

Juliano Tibola

**ENGENHARIA DE TECIDOS NO REPARO CUTÂNEO:
ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS, MATRIZ
DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DA DERME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Coorientador: Prof. Dr. Dilmar Francisco Leonardi

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tibola, Juliano

Engenharia de tecidos no reparo cutâneo:
associação do plasma rico em plaquetas, matriz de
regeneração dérmica e células-tronco mesenquimais da
derme / Juliano Tibola ; orientadora, Andréa
Gonçalves Trentin, coorientador, Dilmir Francisco
Leonardi, 2018.

135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
do Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento.
2. Engenharia de tecidos. 3. Células-tronco
mesenquimais. 4. Plasma rico em plaquetas. 5.
Matriz de regeneração dérmica. I. Trentin,
Andréa Gonçalves. II. Leonardi, Dilmir
Francisco. III.

“Engenharia de tecidos no reparo cutâneo: associação do plasma rico em plaquetas, matriz de regeneração dérmica e células-tronco mesenquimais da derme”

Por

Juliano Tibola

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (28/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof. Dr. Geison de Souza Izidio
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr.ª Andrea Gonçalves Trentin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientadora



Dr.ª Cláudia Beatriz Nedel M. de Aguiar (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Adriano Tony Ramos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Jayme Adriano Farina Júnior (Universidade de São Paulo)
Por videoconferência

Geison de Souza Izidio
Coordenador do PPG em
Biologia Celular e do Desenvolvimento
CCB/UFSC

Florianópolis, 14 de março de 2018.

Este trabalho é dedicado aos pacientes queimados, os quais tive a oportunidade de conviver e participar do árduo do processo de reparo tecidual enquanto fisioterapeuta.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin, pelo exemplo de professora e pesquisadora que é, por ter me oportunizado o crescimento científico, profissional e pessoal ao longo desses anos de estudo, muito obrigado!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Dilmar Francisco Leonardi, por todos os ensinamentos político-profissionais ao longo desses anos e por ter me oportunizado a aproximação da clínica às ciências básicas.

Aos professores que fazem o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da UFSC, obrigado por fazerem parte da minha formação, sem o empenho de todos vocês em ministrar aulas, pesquisar e nos repassar seus ensinamentos, nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima, pela acolhida e oportunidade de ter feito parte da equipe de trabalho da Unidade de Queimados do HIJG enquanto fisioterapeuta por muitos anos, pelo constante incentivo a ciência, e por ter participado desse trabalho durante o estudo clínico preliminar.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que me oportunizou a formação de qualidade no ensino médio, mestrado e doutorado, a qual sou extremamente grato a todos os professores e técnicos que fazem esta instituição.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, local onde atuo profissionalmente, que por acreditar no meu potencial me oportunizou o afastamento das atividades laborais para cursar integralmente o doutorado.

Ao Hospital Universitário da UFSC, ao Ilha Hospital e Maternidade e ao Hospital Infantil Joana de Gusmão, instituições essas que muito colaboraram para que esse estudo pudesse ser realizado.

Ao LAMEB/UFSC - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e a todos os servidores que o compõe, por todo o apoio de infraestrutura laboratorial necessários.

A Profa Dra. Lídia Aparecida Rossi da USP-Ribeirão Preto, que gentilmente cedeu o equipamento *Cutometer* para uso nesse estudo.

A Profa. Dra. Natalia Gonçalves do departamento de enfermagem da UFSC, que participou na coleta de dados desse trabalho com o equipamento *Cutometer*.

Ao Professor Dr. Jamil Assreuy, do departamento de farmacologia da UFSC, que gentilmente cedeu o uso das instalações do Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico para experimentos do estudo pré-clínico.

Ao Professor Dr. Adriano Tony Ramos, do curso de medicina veterinária da UFSC, que gentilmente cedeu o uso das instalações do Laboratório de Patologia Veterinária para experimentos do estudo pré-clínico

A Dra. Bianca Luise Teixeira, que participou dos estudos *in vitro* desse trabalho.

Em especial a Dra. Talita da Silva Jeremias, por haver participado em todas as fases desse estudo, por todos os ensinamentos e convívio ao longo do tempo, sou muito grato por tudo.

Ao Programa UNIEDU da Secretaria de Estado da Educação de Santa Catarina, o qual me proporcionou a concessão de bolsa de pós-graduação.

Às agências financiadoras CNPq, CAPES, FAPESC, Ministério da Ciência e Tecnologia, INCT Regenera, e PRONEX/CNPq.

Aos meus pais Cérgio e Ledy por todos os ensinamentos de vida, por todo o apoio e incentivo proporcionado nos melhores momentos assim como nos mais difíceis, e por se fazerem presentes mesmo a quando a distância física não permite.

As minhas irmãs Daiane e Franciele pelo convívio ao longo dos anos e por se fazerem presentes em muitos bons momentos que a vida nos proporciona em família.

Aos (as) meus (minhas) queridos (as) colegas do LACERT/UFSC, aos (as) quais pude compartilhar muitos bons e também tensos momentos nesses anos, sentirei saudades de todos (as) vocês!

Em especial ao acadêmico de medicina e aluno de iniciação científica Gabriel Trajano Petry, que acompanhou esse trabalho desde a fase inicial, com empenho e dedicação em muitos feriados e horários onde muitos dormiam ou descansavam, obrigado pelo convívio nesses anos.

Aos (as) amigos (as) que me acompanharam nesse período, por todo o companheirismo e compreensão nos momentos que me fiz ausente.

A neurocientista Dra. Alexandra Elbakyan, por haver fundado o website Sci-hub, sem ele não teríamos acesso a muitas pesquisas do mundo.

“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são”.
(Aristóteles, 384 a.C. - 322 a.C.)

RESUMO

A engenharia de tecidos, área de estudo multidisciplinar, tem evoluído à medida que desenvolve e aprimora produtos de uso clínico, os quais buscam a cura ou tratamento de inúmeras moléstias. Dentre elas, lesões cutâneas de origens diversas, como as feridas e queimaduras, as quais apresentam grande impacto econômico e social pois atingem o maior órgão corporal com fundamental importância de barreira protetora. Neste sentido, o presente estudo teve como o objetivo avaliar a associação dos elementos da engenharia tecidual matriz de regeneração dérmica (MRD), plasma rico em plaquetas (PRP) e células-tronco mesenquimais da derme (CTMd) no reparo de lesões cutâneas em abordagens em cultura de células, em estudo pré-clínico em modelo murino e em estudo clínico preliminar com paciente humano. Verificou-se no estudo que a adesão do paciente ao tratamento proposto é fator fundamental para o seu completo sucesso, não dependendo somente dos produtos tecnológicos utilizados. Os estudos *in vitro* revelaram que o PRP estimula a proliferação e migração das CTMd promovendo fechamento da lesão. Além disso, as análises pré-clínicas demonstraram que a associação da MRD e CTMd é efetiva para promover o fechamento acelerado da lesão cutânea acompanhado de melhor reepitelização e homogeneidade da epiderme influenciando positivamente ainda na espessura da neoderme, infiltração celular na MRD, infiltrado inflamatório e neovascularização. O PRP associado à MRD, na presença ou não de CTMd, é efetivo na fase de remodelamento do processo de reparo cutâneo estimulando a produção e organização das fibras de colágeno. O PRP é também efetivo na espessura da derme, infiltração celular na MRD, infiltrado leucocitário e neovascularização. Em conjunto, os resultados sugerem que a utilização associada dos produtos da engenharia tecidual MRD, CTMd e PRP são mais efetivos no processo de reparo cutâneo em modelo pré-clínico murino do que seu uso isoladamente.

Palavras-chave: Engenharia de tecidos. Células-tronco mesenquimais. Plasma rico em plaquetas. Reparo tecidual. Lesões cutâneas. Feridas. Queimaduras.

ABSTRACT

Tissue engineering, a multidisciplinary area of study, has evolved as it develops and enhances products for clinical use, which seek the cure or treatment of numerous diseases. Among them, cutaneous lesions of diverse origins, such as wounds and burns, which present great economic and social impact because they reach the largest body organ with fundamental importance of protective barrier. In this sense, the present study aimed to evaluate tissue engineering elements association - dermal regeneration matrix (DRM), platelet rich plasma (PRP) and mesenchymal stem cells of the dermis (dMSCs) - in cutaneous repair, approaching cell culture, a preclinical study in murine model and a preliminary clinical study with a human patient. In this study, it was verified that patient's adherence to the proposed treatment is a fundamental factor for its complete success, not depending only on the technological products used. *In vitro* studies have shown that PRP stimulates the proliferation and migration of dMSCs promoting lesion closure. In addition, preclinical analyzes demonstrated that the association of DRM and dMSCs is effective promoting the accelerated closure of cutaneous lesion accompanied by better reepithelialization and homogeneity of the epidermis, further influencing the thickness of the neoderm, cellular infiltration in the DRM, inflammatory infiltrate and neovascularization. PRP associated with DRM, in the presence or absence of dMSCs, is effective in the remodeling phase of the skin repair process stimulating the production and organization of collagen fibers. PRP is also effective in dermis thickness, cellular infiltration into DRM, leukocyte infiltrate and neovascularization. Taken together, the results suggest that the associated use of tissue engineering products DRM, dMSCs and PRP is more effective in cutaneous repair process in murine preclinical model than its alone application.

Keywords: Tissue engineering. Mesenchymal stem cells. Platelet rich plasma. Tissue repair. Cutaneous lesions. Wounds. Burns.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele.....	28
Figura 2 - Fases do processo de reparo tecidual.....	34
Figura 3 - Representação gráfica da tríade da engenharia de tecidos.....	36
Figura 4 - Representação gráfica das características das célula-tronco mesenquimais.....	37
Figura 5 - Esquema representativo do desenho experimental do trabalho quanto ao estudo preliminar de caso clínico.....	45
Figura 6 - Esquema representativo do desenho experimental do trabalho quanto aos estudos <i>in vitro</i> e pré-clínico.....	46
Figura 7 - Procedimento cirúrgico e resultado final de enxertia de pele...49	
Figura 8 - Curvas de medidas dos parâmetros R do equipamento <i>Cutometer</i> MPA 580.....	52
Figura 9 - Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliados durante as fases de reparo tecidual.....	63
Figura 10 - Medidas da espessura do tecido de granulação e derme íntegra.....	64
Figura 11 - Medidas da contagem de vasos para análise da neovascularização.....	65
Figura 12 - Áreas de medida das fibras de colágeno.....	67
Figura 13 - Aspecto cicatricial da lesão do paciente 001.....	69
Figura 14 - Aspecto postural geral do paciente 001 após seis meses do procedimento cirúrgico.....	70
Figura 15 - Avaliação da cicatriz.....	71
Figura 16 - Ensaio de migração celular por <i>cell scratch</i>	76
Figura 17 - Representação gráfica da porcentagem de fechamento da área de lesão da monocamada celular em 12 h e 24 h.....	77
Figura 18 - Fotomicrografias do ensaio de proliferação celular das CTMd associado ao PRP nos diferentes grupos com marcação positiva para BrdU.....	78
Figura 19 - Representação gráfica do efeito de PRP na proliferação das CTMd.....	79
Figura 20 - Análise macroscópica do fechamento das lesões.....	81
Figura 21 - Representação gráfica da porcentagem de fechamento das lesões em pele de camundongos nos quatro grupos do estudo.....	82
Figura 22 - Representação gráfica do número de lesões abertas ao longo do tempo após procedimento cirúrgico em camundongos.....	83
Figura 23 - Formação do tecido de granulação e infiltração da MRD no dia 3 de pós-operatório.....	84

Figura 24 - Formação do tecido de granulação e infiltração da MRD no dia 7 de pós-operatório.....	85
Figura 25 - Representação gráfica da espessura do tecido de granulação.....	86
Figura 26 - Espessura da derme recém-formada no dia 18 de pós-operatório.....	87
Figura 27 - Análise da espessura do tecido de granulação e da derme recém-formada nos dias 3, 7 e 18 de pós-operatório.....	88
Figura 28 - Imagens representativas dos cortes histológicos corados com HE para visualização do infiltrado de leucócitos no dia 3 de pós-operatório.....	90
Figura 29 - Neovascularização nas lesões cutâneas nos dias 7 e 18 de pós-operatório.....	92
Figura 30 - Formação da epiderme no 18º dia de pós-operatório.....	93
Figura 31 - Espessura e homogeneidade da epiderme recém-formada no dia 18 de pós-operatório.....	94
Figura 32 - Fotomicrografias representativas das lâminas histológicas após coloração com <i>picrosírius red</i>	95
Figura 33 - Representação gráfica da área de colágeno tipo I e tipo III expressos em área (μm^2).....	96
Figura 34 - Fotomicrografias representativas do colágeno tipo I após coloração com <i>picrosírius red</i>	98
Figura 35 - Esquema representativo dos efeitos da associação dos produtos da engenharia tecidual (MRD, PRP e CTMd) nas lesões cutâneas.....	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Organização dos grupos experimentais do estudo pré-clínico em camundongos.....	60
Quadro 2 - Resultados dos parâmetros biomecânicos da pele.....	72
Quadro 3 - Resultados dos parâmetros de melanina e eritema da pele.....	73
Quadro 4 - Escore do infiltrado inflamatório no dia 3 de pós-operatório.....	91
Quadro 5 - Percentual total da área de colágeno tipo I e tipo III na derme da região da lesão.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise qualitativa da infiltração de células na matriz de regeneração dérmica nos dias 3, 7 e 18 de pós-operatório.....	89
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM – Amplitude de movimento
ANOVA – Análise de variância
BEG/UFSC - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC
BrdU – Bromodesoxiuridina
CCB - Centro de Ciências Biológicas
cDNA - DNA complementar
CEP – Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CO₂ – Dióxido de Carbono
CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPDA-1 - Citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina
CSF-1 - Fator de estimulação de colônia 1
CTM – Células – tronco mesenquimais
CTMd – Células – tronco mesenquimais da derme facial
CT – Células – tronco
DAPI - 4'-6-diamino-2-fenilindol
DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF - Fator de crescimento epidermal
FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana
HCl – Ácido clorídrico
HE - Hematoxilina e eosina
HGF - Fator de crescimento dos hepatócitos
HIJG - Hospital Infantil Joana de Gusmão
IFN – Interferon
IGF 1-2 - Fator de crescimento do tipo insulina 1 e 2
IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina
IgG1 – Imunoglobulina 1
IL-1 - Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
LACERT/UFSC - Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual da Universidade Federal de Santa Catarina
LAMEB/UFSC - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia da UFSC
MHC-I - Complexo principal de histocompatibilidade I

MHC-II - Complexo principal de histocompatibilidade II
MMP - Metaloproteinases
MRD – Matriz de regeneração dérmica
MSC – Célula estromal mesenquimal
MTT - {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}
Parâmetro R - parâmetros relativos
PBS - Solução tampão fosfato-salino
PDGF - Fator de crescimento derivado das plaquetas
PPP - Plasma pobre em plaquetas
PRP - Plasma rico em plaquetas
PS - Penicilina e estreptomicina
RNA - Ácido ribonucleico
SBF - Soro bovino fetal
SCQ - Superfície corporal queimada
SUS – Sistema Único de Saúde
TA – Termo de assentimento
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- α - Fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TIMP - Inibidores de metaloproteinases
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TPN - Terapia por pressão negativa
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
Kg	Quilograma
mbar	Milibar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetro de mercúrio
N	Normal
U	Unidades
X g	Veze a força centrífuga
X	Veze
α	Alfa
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micromêtro
μm^2	Micrômetro quadrado
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$^{\circ}\text{GL}$	Grau Gay Lussac
%	Por cento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	ESTRUTURA DA PELE.....	27
1.2	LESÕES CUTÂNEAS E QUEIMADURAS.....	30
1.3	O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL.....	32
1.4	ENGENHARIA TECIDUAL NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS.....	35
1.5	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	36
1.6	MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA.....	38
1.7	PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	40
1.8	JUSTIFICATIVA.....	41
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
2.2.1	Parte I	43
2.2.2	Parte II	43
2.2.3	Parte III	43
3	METODOLOGIA	45
3.1	PARTE I - ESTUDO PRELIMINAR DE CASO CLÍNICO DE UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ASSOCIANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO, MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E TERAPIA POR PRESSÃO NEGATIVA NA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DAS SEQUELAS DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL.....	47
3.1.1	População e amostra	47
3.1.2	Descrição do caso clínico e procedimentos	47
3.1.3	Obtenção, preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas humano autólogo	49
3.1.4	Análises histológicas	50
3.1.5	Avaliação da cicatriz	51

3.1.6	Análises moleculares.....	56
3.1.7	Análises estatísticas.....	56
3.2	PARTE II - ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL.....	54
3.2.1	Isolamento e cultivo celular das células-tronco mesenquimais da derme facial.....	54
3.2.1.1	Obtenção das amostras de pele humana.....	54
3.2.1.2	Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais da derme facial.....	54
3.2.2	Cultivo celular em matriz de regeneração dérmica.....	55
3.2.3	Obtenção e preparo do plasma rico em plaquetas humano.....	55
3.2.4	Ensaio de migração celular.....	56
3.2.5	Ensaio de proliferação celular.....	57
3.2.6	Análises estatísticas.....	58
3.3	PARTE III - ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO DE LESÕES DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE CAMUNDONGOS.....	59
3.3.1	Obtenção dos animais.....	59
3.3.2	Procedimento cirúrgico e delineamento da amostra.....	59
3.3.3	Análise macroscópica do reparo tecidual.....	61
3.3.4	Processamento das amostras para análises histológicas....	61
3.3.4.1	Coloração com hematoxilina e eosina.....	61
3.3.4.2	Coloração com <i>picrosírius red</i>	62
3.3.5	Análises histológicas.....	62
3.3.5.1	Espessura do tecido de granulação.....	63
3.3.5.2	Colonização celular da matriz de regeneração dérmica.....	64
3.3.5.3	Infiltrado inflamatório.....	64

3.3.5.4	Neovascularização.....	65
3.3.5.5	Espessura da derme recém-formada.....	64
3.3.5.6	Espessura e homogeneidade da epiderme.....	66
3.3.5.7	Espessura da epiderme e derme íntegra.....	66
3.3.5.8	Formação das fibras de colágeno.....	66
3.3.6	Análises estatísticas.....	67
4	RESULTADOS.....	69
4.1	PARTE I - ESTUDO PRELIMINAR DE CASO CLÍNICO DE UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ASSOCIANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO, MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E TERAPIA POR PRESSÃO NEGATIVA NA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DAS SEQUELAS DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL.....	69
4.1.1	Estudo de caso.....	69
4.1.2	Avaliação da Cicatriz.....	71
4.2	PARTE II - ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL.....	75
4.2.1	Efeito do plasma rico em plaquetas na migração das células-tronco mesenquimais da derme facial.....	75
4.2.2	Efeito plasma rico em plaquetas na proliferação das células tronco mesenquimais da derme facial.....	78
4.3	PARTE III - ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO DE LESÕES DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE CAMUNDONGOS.....	80
4.3.1	Aspectos macroscópicos das lesões.....	80
4.3.2	Fechamento das lesões.....	80
4.3.3	Formação do tecido de granulação e da neoderme.....	83
4.3.4	Colonização celular.....	89
4.3.5	Infiltrado inflamatório.....	90

4.3.6	Neovascularização.....	91
4.3.7	Formação e homogeneidade da epiderme.....	93
4.3.8	Formação do colágeno.....	95
5	DISCUSSÃO.....	99
5.1	PARTE I - AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO USO CLÍNICO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	99
5.2	PARTE II – PLASMA RICO EM PLAQUETAS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL <i>IN VITRO</i>	101
5.3	PARTE III - ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO USO ASSOCIADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL, E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO EM MODELO MURINO.....	102
5.3.1	Análises macroscópicas no processo de reparo tecidual.....	102
5.3.2	Avaliação da fase inflamatória do reparo tecidual.....	103
5.3.3	Avaliação da fase proliferativa do reparo tecidual.....	104
5.3.4	Avaliação da fase de remodelamento do reparo tecidual.....	105
6	CONCLUSÃO.....	111
	REFERÊNCIAS.....	113
	ANEXO A - Permissão de uso de imagem da Web MD....	125
	ANEXO B - Termo de Licença e Condições Elsevier and Copyright Clearance Center.....	126
	ANEXO C – Parecer Consubstanciado 828.101 - CEP HIJG.....	127
	ANEXO D – Parecer Consubstanciado 1.500.162 – CONEP.....	131
	ANEXO E – Protocolo PP00810 - CEUA.....	135

1 INTRODUÇÃO

Os seres humanos, assim como os demais animais, são compostos por tecidos celulares, muitos deles frágeis e com necessidade de restabelecimento, cura e/ou cicatrização quando traumatizados (MARQUES; SUZUKI; MARQUES, 2017). A cicatrização de feridas é um fenômeno estudado há mais de cinco mil anos, onde datam os primeiros registros dos cuidados dessas lesões. Desde então, vários princípios de conhecimento referentes aos processos biológicos, cuidados e tratamentos são passados de geração em geração (SHAH, 2011). Nos últimos cem anos, o conhecimento a respeito do reparo das lesões tem evoluído significativamente devido principalmente às descobertas da ciência em relação a eventos fisiológicos e moleculares do organismo e desenvolvimento de novos produtos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006a; SHAH, 2011). Os avanços na pesquisa com células-tronco (CT) e na engenharia de tecidos com o uso de substitutos da pele e outros fatores associados são exemplos desse progresso (CHUA et al., 2016; MARQUES; SUZUKI; MARQUES, 2017).

1.1 ESTRUTURA DA PELE

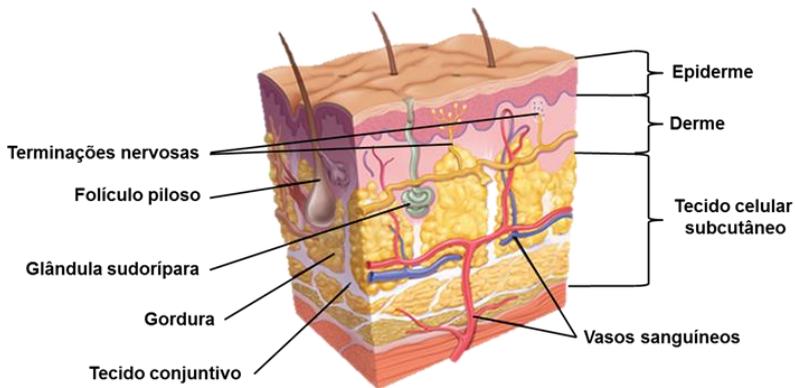
A pele é o maior órgão dos vertebrados, cobrindo toda a superfície dos indivíduos e compreendendo cerca de 10 % do peso corporal (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Especificamente no corpo humano, a pele, como tecido de revestimento corporal, compreende a aproximadamente 16 % do peso total com área de superfície de 1,8 m². Como órgão, possui várias funções sendo a mais importante a formação de barreira física ao meio ambiente, permitindo e limitando a passagem da água, eletrólitos e várias substâncias, proporcionando proteção contra microrganismos, radiação ultravioleta, agentes tóxicos e agressões mecânicas. Embora presente em toda a superfície corporal, varia em espessura de acordo com o local anatômico e a idade do indivíduo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WONG; CHANG, 2009).

A pele nos mamíferos é constituída de epiderme, uma porção epitelial de origem ectodérmica e da derme, uma porção conjuntiva de origem mesodérmica. Sob a derme encontra-se o tecido celular subcutâneo que não faz parte da pele, mas realiza a integração com os órgãos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; O'SULLIVAN; SCHMITZ, 2010; WATT; FUJIWARA, 2011) (Figura 1).

A epiderme, camada mais externa da pele, é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Os queratinócitos são as

células mais abundantes nesse epitélio compreendendo mais de noventa por cento destas, sendo responsáveis pela coesão da estrutura epidérmica e pela função de barreira. Existem ainda mais três tipos de células nessa camada: os melanócitos, as células de Langherans e as de Merkel. Há cinco camadas constituintes da epiderme, sendo a mais importante a basal, constituída de células cubóides que repousam sobre a membrana basal, esta separa a epiderme da derme. A camada basal, também chamada de germinativa, é rica nas CT da epiderme. Logo acima da camada basal encontram-se as camadas espinhosa, granulosa, lúcida e a mais externa que é a camada córnea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; O'SULLIVAN; SCHMITZ, 2010; WONG; CHANG, 2009). A epiderme e a derme estão ligadas à lâmina basal, composta pelas integrinas da superfície celular e elementos na matriz extracelular como laminina, colágeno IV e outros com importante papel na regulação epitélio-mesenquimal. A estrutura é altamente irregular, com papilas dérmicas que se projetam na derme papilar perpendicularmente à superfície da pele (WONG; CHANG, 2009).

Figura 1 - Estrutura da pele. Representação gráfica da estrutura anatômica da pele exibindo epiderme, derme, tecido celular subcutâneo e demais estruturas.



Fonte: Web MD (2018), com permissão de uso de imagem da Web MD (Anexo A).

A derme encontra-se logo abaixo da epiderme sendo composta por uma resistente matriz extracelular de suporte. Contém duas camadas: a papilar, mais superficial e a reticular, mais profunda. A camada papilar é delgada e constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas

dérmicas as quais contém os plexos vasculares. Morfologicamente essa camada é composta de uma rede frouxa de finas fibras de colágeno entrelaçadas. Já a derme reticular é composta de fibras de colágeno densamente entrelaçadas, as quais se prendem ao tecido subcutâneo por meio de uma rede entrelaçada irregular de tecido conjuntivo fibroso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WONG; CHANG, 2009). Os colágenos tipos I, III e V são os predominantes na derme, sendo responsáveis por 87 %, 10 % e 3 %, respectivamente, do colágeno dérmico (BEDOYA, 2016). Muitos autores não fazem referência ao colágeno tipo V em função da sua pouca expressão, referindo-se apenas a composição de colágeno na pele de 80 % - 85 % de colágeno tipo I e 10 % - 15 % de colágeno tipo III (DA CUNHA; PARAVIC; MACHADO, 2015).

O tecido celular subcutâneo está localizado sob a derme e tem sua origem na mesoderme, separando a derme da fáscia muscular. É responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia. É constituído por tecido conjuntivo frouxo, podendo conter muitas células adiposas, e assim constituir o panículo adiposo o qual modela o corpo, e também serve como reserva de energia ao organismo proporcionando proteção contra o frio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; WONG; CHANG, 2009).

Comparativamente, existem diferenças a serem consideradas entre a pele de humanos e de camundongos, animal utilizado como modelo nesse estudo, apesar das duas espécies apresentarem epiderme e derme. A pele humana é mais espessa enquanto a pele murina é mais fina. As alterações de espessura, tanto no tecido cutâneo quanto no tecido celular subcutâneo, também diferem quanto a localização, idade, sexo e estado nutricional (ZOMER; TRENTIN, 2017). Há diferenças ainda quanto ao número de camadas da epiderme: a humana é composta de 5 a 10 camadas celulares, enquanto a murina contém apenas 2 ou 3, o que propicia a diminuição da função de barreira protetora (BORENA et al., 2015). Entre os camundongos, nos machos a derme, é mais espessa e 40 % mais firme. Já nos camundongos fêmeas a epiderme e o tecido celular subcutâneo são mais espessos (ZOMER; TRENTIN, 2017). Por fim, o músculo *Panniculus carnosus* presente no subcutâneo murino, abaixo da derme e acima da fáscia muscular, é um músculo de contração rápida, praticamente ausente em humanos e influencia a biomecânica da pele (NALDAIZ-GASTESI et al., 2016; ZOMER; TRENTIN, 2017).

1.2 LESÕES CUTÂNEAS E QUEIMADURAS

A ruptura da estrutura anatômica normal da pele com perda consecutiva de função pode ser descrita como uma lesão cutânea, a qual gera um processo de reparação tecidual. Há com isso um processo celular dinâmico e altamente regulado por mecanismos humorais e moleculares que iniciam imediatamente após uma lesão, podendo perdurar por anos (GURTNER et al., 2008; LAZARUS et al., 1994; REINKE; SORG, 2012). As lesões cutâneas, também denominadas feridas, podem ocorrer como parte de um processo de doença ou como um trauma acidental ou intencional (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). São inúmeras as causas e origens, que incluem desde desordens genéticas, traumas, feridas crônicas ou intervenções cirúrgicas. Uma das causas mais comuns de lesões cutâneas graves são as queimaduras resultantes de traumas térmicos (GROEBER et al., 2011).

Nas últimas décadas, a prevalência de doenças degenerativas crônicas associadas ao envelhecimento populacional têm aumentado drasticamente; assim também, as feridas crônicas, que representam um importante agravo de saúde nessa população. Milhões de pessoas em todo o mundo são acometidas por feridas agudas e crônicas como resultado de cirurgias, queimaduras, infecções, úlceras por pressão e úlceras diabéticas e venosas. Nos Estados Unidos da América, mais de 6 milhões de pessoas sofrem de feridas crônicas, gerando um gasto anual de 25 bilhões de dólares. Dos 150 milhões de diabéticos no mundo, cerca de 15 % são acometidos com as úlceras localizadas no pé, que são consideradas de difícil tratamento. Na Europa aproximadamente 2 % do orçamento de saúde são gastos no tratamento de feridas crônicas. A eficácia dos tratamentos atuais de feridas crônicas é estimada em 50 %, tornando esses tratamentos altamente dispendiosos em função da necessidade de repetição dos mesmos (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018).

No Brasil não existem estudos epidemiológicos que nos permitam saber o percentual de pessoas acometidas por feridas. Contudo na Inglaterra, a estimativa é de que 1,5 a 3 indivíduos a cada 1000 habitantes apresentam úlceras em membros inferiores a cada ano. Transpondo os dados da Inglaterra ao Brasil, pode-se esperar que cerca de 570 mil brasileiros apresentem novas feridas crônicas a cada ano. Na população acima de 80 anos, essa prevalência é de 20 para cada 1000 indivíduos (UNIVERSIDADE ABERTA DO SUS - UNA SUS, 2011). A Sociedade Brasileira de Queimaduras estima que ocorram cerca de 1 milhão de acidentes com queimaduras no Brasil a cada ano (ODELI et al., 2012). Destes, 200 mil são atendidos em serviços de emergência e 40 mil

demandam hospitalização (TAVARES; HORA, 2011). Devido à grande quantidade de doentes com modificações na integridade da pele, as feridas constituem um sério problema de saúde pública no nosso país, se fazendo presente em praticamente todos os serviços de saúde. A alta incidência destas lesões na população é uma realidade conhecida pelos profissionais de saúde e tem gerado discussões sobre o assunto (ALBUQUERQUE DE ALMEIDA, 2015).

Em relação ao tempo, as lesões cutâneas podem ser classificadas em feridas agudas ou crônicas. As agudas normalmente evoluem por meio de um processo de reparo ordenado, resultando na restauração sustentada da integridade anatômica e funcional. Já as crônicas não efetivam um processo ordenado e apropriado para a produção da integridade funcional. São consideradas agudas quando fecham espontaneamente em até três semanas e consideradas crônicas quando fecham após esse período (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Quanto à complexidade, pode-se definir como ferida simples aquela com evolução espontânea para a resolução e que segue fisiologicamente os três estágios principais do processo de reparo: inflamação, proliferação e remodelamento tecidual. Já as lesões que acometem áreas extensas, e necessitam de métodos diferenciados para sua resolução, possuem seu processo de reparo fisiológico alterado, ou representam ameaça à viabilidade de um segmento corporal são denominadas feridas complexas. Assim também, as feridas recorrentes, que após reparadas por cuidados locais ou cirúrgicos reabrem ou necessitem de tratamento diferenciado, são consideradas como complexas (FERREIRA et al., 2006; SMANIOTTO et al., 2010).

A queimadura, em função da sua especificidade adota conceituação própria, e é definida como uma lesão tecidual resultante da exposição a chamas ou líquidos aquecidos, contato com objetos quentes, exposição a corrosivos químicos, radiação ou contato com corrente elétrica, que determina necrose de coagulação do tecido de revestimento, cuja gravidade está relacionada à profundidade e a extensão da superfície corporal queimada (QUEIMADURAS, 2018). Atualmente as queimaduras podem ser classificadas de acordo com a sua espessura em: superficial, parcial superficial, parcial profunda e de espessura total. De acordo com a sua classificação apresentam as seguintes características: 1) superficial, na qual somente a epiderme é acometida; 2) parcial superficial, que atinge tanto a epiderme quanto a derme papilar, apresenta cor rósea, úmida e dolorosa. Costuma formar flictenas; 3) parcial profunda, que também afeta camadas mais profundas da derme; tem coloração vermelho-brilhante ou amarelo esbranquiçada, com ou sem

flictenas, dolorosa ou indolor; e 4) de espessura total, que atingem todas as camadas da pele, podendo até chegar a estruturas ósseas, apresenta coloração branco-nacarada ou negra (carbonizada) e é indolor (GROEBER et al., 2011; MAES et al., 2012; MONSTREY et al., 2008).

As queimaduras proporcionam a curto e longo prazo sequelas físicas e psicológicas ao indivíduo acometido (DELGADO PARDO et al., 2008). As sequelas das queimaduras em geral aparecem como cicatrizes hipertróficas, queloides e contraturas cicatriciais e levam a grandes deformidades não somente estéticas como funcionais (CONDUTA et al., 2012). Quanto ao meio social e econômico, as queimaduras representam um grande problema ao Sistema Único de Saúde (SUS) pois mais de 90 % das vítimas realizam tratamento via SUS. O custo de um paciente numa unidade de tratamento de queimados pode ultrapassar facilmente R\$ 1.500,00 / dia, e sendo esse trauma responsável por 4,4 % das internações do SUS no ano 2003 (DA FONSECA FILHO et al., 2014).

1.3 O PROCESSO DE REPARO TECIDUAL

Conceitualmente o reparo pode ocorrer através da regeneração tecidual com a recomposição da funcionalidade do tecido, ou pela cicatrização com o restabelecimento da sua homeostasia, mas com perda da atividade funcional em função da formação de cicatriz fibrótica (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Reparar, mais especificamente, refere-se ao método fisiológico de adaptação de um órgão após lesão para restabelecer a continuidade sem a substituição exata de tecido perdido ou danificado (NGUYEN; ORGILL; MURPHY, 2009).

A capacidade e habilidade dos organismos vivos em regenerar os tecidos a fim de restaurar as funções dos órgãos tem sido uma vantagem seletiva e um fator de sobrevivência. Como a maioria dos organismos são sujeitos   renovação contínua de seus tecidos ao longo da vida, a capacidade de restaura o   desenvolvida de diversas formas, conforme a espécie, desde o reparo tecidual   regenera o completa de  rg os (REINKE; SORG, 2012). O processo de reparo de feridas na pele   dinâmico e altamente regulado por sistemas de mecanismos celulares, humorais e moleculares que iniciam imediatamente após a lesão e podem durar anos (REINKE; SORG, 2012).

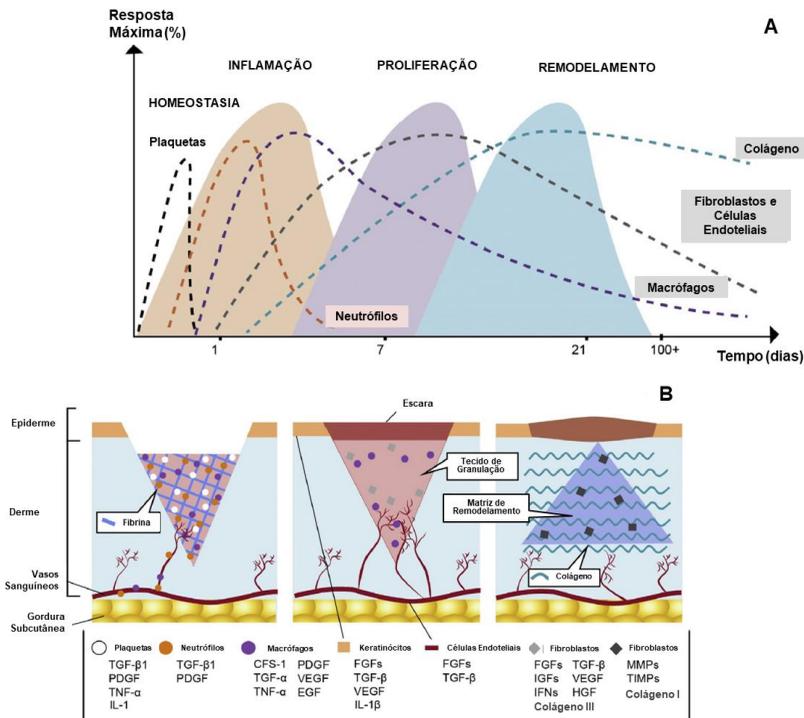
Os mecanismos do reparo tecidual, t mm denominado de cicatriza o, foram descritos por Carrel em 1910 como uma seq ncia ordenada de eventos (CAMPOS LOGOCKI; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007), mais tarde divididos em cinco fases principais: inflama o, prolifera o celular, forma o do tecido de granula o,

contração e remodelação da ferida (ORGILL; DEMLING, 1988). Na atualidade é utilizada de maneira didática a classificação em três fases sobrepostas: inflamatória, de proliferação e de maturação ou remodelamento (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006b; REINKE; SORG, 2012; WITTE; BARBUL, 1997). Essa classificação em fases sobrepostas é utilizada tanto para estudos na pele de humanos quanto em camundongos em função da semelhança do processo de reparo entre as duas espécies (ZOMER; TRENTIN, 2017) (Figura 2).

A fase inflamatória compreende o período crítico de 1 a 3 dias após a lesão com a liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxano A2 e prostaglandinas pelas membranas celulares. A resposta inflamatória inicia com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração) de neutrófilos e macrófagos para a ferida. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação com a liberação de grânulos e formação de coágulo constituído por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório proteico para síntese de citocinas e fatores de crescimento (CAMPOS LOGOCKI; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012).

A fase proliferativa compreende o período de 4 a 21 dias após a lesão e é constituída por quatro etapas fundamentais: reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Caso contrário, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora. A angiogênese é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares. A parte final da fase proliferativa é a formação do tecido de granulação. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, sendo estimulados a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos que promovem a contração da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CAMPOS LOGOCKI; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; REINKE; SORG, 2012).

Figura 2 - Fases do processo de reparo tecidual. (A) Representação gráfica das fases do processo de reparo tecidual em função do tempo e da resposta celular máxima. (B) Representação das camadas da pele lesionada nas diferentes fases do processo de reparo tecidual e as proteínas envolvidas na sinalização celular desse evento. TGF- β : fator de transformação do crescimento beta; PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IL-1: interleucina 1; IL-1 β : interleucina 1 beta; CSF-1: fator de estimulação de colônia 1; TGF- α , fator de transformação do crescimento alfa; VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular; EGF: fator de crescimento epidermal; IGFs: fatores de crescimento semelhantes à insulina; IFNs: interferons; HGFs: fatores de crescimento dos hepatócitos; FGFs: fatores de crescimento de fibroblastos; MMPs: metaloproteínas; TIMPs: inibidores de metaloproteínas.



Fonte: Zomer; Trentin (2017), com permissão de Elsevier and Copyright Clearance Center (Anexo B).

A fase final do reparo tecidual é a maturação ou remodelamento e compreende o período de 21 dias a 2 anos, caracterizada pela deposição de colágeno de maneira organizada. O objetivo nesta fase é o

restabelecimento da elasticidade e força da pele, perdidas com a lesão tecidual. Com o tempo, o colágeno inicial (colágeno tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso (colágeno tipo I) é produzido e organizado ao longo das linhas de tensão. Neste momento há o desenvolvimento de um equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno e outras proteínas que são depositadas na área da lesão de maneira cada vez mais organizada. Estas mudanças se refletem em aumento da força tênsil da ferida. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga (GURTNER et al., 2008; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

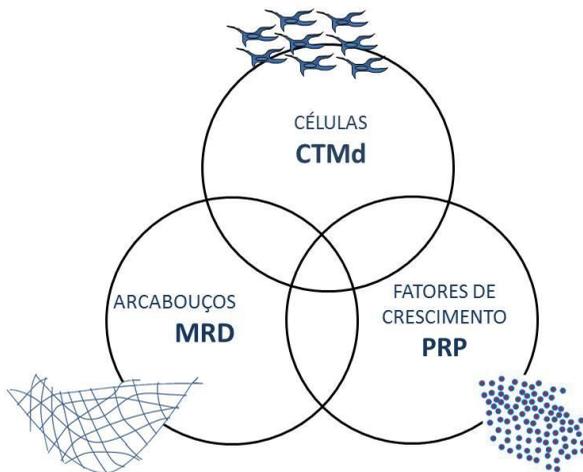
1.4 ENGENHARIA TECIDUAL NO REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS

A engenharia de tecidos é um dos campos da medicina regenerativa que utiliza métodos para promover o crescimento de células através da manipulação de biomateriais, artificiais ou naturais, que forneçam o suporte para o crescimento controlado em diferentes tipos de tecido. Fundamentalmente, os biomateriais devem fornecer um ambiente que favoreça a interação celular; corresponder a uma matriz permeável que permita difusão de nutrientes, gases e metabólitos; e ainda, suporte mecânico, para a reposição e regeneração do tecido (SERPOOSHAN et al., 2010). Em 1993, Langer & Vacanti, se referiram à engenharia de tecidos como uma área interdisciplinar e mencionam o que hoje chamamos da tríade da engenharia tecidual se referindo às três estratégias que devem ser adotadas para se engenheirar um tecido: (1) células isoladas ou substitutos de células, (2) substâncias indutoras do tecido e o (3) arcabouço onde a células serão colocadas (LANGER; VACANTI, 1993) (Figura 3).

O termo engenharia de tecidos está também associado ao reparo de tecidos corporais que utilizam células engenheiradas, ou seja, manipuladas em laboratório e/ou substâncias bioquímicas específicas que favoreçam o seu desenvolvimento. Assim sendo, as CT ou células progenitoras também podem ser utilizadas para produzir tecidos (VAN ZUIJLEN et al., 2015).

A formação do novo tecido pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*, sendo que o primeiro passo consiste em implantar o biomaterial com ou sem células ou fatores semeados no local da lesão. *In vitro*, a regeneração do tecido ocorre em um ambiente controlado e propício ao crescimento celular, como em biorreatores e depois implantado no paciente (SPECTOR, 2007).

Figura 3 - Representação gráfica da tríade da engenharia de tecidos. Exemplificação dos recursos utilizados nesse estudo como os materiais componentes da tríade: Células-Tronco Mesenquimais da Derme Facial (CTMd), Plasma Rico em Plaquetas (PRP) e Matriz de Regeneração Dérmica (MRD).



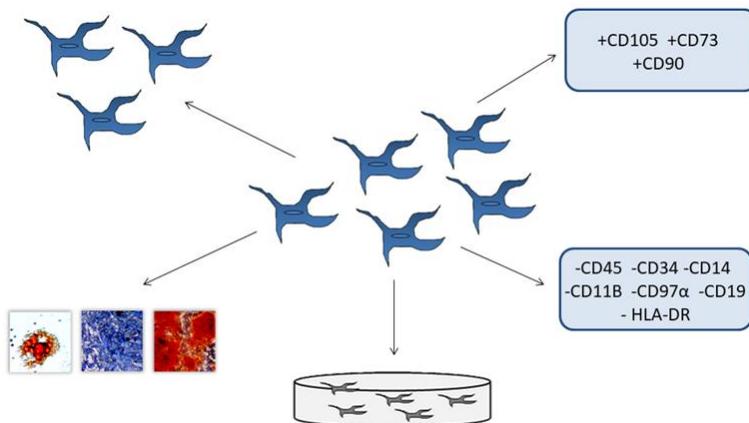
Fonte: do próprio autor (2018).

1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

A Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu a célula-tronco mesenquimal (CTM), também chamada de célula estromal mesenquimal multipotente, pela capacidade de autorrenovação, aderência ao plástico em condições de cultura; capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares formadoras de tecidos, tais como osteoblastos, adipócitos, e condrócitos; expressão positiva dos marcadores de superfície celular CD73, CD90 e CD105, e negativa dos marcadores hematopoiéticos CD34, CD45, CD1, CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006) (Figura 4).

Historicamente as CTM são consideradas hipoimunogênicas porque expressam níveis baixos de MHC-I, e não expressam outros marcadores da classe MHC-II e moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86 o que lhes permite evitar as rejeições imunológicas (BRUNA et al., 2016).

Figura 4 - Representação gráfica das características das célula-tronco mesenquimais. De acordo com a definição da Sociedade Internacional de Terapia Celular, evidencia-se a capacidade de autorrenovação; aderência ao plástico; diferenciação em múltiplas linhagens celulares formadoras de tecidos; e a expressão positiva e negativa de distintos marcadores.



Fonte: do próprio autor (2018).

As CTM podem ser obtidas a partir de vários tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, polpa dental, cordão umbilical e derme (JEREMIAS et al., 2014; LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; MOTEGI; ISHIKAWA, 2017). Em trabalho desenvolvido por Jeremias (2013), nas dependências do Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual da Universidade Federal de Santa Catarina (LACERT/UFSC) foi padronizada a cultura das CTM da derme facial (CTMd) utilizadas nesse estudo. Essas células foram cultivadas a partir de excedentes de pele de cirurgias de lifting facial (ritidoplastia) e caracterizadas como CTM (JEREMIAS et al., 2014).

Na literatura científica observamos que a nomenclatura célula estromal mesenquimal (MSC) é utilizada em substituição à células-tronco mesenquimais (CTM), havendo um amplo debate a respeito da nomenclatura adequada. Muitos pesquisadores defendem o uso de MSC como mais adequado, pois afirmam que as características conhecidas das MSCs são inconsistentes para serem designadas como CT biologicamente funcionais. O termo CTM não é errôneo quando utilizado em um subconjunto de células mesenquimais que demonstram a atividade das CT por critérios rigorosos (HORWITZ; ANDREEF; FRASSONI, 2006;

LINDNER et al., 2010). Nesse estudo optou-se pela utilização do termo CTM em função do conhecimento das características dessa célula, já padronizada em estudo anterior no LACERT/UFSC (JEREMIAS, 2013).

O reparo tecidual é um processo complexo, que para ocorrer de maneira adequada requer migração celular, processo inflamatório, angiogênese, formação tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016). As CTM possuem papel ativo nesse processo e vem demonstrando diversos resultados em função de apresentar propriedades imunomoduladoras migrando ao local da lesão e apresentando resposta quimiotática na modulação de sinais inflamatórios, reparação de tecidos lesados possuindo assim grande potencial terapêutico. Com isso, é clara a importância do papel dessas células em todas as fases do reparo tecidual (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; SANJARI; HAJJAR; MOMENI-MOGHADDAM, 2015). Estudos recentes do processo de reparo de lesões, tem buscado a associação das CTM e biomateriais e/ou substitutivo dérmicos com o objetivo de promover o reparo efetivo das lesões (JEREMIAS et al., 2014).

1.6 MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA

Lesões graves de pele, como queimaduras extensas, traumas e úlceras crônicas, exigem uma cobertura que proporcione a reparação e restauração da função do tecido. Esta cobertura, geralmente, corresponde ao enxerto autólogo de pele. Contudo, a remoção de pele saudável para a realização da cobertura é um processo invasivo e doloroso para os pacientes, além de, em alguns casos, ser impossível a obtenção do enxerto, como em pacientes com queimaduras extensas (VARKEY; DING; TREDGET, 2015; WONG; CHANG, 2009). Em lesões que ultrapassam 30 % a 40 % da superfície corporal, a área doadora disponível e com viabilidade para enxertia geralmente é menor que a área lesionada e as condições clínicas do paciente não permitem a utilização da mesma (LEONARDI, 2008). As Matrizes de regeneração dérmica (MRD) atuam como substitutos cutâneos de forma a regenerar uma neoderme de características histológicas semelhantes à derme normal sobre a qual se irá assentar o enxerto epidérmico (MAES et al., 2012).

Um substitutivo dérmico de degradação programada cumpre a função da cobertura do leito queimado excisado permitindo o desenvolvimento de um tecido histologicamente semelhante à derme normal com neoformação vascular, síntese de colágeno e de elastina. A MRD Integra® Dermal Regeneration Template (Integra Life - Sciences

Inc. USA) corresponde a uma membrana bilaminar, com a camada externa composta por uma lâmina de silicone de 0,1 mm de espessura, que simula a função da epiderme, controlando a perda de fluidos e agindo como barreira mecânica contra microrganismos. A camada interna é composta por fibras de colágeno bovino unidas a um glicosaminoglicano (6 – sulfato de condroitina) derivado da cartilagem de tubarão. Esta camada apresenta uma trama microporosa de aproximadamente 80 µm de diâmetro por onde ocorre a migração de fibroblastos e de células endoteliais provenientes da camada basal permitindo a formação de uma derme autógena, 14 a 21 dias após o implante (BURKE et al., 1981). Contudo, após esse período há necessidade de autoenxerto de cobertura epidérmica para regeneração deste componente da pele, ou seja, depende da disponibilidade de áreas doadoras do paciente (MAES et al., 2012). Dessa forma torna-se evidente a necessidade de uma nova cobertura tecidual que permita ao mesmo tempo a regeneração das duas camadas da pele, a derme e a epiderme, de forma a preservar as características originais do tecido (VAN ZUIJLEN et al., 2015).

Apesar das vantagens da MRD Integra®, como melhora na elasticidade, menor morbidade da área doadora, resultados funcionais e estéticos superiores, quando comparado a enxertos convencionais, suas desvantagens estão no alto custo (JONES; CURRIE; MARTIN, 2002; LEONARDI, 2008), necessidade de dois procedimentos cirúrgicos (CONDUTA et al., 2012), além da curva de aprendizado e do tempo longo para a neovascularização (JONES; CURRIE; MARTIN, 2002; LEONARDI et al., 2012).

A fim de prover um tratamento efetivo e que proporcione a viabilidade no reparo tecidual, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no que se refere à utilização da MRD e a engenharia tecidual (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; VAN ZUIJLEN et al., 2015; WONG; CHANG, 2009). Há descrições na literatura de tentativas de modificações no substituto buscando sua otimização, utilizando-se de células endoteliais alogênicas e fatores de crescimento autólogo (SOEJIMA et al., 2013) e incorporação de antibióticos (CHUA et al., 2016). Assim, a terapia por pressão negativa (TPN), curativo a vácuo associando uma esponja de poliuretano à MRD, tem demonstrado resultados favoráveis com redução na taxa de complicações e neovascularização melhor e mais rápida, notado pelos sinais clínicos (GOULART et al., 2010). Goulart, et al (2010) em estudo no Hospital Infantil Joana de Gusmão, cita que o tempo de maturação da MRD sem uso da TPN é em média de 21 dias, enquanto o tempo médio com o uso

da TPN passou a ser de 15,88 dias, corroborando com dados da literatura (GOULART et al., 2010; MAEGELE et al., 2008).

Em 2012, Leonardi e colaboradores demonstraram que a associação de MRD Integra® com CTM de medula óssea murina propicia a proliferação dessas células em modelo *in vivo* de defeito cutâneo com reparação tecidual e neovascularização (LEONARDI et al., 2012). O trabalho de Jeremias (2013), realizado no LACERT/UFSC demonstrou que o tratamento de lesões de espessura total de pele em camundongos com CMTd associadas à MRD aumenta o tecido de granulação, promove o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), estimula a vascularização, o depósito de colágeno e a reepitelização acelerando o reparo tecidual.

1.7 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) é definido como a porção do plasma sanguíneo, obtida através de protocolos de centrifugação com concentração plaquetária superior aos níveis de referência (CASTRO, 2013; DUAN et al., 2011; MARX, 2004).

O PRP é uma tecnologia terapêutica endógena que vem despertando o interesse da medicina regenerativa em função do seu potencial de estimular e acelerar o tecido de cicatrização (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). O PRP estimula a angiogênese promovendo o crescimento vascular e a proliferação de fibroblastos. Além disso, tem função hemostática devido a formação do coágulo de fibrina. A aplicação de PRP aumenta a cicatrização em tecidos moles e tecidos duros como o osso. No tratamento de queimaduras, o PRP aumenta as taxas de regeneração cutânea e de absorção após o enxerto de pele e acelera a reepitelização (PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010).

O PRP é um produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, que tem sido utilizado para acelerar o reparo das feridas cirúrgicas pela ação dos fatores de crescimento que contém (CASTRO, 2013; MARX, 2004). Os fatores de crescimento presentes no PRP estão estocados nos grânulos α das plaquetas. A secreção destes fatores inicia com a formação do coágulo e consequente ativação plaquetária. Os grânulos se fundem com a membrana das plaquetas e os fatores são secretados. Cerca de 95 % dos fatores de crescimento são secretados na primeira hora de sua ativação. Após a liberação inicial, as plaquetas sintetizam e secretam fatores adicionais pelos sete dias restantes do seu ciclo de vida (CASTRO, 2013; GASSLING et al., 2009; MARX, 2004).

Dentre os fatores presentes no PRP, encontram-se: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento epidermal (EGF), do tipo insulina 1 e 2 (IGF 1-2), e fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). Estes fatores desempenham um papel importante na fase de remodelação tecidual por recrutamento de células mesenquimais e síntese de matriz extracelular com destaque na síntese de colágeno (MAGHSOUDI; NEZAMI; MIRZAJANZADEH, 2013). O PRP por apresentar-se efetivo na proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular, principalmente do colágeno, facilita o reparo tecidual estimulando a angiogênese, melhorando a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilagosos ou adiposos, bem como estimula a cicatrização de feridas (CASTRO, 2013; CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018; VENDRAMIN; FRANCO; FRANCO, 2009).

Apesar de alguns estudos sugerirem que os efeitos do PRP em feridas de queimaduras sejam benéficos, a reparação e regeneração de tecidos deve ser melhor compreendida (PALLUA; WOLTER; MARKOWICZ, 2010). VENTER e colaboradores (2016), estudaram a aplicação de PRP em queimaduras em modelo murino verificando processo de cicatrização em lesões de segundo grau mais rápido em indivíduos hígidos e em diabéticos (VENTER et al., 2016).

O trabalho de Castro (2013) realizado no LACERT/UFSC demonstrou *in vitro* que a associação da MRD com as CTMd e o PRP constituem um microambiente efetivo para o crescimento, a viabilidade, a adesão e a diferenciação das CTMd apresentando grande potencial para a engenharia de tecidos. Além disso, Chicharro-Alcántara et al. (2018), afirmam que o PRP pode ser um tratamento seguro e de baixo custo no reparo de lesões cutâneas, possibilitando a redução do período de recuperação e, portanto, melhora a qualidade de vida dos pacientes que dele se beneficiam.

1.8 JUSTIFICATIVA

Uma das finalidades do presente estudo é a obtenção de conhecimento e desenvolvimento tecnológico de regeneração e reparo de pele possibilitando uma posterior aplicação clínica no SUS. O SUS proporciona o atendimento a pacientes queimados em Centros de Tratamento de Queimados credenciadas como de alta e média complexidade de acordo com as portarias do Ministério da Saúde GM 1273 / MS e GM 1274/MS do ano de 2.000. O desenvolvimento de uma

tecnologia terapêutica, que favoreça a regeneração das camadas dérmicas e epidérmicas em procedimento com maior eficiência e que promova a recuperação mais rápida do paciente, com redução do risco de infecções e outras morbidades representa uma grande economia em relação aos custos e tempo de internação. Além disso, permite ao paciente retornar ao seu meio com o mínimo de sequelas estéticas e funcionais. Há, portanto, uma aplicabilidade clínica importante deste estudo.

Evidencia-se na literatura que a utilização de MRD junto à TPN trouxe vantagens ao tratamento das lesões por queimaduras (HOP et al., 2014; PEREIMA et al., 2013). Além da diminuição do sofrimento do paciente com a redução significativa dos dias de internação junto às decorrências negativas de uma maior permanência no hospital como uma menor exposição aos processos infecciosos, melhora na qualidade do tecido cicatricial, a redução dos custos nas diárias de internação, em contrapartida aos altos custos da tecnologia empregada (MRD e TPN). Mesmo com as vantagens citadas, restam pontos a serem resolvidos em função de se obter tecnologias mais baratas e disponíveis a toda a população que dela necessita, assim como a busca de cobertura cutânea com melhor qualidade e agilidade na reparação. Dentro dessa alternativa clínica, o PRP apresenta vantagem no processo de reparo, por ser um fator de baixo custo e risco e por se tratar de utilização autóloga, levando à hipótese de que a sua associação aos outros elementos da engenharia de tecidos poderia incrementar a diminuição dos dias de internação além de proporcionar um melhor tecido cicatricial. Com isso, nesse estudo pretende-se avaliar de forma preliminar em estudo clínico se o uso do PRP autólogo em cirurgias reparadoras de sequelas de queimadura em membros superiores associado à MRD e TPN contribui para o processo de reparo tecidual e a qualidade da cicatriz em relação ao tempo.

Castro (2013), realizou estudos *in vitro* no LACERT/UFSC utilizando o PRP, MRD e CTMd com resultados efetivos na adesão e colonização das CTMd na MRD quando comparadas ao controle sem uso do PRP. No presente trabalho complementamos os experimentos de Castro (2013), avaliando *in vitro* os efeitos do PRP na migração e proliferação das CTMd, importantes no processo de reparo tecidual. Além disso, realizamos estudos *in vivo* do uso da engenharia tecidual com a associação do PRP com MRD e CTMd no reparo das lesões cutâneas, em modelo pré-clínico murino.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação dos produtos da engenharia tecidual (células-tronco mesenquimais da derme facial, plasma rico em plaquetas e matriz de regeneração dérmica) no reparo de lesões cutâneas *in vitro*, em estudo pré-clínico, e em estudo clínico preliminar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Parte I

Realizar estudo preliminar de caso clínico e utilização da engenharia tecidual associando plasma rico em plaquetas autólogo, matriz de regeneração dérmica e terapia por pressão negativa na reconstrução cirúrgica das sequelas de queimaduras, avaliando:

2.2.1.1 Aspectos macroscópicos da lesão *in vivo*, observando visualmente e por meio de fotografias a evolução do processo de reparo tecidual, sinais de infecção, edema e presença de exsudato, nos dias 7, e 14 pós-operatórios.

2.2.1.2 Instrumentalmente a cicatriz em tempo posterior à realização do procedimento cirúrgico.

2.2.2 Parte II

Avaliar *in vitro* a associação do plasma rico em plaquetas humano na migração e proliferação celular das células-tronco mesenquimais da derme facial.

2.2.3 Parte III

Realizar estudo pré-clínico da utilização de engenharia tecidual associando plasma rico em plaquetas, células-tronco mesenquimais da derme facial à matriz de regeneração dérmica em lesões de espessura total em camundongos em diversas abordagens avaliando:

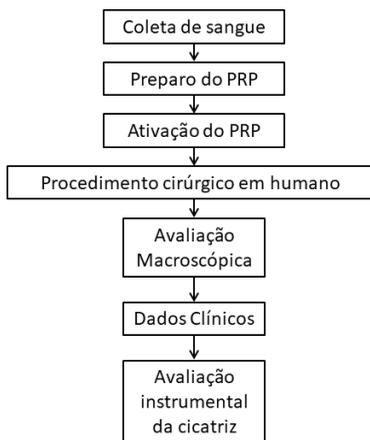
2.2.3.1 Aspectos macroscópicos da lesão *in vivo*, observando visualmente e por meio de fotografias a evolução do processo de reparo tecidual pela mensuração da lesão, sinais de infecção, edema e presença de exsudato, nos dias 3, 7, e 18 pós-operatórios.

2.2.3.2 Histologicamente, formação do tecido de granulação, colonização da matriz de regeneração dérmica, infiltrado inflamatório, neoformação vascular, formação das fibras de colágeno, e a reconstituição da derme e epiderme.

3 METODOLOGIA

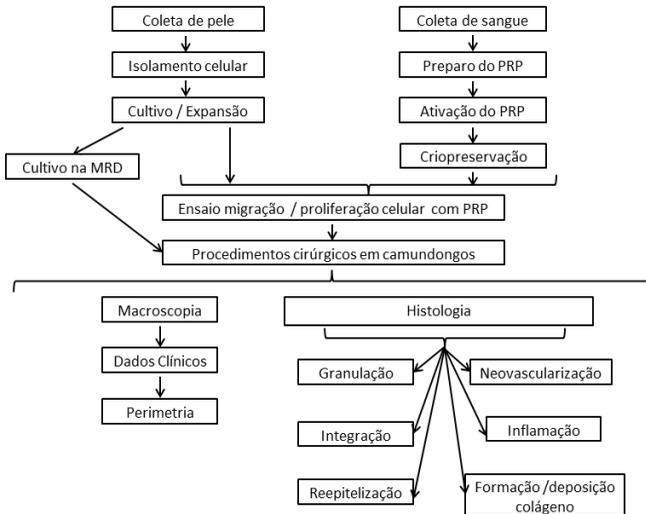
O percurso metodológico desse trabalho foi realizado conforme desenho experimental descrito nas figuras 5 e 6, e será apresentado em três partes de acordo com os objetivos propostos no estudo: (I) estudo preliminar de caso clínico, (II) estudo *in vitro*, (III) estudo pré-clínico.

Figura 5 - Esquema representativo do desenho experimental do trabalho quanto ao estudo preliminar de caso clínico. Realizou-se a coleta de sangue do paciente no momento pré-cirúrgico durante indução anestésica e o preparo e ativação do plasma rico em plaquetas (PRP). Assim iniciado o procedimento cirúrgico, o PRP foi aplicado na excisada. Após a realização do procedimento cirúrgico, nos dias 7 e 14 realizou-se a análise macroscópica da lesão e as biópsias de pele, com o objetivo de analisar as condições descritas na figura. A avaliação instrumental da cicatriz foi realizada 6 meses após a efetivação do procedimento operatório.



Fonte: do próprio autor (2018).

Figura 6 - Esquema representativo do desenho experimental do trabalho quanto aos estudos *in vitro* e pré-clínico. A partir da coleta de pele humana das cirurgias de *lifting* facial proveniente de tecidos que seriam descartados nesses procedimentos, realizou-se o isolamento, cultura e expansão celular. As células foram utilizadas em experimentos posteriores de migração e proliferação celular em ensaios de *cell scratch* e BrdU com PRP em diferentes proporções ou foram cultivadas em matriz de regeneração dérmica (MRD) para uso nos procedimentos cirúrgicos em camundongos. Foi realizada a coleta de sangue humano de doadores, seguido de preparo e ativação do PRP e a criopreservação para uso nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Após os procedimentos cirúrgicos nos camundongos, realizou-se a análise macroscópica da lesão e a coleta de amostras de pele para histologia, com o objetivo de analisar as condições descritas na figura.



Fonte: do próprio autor (2018).

3.1 PARTE I - ESTUDO PRELIMINAR DE CASO CLÍNICO DE UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ASSOCIANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO, MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E TERAPIA POR PRESSÃO NEGATIVA NA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DAS SEQUELAS DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL

O estudo preliminar de caso clínico foi realizado em um indivíduo humano utilizando elementos da engenharia tecidual, sendo o plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo, matriz de regeneração dérmica (MRD) e terapia por pressão negativa (TPN) na reconstrução cirúrgica das sequelas de queimaduras com a prerrogativa de observar os dados clínicos da lesão a curto e longo prazo, e também formas e maneiras de realização dos procedimentos instrumentais e laboratoriais, os quais auxiliaram na construção do desenho metodológico dos estudos *in vitro* e pré-clínico desse trabalho.

3.1.1 População e amostra

O estudo preliminar foi realizado em um sujeito com deficiência funcional grave (OMS, 2015), decorrente de queimadura, ou seja, com restrição de função corporal em decorrência da sequela da lesão (AGBENORKU, 2013; VANA; SCHIOZER, 2013), em membros superiores, especificamente em braço e antebraço. O sujeito de estudo, foi um paciente em acompanhamento no Ambulatório de Queimaduras do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG) em Florianópolis-SC. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HIJG - Parecer Consubstanciado 828.101 de 11/09/2014 – nº CAAE 35465114.6.0000.5361 (Anexo C).

3.1.2 Descrição do caso clínico e procedimentos

A coleta dos dados ocorreu em 2015 como estudo piloto nas dependências do HIJG, em paciente submetido a procedimento cirúrgico ocorrido em 28 de janeiro de 2015. Após a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) assinado pela responsável legal e o termo de assentimento (TA) assinado pelo paciente.

O paciente 001, 13 anos de idade, sexo masculino, histórico de queimadura ocorrida em 01/12/2013, com 50 % de superfície corporal queimada (SCQ), apresentando lesões de espessura parcial profunda e espessura total (essas principalmente em área axilar). O agente causal da

lesão foi álcool líquido. A primeira internação ocorreu no período de 01/12/2013 à 18/02/2014 tendo o paciente realizado 5 intervenções cirúrgicas de enxertia de pele em membros superiores e pescoço. Após 14 meses decorridos da lesão o paciente 001 retornou ao HIJG para realização de cirurgia corretiva de seqüela na axila direita que limitava a menos de 90° a amplitude de movimento (ADM) do membro superior direito e apresentava cordão fibroso bem evidente na região do pilar anterior dessa axila, caracterizando como deficiência funcional grave (OMS, 2015). As seqüelas encontradas no paciente 001 deveram-se à profundidade da lesão ocorrida, conduta inadequada de adesão ao tratamento ambulatorial onde o mesmo não prosseguiu com o tratamento fisioterapêutico e não fez o uso da malha compressiva adequadamente além de não utilizar os cosméticos hidratantes recomendados pela equipe do HIJG.

Foram realizadas as seguintes etapas durante o procedimento cirúrgico: indução anestésica, colheita de sangue e obtenção do PRP autólogo, preparo do campo operatório, demarcação da área, ressecção da cicatriz patológica/seqüela, inoculação do PRP no leito da ferida, cobertura da área operada com MRD, curativo com TPN e acompanhamento pós-operatório. O curativo com TPN foi realizado com a colocação de espuma de poliuretano hidrofóbica, selamento com filme plástico e colocação de pressão negativa de 100 mmHg, via bomba de vácuo, em modo contínuo. A troca do curativo com TPN ocorreu após 7 dias, e posteriormente no dia em que foi realizado o segundo tempo cirúrgico.

O segundo tempo cirúrgico foi realizado após 14 dias (após a neoderme da MRD atingir sua maturação adquirindo coloração amarelo alaranjada) e esse consistiu na aplicação de um enxerto de pele autóloga fina (0,3 mm de espessura) sobre a área tratada.

Nos dias 07 e 14 após a intervenção cirúrgica e aplicação da MRD foram realizadas biópsias com o uso de um *punch* de 6 mm na área central da lesão. As amostras coletadas nas biópsias foram fracionadas em 2 partes: uma para avaliação histológica e outra para a análise molecular. As amostras foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga com reagentes específicos para transporte e foram processadas e armazenadas no LACERT/UFSC (Figura 7).

No 21° dia de pós-operatório, em 18 de fevereiro de 2015, o curativo do paciente 001 foi aberto e pode-se verificar a completa integração do enxerto de pele que ocorreu sem intercorrências clínicas no período.

Figura 7 - Procedimento cirúrgico e resultado final de enxertia de pele. (A) Aplicação de PRP autólogo humano na área excisada. (B) Cobertura da área excisada após aplicação do PRP com MRD. (C) Cobertura da MRD com espuma de poliuretano impregnada com prata micronizada e TPN no 1º momento operatório. (D) Biópsia realizada com *punch* de 6 mm na área central da lesão no 14º dia pós-operatório. (E) Enxerto cutâneo em malha aplicado no 14º dia pós-operatório. (F) Aspecto do enxerto cutâneo em malha com excelente aderência e pega no 21º dia pós-operatório.



Fonte: do próprio autor (2018).

3.1.3 Obtenção, preparo e aplicação do plasma rico em plaquetas humano autólogo

O PRP foi preparado de acordo com o protocolo modificado de Vendramin; Franco; Franco (2009), estabelecido no LACERT/UFSC.

O sangue periférico foi coletado em bolsa de coleta sanguínea contendo solução anticoagulante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina) na quantidade de 0,14 mL de CPDA-1 para cada 1 mL de sangue coletado. (CPDA-1). Coletou-se aproximadamente 73 mL de sangue e o conteúdo foi transferido para dois tubos de centrifuga de 50 mL, sendo dividido em duas partes iguais.

O sangue coletado foi centrifugado a 400 X g por 10 minutos, formando três fases: uma inferior vermelha contendo as hemácias, outra superior amarelada contendo o plasma e as plaquetas, e entre elas uma terceira fase fina e esbranquiçada chamada de zona de névoa (*buffy coat*) contendo plaquetas maiores e leucócitos. A fase superior foi coletada até a borda da zona da névoa e transferida para outro tubo. Desta fase foram reservados 85 µL para cada 1 mL de plasma obtido para uso no preparo

da trombina autóloga e 500 μL para a plaquetometria. A plaquetometria foi realizada em equipamento automatizado, gentilmente cedido pelo Laboratório Médico Ciência localizado dentro das dependências do HIJG. O restante foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos, para a formação do precipitado (pellet) de plaquetas. Após a centrifugação acima foram separados 5/6 do sobrenadante, denominado de plasma pobre em plaquetas (PPP). O precipitado foi ressuspensionado no restante (1/6) do PPP. A trombina autóloga foi preparada pela adição de 250 μL de gluconato de cálcio a 10 % para cada 1 mL de plasma (retirado após a primeira centrifugação do PRP e destinado para produção da trombina) e mantido a 37 °C em banho maria por 25 minutos, ocorrendo a gelificação do plasma. O gel formado foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos, resultando na separação de um líquido claro, contendo a trombina. A ativação do PRP foi realizada pela adição da trombina autóloga ao PRP na proporção de 1 : 5 (1 parte de trombina e 4 partes de plasma).

Após a obtenção do PRP ativado, o mesmo foi acondicionado em seringa de 20 mL e realizado a aplicação no leito da lesão, posterior à ressecção cirúrgica do plastrão cicatricial. Aplicou-se a quantidade de 10 mL de PRP para cada 4 % de superfície corporal queimada (SCQ) (KLOSOVÁ et al., 2013). Logo após a aplicação, a lesão foi coberta pela MRD, e seguiram-se os procedimentos com a TPN, conforme descrito no item acima.

3.1.4 Análises histológicas

Na coleta de material realizada por biópsia das lesões nos dias 7 e 14 após intervenção cirúrgica, foram obtidas duas amostras em cada dia sendo uma destinada à histologia e outra destinada à análise molecular. No LACERT/UFSC as amostras destinadas à análise molecular foram criopreservadas em freezer - 80 °C.

As amostras destinadas à histologia foram imediatamente fixadas em paraformaldeído 4 % por 24 horas e transferidas para álcool 70 %, desidratadas progressivamente em álcool 90 % e 100 %, diafanizadas em xilol I e II, parafinizadas em parafina I, II e III e emblocadas em parafina. Os blocos com as amostras parafinizadas foram seccionados em cortes ultrafinos de 5 μm resultando em lâminas histológicas, as quais foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) / UFSC por meio de protocolo próprio do setor. Após a coloração de HE, todas as lâminas foram fotografadas, em aumento de 40 X utilizando o digitalizador de lâminas (Axio Scan Z1-Carl Zeiss Microscopy GmbH). As imagens foram analisadas por meio

do *software Zen 2012 blue edition*® – Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011.

Não foi possível realizar nenhuma análise histológica conclusiva pois constatou-se após a digitalização das imagens, que as amostras coletadas eram muito superficiais e pequenas não sendo possível avaliar nenhum parâmetro do tecido em relação ao processo de reparo.

3.1.5 Avaliação da cicatriz

No período de 6 meses de pós-operatório do primeiro procedimento cirúrgico, em 14 de agosto de 2015, realizou-se no Ambulatório de Queimaduras do HIJG a avaliação instrumental da cicatriz por meio do equipamento *Cutometer*® - MPA 580 (Courageand Khazaka Electronic GmbH, Koln, Germany), calibrado, sonda com abertura de 2 mm, vácuo de 500 mbar (375 mmHg), aplicado na superfície da área selecionada por um segundo de sucção e um segundo de relaxamento, ou pressão normal, sendo esta medida repetida por três vezes (três curvas), parâmetro R0 (elasticidade bruta), de acordo com o protocolo de Gonçalves et al. (2013). Esse procedimento contou com a colaboração da Dra. Natalia Gonçalves da UFSC, para a mensuração e da Dra. Lídia Aparecida Rossi da USP - Ribeirão Preto, que gentilmente cedeu o equipamento para uso nesse estudo.

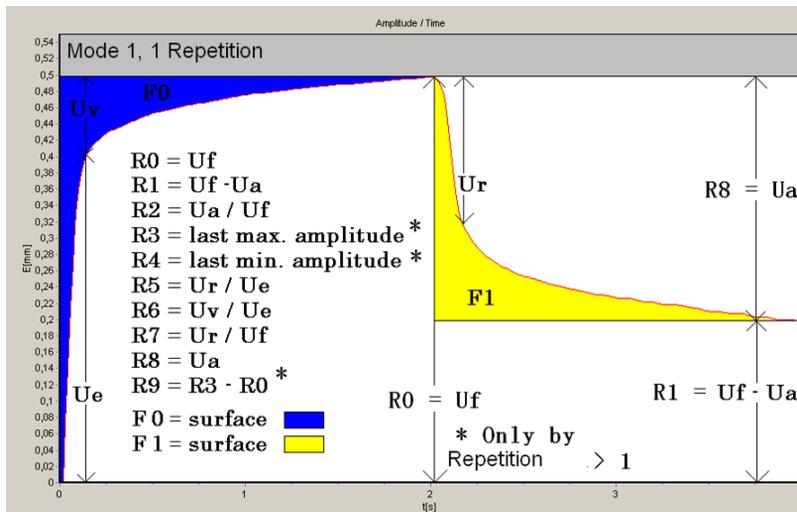
A avaliação foi realizada em ambiente controlado, com umidade de 70 % e temperatura 23 °C, com tempo de adaptação do paciente de 10 minutos, uma única vez em cada área selecionada. Foram mensurados os seguintes parâmetros na área cicatricial e em uma área lateral sem tecido cicatricial para controle:

Viscoelasticidade da pele: as medidas foram realizadas com o equipamento *Cutometer*® MPA580. O princípio de funcionamento do equipamento baseia-se em medidas das propriedades mecânicas (firmeza e elasticidade) da pele através de uma leve sucção controlada. O equipamento emite um sistema de pressão negativa de 500 mbar (375 mmHg) capaz de promover deformação mecânica e instantânea da pele. O teste é programado de forma que durante um segundo a sucção é realizada e durante um segundo a sucção é abolida. O software do equipamento gera um gráfico com os parâmetros R (relativos) calculados automaticamente, mostrados na figura 8.

Foram analisados os seguintes parâmetros R das curvas: R0 (valor absoluto em mm): distensão - máxima extensão da pele/elongação máxima (deformação total); que avalia fase elástica e plástica da pele. R1 (valor absoluto em mm): retorno da pele ao normal. R2 (valor relativo):

elasticidade bruta. R3 (valor absoluto em mm): ponto mais elevado da última curva. R4 (valor absoluto em mm): ponto mais baixo da última curva. R5 (valor relativo): elasticidade líquida. R6 (valor relativo): viscoelasticidade. R7 (valor relativo): elasticidade biológica. R8 (valor absoluto em mm): retorno total. R9 (valor absoluto em mm): fadiga da pele, $R9 = R3 - R0$.

Figura 8 - Curvas de medidas dos parâmetros R do equipamento *Cutometer* MPA 580. As propriedades biomecânicas do instrumento são calculadas por meio de curva que ilustra a deformação imediata ou a extensibilidade da pele (U_e), distensão atrasada ou viscoelasticidade (U_v), deformação final (U_f), retração imediata (U_r) e retração final (U_a). A curva dos valores em milímetros da deformação da pele obtida é analisada por meio do *software* específico do equipamento.



Fonte: *Information and Operating Instructions for the Cutometer® MPA 580* (CK ELECTRONIC GMBH, 2010).

Eritema e melanina da pele: Para a avaliação desses índices foi utilizada a sonda acessória *Mexameter®*. O princípio de medição para as leituras de melanina e eritema baseia-se numa fonte de luz com três comprimentos de onda específicos, cuja radiação é absorvida pela pele e refletida de forma difusa. Um fotodetector analisa a reflexão difusa da pele para esses dois índices. A melanina é medida por meio de dois comprimentos de onda. Esses comprimentos de onda foram determinados

de tal forma a obter duas relações diferentes de absorção pelos pigmentos da melanina. Para a determinação do eritema também são utilizados dois comprimentos de onda: um destes corresponde ao pico de absorção espectral da hemoglobina e o outro foi escolhido de forma a impedir a influência de outras cores (como a da bilirrubina).

3.1.6 Análises moleculares

Foram processadas as amostras coletadas do sujeito de estudo e armazenadas a amostra de RNA em freezer - 80 °C, assim como o cDNA em freezer - 20 °C para criopreservação caso exista interesse de análise em estudo futuro da expressão de genes humanos importantes para o reparo tecidual.

Realizou-se o teste para GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase humana), conforme protocolo do quite de teste RT2 Profiler PCR Arrays – n ° 330231 (Qiagen). A amostra armazenada foi positiva para GAPDH, o que garante a qualidade da mesma.

3.1.7 Análises estatísticas

Os dados coletados foram tabulados no Programa Microsoft Excel, versão 2010®.

Para análise dos mesmos, utilizou-se a estatística descritiva, por meio de frequência simples e percentual.

3.2 PARTE II - ESTUDO *IN VITRO* DE AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL

3.2.1 Isolamento e cultivo celular das células-tronco mesenquimais da derme facial

O procedimento de obtenção, isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais da derme facial (CTMd) humanas foi realizado de acordo com protocolo estabelecido no LACERT/UFSC por Jeremias (2013).

3.2.1.1 Obtenção das amostras de pele humana

As amostras de pele humana foram obtidas por meio de colaboração com o Ilha Hospital e Maternidade (Florianópolis/SC) e Hospital Universitário da UFSC (Florianópolis/SC) provindas de pacientes humanos submetidos a cirurgias plásticas de *lifting* facial (ritidoplastia), com idade entre 48 e 66 anos, os quais realizaram a doação após a apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O fragmento de tecido foi coletado e armazenado a 4 °C em recipiente estéril, contendo solução salina fosfatada (PBS) acrescida de antibióticos (penicilina e estreptomicina - PS) (1 U/ μ g - Gibco) e encaminhado ao LACERT/UFSC, onde foram realizados os procedimentos de cultura celular. Todos os procedimentos realizados foram previamente aprovados pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) - Parecer Consubstanciado 1.500.162 - nº CAAE 37167014.9.0000.5355 (Anexo D).

3.2.1.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais da derme facial

As amostras foram manipuladas em fluxo laminar na sala de cultura celular do LACERT/UFSC. Os fragmentos de pele foram cortados em pedaços de aproximadamente 2,0 cm² e incubados com 12,5 U/mL de dispase (BD) durante 15 horas, a 4 °C. Após este período, os fragmentos foram imersos em PBS em placa de Petri. A epiderme e o tecido celular subcutâneo foram removidos e a derme incubada em solução de tripsina a 0,25 % e EDTA a 0,02 % (Gibco) durante 45 minutos, a 37 °C. Após o bloqueio da reação enzimática com DMEM (Gibco) acrescido de 10 % de

soro bovino fetal (SBF), a suspensão de células foi filtrada com *cell strainer* de 70 μm (BD) e centrifugada durante 7 minutos a 300 X g. As células foram ressuspensas em DMEM suplementado com 20 % de SBF e antibiótico (PS) e mantidas em garrafas de cultura de 25 cm^2 a 37 °C, em 5 % de CO_2 e 95 % de umidade. Após 7 dias, o meio de cultivo foi trocado e as células não aderentes descartadas. Ao atingir confluência de 80 % a 90 %, as células foram incubadas com a solução de tripsina/ EDTA durante 5 minutos a 37 °C, e a reação enzimática bloqueada como descrito acima. As células foram novamente mantidas em DMEM suplementado com 10 % de SBF a uma densidade de 5×10^4 células / 25 cm^2 sendo esta cultura denominada de passagem 1. O procedimento foi repetido até 20 vezes, gerando culturas entre as passagens 1 e 20. Nos experimentos onde foram coletados os dados do estudo, utilizou-se apenas as passagens entre 7 e 10 no cultivo celular na MRD para uso no procedimento cirúrgico e as passagens entre 7 e 12 nos estudos *in vitro*, sendo as demais passagens utilizadas apenas para testes e procedimentos piloto de rotina.

3.2.2 Cultivo celular em matriz de regeneração dérmica

As CTMd foram obtidas conforme descrito no item 3.2.1 e semeadas sobre a matriz de regeneração dérmica (MRD) para uso nos procedimentos cirúrgicos em camundongos. A MRD foi fragmentada em formato circular de 6 mm de diâmetro com auxílio de *punch* cirúrgico do mesmo tamanho, e imersas em PBS durante 10 minutos e em seguida em DMEM acrescido de 10 % SBF por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período, a MRD foi posicionada em placas de 96 poços, com a camada de silicone em contato com a superfície da placa de cultivo e a camada de colágeno voltada para a parte superior do poço. A suspensão de 3×10^5 CTMd (em 150 μL de meio de cultivo) foi preparada e semeada sobre cada fragmento de matriz com auxílio de micropipeta e então incubada durante uma hora em estufa a 37 °C, 5 % CO_2 e 95 % de umidade. Logo após, o volume de meio foi complementado com DMEM acrescido com 10 % de SBF e antibiótico. Esse cultivo ocorreu 48 horas antes da realização do procedimento cirúrgico.

3.2.3 Obtenção e preparo do plasma rico em plaquetas humano

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado de acordo com o protocolo modificado de Vendramim; Franco; Franco (2009), estabelecido no LACERT/UFSC por Castro (2013).

O sangue periférico de doadores foi coletado mediante apresentação e assinatura do TCLE. De cada doador foram coletados 10 mL de sangue e distribuídos em um tubo de coleta de 15 mL contendo solução anticoagulante CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina) na quantidade de 0,14 mL de CPDA-1 para cada 1 mL de sangue coletado. Para compensar as diferenças individuais nos níveis de fatores de crescimento, o PRP foi preparado com sangue de dois doadores.

O sangue coletado foi centrifugado a 400 X g por 10 minutos formando três fases: uma inferior vermelha contendo as hemácias, outra superior amarelada contendo o plasma e as plaquetas, e entre elas uma terceira fase, fina e esbranquiçada, chamada de zona de névoa (*buffy coat*), contendo plaquetas maiores e leucócitos. A fase superior foi coletada até a borda da zona da névoa e transferida para outro tubo. Desta fase foram reservados 85 μ L para cada 1 mL de plasma obtido a fim de ser utilizado no preparo da trombina autóloga e 500 μ L para a plaquetometria. O restante foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos, para a formação do precipitado (*pellet*) de plaquetas. Após a centrifugação acima foram separados 5/6 do sobrenadante, denominado de plasma pobre em plaquetas (PPP). O precipitado foi ressuspensionado no restante (1/6) do PPP. A plaquetometria foi realizada pela contagem de plaquetas em câmara de Neubauer e ajustadas com PPP para uma densidade de 10^9 plaquetas/mL. A trombina autóloga foi preparada pela adição de 250 μ L de Gluconato de Cálcio a 10 % para cada 1 mL de plasma (retirado após a primeira centrifugação do PRP e destinado para produção da trombina) e mantido a 37 °C em banho maria por 25 minutos, ocorrendo a gelificação do plasma. O gel formado foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos, resultando na separação de um líquido claro, contendo a trombina. A ativação do PRP foi realizada pela adição da trombina autóloga ao PRP na proporção de 1 : 5 (1 parte de trombina e 4 partes de plasma). Após a obtenção do PRP ativado, o mesmo foi armazenado em freezer – 80 °C em alíquotas de 200 μ L para criopreservação até a sua utilização.

3.2.4 Ensaio de migração celular

A migração *in vitro* de CTMd cultivadas com PRP foi realizada pelo método de *cell scratch* no LACERT/UFSC (ZHANG et al., 2013). O ensaio consiste na realização de uma lesão na superfície da monocamada de células confluentes e avaliação do fechamento da área dessa lesão pela migração celular. Para tal, as células foram mantidas em placas de 24 poços em condições padrão de cultivo até atingirem

confluência de aproximadamente 90 %. Os poços foram divididos em dois grupos controle: (1) com DMEM F12 e (2) DMEM F12 acrescido de 15 % de SBF. Os grupos de intervenção foram tratados todos com DMEM F12 e PRP nas diluições: (3) 1:25; (4) 1:50; (5) 1:100; e (6) 1:200. Após este período foi realizada uma raspagem na camada de células utilizando uma ponteira de 100 μ L. As células foram lavadas com meio de cultura e a imagem capturada em microscópio invertido (Olympus IX71) com luz clara e fotografados dois campos por poço em aumento de 100 X (câmera Olympus 30 DP71) por um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio (programa de captura de imagens CellSens Dimension). A migração celular foi observada em intervalos regulares (imediatamente, 12 e 24 horas após a lesão), e as imagens obtidas foram comparadas e analisadas pelo *software* ImageJ 1.50i $\text{\textcircled{R}}$ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

3.2.5 Ensaio de proliferação celular

O ensaio *in vitro* de proliferação das CTMd cultivadas com PRP foi realizado pela incorporação de bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina) (BrdU, Invitrogen). O método utilizado foi o padronizado pelo LACERT/UFSC. Para tal, as células foram mantidas em placas de 24 poços em condições padrão de cultivo celular por 24 h. Após, os poços foram divididos em dois grupos controle: (1) com DMEM F12 e (2) DMEM F12 acrescido de 15 % de SBF. Os grupos de intervenção foram tratados todos com DMEM F12 e PRP nas diluições: (3) 1:25; (4) 1:50; (5) 1:100; e (6) 1:200. O BrdU (1:100) foi adicionado 1h após os tratamentos aos poços e as culturas mantidas em estufa a 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO_2 e 95 % de umidade por 24 h.

As células foram então fixadas em 4 % de paraformaldeído por 40 min e permeabilizadas com PBS-Triton (0,3 %) durante 30 min. Realizou-se então uma lavagem com PBS e a incubação em HCl 2 N à temperatura ambiente por 15 min. O procedimento foi repetido 2 vezes. Após mais uma lavagem com PBS, procedeu-se à incubação com tampão borato por 10 min e nova lavagem com PBS seguida de incubação com 5 % SBF em PBS durante 30 min para bloqueio dos sítios inespecíficos. Após nova lavagem com PBS, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-BrdU IgG1 de camundongo (Abcam), 1:100, overnight. Após novas lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário Anti-IgG1 de camundongo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, 1:500) por uma hora. Fez-se nova lavagem com PBS e os núcleos das células foram corados com 4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI) na proporção 1:1000 por

10 min. As placas foram observadas no LAMEB/UFSC em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX83) em aumento de 200 X, e foram fotografados dez campos por poço (câmara Olympus DP73) por um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio (programa de captura de imagens CellSens Dimension 1.12). As imagens obtidas foram comparadas e analisadas com o *software* ImageJ 1.50i ® (National Institutes of Health, Bethesda, MA,USA) e a proliferação celular observada pelas proporções do número de células positivas para BrdU em relação às células totais coradas com DAPI.

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados coletados foram tabulados no Programa Microsoft Excel, versão 2010®.

A normalidade dos dados foi realizada pelo teste de normalidade de Shapiro-wilk em sua versão *on line* (DITTAMI, 2009).

Para calcular os *outliers* dos dados, foi utilizado o teste de Grubbs, com alpha padrão de 0,05 na versão *on line* do *software* GraphPad (GRAPHPAD, 2018).

Utilizou-se o *software* estatístico GraphPad Prism®-5 para as análises estatísticas e a confecção dos gráficos apresentados. Foram utilizados os seguintes testes: ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni; ANOVA de uma via, seguida de pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Para a significância estatística dos dados foi convencionado $p < 0,05$.

3.3 PARTE III - ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO DE LESÕES DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE CAMUNDONGOS

3.3.1 Obtenção dos animais

Os animais utilizados foram disponibilizados pelo Biotério Setorial do LACERT - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – Centro de Ciências Biológicas

(BEG/CCB/UFSC), sendo todos os procedimentos previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC Protocolo PP00810 (Anexo E).

Utilizou-se camundongos machos e fêmeas, da linhagem C57BL/6, entre 3 - 6 meses, com peso entre 20g a 30g. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico revestidas com maravalha, em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas, ração sólida e água ad libitum.

3.3.2 Procedimento cirúrgico e delineamento da amostra

A organização dos grupos experimentais do estudo pré-clínico em camundongos se deu de acordo com a alocação descrita no Quadro 1, sendo os mesmos divididos em quatro grupos de estudos: um controle (G1: MRD) e três tratados (G2: MRD e PRP; G3: MRD, PRD e CTMd; e G4: MRD e CTMd). Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em duas etapas, com trinta e seis animais em cada uma delas, ocorrendo a primeira etapa no mês de dezembro de 2015, e a segunda etapa no mês de maio de 2016, sendo setenta e dois animais ao total, e para tal utilizou-se a adaptação do protocolo de Jeremias (2013), estabelecido no LACERT/UFSC.

Os camundongos C57BL/6 foram anestesiados com associação de quetamina (100 mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) por via intraperitoneal. Em seguida, realizou-se a tricotomia e antissepsia da região dorsal dos animais com solução de iodopolvidona 10 % e álcool líquido 70° GL. Após, foram feitas duas incisões de espessura total na pele, circulares de 6 mm de diâmetro expondo a fáscia muscular. Para tal foi utilizado *punch* cirúrgico de 6 mm (JEREMIAS, 2013; KIOUSSI, 2014).

Logo após a realização da lesão, os animais foram submetidos ao procedimento de acordo com seu grupo experimental (Quadro 1). Nos

animais tratados com plasma rico em plaquetas (PRP), o mesmo foi descongelado do freezer -80°C em temperatura ambiente e aplicado sobre a lesão na quantidade de 10 µL por lesão, e após a matriz de regeneração dérmica (MRD) previamente lavada e mantida com PBS, foi posicionada na área da lesão e fixada à pele normal adjacente com sutura utilizando fio *mononylon* 6 - 0. Nos animais tratados com células-tronco mesenquimais da derme facial (CTMd) semeadas na MRD 48h antes, esta foi posicionada e fixada na ferida. Nos grupos onde utilizou-se MRD sem CTMd seguiu-se o mesmo procedimento de lavagem e fixação na lesão. Após a fixação da MRD as lesões de todos os grupos foram cobertas com curativo de filme transparente de poliuretano.

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ nos dias 3, 7, 18 pós-operatório e as áreas das lesões foram removidas com material cirúrgico para as análises posteriores: lesão esquerda destinada à histologia e lesão direita destinada à biologia molecular.

Quadro 1 - Organização dos grupos experimentais do estudo pré-clínico em camundongos.

GRUPO	Dias de pós-operatório			Número de animais/grupo
	3º dia	7º dia	18º dia	
G1 MRD	6 animais	6 animais	6 animais	18 animais
G2 PRP e MRD	6 animais	6 animais	6 animais	18 animais
G3 PRP, MRD e CTMd	6 animais	6 animais	6 animais	18 animais
G4 MRD e CTMd	6 animais	6 animais	6 animais	18 animais
Total	24 animais	24 animais	24 animais	
			Total Geral	72 animais

Fonte: do próprio autor (2018).

3.3.3 Análise macroscópica do reparo tecidual

As lesões foram avaliadas macroscopicamente quanto à evolução do processo de reparo tecidual, sinais de infecção, edema e presença de exsudato, a partir do 1º dia pós-operatório até o momento de eutanásia.

Na análise morfométrica a medição da lesão foi realizada com paquímetro universal (Starrett 125 6/150), sendo essa feita nos diâmetros vertical e horizontal da lesão, para após os dados tabulados obter-se o diâmetro médio. As lesões dos animais foram observadas partir do 1º dia pós-operatório até o fechamento total da lesão ou até o momento da eutanásia e fotografadas com distância padronizada. A análise morfométrica ocorreu com os animais sedados em câmara de gás isoflurano 5 %, de acordo com protocolos estabelecidos internacionalmente (GARGIULO et al., 2012).

3.3.4 Processamento das amostras para análises histológicas

Após eutanásia dos animais, realizou-se a coleta da amostra das lesões com auxílio de material cirúrgico e fixação imediata da amostra (para histologia) ou criopreservação em freezer – 80 °C (para possíveis estudos futuros da expressão gênica).

As amostras das lesões do lado esquerdo foram fixadas em paraformaldeído 4 % por 24 horas e após transferidas para o álcool 70 %, desidratadas progressivamente em álcool 90 % e 100 %, diafanizadas em xilol I e II, parafinizadas em parafina I, II e III e emblocadas em parafina. Os blocos com as amostras parafinizadas foram seccionados em cortes ultrafinos de 5 µm, resultando em lâminas histológicas.

3.3.4.1 Coloração com hematoxilina e eosina

As lâminas referentes aos dias 3, 7 e 18 de pós-operatório foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) / UFSC por meio de protocolo próprio do setor. Após a coloração de HE, todas as lâminas foram fotografadas, em aumento de 20 X, utilizando o digitalizador de lâminas (Axio Scan Z1-Carl Zeiss Microscopy GmbH). As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® – Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011. A partir destas imagens, foram analisados: a espessura do tecido de granulação, a colonização celular da MRD, o infiltrado inflamatório, a neovascularização, a espessura da derme recém-formada, a espessura e

homogeneidade da epiderme reepitelizada, e a espessura da epiderme e derme da pele íntegra.

3.3.4.2 Coloração com *picrosírius red*

As lâminas referentes ao dia 18 de pós-operatório foram coradas com *picrosírius red* (Picro Sírius Red Stain Kit, Abcam). As lâminas foram diafanizadas em dois banhos em xilol, hidratadas após lavagens em álcool (duas de 5 min em álcool 100 % e mais três em álcool 90 %, 80 % e 70 %) finalizando em lavagem em água corrente por 5 min e em água destilada por 10 min. Após foi aplicado o volume solução de *picrosírius red* adequado para cobrir os cortes de tecido por 60 min. Posteriormente as lâminas foram enxaguadas duas vezes em solução de ácido acético. Em seguida, realizou-se o enxágue em álcool absoluto e a desidratação com duas lavagens de 10 min cada também em álcool absoluto. As lâminas foram então montadas pela aplicação de resina sintética (Entellan - Merk), cobertas com lamínula e fotografadas em aumento de 400 X em microscópio invertido (Olympus IX83) no LAMEB/UFSC utilizando luz clara, e filtros para polarização plana/linear e fotografadas por um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio (câmera Olympus DP73 e programa de captura de imagens CellSens Dimension 1.12). Foram fotomicrografados 3 campos por lâmina na área da lesão e 3 campos em região de pele íntegra, em luz clara e luz polarizada. As imagens obtidas foram comparadas e analisadas com o *software* ImageJ 1.50i ® (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) por meio do *plug in* Threshold Color. A partir dessas imagens foi observada a formação das fibras de colágeno.

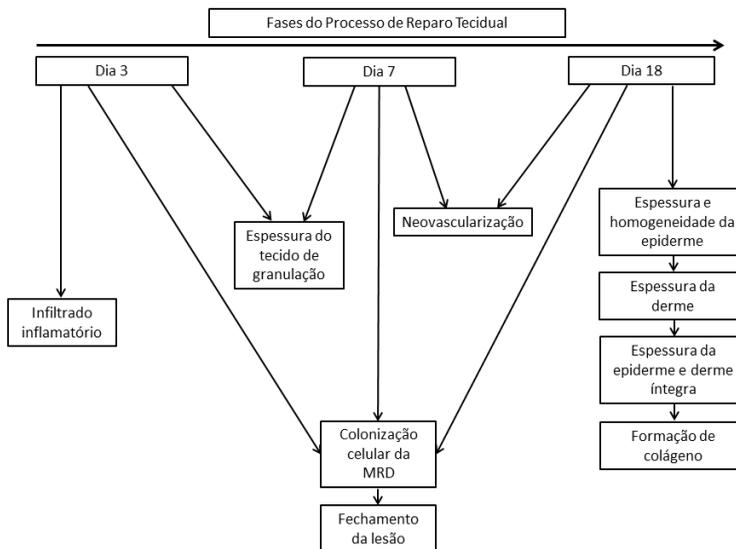
3.3.5 Análises histológicas

Todas as análises microscópicas e macroscópicas do tecido foram realizadas de acordo com as fases do processo de reparo tecidual, sendo elas na fase inflamatória - aos 3 dias, na fase de proliferação - aos 7 dias e na fase de remodelamento – aos 18 dias (Figura 9).

A análise macroscópica de fechamento da lesão foi realizada conforme descrito no item 3.3.3 durante todo o período experimental. As análises histológicas foram realizadas da seguinte maneira por meio da coloração de HE: espessura do tecido de granulação e o infiltrado inflamatório nos dias 3 e 7; a neovascularização nos dias 7 e 18; a colonização celular da MRD nos dias 3, 7 e 18; e a espessura e homogeneidade da epiderme reepitelizada, a espessura da derme recém-

formada, a espessura da epiderme e derme da pele íntegra no dia 18. Pela coloração de *picrossírius red* realizou-se a avaliação da formação das fibras de colágeno no dia 18.

Figura 9 - Parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliados durante as fases de reparo tecidual.

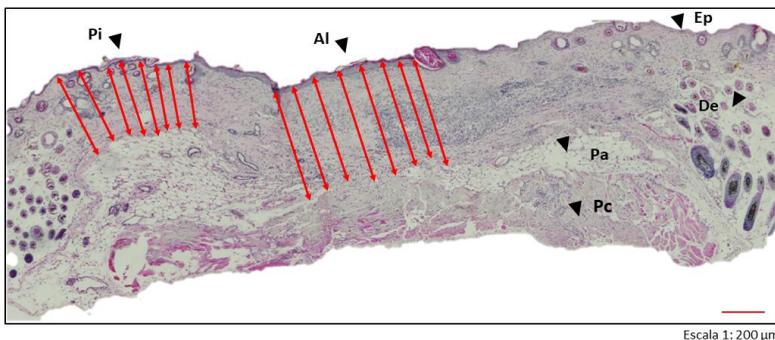


Fonte: do próprio autor (2018).

3.3.5.1 Espessura do tecido de granulação

Para a determinação da espessura do tecido de granulação foram medidos no 3º e 7º dia, em cada amostra, 8 pontos distintos ao longo de toda a lesão. Foi considerada como espessura do tecido de granulação a distância em μm entre a epiderme (em formação) e a tela subcutânea (*Panniculus adiposus*) ou músculo (*Panniculus carnosus*) (Figura 10). As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 15%. O resultado da espessura do tecido de granulação foi calculado como a média destes 8 valores.

Figura 10 - Medidas da espessura do tecido de granulação e derme íntegra. A figura representa corte histológico corado com HE, com área da lesão (Al) ao centro, pele íntegra (Pi) na lateral, e também podem ser vistos a epiderme íntegra (Ep), derme íntegra (De), a tela subcutânea – *Panniculus adiposus* (Pa) e o músculo - *Panniculus carnosus* (Pc). Setas vermelhas indicam as 8 medições lineares da espessura do tecido de granulação e da derme íntegra.



Fonte: do próprio autor (2018).

3.3.5.2 Colonização celular da matriz de regeneração dérmica

Para a determinação da colonização celular da MRD nos dias 3, 7 e 18 as categorias relacionadas foram classificadas por escore quanto a densidade celular: (+) baixa; (++) moderada; (+++) alta; e I: matriz de regeneração dérmica integrada ao tecido apresentando epiderme formada (escore adaptado de Jeremias, 2013). A atribuição dos escores considerou a colonização / infiltração celular na matriz de regeneração dérmica. As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 30 %, 40 % e 50 %.

3.3.5.3 Infiltrado inflamatório

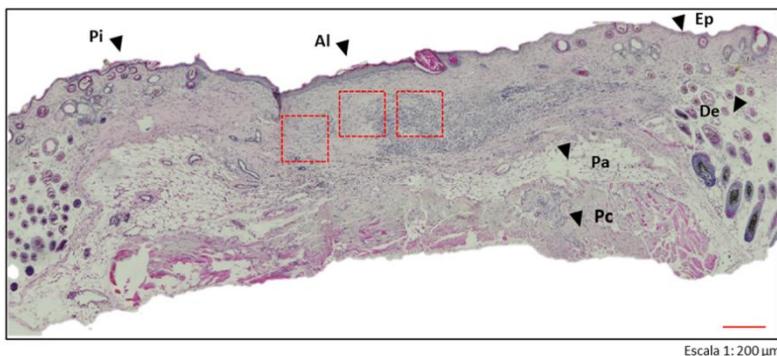
A presença e quantificação do infiltrado inflamatório na área da lesão (incluindo tecido de granulação e MRD) foi realizada de maneira qualitativa, sendo classificada em categorias relacionadas à quantidade de leucócitos presentes: (+) baixa; (++) moderada; (+++) alta de acordo com escore padronizado no LACERT/UFSC por Jeremias (2013). As lâminas histológicas coradas com HE do dia 3 de pós-operatório foram analisadas em microscópio de contraste de fase, em campo claro (Olympus BX 41),

sendo cada grupo avaliado individualmente e após comparados entre si para atribuição dos escores. As imagens foram avaliadas em aumento de 400 X e 1000 X em cada região.

3.3.5.4 Neovascularização

A angiogênese foi analisada pela contagem dos vasos na área da lesão nos dias 7 e 18 pós-operatórios. Foram analisados de 2 a 5 campos medindo 300 x 300 μm , sendo que o número de campos variou de acordo com o tamanho da lesão (Figura 11). Os vasos foram contados entre a epiderme e a tela subcutânea ou o músculo. As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 75 %. O número de vasos em cada lâmina foi calculado pela média dos campos analisados.

Figura 11 - Medidas da contagem de vasos para análise da neovascularização. A figura representa corte histológico corado com HE, com área da lesão (Al) ao centro, pele íntegra (Pi) na lateral, e também podem ser vistos a epiderme íntegra (Ep), derme íntegra (De), a tela subcutânea – *Panniculus adiposus* (Pa) e o músculo - *Panniculus carnosus* (Pc). Quadros vermelhos tracejados indicam os campos de medida dos vasos.



Fonte: do próprio autor (2018).

3.3.5.5 Espessura da derme recém-formada

Para a determinação da espessura da derme recém-formada foram medidos no 18º dia, 8 pontos distintos ao longo de toda a lesão em cada amostra. Foi considerada como espessura da derme, a distância em μm entre a epiderme e a tela subcutânea (*Panniculus adiposus*) ou músculo

(*Panniculus carnosus*) (Figura 10). As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 15 %. O resultado da espessura da derme foi calculado como a média destes 8 valores.

3.3.5.6 Espessura e homogeneidade da epiderme

Para a determinação da espessura da epiderme foram medidos no 18º dia de pós-operatório, 8 pontos distintos ao longo de toda a lesão em cada amostra onde a epiderme se fez presente, expressos em μm . As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 30 %. O resultado da espessura da epiderme foi calculado como a média destes 8 valores.

A homogeneidade da epiderme foi determinada pela comparação dos desvios padrões das lâminas analisadas em relação à média inicial de cada grupo de intervenção, sendo que as lâminas com menor desvio foram consideradas as mais homogêneas.

3.3.5.7 Espessura da epiderme e derme íntegra

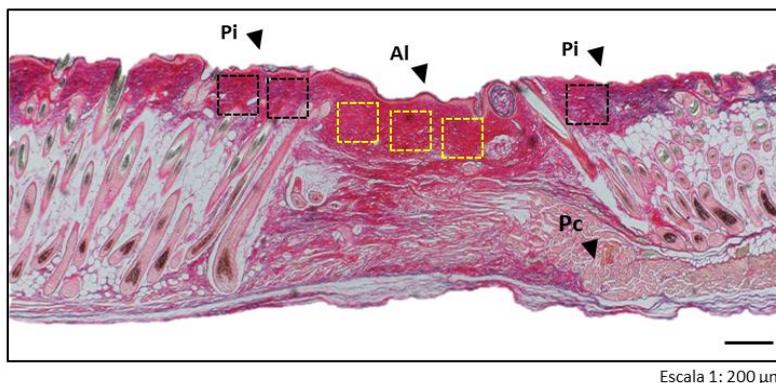
Para a determinação da espessura da epiderme e derme íntegra foram medidos em cada amostra, no 18º dia de pós-operatório, 8 pontos distintos da epiderme (onde se fez presente) e da derme ao longo de toda a extensão de área de pele íntegra, não lesionada, expressos em μm . Foi considerada como espessura da derme a distância entre a epiderme e a tela subcutânea (*Panniculus adiposus*) ou músculo (*Panniculus carnosus*) (Figura 10), na região de pele íntegra. As imagens foram analisadas por meio do *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011) com aumento de 30 % para mensuração da epiderme e 15 % para mensuração da derme. O resultado da espessura da epiderme e da derme foi calculado como a média destes 8 valores em cada grupo e posteriormente como a média dos quatro grupos de intervenção.

3.3.5.8 Formação das fibras de colágeno

A avaliação da formação das fibras de colágeno ocorreu no dia 18 de pós-operatório nas amostras coradas com *picrosírius red*. Foram fotomicrografados 3 campos por lâmina na área da lesão e 3 campos em região de pele íntegra (Figura 12) em luz clara e em luz polarizada com aumento de 400 X. As imagens obtidas foram comparadas e analisadas junto ao *software* ImageJ 1.50i® (National Institutes of Health, Bethesda,

MA, USA) por meio do *plug in* Threshold Color, onde realizou-se a quantificação do colágeno por medida de área expressa em μm^2 . Os valores para cada tipo de colágeno foram padronizados no Threshold Color em função da birrefringência após a polarização: matiz 0 - 40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45 - 120 para a cor verde (colágeno tipo III), saturação 0 - 255 e brilho 5 - 255 para ambos os tipos de colágeno.

Figura 12 - Áreas de medida das fibras de colágeno. Fotomicrografia em área total de pele, aumento de 100 X, com coloração *picrosírius red*, indicando as áreas de medida das fibras de colágeno com área da lesão (Al) ao centro, pele íntegra (Pi) na lateral, podendo também ser visualizado o músculo - *Panniculus carnosus* (Pc). Áreas tracejadas em preto indicam os campos de medida de colágeno na pele íntegra e áreas tracejadas em amarelo indicam os campos de medida de colágeno na área da lesão.



Fonte: do próprio autor (2018).

3.3.6 Análises estatísticas

Os dados coletados foram tabulados no Programa Microsoft Excel, versão 2010®.

A normalidade dos dados da análise morfométrica da lesão foi testada pelo programa IBM SPSS 20.0 Statistics com teste de normalidade de Shapiro-wilk. A normalidade dos demais dados apresentados nesta parte do estudo foi realizada pelo teste de normalidade de Shapiro-wilk em sua versão *on line* (DITTAMI, 2009).

Para calcular os *outliers* dos dados, foi utilizado o teste de Grubbs, com alpha padrão de 0,05 na versão *on line* do software GraphPad (GRAPHPAD, 2018).

Utilizou-se o *software* estatístico GraphPad Prism®-5 para as análises estatísticas e a confecção de todos os gráficos apresentados. Quando apropriado, foram utilizados os seguintes testes: ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de Bonferroni; análise de sobrevivência de Kaplan-Meier seguida por teste de Log-rank - Mantel-Cox; e teste t de student paramétrico e não pareado. Para a significância estatística dos dados foi convencionado $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

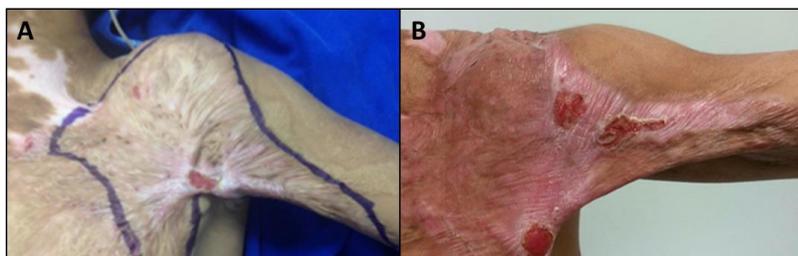
Os resultados serão apresentados em três partes de acordo com os objetivos propostos no estudo: (I) estudo preliminar de caso clínico, (II) estudo *in vitro*, (III) estudo pré-clínico.

4.1 PARTE I - ESTUDO PRELIMINAR DE CASO CLÍNICO DE UTILIZAÇÃO DA ENGENHARIA TECIDUAL ASSOCIANDO PLASMA RICO EM PLAQUETAS AUTÓLOGO, MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E TERAPIA POR PRESSÃO NEGATIVA NA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DAS SEQUELAS DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL

4.1.1 Estudo de caso

O paciente retornou ao ambulatório do HIJG em 14/08/2015 apresentando quatro lesões abertas importantes na área onde havia sido realizado o procedimento cirúrgico corretivo da sequela, e deposição fibrosa na área do pilar anterior da axila direita (Figura 13). Também pode-se evidenciar compensações posturais para a adequada manutenção da postura ereta e elevação dos membros superiores em função da limitação axilar ainda presente. Constatou-se que o paciente não seguiu adequadamente ao tratamento proposto pela equipe do HIJG resultando nas condições apresentadas (Figura 14).

Figura 13 - Aspecto cicatricial da lesão. Representação fotográfica da lesão do paciente 001 (A) no momento do procedimento cirúrgico com demarcação para excisão da área de cicatriz. (B) Detalhe em vista frontal da região axilar em 14/08/2015, após seis meses do procedimento operatório. Observar lesões abertas na área enxertada.



Fonte: do próprio autor (2018).

Figura 14 - Aspecto postural geral do paciente 001 após seis meses do procedimento cirúrgico. Representação fotográfica dos aspectos posturais e da lesão do paciente 001 em 14/08/2015 (A) Vista frontal com membros superiores ao longo do corpo. (B) Vista frontal com membros superiores elevados em 90° de abertura. (C) Vista frontal com membros superiores elevados em 180°, observar auxílio compensatório na elevação. (D) Vista lateral do paciente com membros superiores elevados em 90° de abertura. (E) Vista lateral com membros superiores elevados em 180°, observar auxílio compensatório na elevação.



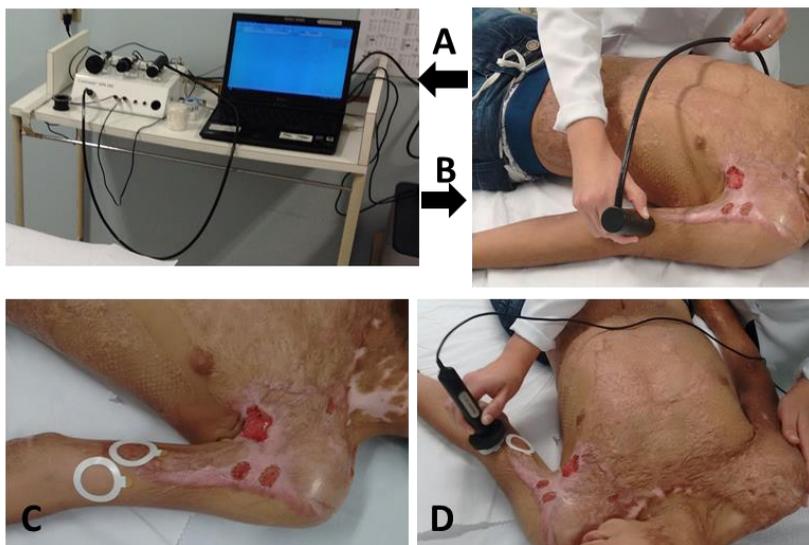
Fonte: do próprio autor (2018).

4.1.2 Avaliação da Cicatriz

O *Cutometer* tem sido utilizado para avaliar cicatrizes por queimaduras, sendo capaz de detectar mudanças mínimas no aumento da elasticidade da pele e indicado para aperfeiçoar o tratamento destes pacientes. É um equipamento não invasivo que realiza medidas objetivas e quantitativas sobre a elasticidade da pele medindo a sua deformação vertical por sucção (GONÇALVES et al., 2013).

Em 14 de agosto, após seis meses da realização do procedimento cirúrgico no paciente foi realizada a avaliação da pele com o equipamento *Cutometer* (Figura 15). O sistema *Cutometer* é considerado na atualidade um dos melhores equipamentos de avaliação objetiva das cicatrizes de queimaduras e o melhor existente no mercado para mensuração das propriedades viscoelásticas da pele (LEE et al., 2016).

Figura 15 - Avaliação da cicatriz. Representação fotográfica da avaliação da cicatriz em 14/08/2015. (A) equipamento *Cutometer*® - MPA 580 com diversas sondas de avaliação (Courageand Khazaka Electronic GmbH, Koln, Germany). (B) Medição da área demarcada com a sonda *Cutometer*. (C) Marcação da área a ser medida com as sondas. (D) Mensuração da área demarcada com a sonda *Mexameter*.



Fonte: do próprio autor (2018).

De acordo com os resultados coletados dos parâmetros biomecânicos da pele expressos no Quadro 2 temos:

Quadro 2 - Resultados dos parâmetros biomecânicos da pele. Representação das médias dos resultados dos parâmetros mecânicos da pele avaliados na área da cicatriz e na área controle.

PARÂMETROS MECÂNICOS	MÉDIA CONTROLE	MÉDIA CICATRIZ
R0	0.357	0.114
R1	0.036	0.033
R2	0.893	0.710
R3	0.377	0.125
R4	0.037	0.052
R5	0.944	0.610
R6	0.411	0.553
R7	0.668	0.390
R8	0.320	0.081
R9	0.020	0.011

Fonte: do próprio autor (2018).

- R0 distensibilidade - amplitude máxima, representa o comportamento passivo da pele a força/firmeza da pele (valor absoluto em mm): cerca de 3 vezes maior na área controle.

- R1 retorno da pele ao normal (valor absoluto em mm): sem diferenças significativas, cerca 10 % menos na cicatriz.

- R2 elasticidade bruta, resistência versus capacidade de retorno (valor relativo): valores próximos nas duas áreas, cerca de 20 % menor na área de cicatriz.

- R3 ponto mais elevado da última curva (valor absoluto em mm): cerca de 3 vezes maior na área controle, compatível com R0.

- R4 ponto mais baixo da última curva, deformação residual da pele após a última sucção (valor absoluto em mm): não compatível com R1 provavelmente devido ao valor da segunda medida do controle (0,017) que foi muito baixa.

- R5 elasticidade líquida, porção elástica da parte de sucção em relação à porção elástica da parte de relaxação (valor relativo): compatível com R2, cerca de 35 % menor na área de cicatriz.

- R6 viscoelasticidade (valor relativo): Maior viscoelasticidade na área controle (valor mais baixo).

- R7 elasticidade biológica, porção da elasticidade comparada à curva completa (valor relativo): compatível com R2 e R5 cerca de 40 % menor na área de cicatriz.

- R8 retorno total, relaxamento completo após a interrupção da pressão (valor absoluto em mm): a área da cicatriz não retorna ao estado inicial - menos elástica.

- R9 fadiga da pele, $R9=R3-R0$ (valor absoluto em mm): área controle 2 vezes maior que área cicatricial.

De maneira geral, a elasticidade da pele é representada por R2, R5 e R7, a viscoelasticidade por R6 e R8, e a fadiga da pele por R3, R4 e R9 (HELD et al., 2015). Não existem valores médios de padrão ouro na avaliação com o equipamento em função das diferentes etiologias da lesão, superfície corporal atingida, tipos de pele, entre outros, portanto, a avaliação continuada e comparativa à pele íntegra, são fundamentais para que os parâmetros analisados possam ser utilizados adequadamente.

Para a avaliação dos índices de eritema e melanina da pele, foi utilizada a sonda acessória *Mexameter* (Quadro 3). Não foram observadas diferenças significativas entre as áreas controle e cicatriz com relação à presença de melanina. Em relação ao eritema, na área de cicatriz os valores foram cerca de 10 % maiores o que evidencia o processo de maturação cicatricial ocorrendo ainda no local com áreas na fase proliferativa do processo de reparo.

Quadro 3 - Resultados dos parâmetros de melanina e eritema da pele. Representação das médias dos resultados dos parâmetros de melanina e eritema da pele avaliados na área da cicatriz e na área controle.

PARÂMETROS	MÉDIA CONTROLE	MÉDIA CICATRIZ
MELANINA	312	308
ERITEMA	304	336

Fonte: do próprio autor (2018).

A avaliação da coloração da cicatriz possui um grande impacto na sua qualidade e nas possíveis sequelas estéticas caracterizadas pelas discromias. O eritema é comumente associado aos sintomas de prurido, dor e hipertrofia em indivíduos com quadro de imaturidade da cicatriz, caracterizada pela hipervascularização e conseqüente eritema local (GONÇALVES et al., 2013). Para a avaliação e quantificação de sintomas como prurido e dor, há a necessidade de escalas subjetivas (COLLARES; LINHARES; VIARO, 2016).

Por meio dos dados coletados e analisados no estudo de caso preliminar, evidencia-se que:

- Houveram lesões abertas de pele na área que sofreu a intervenção cirúrgica, e compensações posturais para a adequada manutenção da postura ereta.

- Constatou-se que o paciente não seguiu adequadamente ao tratamento proposto pela equipe do HIJG, resultando nas condições apresentadas.

- Quanto aos parâmetros mecânicos da pele avaliados seis meses após o procedimento cirúrgico, a área de pele íntegra (controle) encontrava-se com valores condizentes à uma pele com boa elasticidade, viscoelasticidade e fadiga.

- Não houve diferença entre a área controle e a área de cicatriz quanto à presença de melanina, porém a área de cicatriz apresentou eritema aumentado condizendo com uma cicatriz ativa com áreas em diferentes estágios do processo de reparo de tecidual.

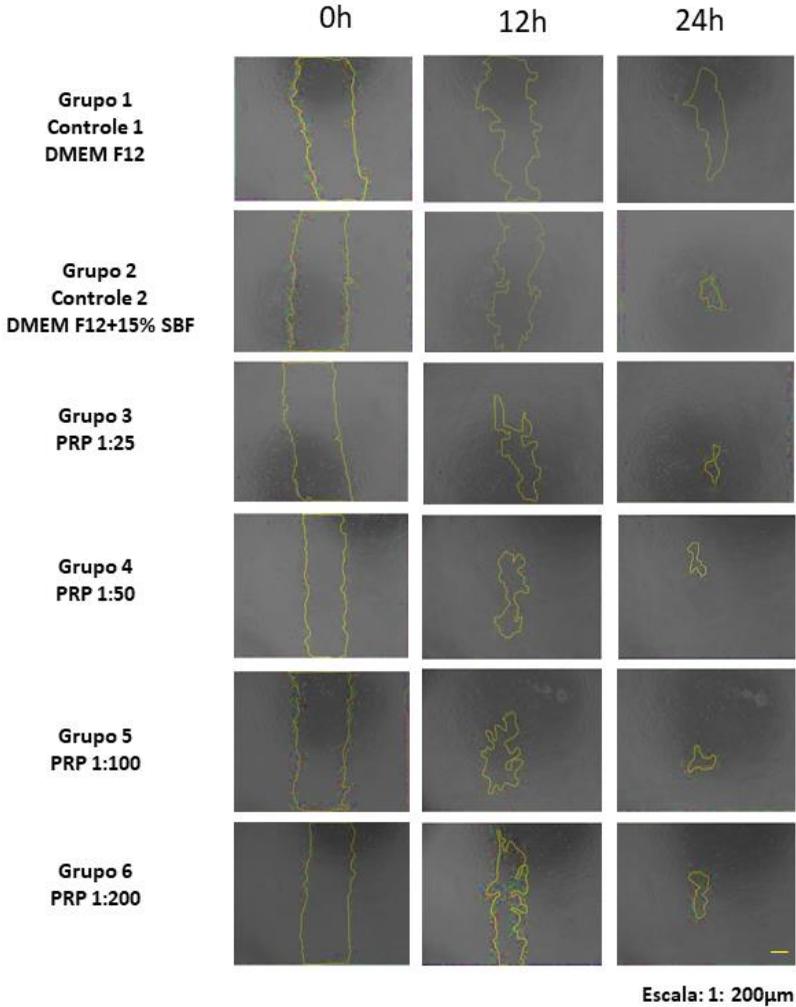
4.2 PARTE II - ESTUDO *IN VITRO* DE AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL

O trabalho realizado no LACERT/UFSC em 2013 por Castro analisou *in vitro* a associação do plasma rico em plaquetas (PRP), matriz de regeneração dérmica (MRD) e as células-tronco mesenquimais da derme facial (CTMd) (CASTRO, 2013). No estudo foram avaliadas as diluições de 1:50 e 1:100 (em DMEM-F12) de PRP que favoreceram a adesão e colonização das CTMd na MRD quando comparadas ao controle sem PRP (DMEM-F12 suplementado com 15 % de SBF) mantendo morfologia similares às CTM migratórias, com muitos pontos de adesão e estruturas citoplasmáticas semelhantes à pseudópodos. Outro resultado do estudo de Castro (2013), foi que em cultivo bidimensional, as CTMd tratadas com PRP não apresentaram morte por necrose e demonstraram maior sobrevida em cultura, porém, houve redução na atividade celular, o que foi coerente com a diminuição da quantidade de células observadas nas culturas submetidas a este tratamento. Resultado semelhante foi encontrado na avaliação tridimensional de viabilidade celular pelo ensaio de MTT junto a MRD, onde o PRP demonstrou não ser tóxico e nem alterar a adesão das CTMd, mantendo a viabilidade nas primeiras 24 h de cultivo. Em função da deficiência de dados na literatura, buscou-se no presente trabalho complementar o estudo de Castro (2013), avaliando os efeitos de PRP na migração e proliferação das CTMd, importante no processo de reparo tecidual.

4.2.1 Efeito do plasma rico em plaquetas na migração das células-tronco mesenquimais da derme facial

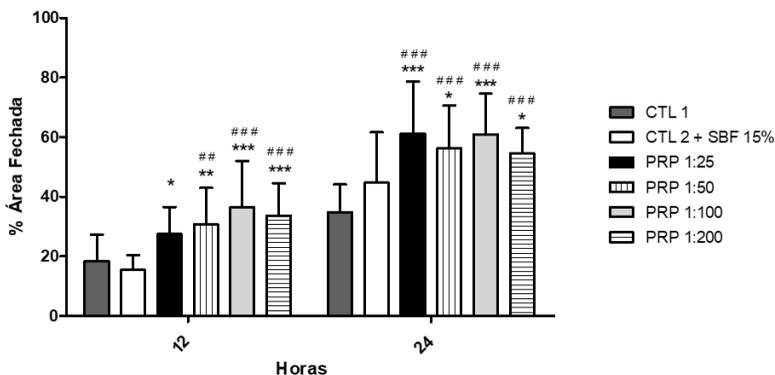
O método de *cell scratch* mimetiza *in vitro* a migração celular durante a cicatrização de feridas. O ensaio consiste na realização de uma lesão mecânica na monocamada de células confluentes e avaliação da área de fechamento pela migração celular observada em intervalos regulares (0, 12, e 24 horas) (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Ensaio de migração celular por *cell scratch*. Fotomicrografia representativa, no momento inicial do ensaio 0 h, 12 h e 24 h após de acordo com os grupos: (1) controle-1 (DMEM F12 sem soro) (2) controle-2 (DMEM F12 acrescido de 15 % SBF) e PRP: (3) 1:25; (4) 1:50; (5) 1:100; e (6) 1:200 diluído em DMEM F12.



Fonte: do próprio autor (2018).

Figura 17 - Representação gráfica da porcentagem de fechamento da área de lesão da monocamada celular em 12 h e 24 h. Valores representam as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata e analisados por ANOVA de duas vias, seguido por pós-teste de Bonferroni. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs Controle 1 (DMEM F12 sem soro) e * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs Controle 2 (DMEM F12 com SBF 15 %).



Fonte: do próprio autor (2018).

No experimento foram analisados seis grupos de tratamento: controle (1) tratado com DMEM F12 sem soro e controle (2) tratado com DMEM F12 acrescido de 15 % SBF. Os grupos de intervenção receberam as seguintes diluições de PRP: (3) 1:25; (4) 1:50; (5) 1:100; e (6) 1:200 em DMEM F12 sem soro.

Nas primeiras 12 horas após a lesão, todos os grupos que utilizaram PRP apresentaram diferença estatística em relação aos dois controles com exceção do grupo PRP 1:25 que apresentou significância somente para o controle 2. Os grupos que apresentaram alta diferença estatística para os dois controles foram PRP 1:100 (36,42 % de fechamento) e PRP 1:200 (33,73 % de fechamento).

Nas 24 horas após a lesão, todos os grupos tratados com PRP apresentaram diferença estatística em relação aos dois controles sendo as maiores diferenças observadas nos grupos PRP 1:25 (61,19 % de fechamento) e PRP 1:100 (60,96 % de fechamento). Já o grupo PRP 1:50 apresentou média de fechamento de 56,27 % e o grupo PRP 1:200 de 54,40 %.

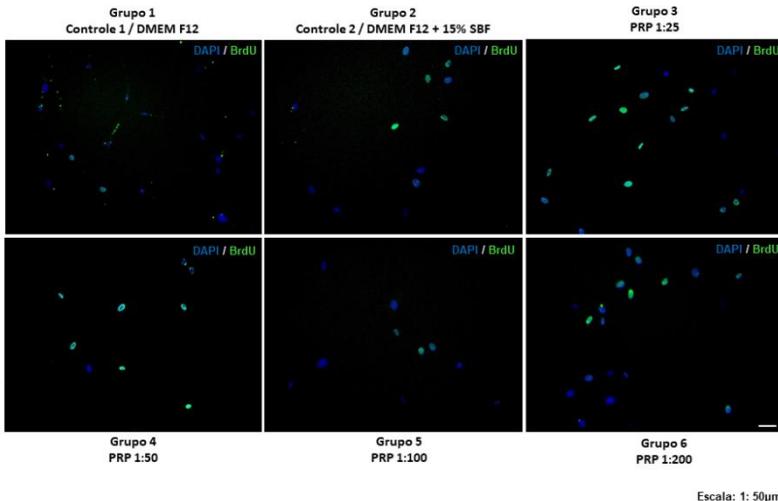
Esses resultados demonstram que no momento inicial do experimento, 12h após a lesão, as concentrações mais elevadas de PRP (1:100 e 1:200) favorecem a capacidade migratória das células. Já nas 24

h após a lesão (próximo ao fechamento total) os resultados mais expressivos foram observados com PRP 1:25 e PRP 1:100. Verificou-se ainda neste período de análise, que frente ao grupo controle 1, todos os grupos tratados com PRP apresentaram resultado significativo, indicando que o PRP favorece a migração das CTMd.

4.2.2 Efeito do plasma rico em plaquetas na proliferação das células tronco mesenquimais da derme facial

A avaliação dos efeitos do PRP na proliferação das CTMd foi realizada pelo ensaio de incorporação de BrdU como descrito no item 3.2.5 – metodologia (Figuras 18 e 19). No experimento foram analisados os mesmos grupos de tratamento do ensaio de migração celular.

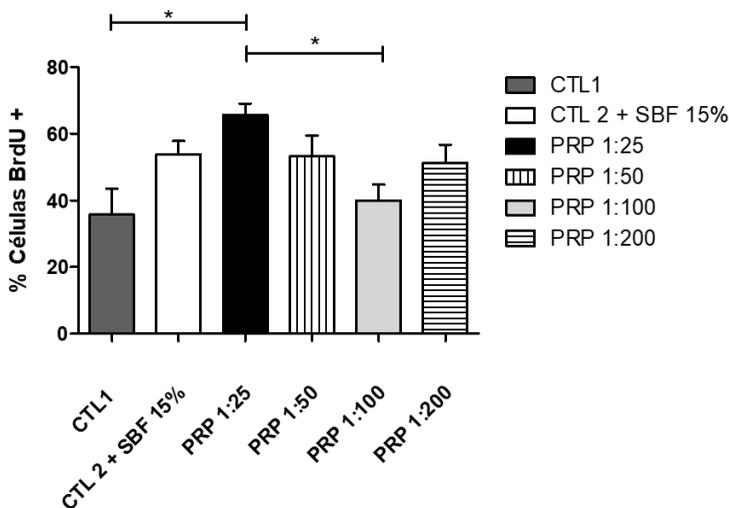
Figura 18 - Fotomicrografias do ensaio de proliferação celular das CTMd associado ao PRP nos diferentes grupos com marcação positiva para BrdU (este aparece em verde nas imagens).



Fonte: do próprio autor (2018).

Os resultados demonstram percentual de células positivas para BrdU maior no grupo PRP 1:25 (65,63 %) em relação aos grupos controle 1 (35,69 %) e PRP 1:100 (40,02 %), indicando aumento de proliferação celular nesta condição. Os demais grupos apresentaram médias próximas entre si, porém sem significância estatística: grupo controle 2 (53,81 %), grupo PRP 1:50 (53,25 %) e grupo PRP 1:200 (51,32 %).

Figura 19 - Representação gráfica do efeito do PRP na proliferação das CTMd. Valores representam as médias \pm erro padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata e avaliados por ANOVA de uma via, seguido por pós-teste de múltipla comparação de Newman-Keuls. Significância estatística: * $p < 0,05$.



Fonte: do próprio autor (2018).

Em conjunto, os ensaios *in vitro* sugerem que o PRP na diluição 1:25 estimula significativamente tanto a migração quanto a proliferação da CTMd contribuindo para o fechamento mais acelerado da lesão.

Esses resultados corroboram e complementam o estudo de Castro (2013) sugerindo que a associação do PRP com CTMd e MRD constitui um microambiente efetivo para o crescimento, viabilidade, migração, adesão e diferenciação celular com potencial aplicação no tratamento de lesões cutâneas.

Assim sendo, buscou-se a seguir aprofundar os resultados *in vitro* por meio de estudo pré-clínico descrito na parte seguinte desse trabalho.

4.3 PARTE III - ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO DE LESÕES DE ESPESSURA TOTAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE CAMUNDONGOS

Em função dos resultados acima e do estudo de Castro (2013), buscou-se avaliar o uso da engenharia tecidual associando células tronco mesenquimais da derme facial (CTMd), matriz de regeneração dérmica (MRD) e plasma rico em plaquetas (PRP) em estudo pré-clínico em modelo murino avaliando os eventos do reparo tecidual em lesões cutâneas de espessura total.

4.3.1 Aspectos macroscópicos das lesões

Pela análise macroscópica das lesões não foram observados sinais de infecção, como infiltrado purulento, edema e presença excessiva de exsudato em nenhum dos animais do estudo desde o momento do procedimento cirúrgico até a eutanásia no 18º dia de pós-operatório.

Os curativos de filme transparente de poliuretano que cobriam a MRD caíram na sua grande maioria no até o dia 5 de pós-operatório. Os que permaneceram foram retirados nesse dia para padronização das fotografias e mensuração das lesões.

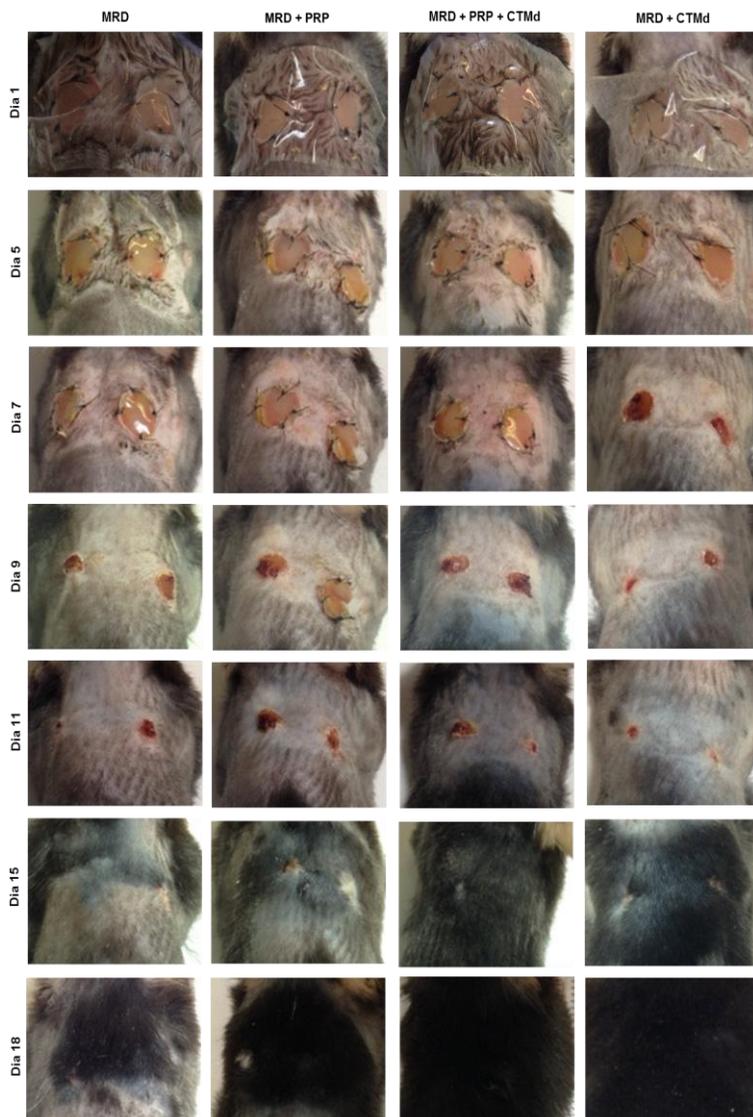
Além disso, foi observado que as películas de silicone, camada externa da MRD, começaram a cair da lesão entre o 7º e 9º dia de pós-operatório. A partir desse momento, a redução do diâmetro das lesões foi acelerada. Não foi observada cicatrização hipertrófica, hipotrófica ou quelóideana em nenhum dos grupos (Figura 20).

4.3.2 Fechamento das lesões

O fechamento das lesões foi avaliado por medições da área lesionada em dias alternados até o 7º dia de pós-operatório e diariamente após esse período até seu completo fechamento ou até o 18º dia.

Em todos os grupos analisados, o fechamento das lesões ocorreu principalmente entre o 5º e o 11º dia de pós-operatório. As curvas mantiveram-se crescentes após o 11º dia, porém numa velocidade menor em relação aos dias anteriores (Figura 21). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

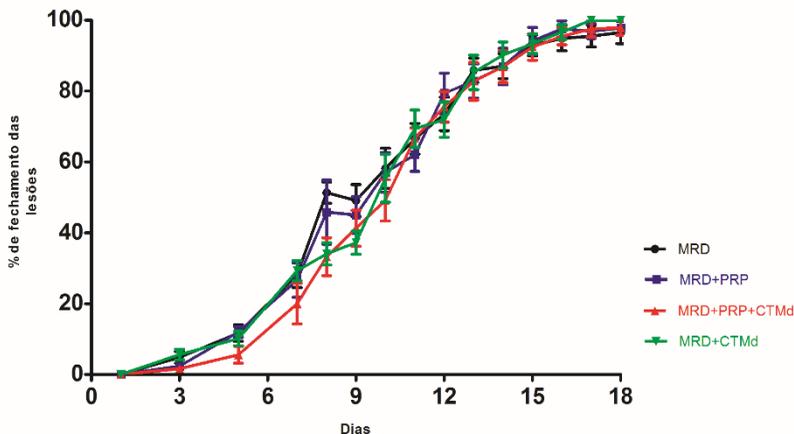
Figura 20 - Análise macroscópica do fechamento das lesões. Registro fotográfico representativo das lesões de pele em camundongos ao longo do tempo nos grupos de intervenção: 1(MRD), 2(MRD e PRP), 3(MRD, PRP e CTMd) e 4(MRD e CTMd). O n foi de seis animais por grupo. Escala: 1:1 cm.



Fonte: do próprio autor (2018).

1 cm

Figura 21 - Representação gráfica da porcentagem de fechamento das lesões em pele de camundongos nos quatro grupos do estudo: Nos grupos: 1 (MRD) (n = 12 lesões sendo 2 lesões por animal) e nos demais grupos 2 (MRD e PRP), 3 (MRD, PRP e CTMd) e 4 (MRD e CTMd) o n foi de 11 lesões por grupo (houve o descarte de dados de uma lesão devido a intercorrências no período de coleta). Não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Bonferroni).

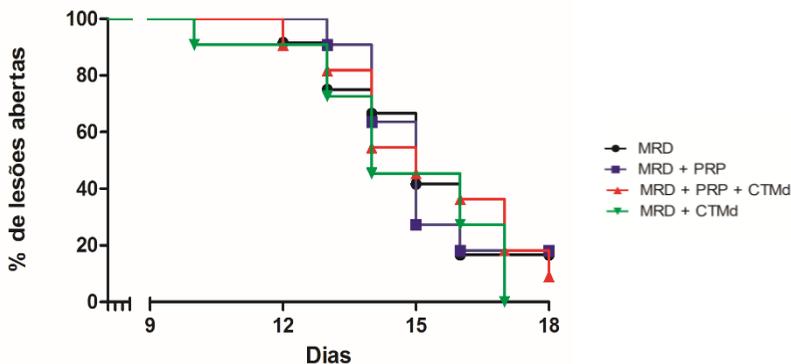


Fonte: do próprio autor (2018).

Observou-se que todos os grupos os animais apresentaram curva de fechamento de lesão semelhante, com o fechamento completo a partir do 17º dia. Os valores médios de lesões fechadas no 18º dia de pós-operatório, quando o experimento foi encerrado, foi de 96,55 %, 97,76 %, 97,90 % e 100 % nos animais tratados com MRD, com MRD e PRP, com MRD, PRP e CTMd e com MRD e CTMd, respectivamente (Figura 21). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Os resultados apresentados na Figura 22 demonstram que todos os animais tratados com MRD e CTMd apresentaram fechamento completo das lesões já no 17º de pós-operatório. No dia 18, os animais tratados com MRD; com MRD e PRP, e com MRD, PRP e CTMd apresentavam ainda 16,66 %, 18,10 %, e 9,10 % de lesões abertas, respectivamente (Figura 22). Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 22 - Representação gráfica do número de lesões abertas ao longo do tempo após procedimento cirúrgico em camundongos. Nos grupos: 1 (MRD) (n = 12 lesões sendo 2 lesões por animal) e nos demais grupos 2 (MRD e PRP), 3 (MRD, PRP e CTMd) e 4 (MRD e CTMd) o n foi de 11 lesões por grupo (houve o descarte de dados de uma lesão devido a intercorrências no período de coleta). Não houve diferença significativa entre os grupos (análise de Kaplan-Meier seguida por teste de Log-rank - Mantel-Cox).



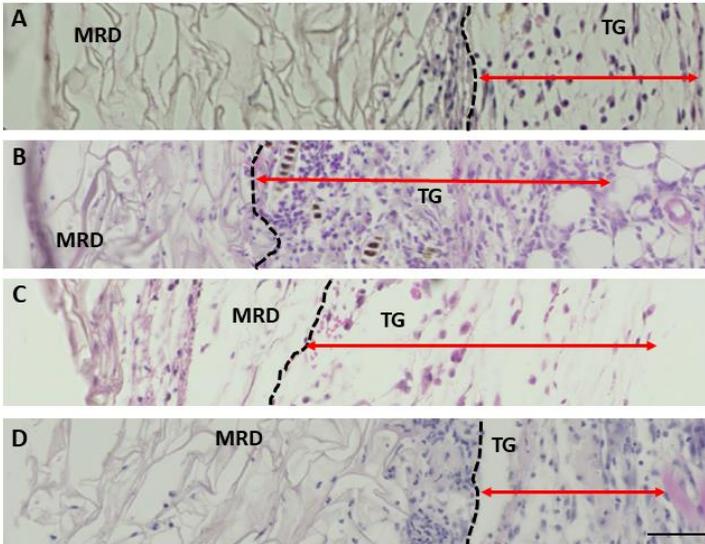
Fonte: do próprio autor (2018).

Esses resultados sugerem que as CTMd possuem efeito positivo no processo de reparo das lesões mesmo sem diferença estatística entre os grupos estudados.

4.3.3 Formação do tecido de granulação e da neoderme

A formação do tecido de granulação e da neoderme durante o processo de reparo tecidual foram avaliados histologicamente por coloração com HE nos dias 3 e 7 (Figuras 23, 24, e 25) e 18 de pós-operatório (Figura 26). Os valores médios são apresentados na Figura 27.

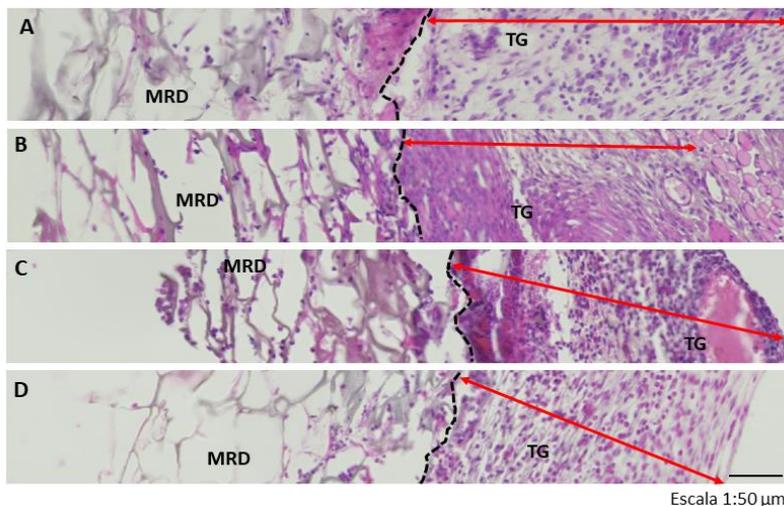
Figura 23 - Formação do tecido de granulação e infiltração celular da MRD no dia 3 de pós-operatório. Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Imagem A: grupo MRD. Imagem B: grupo MRD e PRP. Imagem C: grupo MRD, PRP e CTMd. Imagem D: grupo MRD e CTMd. Linha vermelha representa a espessura do tecido de granulação (TG) nos diferentes grupos. A colonização celular da MRD é visualizada nos diferentes grupos (MRD – matriz de regeneração dérmica).



Escala 1:50 μm

Fonte: do próprio autor (2018).

Figura 24 - Formação do tecido de granulação e infiltração da MRD no dia 7 de pós-operatório. Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Imagem A: grupo MRD. Imagem B: grupo MRD e PRP. Imagem C: grupo MRD, PRP e CTMd. Imagem D: grupo MRD e CTMd. Linha vermelha representa a espessura do tecido de granulação (TG) nos diferentes grupos. A colonização celular da MRD é visualizada nos diferentes grupos (MRD – matriz de regeneração dérmica). Observa-se maior infiltração na MRD em relação ao dia 3 de pós-operatório.

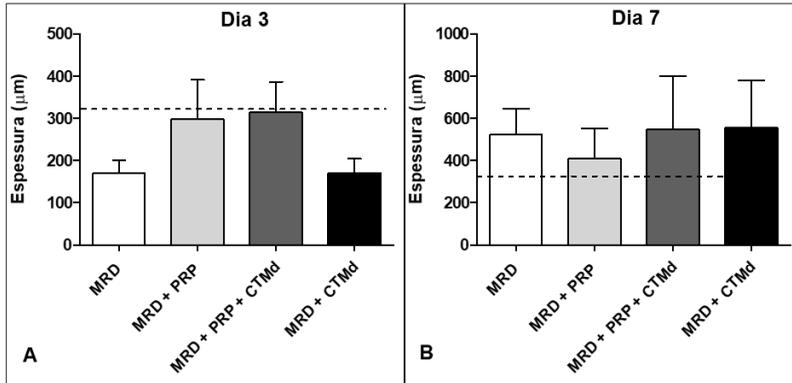


Fonte: do próprio autor (2018).

Os dados apresentados demonstram que não houve diferença significativa na espessura do tecido de granulação entre os diferentes grupos animais nos dias 3 e 7 de pós-operatório (Figura 25). No dia 3, os animais tratados com MRD e PRP e com MRD, PRP e CTMd apresentaram valores da espessura do tecido de granulação mais elevadas (298,81 μm e 314,96 μm , respectivamente) frente aos demais grupos, sendo que nenhum deles atingiu a espessura da derme íntegra (321,19 μm). Os animais tratados com MRD, PRP e CTMd foram os que mais se aproximaram da espessura da derme íntegra (Figura 25 A).

No dia 7, em todos os grupos animais, a espessura do tecido de granulação foi maior que a da derme íntegra (321,19 μm), sendo os valores médios: MRD (521,71 μm), MRD e PRP (409,55 μm), MRD, PRP e CTMd (547,33 μm) e MRD e CTMd (556,08 μm) (Figura 25 B).

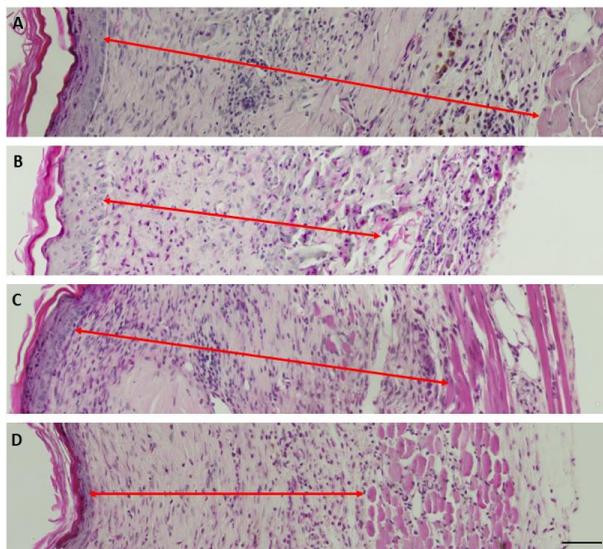
Figura 25 - Representação gráfica da espessura do tecido de granulação. (A) Dia 3 e (B) dia 7 de pós-operatório. A linha tracejada demarca a espessura média da derme íntegra (321,19 μm). Valores representam as médias \pm erro padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos nos dois dias apresentados (Teste t de student paramétrico e não pareado).



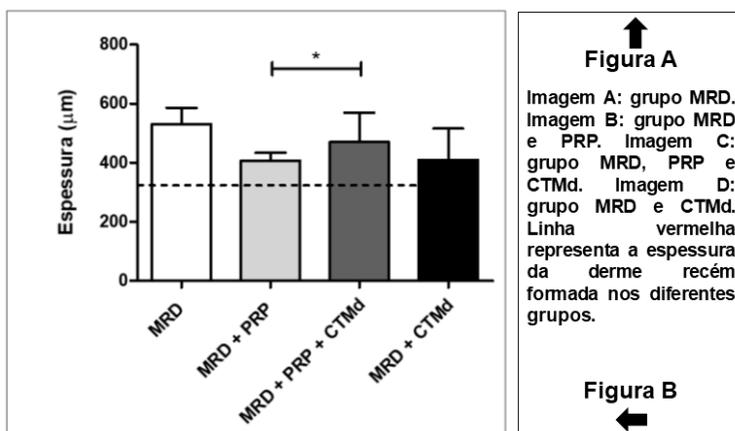
Fonte: do próprio autor (2018).

No dia 18 de pós-operatório, que corresponde à fase de remodelamento, todos os grupos animais apresentaram espessura da derme recém-formada maior que a da derme íntegra (321,19 μm). Os grupos com valores mais próximos a esta foram o MRD e PRP (407,36 μm ou 1,27 vezes), MRD e CTMd (409,64 μm ou 1,28 vezes), e o MRD, PRP e CTMd (média de 469,46 μm ou 1,46 vezes). O grupo com valor mais distante foi o MRD (530,87 μm ou 1,65 vezes). Figura 26.

Figura 26 - Espessura da derme recém-formada no dia 18 de pós-operatório. Figura A: Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. A MRD encontra-se completamente integrada à derme. Figura B: Representação gráfica. A linha tracejada no gráfico exibe a espessura média da derme íntegra (321,19 μm). Valores representam as médias \pm erro padrão. Teste t de student paramétrico e não pareado. Significância estatística: * $p < 0,05$.



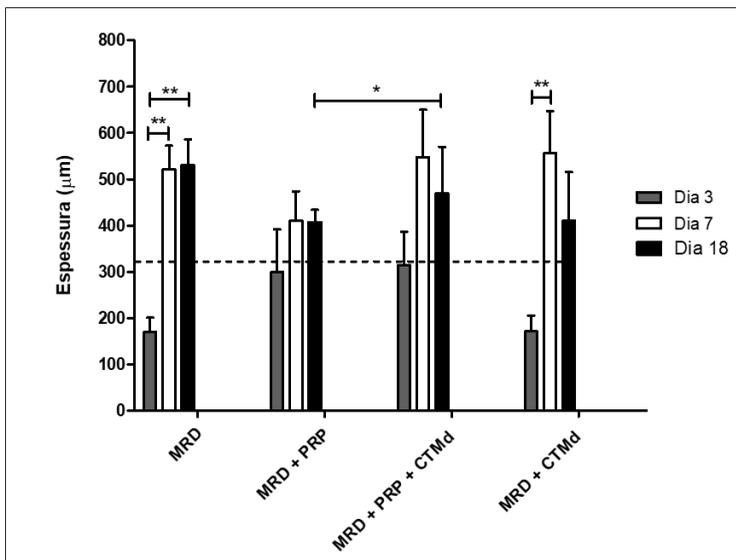
Escala 1:50 μm



Fonte: do próprio autor (2018).

Analisando em conjunto os valores dos três dias de pós-operatório, foi possível observar que a espessura do tecido de granulação aumentou no dia 7 em relação ao dia 3 em todos os grupos animais e que a espessura da derme recém-formada diminuiu no dia 18 em relação ao tecido de granulação no dia 7 nos grupos MRD e PRP; MRD, PRP e CTMd e também no grupo MRD e CTMd (Figura 27). No grupo MRD a espessura da derme recém-formada aumentou no dia 18 em relação ao tecido de granulação no dia 7 (aumento de 1,02 vezes).

Figura 27 - Análise da espessura do tecido de granulação e da derme recém-formada nos dias 3, 7 e 18 de pós-operatório. A linha tracejada exibe a espessura média da derme íntegra (321,19 μm). Valores representam as médias \pm erro padrão. ANOVA 2 vias, seguido por pós-teste de Bonferroni com significância estatística: ** $p < 0,01$. Significância estatística: * $p < 0,05$ quando realizado Teste t de student paramétrico e não pareado entre os grupos.



Fonte: do próprio autor (2018).

Os dados demonstram ainda aumento significativo do tecido de granulação no dia 7 em relação ao dia 3 de pós-operatório de 3,08 vezes no grupo MRD e 3,25 vezes no grupo MRD e CTMd. No dia 18, o grupo MRD apresentou aumento de 3,13 vezes na espessura da derme recém-formada em relação ao tecido de granulação no dia 3. Houve ainda

aumento de 1,15 vezes na espessura da derme recém-formada no dia 18 no grupo MRD, PRP e CTMd em relação ao grupo MRD e PRP. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo.

4.3.4 Colonização Celular

A colonização celular (densidade de células infiltradas) na MRD nos dias 3, 7 e 18 foi analisada qualitativamente após coloração com HE utilizando escore adaptado de Jeremias (2013) nos três períodos do reparo tecidual.

Os resultados encontrados demonstraram que no dia 3 de pós-operatório os animais tratados com MRD e PRP; MRD, PRP e CTMd; e MRD e CTMd apresentaram infiltrado celular na MRD maior que os animais tratados com MRD apenas, sugerindo que o PRP e as CTMd estimulam a colonização celular na MRD nessa fase inicial do processo de reparo. (Tabela 1 e Figura 23).

No dia 7 de pós-operatório o infiltrado celular foi maior do que no dia 3 sendo similar nos quatro grupos animais a partir desse momento (Figura 24). No dia 18 a integração da MRD ao tecido foi completa com epiderme formada (Figura 26 A).

Tabela 1 - Análise qualitativa da infiltração de células na matriz de regeneração dérmica nos dias 3, 7 e 18 de pós-operatório. Escore da quantidade de células: (+) baixa, (++) moderada e (+++) alta. I: matriz e regeneração dérmica integrada ao tecido apresentando epiderme formada (escore adaptado de Jeremias, 2013).

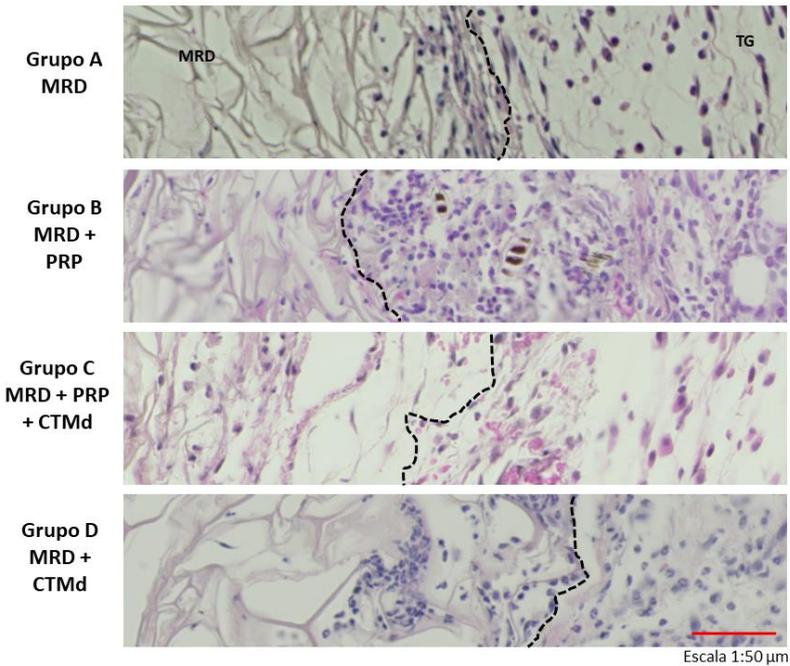
	MRD	MRD e PRP	MRD, PRP e CTMd	MRD e CTMd
Tempo	<i>Quantidade de células</i>			
Dia 3	+	++	++	++
Dia 7	+++	+++	+++	+++
Dia 18	I	I	I	I

Fonte: Do próprio autor (2018).

4.3.5 Infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório foi avaliado qualitativamente após coloração com HE no dia 3 de pós-operatório durante a fase inflamatória do reparo tecidual. Foi utilizado o escore descrito no Quadro 4 para análise dos leucócitos infiltrantes na área da lesão (incluindo tecido de granulação e MRD) (Figura 28).

Figura 28 - Imagens representativas dos cortes histológicos corados com HE para visualização do infiltrado de leucócitos no dia 3 de pós-operatório. (A) MRD. (B) MRD e PRP. (C) MRD, PRP e CTMd. (D) MRD e CTMd. À direita da linha pontilhada de todas as imagens pode-se visualizar a MRD sob o tecido de granulação (TG, a esquerda) com maior densidade de leucócitos. Imagens obtidas em aumento de 20X, utilizando o digitalizador de lâminas (Axio Scan Z1- Carl Zeiss Microscopy GmbH) e formatadas com aumento de zoom de 50 % no *software* Zen 2012 blue edition® (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011).



Fonte: do próprio autor (2018).

Assim como as análises de colonização celular, os animais tratados com MRD e PRP; MRD, PRP e CTMd; e com MRD e CTMd

apresentaram alto escore de infiltrado de células inflamatórias, maior do que os tratados com MRD, sendo que esse apresentou escore moderado.

Quadro 4 - Escore do infiltrado inflamatório no dia 3 de pós-operatório. Quantidade de células: (+) baixa; (++) moderada; (+++) alta (escore adaptado de Jeremias, 2013).

Grupos	Quantidade de células
MRD	++
MRD + PRP	+++
MRD + PRP + CTMd	+++
MRD + CTMd	+++

Fonte: do próprio autor (2018).

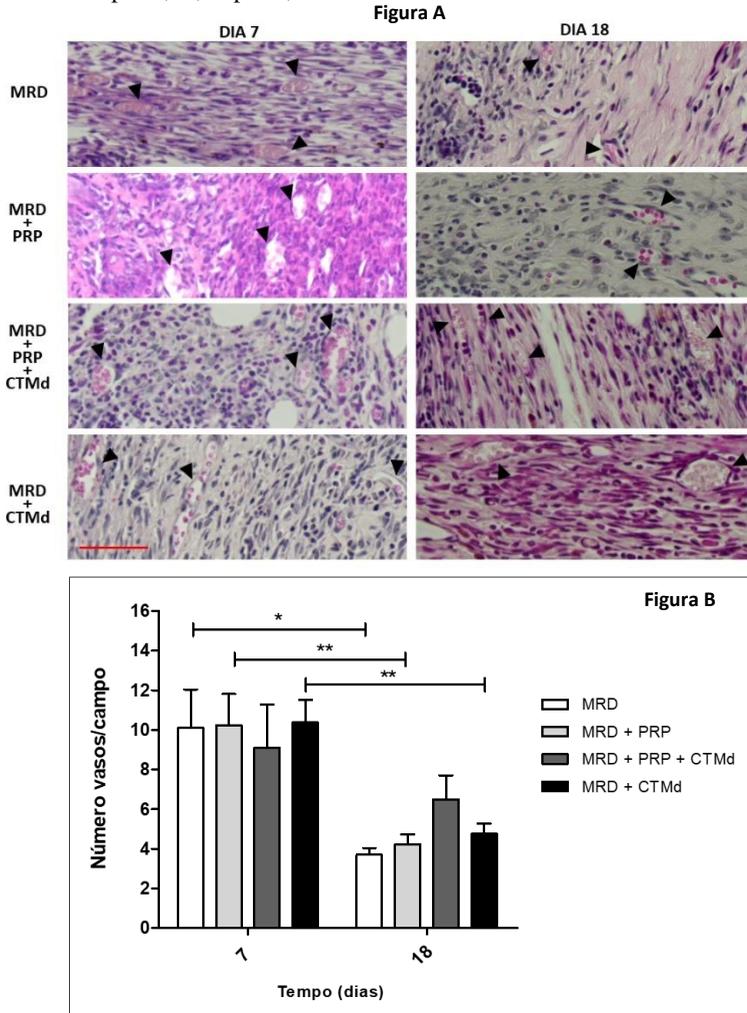
4.3.6 Neovascularização

A formação de novos vasos (angiogênese ou neovascularização) foi avaliada pela coloração com HE nos dias 7 e 18 de pós-operatório que correspondem às fases proliferativa e de maturação do processo de reparo tecidual quando o evento tem início.

Como representado na figura 29, em todos os grupos animais a densidade dos vasos/campo foi maior no dia 7 do que no dia 18 com diferença significativa nos grupos MRD (2,73 vezes); MRD e PRP (2,42 vezes); MRD e CTMd (2,18 vezes). Entre os grupos não houve diferença estatística significativa.

Interessantemente, os animais do grupo MRD, PRP e CTMd apresentaram a menor média de vasos/campo no dia 7 de pós-operatório (9,11) e a maior média no dia 18 (6,5), sem, porém, significância estatística para os demais grupos. Os valores das médias dos demais grupos animais no dia 7 foram próximas entre si, sendo MRD (10,10); MRD e PRP (10,23); MRD e CTMd (10,37) ao contrário do dia 18 onde foram observadas variações maiores, sendo MRD (3,70); MRD e PRP (4,22) e MRD e CTMd (4,75).

Figura 29 - Neovascularização nas lesões cutâneas nos dias 7 e 18 de pós-operatório. Figura A: Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Setas indicam vasos sanguíneos. Escala 1: 50µm. Imagens obtidas em aumento de 20X, utilizando o digitalizador de lâminas (Axio Scan Z1- Carl Zeiss Microscopy GmbH) e formatadas com aumento de zoom de 50% no Software Zen 2012 blue edition® – Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011. Figura B: Representação gráfica do número de vasos/campo. Valores representam as médias ± erro padrão. Teste t de student paramétrico e não pareado. Significância estatística: *p < 0,05, **p < 0,01

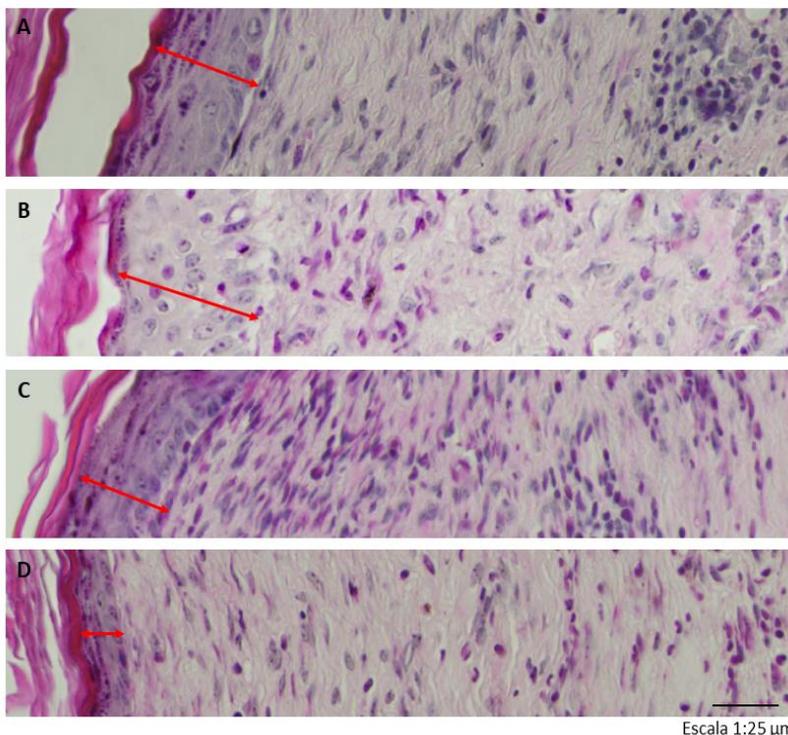


Fonte: do próprio autor (2018).

4.3.7 Formação e homogeneidade da epiderme

A formação da epiderme foi analisada por coloração com HE no dia 18 de pós-operatório, na fase de remodelamento do processo de reparo. Foram avaliados a espessura média da epiderme neoformada, a espessura média da epiderme íntegra e a homogeneidade da epiderme reepitelizada (Figuras 30 e 31).

Figura 30 - Formação da epiderme no 18º dia de pós-operatório. Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Imagem A: MRD. Imagem B: MRD e PRP. Imagem C: MRD, PRP e CTMd. Imagem D: MRD e CTMd. A linha vermelha representa a espessura da epiderme nos diferentes grupos.



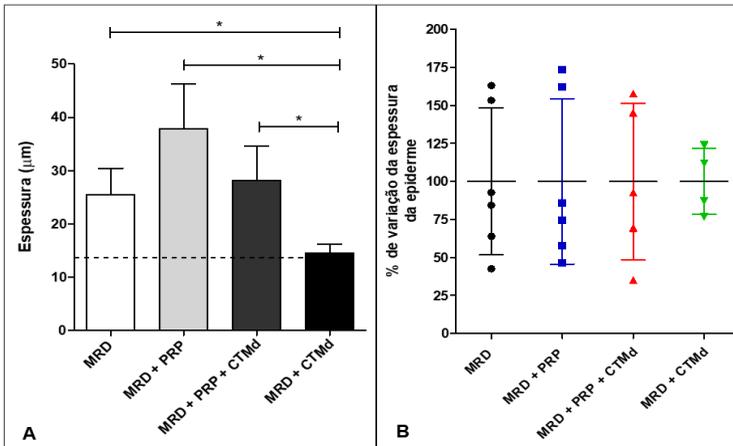
Fonte: do próprio autor (2018).

Os dados apresentados na figura 31A demonstram que os animais do grupo tratado com MRD e CTMd apresentaram os menores valores de

espessura média da epiderme recém-formada (14,57 μm) sendo este muito próximo ao da epiderme íntegra (13,86 μm).

Os demais grupos animais apresentam espessura média de epiderme significativamente maior à da epiderme íntegra e aos animais tratados com MRD e CTMd. Os maiores valores foram observados no grupo animal tratado com MRD e PRP (37,89 μm), 2,73 vezes mais espesso que a epiderme íntegra. Os animais tratados apenas com MRD apresentaram espessura média de epiderme 25,41 μm e os tratados com MRD, PRP e CTMd 28,15 μm correspondendo a 1,83 e 2,03 vezes, respectivamente, maior que epiderme íntegra.

Figura 31 - Espessura e homogeneidade da epiderme recém-formada no dia 18 de pós-operatório. Figura (A): Representação gráfica da espessura da epiderme. A linha tracejada no gráfico exibe a espessura média da epiderme íntegra (13,86 μm). Valores representam as médias \pm erro padrão. Teste t de student paramétrico e não pareado. Significância estatística: * $p < 0,05$. Figura (B): Representação gráfica da porcentagem de variação da epiderme demonstrando a homogeneidade da mesma. Valores representam as médias \pm desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos (Teste t de student paramétrico e não pareado).



Fonte: do próprio autor (2018).

A homogeneidade da epiderme foi avaliada pela análise dos valores da espessura média ao longo da sua extensão. Os dados representados na Figura 31 B demonstram que não houveram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos animais. Assim como para a espessura, os animais tratados com MRD e CTMd apresentaram os

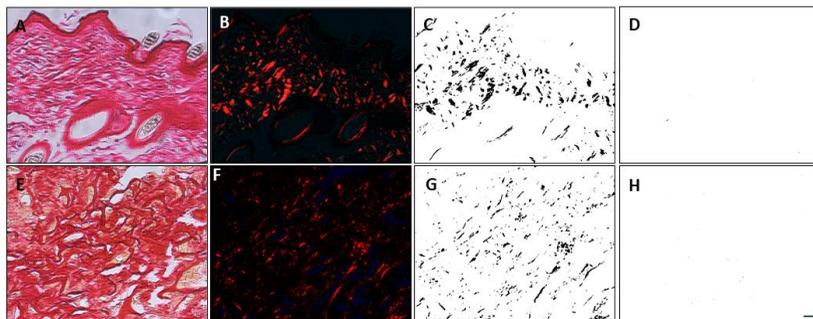
menores desvios do percentual de espessura da epiderme (100 %) em relação aos demais sugerindo maior homogeneidade de epiderme. A variação dos desvios encontrados nesse grupo foram: 23,96 % para cima (123,96 %) e 23,20 % para baixo (76,80 %).

4.3.8 Formação do colágeno

A formação das fibras de colágeno na derme recém-formada foi analisada no dia 18 de pós-operatório por coloração com *picrosírius red*. O colágeno é o principal componente do tecido conjuntivo com papel chave na arquitetura e integridade da sua matriz extracelular, sendo o principal constituinte da derme (cerca de 90 %) (BEDOYA, 2016).

As lâminas histológicas coradas com *picrosírius red* foram analisadas em microscópio óptico utilizando-se luz clara e luz polarizada nas áreas de pele íntegra e da lesão. Os valores do *Threshold Color* foram padronizados para os colágenos I e III em todas as imagens em função da birrefringência após a polarização: matiz 0 - 40 para a cor vermelha (colágeno tipo I) e 45 - 120 para a cor verde (colágeno tipo III) (Figura 32). As áreas de colágeno tipo I e do tipo III foi calculada pela medida em μm^2 (Figura 33).

Figura 32 - Fotomicrografias representativas das lâminas histológicas após coloração com *picrosírius red*. Figuras A, B, C, D: pele íntegra. Figuras: E, F, G, H área da lesão. Figuras A e E: sob luz branca. Figuras B e F: sob luz polarizada. Nas Figuras C e G, a cor preta corresponde à área selecionada para medida de colágeno tipo I pelo *software* Image J e *plug-in* Threshold Color. Nas Figuras D e H a cor preta corresponde à área selecionada para medida de colágeno tipo III pelo software. Aumento de 400 X.

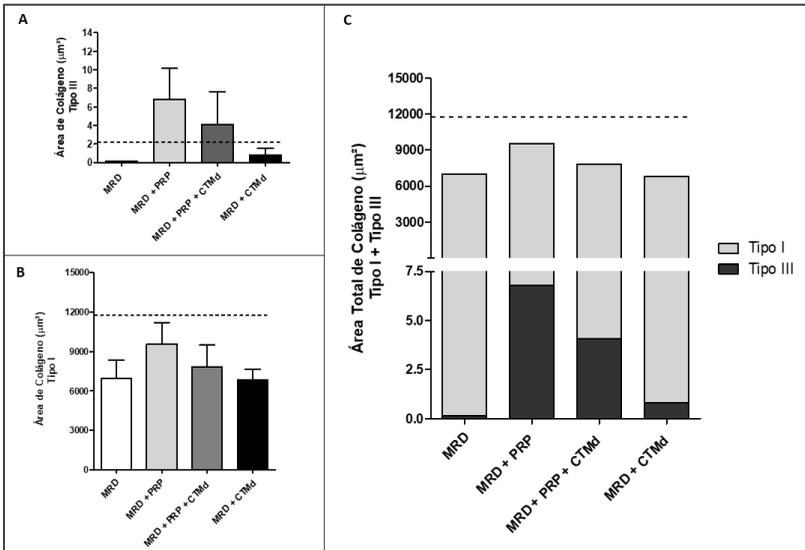


Escala 1: 20 μm

Fonte: do próprio autor (2018).

A figura 33 A representa a área de colágeno tipo III na região da lesão. Os animais tratados com MRD e PRP e os tratados com MRD, PRP e CTMd apresentaram valores médios (6,78 μm^2 e 4,08 μm^2 , respectivamente) maiores que a pele íntegra (2,15 μm^2). Por outro lado, os animais tratados apenas com MRD ou com MRD e CTMd apresentaram valores inferiores a esta (0,138 μm^2 e 0,816 μm^2 , respectivamente).

Figura 33 - Representação gráfica da área de colágeno tipo I e tipo III expressos em área (μm^2). Figura A: colágeno tipo III na região da lesão. A linha tracejada no gráfico exibe a espessura média da área de colágeno tipo III na pele íntegra (2,15 μm^2). Valores representam as médias \pm erro padrão. Figura B: área de colágeno tipo I na região da lesão. A linha tracejada no gráfico exibe a espessura média da área de colágeno tipo I na pele íntegra (11.715,44 μm^2). Valores representam as médias \pm erro padrão. Figura C: área total de colágeno (colágeno tipo I + colágeno tipo III) na região da lesão, expresso pela soma das médias das áreas por grupo. A linha tracejada no gráfico exibe a espessura média da área de colágeno tipo I + área de colágeno tipo III na pele íntegra (11.717,59 μm^2). Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos animais (Teste t de student paramétrico e não pareado).



Fonte: do próprio autor (2018).

A figura 33 B demonstra a área de colágeno tipo I na região da lesão evidenciando que todos os grupos animais de intervenção obtiveram

valores inferiores à da pele íntegra ($11.715,44 \mu\text{m}^2$). O grupo com valores mais próximos foi o tratado com MRD e PRP ($9.561,19 \mu\text{m}^2$). Os demais grupos apresentaram as seguintes áreas: MRD, PRP e CTMd ($7.811,89 \mu\text{m}^2$), MRD ($6.980,52 \mu\text{m}^2$), e MRD e CTMd ($6.836,21 \mu\text{m}^2$).

Na figura 33 C é demonstrada a área total de colágeno pelo somatório das médias individuais. Todos os grupos animais mantiveram-se abaixo dos valores da pele íntegra (de $11.717,59 \mu\text{m}^2$). O grupo com maior área total de colágeno (somatório dos colágenos I e III) foi o tratado com MRD e PRP ($9.567,97 \mu\text{m}^2$). Os demais grupos apresentaram as seguintes áreas médias: MRD, PRP e CTMd ($7.815,97 \mu\text{m}^2$), MRD ($6.980,66 \mu\text{m}^2$), e MRD e CTMd ($6.837,03 \mu\text{m}^2$).

Os resultados demonstram ainda o baixo percentual de colágeno tipo III em relação ao tipo I (Quadro 5). Os grupos que apresentaram maior percentual de colágeno tipo III foram os tratados com MRD e PRP e MRD, PRP e CTMd.

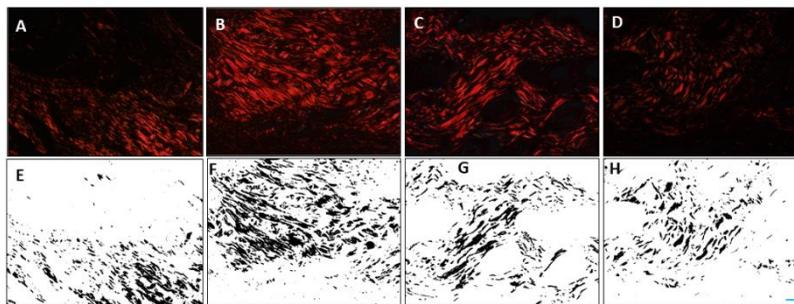
Quadro 5 - Percentual total da área de colágeno tipo I e tipo III na derme da região da lesão. O cálculo foi realizado pelos percentis da área média total de cada grupo de intervenção em cada tipo de colágeno.

Tipos de Colágeno \ Grupos	MRD	MRD e PRP	MRD, PRP e CTMd	MRD e CTMd
Tipo I	99,998 %	99,929 %	99,948 %	99,988%
Tipo III	0,002 %	0,071 %	0,052 %	0,012 %
Total (I + III)	100%	100%	100%	100%

Fonte: Do próprio autor (2018).

A Figura 34 evidencia a organização paralela das fibras de colágeno tipo I recém-formadas nos animais tratados com MRD e com MRD e PRP. Este último grupo animal apresenta fibras mais espessas assim como o tratado com MRD, PRP e CTMd. Nos animais tratados com MRD e CTMd as fibras de colágeno ainda encontram-se desorganizadas.

Figura 34 - Fotomicrografias representativas do colágeno tipo I após coloração com *picrossírius red*. Figuras A, B, C, e D: área da lesão sob polarização. Figuras: E, F, G, e H área da lesão em cor preta que corresponde à área selecionada para medida de colágeno tipo I pelo *software* Image J e *plug-in* Threshold Color. Figuras A e E: MRD. Figuras B e F: MRD e PRP. Figuras C e G: grupo MRD, PRP e CTMd. Figuras D e H: grupo MRD e CTMd. Aumento de 400 X.



Escala 1: 20 μ m

Fonte: Do próprio autor (2018).

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como tema central estudar os avanços da engenharia de tecidos, mais especificamente da associação dos produtos plasma rico em plaquetas (PRP), matriz de regeneração dérmica (MRD) e células-tronco mesenquimais da derme facial (CTMd), buscando desenvolver tratamentos mais efetivos e viáveis para as lesões cutâneas. De modo a abordar o processo de reparo tecidual cutâneo, evento sequente e fisiológico essencial organizado didaticamente nas fases inflamatória, proliferativa e de maturação (GONZALEZ et al., 2016), o trabalho foi realizado em três etapas. Inicialmente realizou-se estudo preliminar de caso clínico em um indivíduo humano utilizando os elementos da engenharia tecidual PRP autólogo, MRD e TPN na reconstrução cirúrgica das sequelas de queimaduras. A segunda etapa incluiu estudos *in vitro* que buscaram analisar os efeitos do PRP na migração e proliferação das CTMd complementando o estudo de Castro (2013). Por fim foram analisados os efeitos da associação dos elementos da engenharia tecidual PRP, MRD e CTMd nas diferentes fases do processo de reparo cutâneo em modelo pré-clínico murino. Optou-se por não alocar um grupo de estudo controle sem MRD, visto que um trabalho com essas características já foi desenvolvido no LACERT/UFSC (WOSGRAU, 2012), tendo demonstrado resultados superiores no reparo da lesão quando do uso da MRD comparado ao não uso, corroborando com estudos encontrados na literatura (MAES et al., 2012; VAN ZUIJLEN et al., 2015).

5.1 PARTE I - AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO USO CLÍNICO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS

A queimadura enquanto lesão tecidual é semelhante a outras feridas no que se refere aos conceitos básicos de reparo tecidual e de cuidados, mas difere no fato de impactar de maneira ávida a condição geral do indivíduo, que dependendo da sua intensidade/gravidade, interfere diretamente na sobrevivência, no desenvolvimento das deformidades e no processo de reintegração social (TIWARI, 2012). No estudo preliminar de caso clínico verificou-se que a adesão do paciente ao tratamento proposto é substancial para o seu completo sucesso (SZABO et al., 2016). Nos tratamentos com uso de tecnologias avançadas oferecidos pelo serviço público onde o custo financeiro é alto, sem a adesão do paciente não há sucesso no tratamento, havendo consequente

desperdício desses recursos, escassos na grande maioria das vezes (OLIVEIRA et al., 2009; SZABO et al., 2016).

Neste estudo foi observado que a área da cicatriz tratada com PRP não demonstrou estar melhor ou equivalente à pele íntegra na avaliação realizada seis meses após a intervenção cirúrgica, utilizando-se o sistema *Cutometer*, um dos melhores sistemas de avaliação objetiva das cicatrizes de queimaduras e padrão ouro para mensuração das propriedades viscoelásticas da pele (LEE et al., 2016). A fase de maturação cicatricial no processo de reparo cutâneo em paciente queimado de espessura total (como foi o caso estudado, em função da cirurgia envolver a retirada de uma área cicatricial profunda, correspondente a uma lesão de espessura total), dura em média dois anos (mínimo de um ano) após a lesão, podendo variar em função da extensão e profundidade do trauma (AHUJA et al., 2016; O'SULLIVAN; SCHMITZ, 2010). Considera-se que seis meses seja ainda um período recente para alterações em toda a estrutura biomecânica da pele, que depende da deposição e arranjo das fibras de colágeno, principalmente colágeno tipo I (DA CUNHA; PARAVIC; MACHADO, 2015). Esse dado é corroborado pela avaliação do eritema e na pele da área cicatricial que indica cicatriz ativa em plena fase de remodelamento cicatricial, podendo estar esse associado aos sintomas de prurido, dor e hipertrofia em indivíduos com quadro de imaturidade da cicatriz, caracterizada pela hipervascularização (GONÇALVES et al., 2013).

Os dados das condições biomecânicas da pele do paciente indicaram que mesmo o PRP possuindo uma concentração alta de fatores de crescimento, quimiotáticos, entre outros, que interferem no processo de reparo tecidual (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018; MARCK; MIDDELKOOP; BREEDERVELD, 2014), o tratamento não foi suficientemente para influenciar a maturação cicatricial no período de seis meses após a lesão a ponto de se igualar a pele íntegra. Não foram realizadas avaliações posteriores. Em estudo anterior, Klosová e colaboradores (2013) observaram nas áreas de enxerto de pele associadas ao PRP condições biomecânicas melhores no primeiro, terceiro e sexto mês após a lesão comparativamente às áreas sem uso de PRP, sendo equivalente à pele íntegra após um ano (KLOSOVÁ et al., 2013). Apesar da fase de maturação cicatricial ainda não haver cessado (AHUJA et al., 2016), o PRP demonstrou-se promissor na melhora das condições biomecânicas da pele (ELSAYED, 2017; KLOSOVÁ et al., 2013).

5.2 PARTE II – PLASMA RICO EM PLAQUETAS ESTIMULA A PROLIFERAÇÃO E MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL *IN VITRO*

As análises em cultura de células revelaram que o PRP, em todas as diluições estudadas, mas principalmente em 1:25, estimula a migração e proliferação das CTMd promovendo fechamento mais rápido da lesão.

Esses resultados corroboram os de Castro (2013) que observou que o PRP estimula a viabilidade e crescimento das CTMd, eventos importantes no reparo tecidual. Além disso, demonstrou que a associação do PRP às CTMd cultivadas na MRD constitui um microambiente efetivo para a adesão, o crescimento, a viabilidade, a migração, e diferenciação celular com grande potencial para a engenharia de tecidos. Do mesmo modo, Formigli e colaboradores (2011) verificaram a efetividade do PRP associado às CTM de tecido adiposo e à MRD (FORMIGLI et al., 2011). Dados semelhantes foram encontrados por Roubelakis e colaboradores (2014) que, em abordagens *in vitro*, demonstraram efeitos positivos do PRP na capacidade de migração e taxa de proliferação de CTM do fluido amniótico e fibroblastos da pele com diversas diluições de PRP (de 1:5 à 1:50). O mesmo trabalho, em estudo clínico de tratamento de úlceras, demonstrou que PRP promoveu cicatrização mais rápida com incremento na neovascularização (ROUBELAKIS et al., 2014).

Entretanto, ainda não há consenso na literatura a respeito de uso, diluições e procedimentos de preparo do PRP (DHURAT; SUKESH, 2014) sendo a uniformização nos parâmetros de centrifugação primordial para a padronização.

Em conjunto, os dados da literatura citados acima e os resultados dos experimentos em cultura de células sugerem que a associação dos três elementos da engenharia de tecidos PRP, CTMd e MRD influenciam a capacidade de migração e proliferação celular em área de lesão com participação efetiva no processo de reparo tecidual.

5.3 PARTE III - ESTUDO PRÉ-CLÍNICO DO USO ASSOCIADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS, CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME FACIAL, E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA NO REPARO CUTÂNEO EM MODELO MURINO

Na terceira parte do trabalho, foi analisada a associação de produtos da engenharia tecidual em estudo pré-clínico em camundongos onde se verificou que os animais tratados com as CTMd associadas à MRD foram os que apresentaram de modo geral as melhores condições nas diversas fases do reparo tecidual.

Os grupos animais tratados com PRP (associado ou não às CTMd) apresentaram na fase inflamatória os maiores valores da espessura do tecido de granulação, sendo estes os mais próximos da pele íntegra. Este efeito é explicado pelos fatores de crescimento e quimiotáticos presentes no PRP, principalmente pelos fatores plaquetários que atuam na hemostasia (oclusão da lesão) (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Esses grupos animais apresentaram ainda os maiores valores de colágeno I e III o que pode influenciar a fase de remodelamento do reparo tecidual, mais especificamente na fase de maturação.

Por outro lado, o uso da MRD isolada em raras condições nesse estudo demonstrou ser a melhor opção para uso. A literatura é enfática no que diz respeito à associação de produtos da engenharia tecidual, que tem se demonstrado mais efetiva no tratamento de lesões do que o uso de produtos isoladamente (FORMIGLI et al., 2015).

5.3.1 Análises macroscópicas no processo de reparo tecidual

Na análise macroscópica das lesões dos animais do estudo não foram observados sinais de infecção, como infiltrado purulento, edema e presença excessiva de exsudato em nenhum animal, indicando boas condições de manejo com os animais. Além disso, não foram observadas cicatrização hipertrófica, hipotrófica ou queiloideana em nenhum dos grupos estudados o que pode ser explicado pelo modelo animal cuja cicatrização ocorre por contração dos bordos contribuindo para o fechamento da lesão sem a expressão de cicatrizes anormais (ZOMER; TRENTIN, 2017).

Os animais tratados com as CTMd (associadas ou não ao PRP) foram os que apresentaram o fechamento da lesão mais rápido mesmo sem diferenças estatísticas, o que pode ser explicado pela interação dessas células com o microambiente da ferida. Durante o processo de

cicatrização, as CT são influenciadas pela secreção local de fatores de crescimento e sinais endógenos e assim contribuem para um rápido fechamento da lesão (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; ROUBELAKIS et al., 2014).

5.3.2 Avaliação da fase inflamatória do reparo tecidual

A fase inflamatória do reparo tecidual foi analisada no 3o dia de pós-operatório pela observação da espessura do tecido de granulação, infiltrado celular na MRD e infiltrado de leucócitos na área de lesão.

Os grupos animais tratados com PRP, associado ou não às CTMd, foram os que apresentaram maior espessura do tecido de granulação nesse momento inicial da fase de reparo tecidual apesar de não ter havido significância estatística.

Ação do PRP na fase inflamatória é explicada pela liberação de diversos fatores crescimento quimiotáticos que tem efeito contínuo em todas as fases do processo de reparo. O PRP quando adicionado à lesão aumenta a concentração de fatores com efeito na inflamação como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (ROUBELAKIS et al., 2014).

A ativação celular promovida pelo PRP (ROUBELAKIS et al., 2014) e pela mediação da sinalização parácrina das CTM (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016) foi observada na infiltração celular na MRD. No dia 3 de pós-operatório os grupos de animais tratados com PRP e/ou CTMd associados à MRD apresentaram maior quantidade de células infiltradas na MRD em relação aos animais do grupo tratado apenas com MRD. Resultado semelhante foi encontrado por Jeremias (2013) em relação aos animais tratados somente com MRD e com MRD e CTMd.

De modo semelhante, o grupo animal tratado com MRD apresentou infiltrado inflamatório moderado na área da lesão enquanto os demais grupos apresentaram alta quantidade de células inflamatórias nessa área. A ativação dos fatores do PRP e da ação parácrina das CTMd podem explicar também esses achados. De fato, trabalhos da literatura sugerem o papel das CTM na mediação inflamatória no processo de reparo tecidual (BRUNA et al., 2016). Além disso, Jeremias (2013) detectou aumento do infiltrado inflamatório nos animais tratados com CTMd.

A plasticidade e conversão dos macrófagos do tipo M1 (pró-inflamatório) em M2 (anti-inflamatório e pró-angiogênico) pode estar relacionada à ação das CTMd e do PRP e assim modular a inflamação em

resposta aos estímulos do ambiente (GONZALEZ et al., 2016; HONG et al., 2013; VASANDAN et al., 2016). Neste sentido, pode-se ressaltar a secreção pelas CTM de IL-6, IL-1, PDGF e TGF- β que participam no recrutamento e migração de neutrófilos (ZACHAR; BAČENKOVÁ; ROSOCHA, 2016). Por outro lado, as CTM também secretam IL-10, uma citocina anti-inflamatória que promove a diminuição da migração de neutrófilos ao tecido e que em conjunto à plasticidade dos macrófagos (o macrófago M2 secreta IL-10) regulam o microambiente da lesão (GONZALEZ et al., 2016; ZACHAR; BAČENKOVÁ; ROSOCHA, 2016). Outra questão importante a se levar em consideração é que os maiores níveis de neutrófilos no reparo tecidual, que ocorrem por volta de 1 - 2 dias após o trauma, atuam na prevenção de infecções bacterianas em conjunto à ação dos macrófagos além de ativar queratinócitos, fibroblastos e as células de sistema imune (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). Esses resultados sugerem que o aumento do infiltrado leucocitário possui ação nos demais eventos do reparo tecidual colaborando positivamente nesse processo.

5.3.3 Avaliação da fase proliferativa do reparo tecidual

A fase proliferativa do reparo tecidual foi avaliada no dia 7 de pós-operatório pelas análises do tecido de granulação, infiltração celular na MRD e número de vasos sanguíneos. Em todos os grupos animais estudados houve aumento da espessura do tecido de granulação em relação ao dia 3 de pós-operatório, sem diferença estatística entre eles. Este resultado está relacionado e é necessário à progressão do processo de reparo, porém desregulações e principalmente as formações em excesso podem levar a cicatrizes patológicas, como o caso das hipertróficas (HONG et al., 2013) o que não foi observado na pesquisa atual.

Resultado similar foi obtido quanto à infiltração celular na MRD onde os quatro grupos animais estudados apresentaram de modo semelhante aumento da colonização celular em relação ao dia 3 de pós-operatório. Esse dado pode ser explicado pelo recrutamento de fatores, células e demais agregados celulares durante a progressão do processo de reparo facilitado tanto pelo PRP, quanto pelas CTMd e pela MRD, um biomaterial que serve como arcabouço para a migração e depósitos de todos os componentes que vão formar o novo tecido (FORMIGLI et al., 2015; JEREMIAS et al., 2014; MARQUES; SUZUKI; MARQUES, 2017).

Além disso, os fatores presentes durante o processo de reparo promovem a angiogênese e atuam na reepitelização, completada na fase de maturação (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018). A neovascularização ocorre pela deposição de células endoteliais que favorecem a formação de novos vasos, evento estimulado pelo aumento dos níveis do fator de crescimento VEGF (GONZALEZ et al., 2016) e que no presente trabalho pode ser favorecido pela ação parácrina das CTMd e do PRP. O VEGF exerce um forte efeito parácrino nas células endoteliais, promovendo a angiogênese na lesão, no tecido de granulação em si e aumentando a densidade dos microvasos (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018; LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016). Neste sentido, a elevada quantidade de células infiltradas na MRD observada nos grupos animais estudados são condizentes com a formação dos vasos no dia 7 pós-operatório. Assim sendo, todos os grupos animais apresentaram diminuição no número de vasos/campo entre os dias 7 e 18 de pós-operatório. Na fase de maturação cicatricial que ocorre aos 18 dias de pós-operatório, a maioria dos vasos sanguíneos, assim como os fibroblastos e células inflamatórias diminuem e desaparecem da área da lesão devido a processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular (GONZALEZ et al., 2016). É importante salientar que, apesar de não ter sido observada diferença estatística para os demais grupos, o grupo de animais tratado com MRD, PRP e CTMd apresentaram o menor número de vasos/campo no dia 7 de pós-operatório, o maior número no dia 18, sugerindo um processo de reparo prolongado frente aos demais com maior quantidade de vasos presentes (YOUSEFI et al., 2014), condizendo ainda com uma alta espessura de derme recém-formada observada nesse dia.

5.3.4 Avaliação da fase de remodelamento do reparo tecidual

A fase de remodelamento foi avaliada aos 18 dias de pós-operatório pelas análises da espessura da neoderme, espessura da epiderme recém-formada e formação das fibras de colágeno.

Todos os grupos animais estudados apresentaram espessura da derme recém-formada maior que a da derme íntegra, sendo os tratados com MRD e PRP e com MRD e CTMd os de valores mais próximos à derme não lesionada. Pode-se sugerir uma fase de remodelamento em estágio mais avançado nesses animais, quando os fibroblastos do tecido de granulação mudam seu fenótipo e começam a expressar temporariamente a actina do músculo liso, convertendo-se em miofibroblastos (GONZALEZ et al., 2016).

Quanto à espessura da epiderme recém-formada, os dados demonstraram diferenças significativas entre o grupo de animais tratados com MRD e CTMd e os demais, sendo esse o mais próximo da epiderme íntegra enquanto que os tratados com PRP (MRD e PRP ou MRD, CTMd e PRP) foram os mais espessos e distantes indicando prolongamento da fase de maturação. Do mesmo modo, Venter e colaboradores (2016) observaram em lesões cutâneas de ratos, espessura aumentada da epiderme nos animais tratados com PRP (VENTER et al., 2016).

O grupo animal tratado com MRD e CTMd apresentou também os menores desvios da média percentual frente aos demais grupos sugerindo epiderme mais homogênea, mesmo não tendo apresentado diferença estatística quanto ao fechamento da lesão pelas análises macroscópicas. Não foram encontrados dados na literatura a respeito de uma espessura padrão esperada para o modelo estudado, contudo pode-se afirmar que as espessuras mais homogêneas e próximas à epiderme da pele íntegra são desejáveis no reestabelecimento da estrutura lesionada. Esses resultados em conjunto aos da espessura da epiderme recém-formada ressaltam a ação das CTMd, possivelmente pelos seus efeitos parácrinos, em recrutar os tipos de celulares envolvidos no reparo, incluindo células epiteliais, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos, e em regular as respostas celulares necessárias como sobrevivência, proliferação, migração e alteração da expressão gênica (MAXSON et al., 2012).

Quanto à formação das fibras de colágeno, não foram observadas diferenças estatísticas para os dois tipos (I e III) entre os grupos animais estudados.

Os animais tratados com MRD e PRP e com MRD, PRP e CTMd apresentaram os maiores percentuais e área média de colágeno tipo III acima da pele íntegra, o que corrobora os resultados acima sugerindo fase de maturação mais lenta nos grupos animais tratados com PRP, uma vez que nessa etapa do processo de reparo, o colágeno tipo III sofre degradação e aumenta a síntese de colágeno tipo I (GONZALEZ et al., 2016).

Cabe elucidar que nessa pesquisa, para a análise do percentual de colágeno (com *software* ImageJ 1.50i ©, *plug in* Threshold Color), a birrefringência foi definida pela cor verde (colágeno tipo III) e vermelha (colágeno tipo I). A literatura mostra que 80 % - 85 % do percentual de colágeno da pele íntegra corresponde ao colágeno tipo I e 10%-15% ao colágeno tipo III (DA CUNHA; PARAVIC; MACHADO, 2015), sendo este último muito diferente do encontrado nessa pesquisa. De modo similar, Ribeiro e colaboradores (2015) analisaram a produção de colágeno no reparo de lesões cutâneas em ratos encontrando níveis de

colágeno III muito abaixo dos preditos pela literatura para a pele íntegra (RIBEIRO et al., 2015). Lattouf e colaboradores (2014) estudaram por coloração com *picrosírius red* e visualização em microscópio sob luz polarizada, os níveis de colágeno em pacientes com Síndrome de Ehlers-Danlos Tipo IV (deficientes em colágeno tipo III) e em indivíduos hígidos. O grupo constatou que rotações no filtro do microscópio alterou a cor das fibras de colágeno nos grupos estudados sugerindo que a diferença de cores observada pode não estar associada aos tipos de colágeno, mas sim a artefato de técnica (LATTOUF et al., 2014). Acrescenta-se a afirmação dos precursores da técnica Montes e Junqueira (1991), quanto a dificuldade de diferenciação colorimétrica dos tipos de colágeno por coloração com *picrosírius red* (MONTES; JUNQUEIRA, 1991). Atualmente há na plataforma web *Research Gate* lista de discussão onde pesquisadores compartilham dessas observações (ATHENA REN, 2017). Sendo assim, os valores baixos da área de colágeno tipo III detectados no presente trabalho podem estar sendo subestimados.

Em todos os grupos animais estudados a área média de colágeno tipo I assim como o somatório das áreas dos colágenos tipo I e III foram abaixo dos da pele íntegra, o que sugere que em nenhum deles a fase de remodelamento foi finalizada no 18º dia de pós-operatório. O grupo animal que mais se aproximou da pele íntegra foi o tratado com MRD e PRP, seguido pelos tratados com MRD, PRP e CTMd, coincidindo com a maior espessura da neoderme e maior número de vasos e sugerindo fase de remodelamento tecidual mais lenta. Apesar dos animais tratados com MRD e PRP terem apresentado espessura de neoderme menor que os outros, os demais indicadores corroboram essa hipótese. Neste sentido, Chicharro-Alcántara e colaboradores (2018) demonstram que lesões cutâneas tratadas com PRP apresentam maior deposição de colágeno que as controle além de fibras mais organizadas. O PRP estimula a produção de colágeno tipo I, da metaloproteinase tipo I e aumenta os reguladores da progressão do ciclo celular para acelerar a cicatrização de feridas (CHICHARRO-ALCÁNTARA et al., 2018).

No presente estudo, foi observada maior espessura e organização paralela das fibras de colágeno tipo I nos animais tratados com MRD e PRP e com MRD, PRP e CTMd sugerindo que o processo de reparo mais lento é acompanhado por fibras de colágeno mais maduras e possivelmente de maior qualidade. Por outro lado, o grupo animal tratado com a associação de MRD e CTMd apresentou fibras de colágeno desorganizadas sugerindo maturação mais lenta dos componentes da matriz extracelular apesar da espessura da derme recém-formada ser mais próxima da pele íntegra. Esse resultado parece contradizer com a

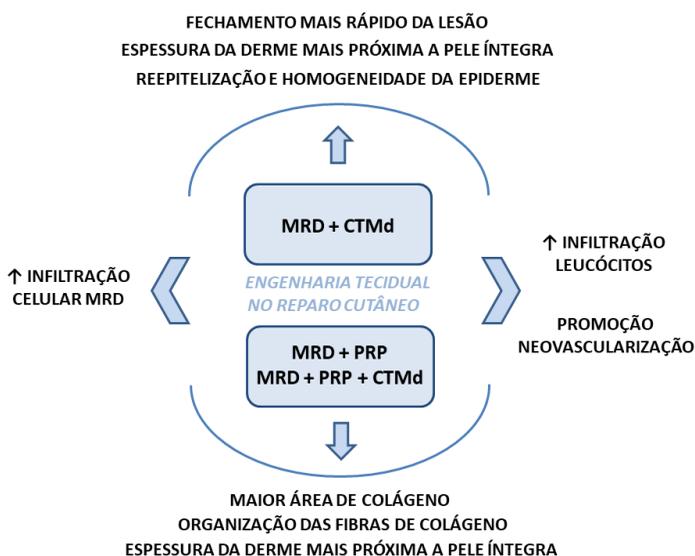
literatura (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016) que relata alinhamento regular das fibras de colágeno em lesões cutâneas tratadas com CTM e ainda aponta que estas desenvolveram apêndices cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas, característicos de uma pele com boa formação.

No momento final da fase de remodelamento, as fibras de colágeno tornam-se mais espessas e são dispostas em paralelo, resultando em força de tração aprimorada para o tecido, essencial para que restauração da funcionalidade e a aparência "normal" do tecido lesado ocorra. Nesse momento ainda, há alteração na produção de quimiocinas por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 ou TGF- β 1 com um forte efeito sobre a expressão gênica de colágeno (GONZALEZ et al., 2016).

Em conjunto, os dados de quantificação total e organização paralela das fibras de colágeno nos grupos animais tratados com PRP, sugerem processo de remodelamento mais lento na área da lesão acompanhado de resultados cicatriciais melhores. Esses resultados são corroborados por Klosová e colaboradores (2013) os quais verificaram que as cicatrizes tratadas com PRP em longo prazo apresentaram condições biomecânicas semelhantes a área de pele íntegra (KLOSOVÁ et al., 2013).

Em resumo, os resultados desse trabalho sugerem que o uso associado dos produtos da engenharia tecidual (MRD, PRP e CTMd) em lesões cutâneas são mais efetivos no processo de reparo do que seu uso isoladamente. A associação da MRD e as CTMd promoveu o fechamento mais rápido da lesão, e uma melhor reepitelização junto com maior homogeneidade da epiderme. A associação da MRD e PRP ou da MRD, PRP e CTMd resultou em maior área total de colágeno com melhor organização das fibras. Os três grupos de animais que utilizaram esses produtos associados ainda apresentaram a neoderme mais próxima à da pele íntegra, aumento da infiltração celular na MRD e do infiltrado leucocitário na lesão e maior vascularização (Figura 35).

Figura 35 - Esquema representativo dos efeitos da associação dos produtos da engenharia tecidual (MRD, PRP e CTMd) nas lesões cutâneas. Os resultados desse trabalho sugerem que associação desses elementos são mais efetivos do que seu uso isoladamente. A associação da MRD com a CTMd promoveu o fechamento mais rápido da lesão, e uma melhor reepitelização associada à homogeneidade da epiderme. A associação da MRD e PRP e da MRD, PRP e CTMd resultou em maior área total de colágeno assim como melhor organização das fibras de colágeno. A associação desses produtos resultou ainda em derme mais próxima à da pele íntegra, aumento da infiltração celular na MRD do infiltrado leucocitário na lesão e maior vascularização.



Fonte: do próprio autor (2018).

6 CONCLUSÃO

- A adesão do paciente ao tratamento proposto é fator fundamental para o seu completo sucesso.

- O plasma rico em plaquetas (PRP) estimula a proliferação e migração das células-tronco mesenquimais da derme facial (CTMd) promovendo fechamento da lesão *in vitro*.

- A utilização associada dos produtos da engenharia tecidual matriz de regeneração dérmica (MRD), CTMd e PRP são mais efetivos em todas as fases do processo de reparo cutâneo em modelo pré-clínico murino do que seu uso isoladamente.

- A associação da MRD com CTMd é efetiva em promover o fechamento acelerado da lesão cutânea acompanhado de melhor reepitelização e homogeneidade da epiderme influenciando positivamente ainda na espessura da neoderme, infiltração celular na MRD, infiltrado inflamatório e neovascularização.

- O PRP associado à MRD, na presença ou não de CTMd, é efetivo na fase de remodelamento do processo de reparo cutâneo estimulando a produção e organização das fibras de colágeno podendo resultar em cicatrizes de melhor qualidade. O PRP é também efetivo na espessura da derme, infiltração celular na MRD, infiltrado leucocitário e neovascularização.

REFERÊNCIAS

AGBENORKU, P. Burns functional disabilities among burn survivors: a study in Komfo Anokye Teaching Hospital, Ghana. **International journal of burns and trauma**, v. 3, n. 2, p. 78–86, 2013.

AHUJA, R. B. et al. ISBI Practice Guidelines for Burn Care. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 953–1021, 2016.

ALBUQUERQUE DE ALMEIDA, W. **Impacto das feridas na qualidade de vida de pessoas atendidas na rede primária de saúde**. [s.l.] Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2015.

ATHENA REN, Y. **Collagen type in Picrosirius red staining?**
Disponível em: <https://www.researchgate.net/post/Collagen_type_in>.
Acesso em: 2 jan. 2018.

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

BEDOYA, S. A. O. Caracterização De Colágeno Tipo I E III No Estroma Do Carcinoma De Células Escamosas Cutâneo Em Cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 68, n. 1, p. 147–154, 2016.

BORENA, B. M. et al. Regenerative Skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 1–23, 2015.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 6–11, 2006a.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. 7 SUPPL., p. 12–34, 2006b.

BRUNA, F. et al. Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells: Age-Related Changes. **Stem Cells International**, v. 2016, 2016.

BURKE, J. F. et al. Successful use of a physiologically acceptable

artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of surgery**, v. 194, p. 413–428, 1981.

CAMPOS LOGOCKI, A. C.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CASTRO, B. L. **Avaliação do uso de plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme associadas à matriz de regeneração dérmica**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

CHICHARRO-ALCÁNTARA, D. et al. Platelet Rich Plasma: New Insights for Cutaneous Wound Healing Management. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 1, p. 10, 2018.

CHUA, A. W. C. et al. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. **Burns & Trauma**, v. 4, n. 1, p. 3, 2016.

CK ELECTRONIC GMBH. **Information and Operating Instructions for the Multi Probe Adapter MPA and its probes**, 2010.

COLLARES, M. V. M.; LINHARES, C. B.; VIARO, M. S. S. Portuguese translation of Patient and Observer Scar Assessment Scale (POSAS). **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery**, v. 31, n. 1, p. 95–100, 2016.

CONDUTA, J. L. et al. Uso de matriz dérmica associado ao curativo por pressão negativa na abordagem da contratatura em pacientes queimados. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 3, p. 369–373, 2012.

DA CUNHA, M. G.; PARAVIC, F. D.; MACHADO, C. A. Alterações histológicas dos tipos de colágeno após diferentes modalidades de tratamento para remodelamento dérmico: Uma revisão bibliográfica. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 285–292, 2015.

DA FONSECA FILHO, R. et al. Superfície corporal queimada vs . tempo de internação . Análise dos últimos 15 anos. **Revista Brasileira De Queimaduras**, v. 13, n. Viii, p. 18–20, 2014.

DELGADO PARDO, G. et al. Psychological impact of burns on children treated in a severe burns unit. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 34, n. 7, p. 986–93, nov. 2008.

DHURAT, R.; SUKESH, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. **Journal of cutaneous and aesthetic surgery**, v. 7, n. 4, p. 189–97, 2014.

DITTAMI, S. **Shapiro-Wilk Normality Test**. Disponível em: <<http://sdittami.altervista.org/shapirotest/ShapiroTest.html>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

DOMINICI, M. et al. Cortenbach I , Marini FC , Krause DS . Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellu ... Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellul. n. September, 2006.

DUAN, J. et al. Differential effects of platelet rich plasma and washed platelets on the proliferation of mouse MSC cells. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 4, p. 2485–2490, 2011.

ELSAYED, M. Evaluation of the Effect of Platelet-Rich Plasma on Post-Burn Scars. **Open Access Journal of Surgery**, v. 5, n. 2, p. 6–10, 2017.

FERREIRA, M. C. et al. Complex wounds. **Clinics**, v. 61, n. 6, p. 571–578, 2006.

FORMIGLI, L. et al. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 4, n. 7, p. 524–531, 2011.

FORMIGLI, L. et al. MSCs seeded on bioengineered scaffolds improve skin wound healing in rats. **Wound Repair and Regeneration**, v. 23, n. 1, p. 115–123, 2015.

GARGIULO, S. et al. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. **ILAR Journal**, p. 1–

13, 2012.

GASSLING, V. L. W. et al. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 108, n. 1, p. 48–55, 2009.

GONÇALVES, C. et al. Avaliação de diferentes áreas de cicatriz na vítima de queimadura pela utilização do Cutometer : relato de um caso. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 12, n. 4, p. 289–292, 2013.

GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GOULART, B. C. et al. Análise do tempo de maturação dos implantes de matriz de regeneração dérmica utilizando curativos sob pressão negativa. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 4, p. 124–129, 2010.

GRAPHPAD, S. **QuickCalcs**. Disponível em: <<https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4, p. 352–366, 2011.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, p. 314–21, 2008.

HELD, M. et al. Alteration of biomechanical properties of burned skin. **Burns**, v. 41, n. 4, p. 789–795, 2015.

HONG, S. J. et al. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

HOP, M. J. et al. Cost study of dermal substitutes and topical negative pressure in the surgical treatment of burns. **Burns**, v. 40, n. 3, p. 388–396, 2014.

HORWITZ, E. M.; ANDREEF, M.; FRASSONI, F. Mesenchymal

Stromal Cells. **Curr Opin Hematol.**, v. 13, n. 6, p. 419–425, 2006.

JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: Potential tool for skin regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

JEREMIAS, T. DA S. **Avaliação do potencial terapêutico de células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **British journal of plastic surgery**, v. 55, n. 3, p. 185–193, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 12. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2013.

KIOUSSI, C. **Stem Cells and Tissue Repair.** New York, NY: Springer New York, 2014.

KLOSOVÁ, H. et al. Objective evaluation of the effect of autologous platelet concentrate on post-operative scarring in deep burns. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 39, n. 6, p. 1263–76, set. 2013.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. - ARTICLES Tissue Engineering. **Science**, v. 260, p. 920–926, 1993.

LATTOUF, R. et al. Picrosirius Red Staining: A Useful Tool to Appraise Collagen Networks in Normal and Pathological Tissues. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 10, p. 751–758, 2014.

LAZARUS, G. S. et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. **Archives of dermatology**, v. 130, n. 4, p. 489–493, 1994.

LEE, D. E.; AYOUB, N.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal stem cells and cutaneous wound healing: novel methods to increase cell delivery and therapeutic efficacy. **Stem cell research & therapy**, v. 7, n. 1, p. 37, 2016.

LEE, K. C. et al. A systematic review of objective burn scar measurements. **Burns & Trauma**, v. 4, n. 14, p. 3–33, 2016.

LEONARDI, D. et al. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1143–50, dez. 2012.

LEONARDI, D. F. **Avaliação do uso associado de células-tronco e engenharia tecidual na regeneração e neovascularização de lesão cutânea em camundongos**. [s.l.] Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.

LINDNER, U. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: Toward a better understanding of their biology? **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 37, n. 2, p. 75–83, 2010.

MAEGELE, M. et al. Negative pressure wound therapy: a vacuum of evidence. **Arch Surg.**, v. 143, n. 2, p. 189–196, 2008.

MAES, N. B. et al. Uso de matriz de regeneração dérmica em pacientes vítimas de queimaduras em hospital infantil de referência de Santa Catarina: nove anos de experiência. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 1, p. 6–14, 2012.

MAGHSOUDI, H.; NEZAMI, N.; MIRZAJANZADEH, M. Enhancement of burn wounds healing by platelet dressing. **Int J Burn Trauma**, v. 3, n. 2, p. 96–101, jan. 2013.

MARCK, R. E.; MIDDELKOOP, E.; BREEDERVELD, R. S. Considerations on the use of platelet-rich plasma, specifically for burn treatment. **Journal of Burn Care and Research**, v. 35, n. 3, p. 219–227, 2014.

MARQUES, C. M. DE G.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Tissue Engineering and Regenerative Medicine in Skin Wound Healing: What Has Been Done Recently -A Mini Review. **Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access**, v. 2, n. 4, p. 9–11, 2017.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **J. Oral**

Maxillofac. Surg., v. 62, p. 489–496, 2004.

MAXSON, S. et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012.

MONSTREY, S. et al. Assessment of burn depth and burn wound healing potential. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 34, n. 6, p. 761–9, set. 2008.

MONTES, G.; JUNQUEIRA, L. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. III, p. 1–11, 1991.

MOTEGI, S. ICHIRO; ISHIKAWA, O. Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. **Journal of Dermatological Science**, v. 86, n. 2, p. 83–89, 2017.

NALDAIZ-GASTESI, N. et al. Identification and Characterization of the Dermal Panniculus Carnosus Muscle Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 7, n. 3, p. 411–424, 2016.

NGUYEN, D. T.; ORGILL, D. P.; MURPHY, G. F. The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. In: D.P. ORGILL AND C. BLANCO (Ed.). **Biomaterials for Treating Skin Loss**. [s.l.: s.n.]. p. 25–57.

O’SULLIVAN, S. B.; SCHMITZ, T. J. **Fisioterapia: avaliação e tratamento**. 5ª ed. [s.l.] Manole, 2010.

ODELI, J. et al. Análise do diagnóstico inicial e na alta hospitalar de crianças queimadas internadas no Hospital Infantil Joana de Gusmão. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 11, n. 2, p. 67–73, 2012.

OLIVEIRA, F. P. S. DE et al. Análise Do Comportamento De Crianças Vítimas De Queimaduras Expostas a Curativo sem Sedação em Enfermaria. **Rev Bras Crescimento Desenvolvimento Hum**, v. 19, n. 3, p. 369–382, 2009.

OMS. **CIF - Classificação Internacional de Funcionalidade, Incapacidade e Saúde / Organização Panamericana da Saúde**,

Organização Mundial da Saúde. São Paulo: EDUSP, 2015.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 9, p. 899-908, 1988.

PALLUA, N.; WOLTER, T.; MARKOWICZ, M. Platelet-rich plasma in burns. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 36, n. 1, p. 4–8, fev. 2010.

PEREIRA, M. J. L. et al. Diminuição do tempo de maturação de matrizes de regeneração dérmica quando associados a uso de curativos de pressão negativa. **Rev Bras Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 145–152, 2013.

QUEIMADURAS, S. B. DE. **Queimaduras: Conceito e Causa.** Disponível em: <<http://sbqueimaduras.org.br/queimaduras-conceito-e-causas/>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RIBEIRO, F. et al. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v. 60, n. 11, p. 22–26, 2015.

ROUBELAKIS, M. G. et al. Platelet-Rich Plasma (PRP) Promotes Fetal Mesenchymal Stem/Stromal Cell Migration and Wound Healing Process. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 3, p. 417–428, 2014.

SANJARI, T.; HAJJAR, T.; MOMENI-MOGHADDAM, M. The Role of Mesenchymal Stem Cells in Skin Wound Healing. **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 70–75, 2015.

SERPOOSHAN, V. et al. Reduced hydraulic permeability of three-dimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3978–3987, 2010.

SHAH, J. B. The history of wound care. **Journal of the American**

College of Certified Wound Specialists, v. 3, n. 3, p. 65–66, 2011.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (United Kingdom)**, v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017.

SMANIOTTO, P. H. DE S. et al. Tratamento clínico das feridas - curativos. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 4, p. 137–141, 2010.

SOEJIMA, K. et al. One-step grafting procedure using artificial dermis and split-thickness skin in burn patients. **European Journal of Plastic Surgery**, v. 36, n. 9, p. 585–590, 2013.

SPECTOR, M. **Principles and practice: Tissue Engineering**. [s.l.] Massachusetts Institute of Technology, 2007.

SZABO, M. M. et al. Patient adherence to burn care: A systematic review of the literature. **Burns**, v. 42, n. 3, p. 484–491, 2016.

TAVARES, C.; HORA, E. Caracterização das vítimas de queimaduras em seguimento ambulatorial. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 10, n. 4, p. 119–123, 2011.

TIWARI, VK. Burn wound: How it differs from other wounds? **Indian Journal of Plastic Surgery**, v. 45, n. 2, p. 364, 2012.

UNIVERSIDADE ABERTA DO SUS - UNA SUS. **Fundamentação Teórica: Feridas**. São Paulo: [s.n.]. v. 3.

VANA, L. P. M.; SCHIOZER, W. Sequelas de queimaduras : nova classificação. **Revista Brasileira De Queimaduras**, v. 12, n. 3, p. 192, 2013.

VAN ZUIJLEN, P. et al. Tissue engineering in burn scar reconstruction. **Burns & trauma**, v. 3, n. 2015, p. 18, jan. 2015.

VARKEY, M.; DING, J.; TREDGET, E. Advances in Skin Substitutes—Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 547–563, 2015.

VASANDAN, A. B. et al. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE 2 - dependent mechanism. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–17, 2016.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212–218, 2009.

VENTER, N. G. et al. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. **Burns**, v. 42, n. 4, p. 807–814, 2016.

WATT, F. M.; FUJIWARA, H. Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2011.

WEB, M. **Picture of the Skin**. Disponível em: <<http://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General Principles of Wound Healing. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

WONG, D. J.; CHANG, H. Y. Skin tissue engineering. In: **Stem book**. Cambridge: Edited by The Stem Cell Research Community, 2009.

WOSGRAU, A. C. **Estudo comparativo de cicatrização entre matrizes de regeneração dérmica em pele de camundongo**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

YOUSEFI, S. et al. Assessment of microcirculation dynamics during cutaneous wound healing phases *in vivo* using optical microangiography. **Journal of Biomedical Optics**, v. 19, n. 7, p. 76015, 2014.

ZACHAR, L.; BAČENKOVÁ, D.; ROSOCHA, J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 231–240, 2016.

ZHANG, M. et al. A simple microfluidic strategy for cell migration

assay in an in vitro wound-healing model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 6, p. 897–903, 2013.

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. **Journal of Dermatological Science**, 2017.

ANEXO A – Permissão de uso de imagem da Web MD

20/02/2018

Email – jtibola@hotmail.com

FW: License for use a picture

Passehl, Beth

ter 20/02/2018 15:47

Para:jtibola@hotmail.com <jtibola@hotmail.com>;

📎 1 anexos (248 KB)

Picture of the Skin.jpg;

Hello,

Thank you for your request and interest in WebMD content. In response to your email below, WebMD grants permission for you to reprint the Picture of the Skin found at <https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>. Please note that we do not provide permission to reprint excerpts from articles or partial articles. There is no fee associated with this permission and I've attached a PDF copy of the article for your convenience.

Such reprint will be for the following purpose only: Use in Thesis

WebMD retains copyright for the material that you reproduce as part of this agreement. Please be sure to include the credit line and copyright acknowledgement at the bottom of the attached file with all reproductions.

Please feel free to contact me directly if you have further questions or requests. Thank you again for your use of the WebMD site!

Beth

Beth Passehl, MS, CPT, RYT
Senior Project Manager, Client Services and Medical Review
WebMD
[1201 Peachtree Street NE](#)
[Suite 2100](#)
[Atlanta, GA 30361](#)
Direct: 404-541-0108
Fax: 404-541-2087

From: Juliano Tibola [<mailto:jtibola@hotmail.com>]

Sent: Monday, February 19, 2018 5:02 PM

To: Copyright <Copyright@webmd.net>

Subject: License for use a picture

Good afternoon Web MD

I am a doctoral student at the Federal University of Santa Catarina - Brazil, and would like to request permission to use the image of "skin" on your web site for use in my doctoral thesis.

<https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>

<https://outlook.live.com/owa/?path=/mail/inbox/rp>

1/2

ANEXO B – Termo de Licença e Condições Elsevier and Copyright Clearance Center

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 19, 2018

This Agreement between Federal University of Santa Catarina State -- Juliano Tibola ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4292631024372
License date	Feb 19, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Dermatological Science
Licensed Content Title	Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research
Licensed Content Author	Helena D. Zomer, Andrea G. Trentin
Licensed Content Date	Available online 26 December 2017
Licensed Content Volume	n/a
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	0
End Page	0
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	1
Languages	English
Original figure numbers	Fig. 1. Skin wound healing.
Title of your thesis/dissertation	ENGENHARIA DE TECIDOS NO REPARO CUTÂNEO: ASSOCIAÇÃO DO PLAŞMA RICO EM PLAQUETAS, MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS DA DERME
Expected completion date	Mar 2018
Estimated size (number of pages)	110
Requestor Location	Federal University of Santa Catarina State Campus Universitário, s/nº FLORIANOPOLIS, Santa Catarina 88035-001 Brazil Attn: Juliano Tibola
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

ANEXO C – Parecer Consubstanciado 828.101 - CEP HIJG

HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO COMPARATIVO DO USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP) E MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA (MRD) SOB TERAPIA POR PRESSÃO NEGATIVA (TPN) NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO NO TRATAMENTO CIRÚRGICO DAS SEQUELAS DE QUEIMADURAS

Pesquisador: Maurício José Lopes Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35465114.6.0000.5361

Instituição Proponente: Hospital Infantil Joana de Gusmão/ SES - SC

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 828.101

Data da Relatoria: 11/09/2014

Apresentação do Projeto:

A literatura demonstra que a utilização da Matriz de Regeneração Dérmica (MRD) junto a Terapia por Pressão Negativa (TPN) trouxe enormes vantagens ao tratamento das lesões por queimaduras. O principal aspecto é a melhora na qualidade do tecido cicatricial, além da diminuição do sofrimento do paciente com redução significativa dos dias de internação, que inclui redução das decorrências negativas de uma maior permanência no hospital com menor exposição aos processos infecciosos, redução dos custos nas diárias de internação, em contrapartida aos altos custos da tecnologia empregada (MRD e TPN). Mesmo com as vantagens citadas, restam pontos a serem resolvidos em função de se obter tecnologias mais baratas e disponíveis a toda a população que dela necessita, assim como a busca de uma cobertura cutânea com melhor qualidade e agilidade no processo de cicatrização. Dentro dessa alternativa, temos o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) com a sua grande vantagem de facilitação no processo de neovascularização, por ser um fator de baixo custo e baixo risco e pela possibilidade de obtenção de modo autólogo. Assim, acreditamos que a associação do mesmo com a MRD e TNP poderia proporcionar a redução significativa dos dias de internação além de um melhor tecido cicatricial em função da facilitação do processo de cicatrização. O objetivo desse estudo é avaliar os efeitos da associação dos

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agronômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 828.101

produtos da engenharia tecidual (PRP e MRD) e da TPN na cicatrização, em cirurgias reparadoras de sequelas de queimaduras de espessura parcial profunda e de espessura total, em relação ao tempo, em estudo clínico, em membros superiores. O estudo será realizado em pacientes portadores de sequelas de queimaduras em membros superiores, que estão em acompanhamento ambulatorial no Ambulatório de Queimaduras do Hospital Infantil Joana de Gusmão (HIJG). A população será composta por doze sujeitos na faixa etária dos 12 aos 18 anos incompletos, independente do sexo com sequelas de lesões por queimaduras, com caráter funcional, ou seja, que possuam alguma restrição de função em decorrência da seqüela, nos membros superiores, especificamente em braço e antebraço. Após a obtenção do consentimento livre e esclarecido assinado pelos pais ou responsável legal e o termo de assentimento assinado pelo paciente, o mesmo será submetido ao procedimento cirúrgico. Os pacientes serão alocados em dois grupos distintos onde o grupo de intervenção após a retirada do tecido cicatricial será tratado com PRP + MRD + TPN enquanto o grupo controle não receberá o PRP, sendo submetido ao procedimento padrão e rotina de tratamento do HIJG com MRD e TNP. Nos dias 07 e 14 após a intervenção cirúrgica e aplicação da MRD, serão obtidas biópsias com o uso de um punch de 6mm na área central da lesão. As amostras coletadas nas biópsias serão fracionadas em 2 partes: uma avaliação histológica e para imunohistoquímica e outra para a análise molecular. As amostras serão acondicionadas em tubos de microcentrifuga para transporte até o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual - LACERT/UFSC onde o estudo laboratorial será realizado. Todo procedimento somente terá início após a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do HIJG e UFSC. No período de 6 meses de pós-operatório do primeiro procedimento cirúrgico, todos os indivíduos participantes do estudo serão reavaliados ambulatorialmente, no Ambulatório de Queimaduras do HIJG, onde ocorrerá a avaliação da cicatriz através do equipamento Cutometer - MPA 580 e da sonda Reviscometer, Courageand Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany). Os dados serão analisados por programas estatísticos a serem ainda definidos pelos pesquisadores. Cabe a esse estudo produzir conhecimentos, desenvolver e avaliar uma tecnologia com grande potencial de aplicabilidade ao Sistema Único de Saúde-SUS. A grande meta do projeto é o de gerar conhecimentos e tecnologias que proporcionem uma recuperação mais rápida e eficiente do paciente queimado, permitindo, a médio e longo prazo a reintegração deste ao seu meio e, conseqüentemente, a redução dos custos hospitalares, assim como, com a reabilitação no momento em que melhores resultados poderão ser obtidos, durante a fase aguda de tratamento das queimaduras.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 828.101

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos da associação dos produtos da engenharia tecidual (PRP e MRD) e da TPN na cicatrização, em cirurgias reparadoras de sequelas de queimaduras de espessura parcial profunda e de espessura total, em relação ao tempo, em estudo clínico, em membros superiores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos de participação dos sujeitos nesse estudo não são maiores à aqueles que os mesmos estariam expostos no momento da submissão ao tratamento cirúrgico de correção das sequelas de queimaduras, visto que a utilização da MRD + TPN fazem parte da rotina de tratamento da Unidade de Queimados do HJUG. Quanto à realização da biópsia de pele, com um punch de 6mm, no sétimo e no décimo quarto dia após o primeiro procedimento cirúrgico, esse não causará dor aos pacientes pois estarão medicados para a dor em função da troca de curativo que já é realizada de rotina pelo médico e enfermeiro do setor. A biópsia não deixará marcas ou cicatrizes, pois essa será realizada antes da enxertia de pele sobre a área onde foi colocada a MRD. Por se tratar de um procedimento invasivo, pode ser considerada como um procedimento de risco médio ao paciente. Quanto à aplicação do PRP, esse por se tratar de um produto autólogo, não causará danos ao paciente. Em função da coleta e manuseio seguir todas as orientações de qualidade e segurança do HEMOSC e ANVISA, e ocorrer em ambiente cirúrgico, limpo e estéril, não há relatos na literatura e pela ANVISA, de reações adversas ou danos aos pacientes. Portanto será considerado como um procedimento de risco mínimo ao paciente. Quanto à avaliação da cicatriz no período de 6 meses de pós-operatório do primeiro procedimento cirúrgico, através do equipamento Cutometer - MPA 580 e da sonda Reviscometer (Courageand Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany), o mesmo poderá causar um leve desconforto semelhante à um leve beliscão, esse gerado pela sucção que a sonda executa na pele. Portanto será considerado como um procedimento de risco mínimo ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante com perspectiva de melhora na qualidade do atendimento aos referidos pacientes com meta do projeto de gerar conhecimentos e tecnologias que proporcionem uma recuperação mais rápida e eficiente do paciente queimado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de apresentação obrigatória foram entregues conforme solicitado.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152
Bairro: Agrônoma CEP: 88.025-301
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251-9092 E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 828.101

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nada com pendência. Todos os documentos solicitados foram apresentados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme preconizado na Resolução 466/2012, XI.2, item d, cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final.

Assim sendo, o(a) pesquisador(a) deve enviar relatórios parciais semestrais da pesquisa ao CEP (a partir de Abril/2015) e relatório final quando do seu encerramento.

Um modelo deste relatório está disponibilizado no site <http://www.saude.sc.gov.br/hijg/cep/deveresdopesquisador.htm>

FLORIANÓPOLIS, 10 de Outubro de 2014

Assinado por:
Jucélia Maria Guedert
(Coordenador)

Jucélia Maria Guedert
Coordenadora do CEP-HIJG

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agrônômica

CEP: 88.025-301

UF: SC

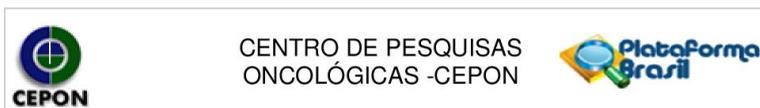
Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092

Fax: (48)3251-9092

E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br

ANEXO D – Parecer Consubstanciado 1.500.162 – CONEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele

Pesquisador: Andrea Gonçalves Trentin

Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;

Versão: 4

CAAE: 37167014.9.0000.5355

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
MINISTERIO DA EDUCACAO
Ministério da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.082.454

Data da Relatoria: 12/06/2015

Apresentação do Projeto:

Células estromais mesenquimais (CEM), também denominadas de células tronco mesenquimais (CTM), juntamente com células tronco epidermais (CT epidermais) têm sido alvo de diversos estudos que procuram utilizá-las como uma nova forma de terapia para tratar diversas doenças e lesões. Estas células têm sido descritas como uma fonte atrativa para a engenharia de tecidos, podendo agir em lesões se diferenciando

nos tipos celulares afetados ou através de efeitos parácrinos, além de serem naturalmente recrutadas pelo organismo para reparar tecidos danificados. Visando futuras aplicações clínicas, principalmente na área de reparo cutâneo, o presente trabalho tem como objetivo conhecer a biologia destas células analisando sua potencialidade, características morfológicas, fenotípicas e migratórias além de sua associação com diferentes biomateriais e fatores que poderiam auxiliar o reparo cutâneo. As CTM e CT epidermais

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404

Bairro: Itacorubi

CEP: 88.034-000

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3331-1502

Fax: (48)3331-1502

E-mail: cep@cepon.org.br



CENTRO DE PESQUISAS
ONCOLÓGICAS - CEPON



Continuação do Parecer: 1.082.454

serão obtidas a partir de fragmentos de excedentes de pele retirados através de cirurgias deritidoplastia realizadas no Hospital Ilha e no Hospital Universitário (Florianópolis) após consentimento dos pacientes. Esses fragmentos serão incubados com dispase e a epiderme e a hipoderme serão removidas do tecido. Os folículos serão retirados e colocados em placas de cultura com meio específico. A derme será dissociada mecânica e enzimaticamente para a obtenção das CTM. As CEM e CT epidermais serão mantidas em garrafas de cultura e serão submetidas a diversos processos como:avaliação de seu estado indiferenciado, capacidade de diferenciação celular, viabilidade celular em distintas condições de cultura, associação com diferentes biomateriais, associação com compostos como plasma rico em plaquetas e flavonoides e implantação em camundongos para avaliação de sua atuação no reparo cutâneo. Com este projeto se espera compreender as características e potencialidades das CTM e CT epidermais isoladas da pele humana e definir sua participação no reparo de lesões cutâneas em camundongos juntamente com biomateriais, visando sua aplicação em diversas terapias regenerativas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial de CTM e CT epidermais derivadas de pele, através de ensaios in vitro e in vivo visando sua utilização na terapia celular.

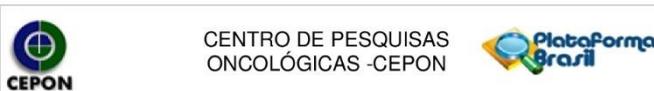
Objetivo Secundário:

- Cultivar células tronco epidermais de epitélio interfolicular e de folículo piloso humano, desenvolvendo metodologia de amplificação dessas populações celulares. - Realizar estudos de cultivo de células tronco epidermais e CTM de derme humana sobre matrizes de regeneração dérmica (MRD) e diferentes biomateriais como hidrogéis de carragenana, nanomatrizes e celulose bacteriana. - Realizar estudos pré-clínicos de regeneração de lesão de espessura total de pele em camundongos isogênicos após a inserção de MDR e biomateriais em conjunto com células tronco (epidermais e CTM de derme) e/ou PRP. - Testar fatores que possam modificar a sobrevivência, proliferação, diferenciação, migração celular, entre outras características das células, como o plasma rico em plaquetas (PRP) e flavonoides.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não foram identificados riscos significativos aos participantes

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.034-000
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3331-1502 **Fax:** (48)3331-1502 **E-mail:** cep@cepon.org.br



Continuação do Parecer: 1.082.454

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de doutorado de abordagem multidisciplinar utilizando análises de cultura de diversos tipos de células tronco, desenvolvimento e avaliação de matrizes de regeneração dérmica. É objetivo do projeto produzir conhecimentos, desenvolver e avaliar tecnologias com grandepotencial de aplicabilidade ao SUS, proporcionando melhor recuperação e redução dos custos hospitalares do paciente queimado. As amostras de pele serão obtidas de excedentes de cirurgias de ritidoplastia, após a apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, através de colaboração com o Hospital Universitário e com o Hospital Ilha Maternidade, ambos de Florianópolis. O material coletado será armazenado em recipiente estéril, e encaminhado para o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (UFSC), onde será realizado o procedimento de cultura celular.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados de acordo com as normas do CEP/CONEP e resolução 466/12.

Recomendações:

Nada a acrescentar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências equacionadas

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Qualquer alteração no projeto original deverá ser imediatamente encaminhada ao CEP para análise e aprovação. Relatórios semestrais deverão ser encaminhados.

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404
Bairro: Itacorubi **Município:** FLORIANOPOLIS **CEP:** 88.034-000
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3331-1502 **Fax:** (48)3331-1502 **E-mail:** cep@cepon.org.br



CENTRO DE PESQUISAS
ONCOLÓGICAS - CEPON



Continuação do Parecer: 1.082.454

FLORIANOPOLIS, 27 de Maio de 2015

Assinado por:
Luiz Roberto Medina dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Rodovia Admar Gonzaga,655 - SC 404
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.034-000
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3331-1502 **Fax:** (48)3331-1502 **E-mail:** cep@cepon.org.br

ANEXO E – Protocolo PP00810 - CEUA**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00810

TítuloProtocolos experimentais utilizados pelo LACERT/UFSC que envolvem animais da espécie *Mus musculus***Data de Entrada**

21/06/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

29/11/2012

Considerações

Ofício nº 113/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil seiscentos e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência Biotério Setorial LACERT (BEG/CCB)

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)**Data 28/02/2017**

Data 29/11/2012

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE