Também não encontraram diferenças em relação à espessura da epiderme, reepitelização e remodelação do colágeno. Sendo assim, os estudos discordam quanto a presença de diferenças na organização tecidual dentre os diferentes tratamentos. Talvez essa falta de evidência nos estudos de (OZPUR et al., 2016) e (SAMBERG et al., 2019) ocorreu devido a análise precoce dessas feridas, onde o tecido ainda se encontra imaturo para essa avaliação. Os estudos que encontraram diferenças na organização tecidual, fizeram a avaliação mais tardiamente.

Os estudos realizados por (LIAN et al., 2014) e (MONTANUCCI et al., 2017) demonstraram que a associação das terapias obteve um melhor resultado. Nos estudos de (ARGÔLO NETO et al., 2012) e (OZPUR et al., 2016) houve maior deposição de colágeno nos grupos tratados com a terapia celular isolada e na sua associação com as membranas autólogas em relação ao controle, porém não houve diferença entre os tratamentos. (SAMBERG et al., 2019) referem que não houve diferença entre os grupos em relação à remodelação do colágeno. Os autores sugerem que o dia 12 pode ser muito cedo para observar diferenças na maturação do colágeno. Assim, percebe-se claramente que as associações das MSCs com as matrizes autólogas influenciaram positivamente no número e organização das fibras colágenas.

Segundo (ARGÔLO NETO et al., 2012), o uso tópico de MSCs isoladamente ou em associação com PRP estimulou a reepitelização, apesar da combinação não acelerar a reepitelização em comparação com o uso de MSCs de forma isolada. No estudo de (LIAN et al., 2014) foi encontrado

aumento do número de células positivas para PCNA no grupo MSCs+PRP em relação ao grupo PRP, demonstrando que essa associação pode aumentar os fibroblastos e queratinócitos, que por sua vez melhoram o remodelamento e reepitelização, respectivamente. Além disso, devido ao aumento de expressão do fator de crescimento TGF- $\beta$ 1 no grupo tratado com associação de MSCs+PRP em relação aos grupos que receberam PRP e MSCs isoladamente, os autores acreditam a associação estimulou a proliferação de células epiteliais no tecido de granulação durante a fase inicial do processo de reparação. (OZPUR et al., 2016) relataram que a progressão epitelial foi maior no grupo MSC+malha de fibrina. Já (MONTANUCCI et al., 2017) relataram que a espessura da epiderme diferiu entre o grupo controle e o grupo que recebeu o equivalente dermal. As alterações na espessura da epiderme (em comparação com a da pele saudável) são diminuídas e homogêneas em toda a ferida que recebeu o equivalente dermal, enquanto que no grupo controle, as variações de espessura são constantes e aumentam em direção ao centro da ferida. (SAMBERG et al., 2019) relata que não houve diferença entre os grupos em relação à reepitelização tendo todos uma espessura epidérmica semelhante. Apesar de haver divergências, percebe-se que a associação da terapia celular e membranas autólogas pode influenciar a reepitelização tanto em relação a espessura da epiderme quanto na velocidade com que ocorre.

(LIAN et al., 2014) mostraram que o tratamento combinado de MSCs+PRP acelera o processo de reparação de feridas quanto à angiogênese. (OZPUR et al., 2016) demonstraram aumento no volume de vasos presentes nas feridas com MSCs associada a malha de fibrina e (SAMBERG et al., 2019) com PRP+ASCs relatando o aumento de produção de VEGF. Assim, os estudos deixam clara a ação angiogênica das MSCs nas feridas de pele. Considerando que os vasos sanguíneos estão envolvidos no fornecimento de novas células responsáveis pela formação de novo tecido e na nutrição do novo tecido (DIPIETRO, 2016), fica evidente o efeito positivo na reparação da ferida de pele.

Apenas (ARGÔLO NETO et al., 2012) avaliaram a permanência das MSCs no tecido cutâneo, uma limitação dos estudos que não o fizeram, uma vez que a capacidade de migração das MSCs é um fenômeno comprovado

(DE BECKER; VAN RIET, 2016). Essa avaliação também é importante para verificar a ação contínua das células no leito da ferida, uma vez que os efeitos observados nos estudos podem ser provenientes dos poucos dias em que elas permaneceram no local (tendo posteriormente morrido ou migrado)(KANAZAWA et al., 2018) ou de seu efeito sustentado durante todo o período de avaliação. É difícil avaliar se houve influência da membrana na adesão das células, pois a maioria dos estudos não realizou a detecção da sobrevivência das MSCs na ferida. Mas devido aos dados que os trabalhos sugerem de diferenciação das MSCs aplicadas em células tanto endoteliais quanto epiteliais no novo tecido formado, acredita-se que essas membranas tiveram participação na adesão a atuação das MSCs no leito da ferida.

Ao avaliar os estudos incluídos na revisão é evidente que não existe uma padronização da metodologia de realização e análise dos dados. A começar pelos variados tamanhos de feridas experimentais que podem ser encontrados. Não existe também padronização na quantidade de MSCs aplicadas por mm<sup>2</sup> de ferida, assim como no número amostral (n) e tempo de avaliação do tratamento, que variaram muito dentre os trabalhos. Outra característica importante e que não pode deixar de ser observada são as avaliações que os estudos usaram para determinar a eficácia de cada tratamento proposto. Alguns trabalhos realizaram apenas avaliação macroscópica e histológica das feridas, enquanto outros trabalhos foram além fornecendo importantes informações como: (i) análise histomorfométrica para avaliar a presença, quantificação e organização das fibras de colágeno, (ii) avaliação da sobrevivência das MSCs no novo tecido formado, (iii) mensuração ou avaliação da expressão gênica dos fatores de crescimento e outras citocinas relacionadas às fases de reparação tecidual.

Com estudos muito heterogêneos, não foi possível realizar meta-análise nessa revisão, dificultando a comparação entre tratamentos propostos. Sendo assim, propõe-se que seja elaborado um consenso sobre características e critérios de avaliação para realização de pesquisas no tratamento de feridas cutâneas, objetivando a padronização e consequente possibilidade de melhor comparação entre tratamentos.

## **CONCLUSÃO**

Observou-se que a associação da terapia celular com as matrizes autólogas, nas suas diferentes formas de produção, teve ação ou influência nos parâmetros envolvidos no reparo tecidual: organização do tecido, reepitelização, deposição de colágeno e angiogênese. Essa terapia combinada proporcionou a regeneração da pele devido aos achados de formação epitelial com a presença de anexos cutâneos como pêlos e glândulas sudoríparas. Sem dúvida a neovascularização foi o fator com dados mais consistentes entre os trabalhos e com maior efeito do tratamento utilizando as MSCs associadas a membranas autólogas. Mesmo não havendo diferença entre a porcentagem de colágeno depositado, ficou evidente que essa terapia associada aumentou a organização dessas fibras.

## **CAPÍTULO II**

**Matriz autóloga de PRF e terapia celular na reparação de feridas de pele:**

**Estudo experimental**

Aline Silvestrini et al.

Artigo preparado para publicação na revista Organogenesis

## **Matriz autóloga de PRF e terapia celular na reparação de feridas de pele**

### **RESUMO**

As complicações existentes na reparação de feridas cutâneas geram importantes limitações para os pacientes acometidos, o que leva pesquisadores a buscar novas propostas de tratamentos, principalmente na área de medicina regenerativa e engenharia de tecidos. As MSCs, devido as suas características apresentam potencial terapêutico para a reparação de feridas. Esse trabalho buscou investigar a influência das células estromais derivadas de tecido adiposo (ASCs) em associação com a membrana de fibrina rica em plaquetas (PRF) na reparação de feridas de pele. Para este fim, defeitos cutâneos de espessura total de 8mm de diâmetro foram criados no dorso de coelhos saudáveis. Em seguida, os defeitos foram tratados de acordo com três grupos: controle (solução salina), PRF autólogo e PRF autólogo associado às ASC alogênicas. Foi realizada avaliação macroscópica nos dias 0, 7 e 14. As biópsias foram realizadas nos dias 7 e 14 após a aplicação de cada tratamento. Foi realizada microscopia confocal para análise da adesão e sobrevivência celular, análise histopatológica e histomorfométrica das amostras obtidas. Os resultados mostraram que as ASCs associadas com PRF permaneceram na ferida até o dia 14, e foi observado vascularização mais abundante neste grupo, além de maior proporção entre as fibras de colageno tipo I e tipo III, embora não tenham influenciado no tempo de fechamento das feridas em comparação aos demais grupos. A membrana de PRF foi capaz de aumentar angiogênese e maturação do colágeno na transição da fase inflamatória para a proliferativa

**Palavras-chave:** ASCs, fibrina, plaquetas, fatores de crescimento, reparo tecidual.

## INTRODUÇÃO

Uma ferida cutânea pode ser definida como uma descontinuidade do tecido epitelial onde as funções básicas de proteção conferidas pela pele são comprometidas. As causas dessa ferida podem ser geradas por fatores extrínsecos, como traumas mecânicos e calor, assim como por fatores intrínsecos, como aquelas originadas de um processo infeccioso (SANTOS et al., 2011). A reparação de feridas cutâneas é um processo fisiológico essencial, no qual ocorre a coordenação de muitos tipos celulares e seus produtos, como citocinas e fatores de crescimento (SHAW; MARTIN, 2009). No mesmo tecido podem ocorrer regeneração e cicatrização, dependendo dos tipos celulares comprometidos na lesão (GONZALEZ et al., 2016).

Nesse sentido, as MSCs têm sido estudadas na regeneração da pele com estudos demonstrando que sua utilização acelera o fechamento da ferida, por meio do aumento da angiogênese, favorecimento da formação de tecido de granulação, da regulação do remodelamento da matriz extracelular e o aumento da reepitelização (LEE et al., 2012). Contudo, diversos fatores podem influenciar o sucesso do tratamento, como a escolha certa do tipo de célula, os procedimentos para aplicação das células, seu veículo carreador e número de aplicações, dentre outros (OJEH et al., 2015). Dentre esses fatores, sabe-se que as MSCs precisam de um agente carreador que facilite sua adesão ao leito receptor de uma ferida, isso porque a injeção direta ou administração tópica de MSCs por meio de matrizes de gel pode ser prejudicial para a sobrevivência das células. A utilização de matrizes de fibrina como carreadoras das MSCs pode fornecer um microambiente mais adequado para adesão, proliferação e diferenciação celular (HU et al., 2018; TARTARINI; MELE, 2016). Assim, pesquisadores têm desenvolvido matrizes para manter as células no leito da ferida e proporcionar o meio adequado para sua atuação (ZEBARDAST; LICKORISH; DAVIES, 2010).

O processo de reparação de feridas é complexo e se inicia imediatamente após a lesão. A primeira fase desse processo envolve a agregação plaquetária e formação de coágulos de fibrina (GROEBER et al., 2012). Devido ao envolvimento das plaquetas e das fibrinas na reparação tecidual, deve-se dar atenção à fibrina rica em plaquetas (PRF).

A PRF é uma matriz autóloga descrita pela primeira vez por (CHOUKROUN et al., 2001). A PRF é uma matriz de reparação totalmente autóloga de concentrados de plaquetas sem a adição de trombina bovina ou anticoagulante para sua obtenção. Ela pode ser definida como um biomaterial concentrado de plaquetas sobre uma membrana de fibrina com alto potencial regenerativo (CHOUKROUN et al., 2001). Na PRF, as plaquetas e fatores de crescimento ficam aprisionados em um coágulo de fibrina. Esses fatores de crescimento se encontram em concentrações significativamente superiores aos níveis séricos e estimulam a regeneração autóloga de tecidos (CIVININI et al., 2011). (DOHAN et al., 2006c) afirmou que a PRF possui propriedades imunológicas e antibacterianas, devido a degranulação de leucócitos e a presença de alguns fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) que podem induzir angiogênese e reações pró- e anti-inflamatórias). Além disso, a própria atividade biológica da molécula de fibrina é suficiente para explicar sua capacidade de reparação. O modo de polimerização lenta confere à membrana PRF uma arquitetura particularmente favorável para suportar o processo de reparação através da orientação da migração das células epiteliais para a sua superfície e desenvolvimento da microvascularização (DOHAN et al., 2006a; LI et al., 2013).

Neste estudo, o objetivo foi avaliar o efeito da associação das MSCs à membrana autóloga de PRF em feridas de pele. A PRF foi utilizada para melhorar a adesão e sobrevivência das ASCs no leito da ferida além da liberação de fatores de crescimento, assim, proporcionando um ambiente propício para favorecer o processo de reparação tecidual. Objetivou-se caracterizar o processo e identificar a(s) fase (s) em que se pode observar ação do tratamento proposto, comparando ao processo natural de reparação sem qualquer tratamento.

Esse estudo é o primeiro a utilizar essa associação diretamente no leito da ferida e objetiva embasar estudos futuros para uma avaliação mais aprofundada do tratamento de feridas cutâneas com complicações locais e sistêmicas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFV com o protocolo de número 05/2018.

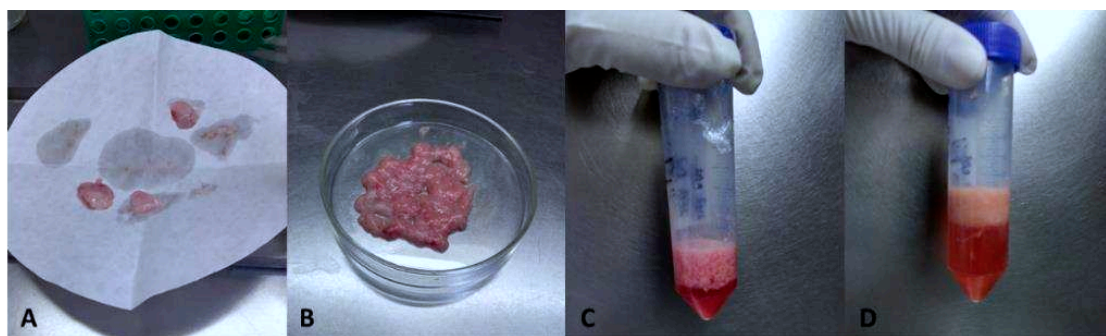
### **Coleta de tecido adiposo**

Uma coelha da raça Nova Zelândia (com três meses de idade, cerca de 3,5kg de peso) foi usada para coleta de tecido adiposo. Após a medicação pré-anestésica com aplicação por via intramuscular da associação de midazolam (1 mg/kg) e quetamina (12,5 mg/kg), indução e anestesia geral com isoflurano diluído em oxigênio a 100%, foi realizada a preparação asséptica da região cranial do dorso. Em seguida, realizou-se uma incisão cutânea linear na região inter-escapular onde se localiza uma bolsa de tecido adiposo que foi coletado e acondicionado em 50 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) estéril. O fechamento subcutâneo foi feito com poliglactina 3-0 e a ferida foi suturada com náilon 3-0. A analgesia foi realizada com cloridrato de tramadol (6 mg/kg/IM/BID) por dois dias.

### **Isolamento das células tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs)**

Em capela de fluxo laminar usando técnica estéril, a bolsa foi fragmentada e os fragmentos de tecido adiposo foram secos usando papel de filtro (figura 2A) e então cortados com um bisturi em uma placa de Petri (figura 2B). Em seguida, o tecido foi digerido com colagenase tipo I (2 mg / mL, Sigma-Aldrich) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, Invitrogen) durante 3 horas a 37° C, adaptado de Semyari et al. (2015) (figuras 2C e 2D). Após a digestão, os frascos foram centrifugados e o sedimento transferido para frasco T25 contendo 5 ml de meio de cultura (74,2% de DMEM com alta concentração de glicose + 15% de soro fetal bovino + 10% de solução antibiótica + 0,4% de aminoácidos essenciais + 0,4% de L-glutamina) 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> até atingir 80-90% de confluência. O

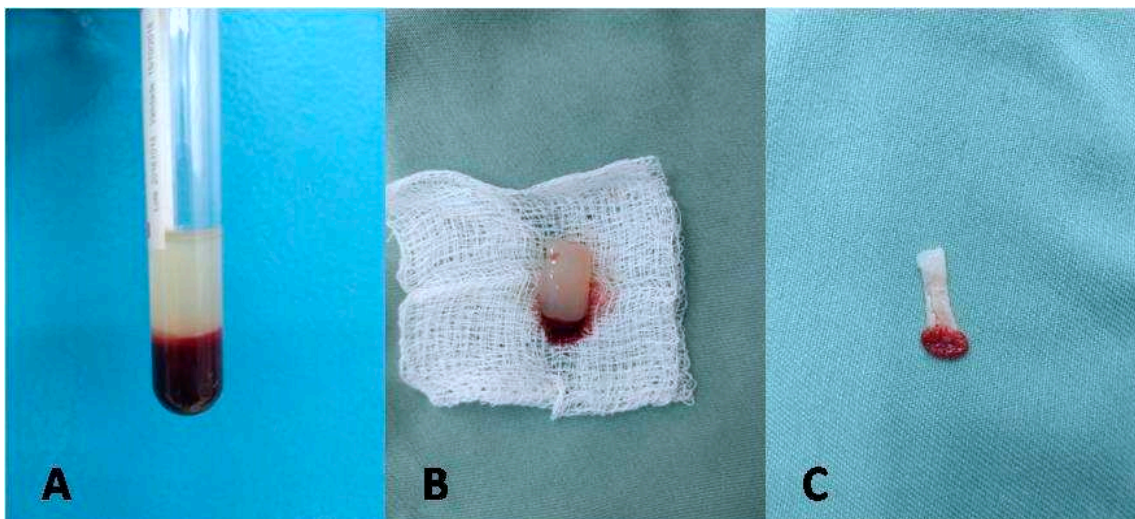
meio de cultura foi trocado a cada dois ou três dias. Uma vez atingida a confluência, as células foram tripsinizadas utilizando 0,25% de tripsina-EDTA tratada termicamente e foram plaqueadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup>. As células foram cultivadas até a quarta passagem para sua aplicação in vivo. Uma quantidade suficiente de células para preencher seis defeitos foram coradas com o corante de membrana PKH26 (MINI26-1KT, Sigma-Aldrich) de acordo com as instruções do fabricante. Antes do transplante, a viabilidade das células foi avaliada utilizando um ViCell (BeckmanCoulter).



**Figura 2:** Processo de isolamento. **A.** Tecido adiposo interescapular secando em papel filtro. **B.** Tecido adiposo após o corte. **C.** Tecido adiposo em suspensão de collagenase. **D.** Aparência do tecido adiposo após a digestão. Laboratório de Biotecnologia Animal. DZO - UFV.

### **Método de preparação da PRF**

A metodologia para obtenção da matriz de PRF foi adaptada de (CHOUKROUN et al., 2001). 10 ml de sangue foram coletados de cada animal utilizando seringa acoplada ao scalp, em tubos de vidro sem anticoagulante. Imediatamente após a coleta, o sangue foi submetido à centrifugação a 2700 rpm durante 12 minutos. Após a centrifugação foi possível observar três camadas distintas (figura 3A), sendo a PRF a do meio, no fundo uma base de hemácias e o sobrenadante constituindo um plasma. O coágulo de fibrina foi separado de forma estéril (figura 3B) e comprimido em gaze até adquirir o formato de uma membrana resistente (figura 3C).



**Figura 3:** obtenção da membrana autóloga de PRF. **A.** aparência do sangue após centrifugação. **B.** O coágulo de PRF. **C.** Aparência da membrana após compressão digital com gaze .

### Modelo experimental de feridas cutâneas

Foram utilizados 18 coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas e machos com oito meses de idade, pesando aproximadamente 4kg, mantidos em gaiolas individuais com alimentação e ingestão hídrica *ad libitum*. A indução anestésica foi realizada com midazolam (1 mg/kg/IM) e quetamina (12 mg/Kg/IM) e manutenção com isoflurano diluído em oxigênio a 100% por via inalatória. Sob técnica asséptica, foram realizados quatro defeitos cutâneos equidistantes no dorso com bisturi circular de 8 mm de diâmetro, de modo que cada defeito recebeu o mesmo tratamento. Estes foram divididos aleatoriamente em três grupos: (1) controle com solução salina, (2) matriz autóloga de PRF (PRF) e (3) matriz autóloga de PRF associada às ASCs (PRF+ASCs). O tratamento foi aplicado imediatamente após a realização das feridas, ainda sob anestesia geral. No grupo 1, foi aplicado somente solução salina. No grupo 2, foi aplicado a matriz autóloga de PRF diretamente no leito da ferida (figura 4A). No grupo 3a suspensão celular foi aplicada diretamente sobre o leito da ferida seguida da aplicação da matriz autóloga por cima (figura 4B). Em seguida, foi colocado curativo filme transparente Curatec® (figura 4C) que permaneceu durante 7 dias. Nos dois primeiros dias foi administrado o analgésico tramadol para controle da dor (6mg/kg/IM/BID) por 2 dias.



**Figura 4:** Aplicação dos tratamentos e confecção do curativo. **A.** Observa-se a presença da membrana de PRF no leito da ferida indicada pela seta. **B.** Aplicação da suspensão de ASCs no leito da ferida. **C.** Aparência do curativo após aplicação dos tratamentos. Bloco cirúrgico experimental do hospital veterinário de pequenos animais - UFV.

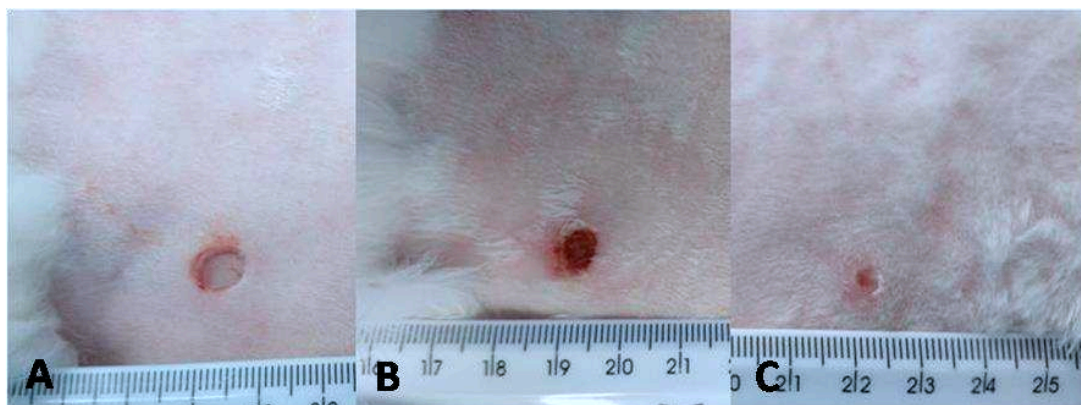
### **Avaliação macroscópica das feridas**

O curativo foi mantido até o dia 7 para que não houvesse interferência na liberação dos fatores de crescimento da PRF. Depois, a ferida foi deixada sem curativo. A evolução das feridas foi documentada com fotografias digitais, utilizando uma régua para referência de medida, posicionada próximo à ferida (figura 5). Foi utilizando o software ImageJ para o cálculo do percentual de contração da ferida de acordo com as fórmulas de (KAZEMI MEHRJERDI et al., 2006), descrito a seguir, nos dias 7 e 14. Para isso, o dia da criação da ferida foi considerado dia zero.

1. Tamanho da ferida ao dia (x)  $\text{mm}^2$  / tamanho da ferida ao dia (0)  $\text{mm}^2 \times 100 =$  porcentagem do tamanho da ferida ao dia (x)

2.  $100 -$  Porcentagem do tamanho da ferida ao dia (x) = porcentagem de contração da ferida.

A inspeção das feridas foi realizada diariamente, seguindo as seguintes variáveis clínicas: edema, presença de tecido necrótico, crostas, tecido de granulação e fluido.



**Figura 5:** fotografia das feridas com a régua para mensuração da área nos dias zero (A), 7 (B) e 14 (C) no grupo PRF+ASCs. Bloco cirúrgico experimental do hospital veterinário de pequenos animais - UFV.

### **Obtenção das amostras**

Após 7 e 14 dias de tratamento, foram realizadas biópsias de espessura total da pele, contendo toda área da ferida e pele normal adjacente e fixadas em solução de formol 10%. Para tal, foi realizado o mesmo protocolo anestésico descrito nos outros procedimentos.

### **Análise histopatológica e histomorfométrica**

As amostras foram processadas de forma padrão (TIMM, 2005) para obtenção dos cortes histológicos incluídos em parafina e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (H&E) e Picrosirius red. A presença de infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos, angiogênese e presença de colágeno foram classificados em ausente, discreta, moderada e intensa em cada amostra, em avaliação cega por dois médicos veterinários patologistas, experientes na avaliação de amostras de pele de coelhos.

Para análise de colágeno, todas as seções foram examinadas com um microscópio óptico de luz polarizada (Olympus BX-53®, Japão). Com uma câmera digital acoplada (5,0m), foram selecionados seis campos histológicos para cada aumento de 20x do slide. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ, com o plug-in Threshold Color, obtendo-se o percentual de colágeno por meio de análise de partículas

automatizadas de acordo com a seleção e mensuração das áreas com base na coloração.

### **Análise estatística**

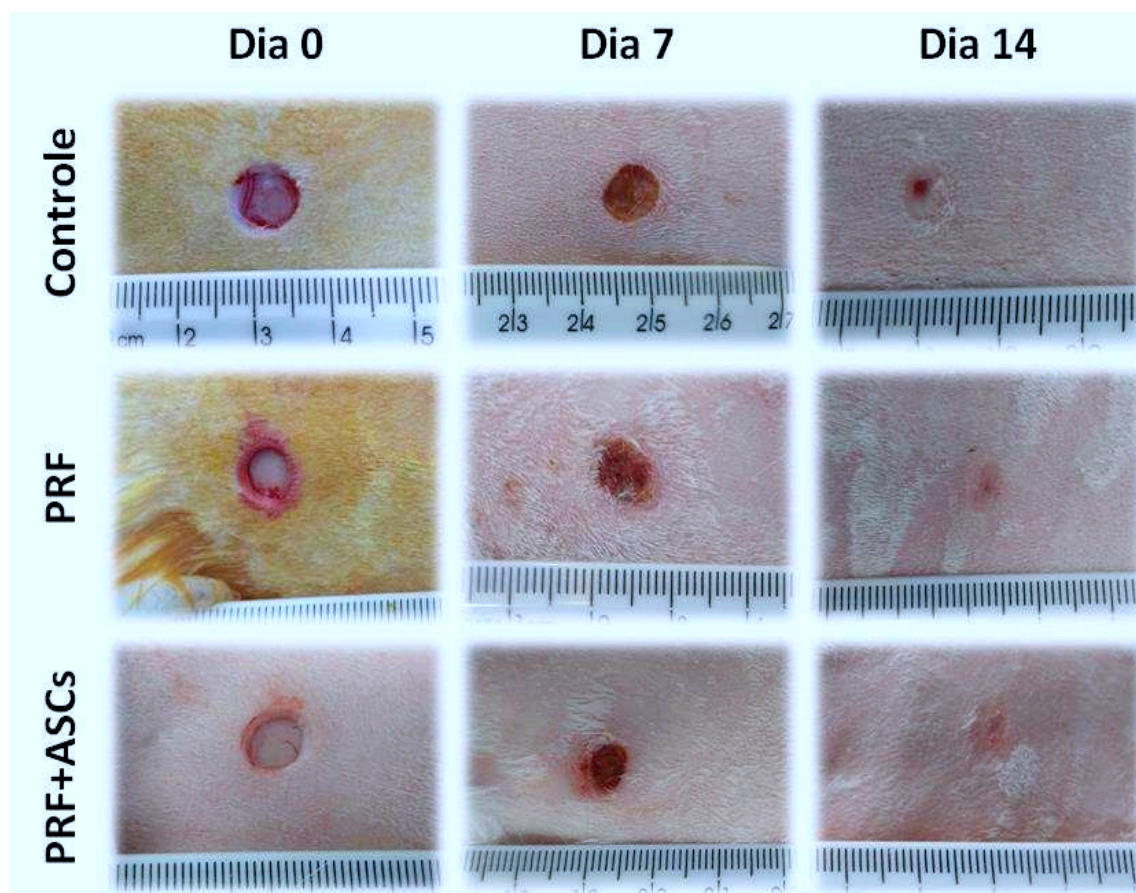
Os dados foram analisados por ANOVA para dois fatores, considerando tratamento e tempo como variáveis independentes. Em caso de significância, procedeu-se o teste de Tukey. Para todos os testes, considerou-se nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS**

### **Análise macroscópica da ferida**

Não foram observados a presença de tecido necrótico ou fluido indicando infecção das feridas. Todas as feridas apresentaram crostas após a retirada do curativo.

A porcentagem de contração da ferida não foi diferente entre os grupos, embora tenha apresentado uma discreta tendência a ser maior nos grupos PRF e PRF+ASCs no dia 7 (figura 6 e tabela 3).



**Figura 6:** Medidas para avaliação das características macroscópicas das feridas nos grupos controle, fibrina rica em plaquetas (PRF) e associação entre PRF e células-tronco derivadas do tecido adiposo nos dias 0, 7 e 14.

	<b>Dia 7</b>	<b>Dia 14</b>
<b>Controle</b>	26,399 ± 14,402*	98,199 ± 2,218*
<b>PRF</b>	38,005 ± 18,344*	97,597 ± 2,474*
<b>PRF+ASCs</b>	46,214 ± 12,038*	94,273 ± 4,960*

**Tabela 3:** Porcentagem da contração das feridas em cada grupo tratado.

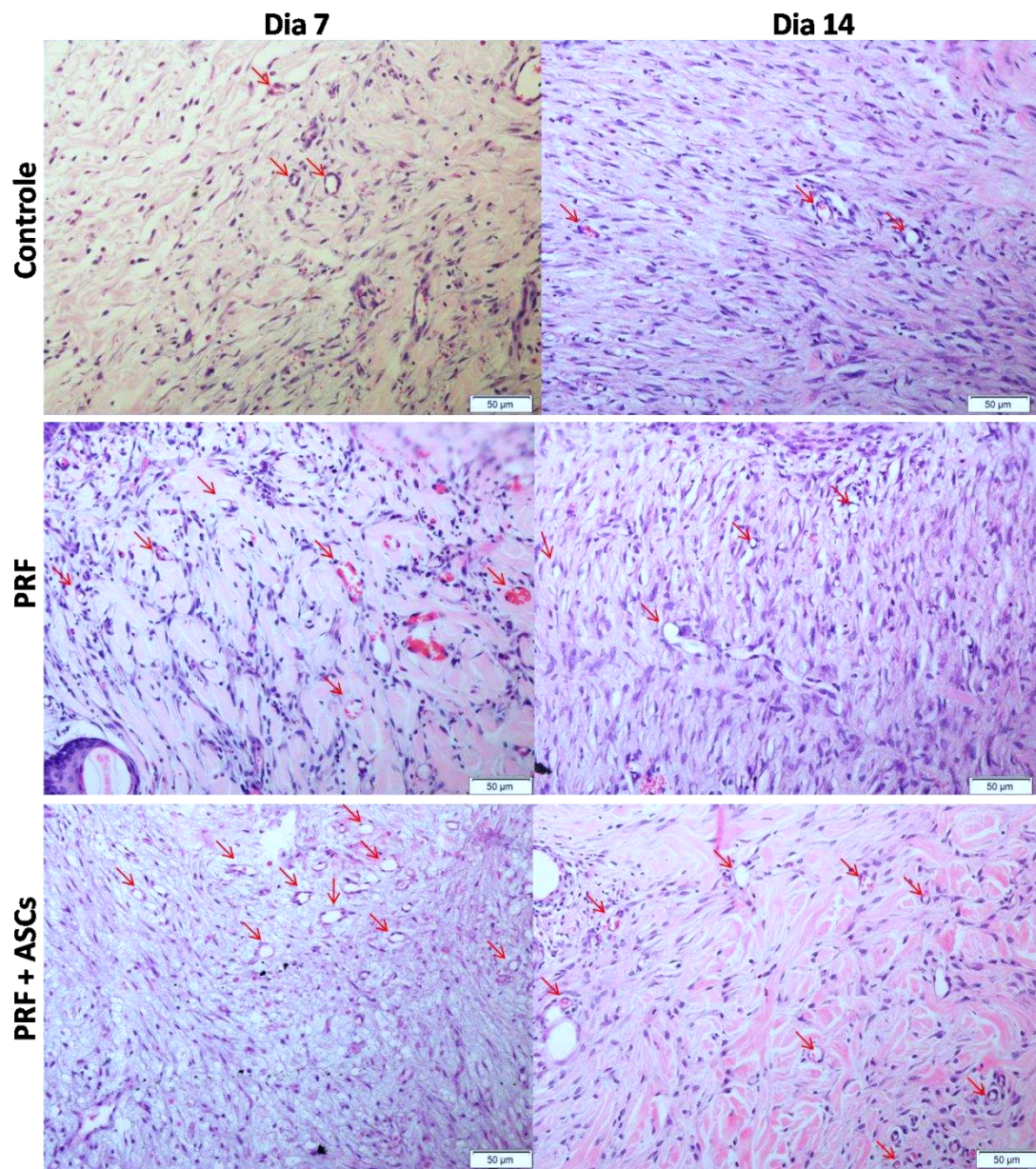
\* Não houve diferença significativa entre os grupos.

### **Análise histopatológica e histomorfométrica**

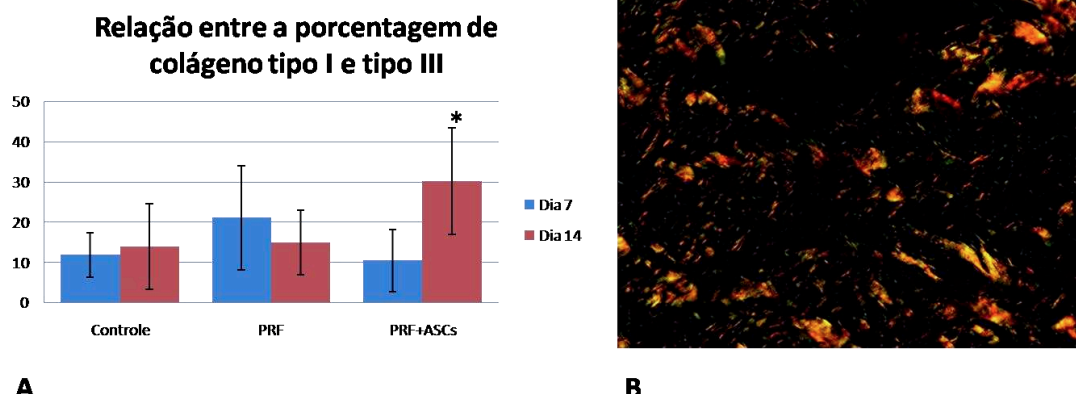
Na análise histológica referente ao dia 7, foi observado infiltrado inflamatório misto em todos os grupos sendo moderado nos grupos controle e PRF e intenso no grupo PRF+ASCs. A proliferação de colágeno e fibroblastos foi semelhante em todos os grupos. Foi observado proliferação vascular moderada a intensa nos grupos controle e PRF, mas no grupo PRF+ASCs a proliferação foi considerada mais intensa devido ao maior calibre dos vasos e arranjo mais organizado (figura 7). A hiperplasia da epiderme variou muito entre os grupos entre discreto a moderado e houve área ulcerada em todos os grupos, uma vez que a ferida ainda não havia se fechado por completo. Já no dia 14, foi observado que o infiltrado inflamatório diminuiu nos grupos controle e PRF, mas permaneceu intenso no grupo PRF+ASCs. A proliferação de colágeno e fibroblastos se manteve semelhante ao dia 7. Já no dia 14, a vascularização foi moderada nos grupos controle e PRF porém, com arranjo mais organizado dos vasos, no grupo PRF+ASCs a vascularização se manteve intensa, em relação aos outros grupos. A epiderme foi pouco hiperplásica em todos os grupos e em raros casos foi observado pequena ulceração central.

Na histomorfometria não houve diferença significativa entre a porcentagem de fibras de colágeno tipo I (vermelho) e tipo III (verde) em nenhum dos grupos nos dias 7 e 14. Quanto à proporção entre colágeno tipo I e colágeno tipo III, não foi observada diferença entre os grupos no dia 7, mas no dia 14 foi observada diferença significativa entre o grupo PRF+ASCs e ambos os grupos PRF e controle. Não houve diferença significativa entre o

grupo PRF e controle na proporção de colágeno tipo I/colágeno tipo III (Figura 8)



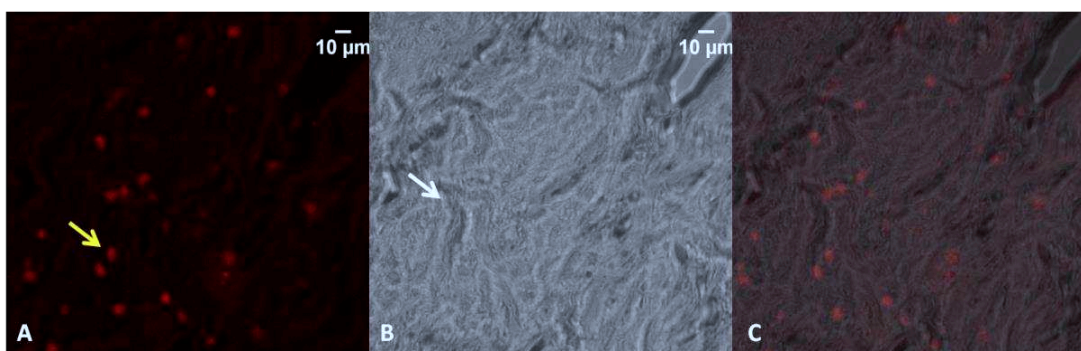
**Figura 7:** Imagens de microscopia óptica (20x) das amostras de pele coradas com H&E dos grupos tratados nos dias 7 e 14. Setas vermelhas indicando vasos sanguíneos.



**A** **B**  
**Figura 8:** Relação entre a porcentagem de colágeno tipo I e tipo III nos grupos (A). Imagem obtida no microscópio de luz polarizada na avaliação histomorfométrica de amostra de ferida do grupo PRF+ASCs no dia 14 (B).  
 \* Teve diferença estatística em relação aos outros grupos.

### Identificação das ASC no leito da ferida

A análise tecidual por microscopia confocal mostrou presença marcada de ASCs no leito da ferida 14 dias após a marcação e aplicação (figura 9), que pela análise das fibras adjacentes, percebe-se que estão localizadas predominantemente na derme.



**Figura 9:** Imagens obtidas através de microscopia confocal de campo escuro com fluorescência e campo claro 14 dias após aplicação das ASCs ao leito da ferida. Aglomerados de ASCs indicados pela seta amarela (A); Fibra de colágeno observadas no campo claro indicadas pela seta branca (B); sobreposição das imagens para verificar a exata localização das células no tecido (C).

### DISCUSSÃO

A reparação de feridas consiste em três fases que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelação. Existem muitos fatores que podem alterar a reparação das feridas e interferir em uma ou mais fases desse processo, causando, assim reparo inadequado (GOSAIN; DIPIETRO, 2004;

GUO; DIPIETRO, 2010). Os esforços no desenvolvimento de novas formas de tratamento têm como objetivo essas feridas que apresentam reparo inadequado. Na medicina veterinária elas são principalmente representadas por feridas traumáticas com grande perda tecidual ou com comprometimento sistêmico em pacientes de pequeno porte (FERREIRA et al., 2006; LOPES, 2016). Contudo, no processo de desenvolvimento de novas terapias, inicialmente é necessário entender o processo de reparação da pele, o que deve ser realizado em feridas que não apresentam tais desafios (KARAYANNOPOULOU et al., 2015; MENDONÇA et al., 2009), como no presente trabalho. (KARAYANNOPOULOU et al., 2015) também observaram que não houve diferença significativa no tempo de reparação das feridas ao avaliar a reparação da pele em feridas de coelhos hígidos.

Avaliando as características histológicas e histomorfométricas, observou-se que os processos de reparação tecidual foram muito semelhantes. Diferenças foram observadas apenas quanto vascularização e proporção entre os tipos de colágeno.

A capacidade angiogênica é um efeito reconhecido das MSCs (KUSUMA et al., 2017; ZEBARDAST; LICKORISH; DAVIES, 2010). Nos últimos anos tem sido amplamente avaliada no tratamento de feridas agudas e crônicas (HU et al., 2018). Um estudo demonstrou que os perfis de expressão parácrina das MSCs variam de acordo com sua fonte, o que pode afetar diferencialmente sua influência na regeneração dos diferentes tecidos. Além disso, as ASCs avaliadas no mesmo estudo produziram maiores quantidades de fatores pró-angiogênicos, o que pode torná-las a população de MSC de eleição para a reparação de feridas de pele (HSIAO et al., 2012). Esses fatos corroboram com os achados encontrados na avaliação histológica das amostras de pele, onde ficou demonstrado que as feridas que receberam a associação PRF+ASCs tiveram uma angiogênese de forma intensa, tanto aos 7 quanto aos 14 dias de tratamento.

É preciso ainda considerar que as feridas que receberam a membrana de PRF de forma isolada apresentou uma moderada a intensa neoangiogênese. A membrana de PRF é um concentrado de plaquetas que proporciona o enriquecimento do coágulo sanguíneo natural, que se forma em feridas, de forma a iniciar o processo de reparação de forma mais rápida

(DESAI et al., 2013). As plaquetas desempenham um papel fundamental na reparação de feridas devido à liberação de citocinas e fatores de crescimento (BLANTON et al., 2009; EPPLEY; PIETRZAK; BLANTON, 2006). Embora as citocinas plaquetárias sejam importantes na biologia desse biomaterial, acredita-se que a matriz de fibrina que as sustenta, constitui o elemento determinante responsável pelo real potencial terapêutico da PRF, pois suportam o desenvolvimento de pontos chave para a cura e maturação dos tecidos moles: angiogênese e reepitelização. Essa membrana protege feridas abertas, acelera a reparação, favorece o desenvolvimento da microvascularização e também orienta a migração das células epiteliais para sua superfície (CHOUKROUN et al., 2006). Mesmo assim, é preciso ressaltar que, no presente estudo a neovascularização foi mais intensa nas feridas tratadas com a associação das ASCs à matriz autóloga de PRF nesse grupo já no dia 7. Corrobora com esses achados o estudo realizado por (BLANTON et al., 2009), que demonstrou que a associação das ASCs à matriz autóloga rica em plaquetas, aumentou o potencial de reparação das feridas cutâneas, fato atribuído a um aumento na vascularização.

A diferença entre os grupos foi além da vascularização, encontrada também na proporção entre os tipos de colágeno tipo I e III no dia 14. O colágeno é o principal constituinte da matriz extracelular na derme (KIM; TURNBULL; GUIMOND, 2011; TANZER, 2006) e existem quase 30 tipos de colágeno identificados (HEINO, 2007). Os tipos mais encontrados na pele são o tipo I e o tipo III, sendo que sua proporção é mantida fixa em relação ao outro na pele normal (CHENG et al., 2011). O colágeno tipo I predomina na matriz extracelular da pele normal, enquanto que o tipo III, está presente em menor quantidade. No processo de reparação de feridas, o colágeno tipo III aumenta, especialmente na fase inicial do reparo tecidual (HUNT, 2006). Sendo assim, percebe-se que a formação da derme estava discretamente mais avançada ou organizada no grupo tratado com a associação das MSCs à PRF. É interessante ressaltar que essa diferença não foi observada no dia 7, apenas no dia 14. O estudo de (LIAN et al., 2014) demonstrou resultados semelhantes, os pesquisadores observaram que a associação de terapia celular com matriz autóloga de PRP revelou uma maior expressão da proteína de colágeno com melhor organização dos feixes de fibras em

relação ao uso do PRP isolado. Já o estudo de (OZPUR et al., 2016) identificou aumento de colágeno nos grupos que receberam apenas uma malha de fibrina e a associação de ASCs com a malha de fibrina.

Um estudo feito por (SAMBERG et al., 2019) refere que não houve diferença em relação à remodelação do colágeno frente ao tratamento com ASCs isoladas ou associadas ao PRP ou PPP. Os autores fizeram a avaliação 12 dias após a aplicação do tratamento, e sugerem que o dia 12 pode ser muito cedo para observar diferenças na maturação do colágeno. Dessa forma, no presente estudo o dia 7 pode ser muito cedo para observar diferenças em relação a deposição de fibras de colágeno uma vez que as feridas podem ainda não ter atingido em sua maior parte a fase de proliferação. Porém, no dia 14, já é possível observar a diferença entre a proporção de colágeno tipo I em relação ao tipo III nas feridas que receberam a associação PRF+ASCs.

Contudo, a associação das ASCs com a membrana de PRF aumentou a vascularização e a fibroplasia da ferida na transição da fase inflamatória para a proliferativa, e aumentou a proporção entre as fibras de colágeno maduras em relação as imaturas, mesmo nessas feridas singelas. Os resultados deste estudo servirão de base para a avaliação da associação das ASCs à membrana de PRF em feridas extensas ou em pacientes com co-morbidades, uma vez que a reparação ocorre de forma organizada e sem intercorrências, semelhante à reparação normal da pele sem tratamento (grupo controle). Análises moleculares da expressão gênica de fatores de crescimento e citocinas também poderiam esclarecer os mecanismos pelos quais as ASCs influenciam o reparo das feridas.

## **CONCLUSÃO**

A associação PRF+ASCs melhoraram angiogênese, fibroplasia e maturação do colágeno na transição da fase inflamatória para a proliferativa. A membrana de PRF foi bem sucedida para facilitar o estabelecimento das ASCs no leito da ferida.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores gostariam de agradecer à FAPEMIG e à CAPES pelo apoio financeiro; ao Laboratório de Biotecnologia Animal e a professora Simone Eliza Facioni Guimarães pelo apoio no cultivo de células; ao Laboratório Imunoquímica e Glicobiologia e ao professor Leandro Licursi de Oliveira pelo apoio da extração de RNA; ao Núcleo de Microscopia Microanálise pelo apoio na microscopia confocal; ao Laboratório de Imunobiológicos e Virologia Animal e ao professor Ricardo Seiti Yamatogi pelo apoio na realização do PCR em tempo real; ao Laboratório de Ultraestrutura Celular e ao professor José Eduardo Serrão pelo apoio no processamento das lâminas histológicas, e ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia e ao professor Fabricio Luciani Valente e à Fabrícia Hallack Loures pelo apoio nas análises histológicas.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

As MSCs são capazes de influenciar o resultado do processo de reparação tecidual nas feridas de pele, devido a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares e ao seu efeito parácrino, atuando por meio da secreção de diversos fatores de crescimento e citocinas que podem modular a resposta inflamatória, recrutar outros tipos celulares e influenciar na composição da matriz extracelular. Os eventos moleculares na cicatrização de feridas, por influência dos MSCs, precisam de elucidação, para que possamos entender exatamente por quais mecanismos essas células agem.

No presente estudo, mostramos que as ASCs associada a membrana de PRF permaneceram nas feridas e melhoraram vascularização e maturação do colágeno. Também aumentou o infiltrado celular e a fibroplasia. Acreditamos que as ASC sem ação conjunta com a PRF foram capazes de recrutar outros tipos celulares devido a ação dos fatores de crescimento e permitir um meio para a migração celular, desempenhando dois papéis diferentes na reparação de feridas. Mais estudos são necessários para elucidar este comportamento e a análise molecular também deve ajudar a esclarecer. Esses resultados nos permitem analisar com segurança a terapia usando PRF+ASCs em feridas complexas, nas

quais esperamos que seu efeito notável melhore os aspectos envolvidos no processo de reparação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGÔLO NETO, N. M. et al. Role of autologous mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma on healing of cutaneous wounds in diabetic mice. **Clin Exp Dermatol**, v. 37, n. 5, p. 544–553, 2012.
- BAI, M. Y. et al. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. **Clinics**, 2017.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27–51, 2005.
- BEANE, O. S. et al. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. **PLoS ONE**, 2014.
- BIELECKI, T. et al. The Role of Leukocytes from L-PRP/L-PRF in Wound Healing and Immune Defense: New Perspectives. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2012.
- BLANTON, M. W. et al. **Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing**. Plastic and Reconstructive Surgery. **Anais...2009**
- CAPPUZZELLO, C. et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived PTX3 Promotes Wound Healing via Fibrin Remodeling. **The Journal of investigative dermatology**, v. 136, n. 1, p. 293–300, jan. 2016.
- CHENG, W. et al. The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. **African Journal of Biotechnology**, 2011.
- CHICHARRO, D. et al. Combined plasma rich in growth factors and adipose-derived mesenchymal stem cells promotes the cutaneous wound healing in rabbits. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 288, set. 2018.
- CHOUKROUN, J. et al. Une opportunité en paro implantologie: le PRF. **Implantodontie**, 2001.
- CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 2006.
- CIVININI, R. et al. **The use of autologous blood-derived growth factors in**

- bone regeneration***Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2011.
- DA ROSA SILVA, C. F. et al. High prevalence of skin and wound care of hospitalized elderly in Brazil: A prospective observational study. **BMC Research Notes**, 2017.
- DE BECKER, A.; VAN RIET, I. **Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?***World Journal of Stem Cells*, 2016.
- DESAI, C. et al. Use of platelet-rich fibrin over skin wounds: Modified secondary intention healing. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, 2013.
- DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, 2016.
- DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 2006a.
- DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 2006b.
- DOHAN, D. M. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, 2006c.
- DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. **Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)***Trends in Biotechnology*, 2009.
- EPPLEY, B. L.; PIETRZAK, W. S.; BLANTON, M. **Platelet-rich plasma: A review of biology and applications in plastic surgery***Plastic and Reconstructive Surgery*, 2006.
- FERREIRA, M. C. et al. Review Complex Wounds. **Clinics**, 2006.
- FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560–582, set. 2015.
- GONZALEZ, A. C. D. O. et al. **Wound healing - A literature review***Anais*

**Brasileiros de Dermatologia**, 2016.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. **Aging and Wound Healing***World Journal of Surgery*, 2004.

GROEBER, F. et al. **Skin Tissue Engineering-In Vivo and In Vitro Applications***Clinics in Plastic Surgery*, 2012.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219–29, mar. 2010.

HATAKEYAMA, I. et al. Effects of platelet-poor plasma, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin on healing of extraction sockets with buccal dehiscence in dogs. **Tissue Engineering - Part A**, 2014.

HEINO, J. **The collagen family members as cell adhesion proteins***BioEssays*, 2007.

HSIAO, S. T. F. et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. **Stem Cells and Development**, 2012.

HU, M. S. et al. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: A comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. **Stem Cells International**, 2018.

KANAZAWA, M. et al. The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. **International Journal of Implant Dentistry**, 2018.

KARAYANNOPOULOU, M. et al. Effect of locally injected autologous platelet-rich plasma on second intention wound healing of acute full-thickness skin defects in dogs. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, 2015.

KAZEMI MEHRJERDI, H. et al. Efficacy of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) Activated By Thromboplastin-D on the Repair and Regeneration of Wounds in Dogs. **Iranian Journal of Veterinary Surgery**, 2006.

KIM, S. H.; TURNBULL, J.; GUIMOND, S. **Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor***Journal of Endocrinology*, 2011.

KLINGEMANN, H.; MATZILEVICH, D.; MARCHAND, J. **Mesenchymal stem cells - Sources and clinical applications***Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 2008.

- KRAFTS, K. P. **Tissue repair: The hidden drama** *Organogenesis*, out. 2010.
- KUSUMA, G. D. et al. **Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect** *Stem Cells and Development*, 2017.
- LANDESBURG, R. et al. Activation of platelet-rich plasma using thrombin receptor agonist peptide. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2005.
- LEE, S. H. et al. Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. **Annals of Dermatology**, 2012.
- LI, Q. et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. **BioMed Research International**, 2013.
- LIAN, Z. et al. Synergistic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma in streptozotocin-induced diabetic rats. **Annals of dermatology**, v. 26, n. 1, p. 1–10, fev. 2014.
- LIANG, Z. J. et al. Precise Intradermal Injection of Nanofat-Derived Stromal Cells Combined with Platelet-Rich Fibrin Improves the Efficacy of Facial Skin Rejuvenation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 2018.
- MANDELBAUM, S.; DI SANTIS, É.; MANDELBAUM, M. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I Cicatrization: current concepts and auxiliary resources-Part I. **An Bras Dermatol**, 2003.
- MARTÍNEZ, C. E. et al. Platelet-Poor and Platelet-Rich Plasma Stimulate Bone Lineage Differentiation in Periodontal Ligament Stem Cells. **Journal of Periodontology**, 2016.
- MENDONÇA, F. A. S. et al. Effects of the application of Aloe vera (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, 2009.
- MONTANUCCI, P. et al. Human Umbilical Cord Wharton Jelly-Derived Adult Mesenchymal Stem Cells, in Biohybrid Scaffolds, for Experimental Skin Regeneration. **Stem cells international**, v. 2017, p. 1472642, 2017.
- NIE, C. et al. Locally administered Adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. **Cell Transplantation**, 2011.
- OJEH, N. et al. **Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their**

**clinical applications** *International Journal of Molecular Sciences*, 2015.

OZPUR, M. A. et al. Generation of Skin Tissue Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 137, n. 1, p. 134–143, jan. 2016.

PAGANELA, J. C. et al. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos Clinical approach in equine skin wounds. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 2009.

PENG, Y. et al. Platelet rich plasma clot releasate preconditioning induced PI3K/AKT/NFκB signaling enhances survival and regenerative function of rat bone marrow mesenchymal stem cells in hostile microenvironments. **Stem Cells and Development**, 2013.

SAMBERG, M. et al. Platelet rich plasma hydrogels promote in vitro and in vivo angiogenic potential of adipose-derived stem cells. **Acta biomaterialia**, v. 87, p. 76–87, mar. 2019.

SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair at a glance. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 18, p. 3209–13, 15 set. 2009.

TANZER, M. L. **Current concepts of extracellular matrix**. Journal of Orthopaedic Science. **Anais...**2006

TARTARINI, D.; MELE, E. **Adult stem cell therapies for wound healing: Biomaterials and computational models** *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2016.

TIMM, L. D. L. Técnicas Rotineiras De Preparação E Análise De Lâminas Histológicas. **Caderno La Salle XI**, 2005.

TOFFLER, M. et al. Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. **journal of implant&advanced clinical Dentistry**, 2009.

WALKER, N. et al. Leg ulcers in New Zealand: age at onset, recurrence and provision of care in an urban population. **The New Zealand medical journal**, v. 115, n. 1156, p. 286–9, 21 jun. 2002.

WOO, D. H.; HWANG, H. S.; SHIM, J. H. Comparison of adult stem cells derived from multiple stem cell niches. **Biotechnology Letters**, 2016.

YANG, L. et al. Platelet poor plasma gel combined with amnion improves the therapeutic effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on wound healing in rats. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 3, p. 3494–

3502, set. 2017.

ZEBARDAST, N.; LICKORISH, D.; DAVIES, J. E. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 197–203, 2010.

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

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4279–95, dez. 2002.