

Talita da Silva Jeremias

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DA PELE NO REPARO
DE LESÕES CUTÂNEAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção de Grau de Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Andréa Gonçalves Trentin

Florianópolis
2013

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

Jeremias, Talita da Silva

Avaliação do potencial terapêutico de células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas / Talita da Silva Jeremias ; orientadora, Andréa Gonçalves Trentin - Florianópolis, SC, 2013.

135 p.

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

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Célula-tronco mesenquimal. 3. regeneração. 4. pele. 5. substitutos dérmicos. I. Trentin, Andréa Gonçalves . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

*Ao meu filho, ainda em meu ventre,
que me selecionou para o mais belo
doutorado da vida: ser mãe.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andréa, exemplo de dedicação, agradeço por todo ensinamento, apoio, oportunidades e conselhos profissionais e pessoais em todos esses anos de laboratório. Sem dúvida, esses anos foram essenciais para o meu crescimento científico e pessoal. Obrigada sempre pela confiança.

Aos professores do LACERT, Giordano Calloni, Ricardo Garcez e Márcio Alvarez pelas conversas sábias, que iam desde questões científicas até vinhos e filmes. Obrigada pelo incentivo e ensinamentos.

À professora e amiga Cláudia, por estar sempre me alegrando com suas histórias. Sinto falta de ter você no meu dia-a-dia laboratorial, era muito mais divertido!

Às professoras Yara Muller e Ilíada, que me deram uma aula de vida. Com pequenas falas vocês me fizeram ter percepções do mundo e das pessoas de uma maneira diferente. Um trabalho de doutorado é muito mais do que está aqui apresentado nesta tese.

Aos médicos Dilmar Leonardi e Maurício Pereima, pela disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos durante esse trabalho. Pela dedicação e trabalho sério que realizam na área da saúde, são de profissionais como vocês que necessitamos. Em especial ao Leonardi, que no início do doutorado me ensinou a realizar as cirurgias nos animais e pelas longas tardes de cirurgia regadas a um bom papo.

Ao médico Rogério Gomes e a equipe do Hospital e Maternidade Ilha, por viabilizarem a coleta de pele humana utilizada nesta tese, e a todos os pacientes que doaram um “pedacinho” de si.

À todos os profissionais da UFSC com os quais cruzei durante este trabalho, professores, biólogos, administradores, pessoal da limpeza e da manutenção. Em especial aos profissionais do LAMEB I e II e do LCME, que sempre foram muitos solícitos e pacientes.

Ao pessoal do laboratório, a turma mais divertida que existe! Nestes anos de laboratório não tive apenas colegas, e sim grandes amigos. Pessoas

maravilhosas que entraram na minha vida e espero que nunca saiam. Alguns não estão mais no laboratório, viraram médicos, professores, estão trabalhando, fazendo doutorado/mestrado em outros lugares. Aos que me ajudaram nos experimentos, nas cirurgias, na limpeza do biotério. Cada um de vocês tem um espaço no meu coração e fizeram parte desta história. Vocês são e sempre serão especiais!

Aos meus amigos queridos, obrigada por sempre estarem ao meu lado, pelas conversas, cafezinhos e jantinhas. Vocês fazem parte da base que me sustenta!

Aos meus cunhados, Renata e Daniel, obrigada por todo carinho. Vocês já são como irmãos para mim.

À minha família Alemã, Nora, Rúbia, Flávio e meu afilhado Enzo, por todo carinho e amizade. Em especial ao meu furrequinho Enzo, a “Tata” te ama!

Aos meus irmãos, Lhalha e Dede, por toda força, amizade e união. Vocês são maravilhosos. Faz falta ter vocês ao meu lado.

Aos meus pais, Dalmir e Antonia, muito obrigada por tudo. Vou ser mãe daqui a alguns meses, mas nunca vou deixar de ser filha. Sempre serei a caçula, que vai deitar na cama de vocês e chorar ao telefone quando o bolo não der certo. Agradeço pela super dedicação, por estarem sempre presentes, pela educação e conselhos recebidos. Passarei ao meu filho tudo que vocês me ensinaram, serão meu espelho de como ser ótimos e admiráveis pais.

Ao Rafael, meu grande amor e pai do meu filho, simplesmente por tudo. Continuo usando esta simples e mais sincera frase. Te amo muito!

RESUMO

Novas estratégias para a regeneração da pele são necessárias a fim de proporcionar um tratamento eficaz para feridas cutâneas e doenças. Dentre estas possíveis estratégias estão o desenvolvimento de novos biomateriais, a realização de terapia celular e a identificação e aplicação de fatores envolvidos no reparo de tecidos. Avanços na área de engenharia tecidual têm possibilitado o desenvolvimento de biomateriais que se assemelham a arquitetura tecidual da pele, como os substitutos dérmicos, que permitem o recobrimento da lesão e facilitam a recolonização celular, auxiliando assim a regeneração do tecido dérmico. Além disso, as células-tronco mesenquimais (CTMs) têm sido descritas como uma fonte atrativa de células para a engenharia de tecidos, em razão da sua multipotencialidade e capacidade de liberação de moléculas ativas importantes para o reparo tecidual. Tendo em vista estes aspectos, o presente trabalho busca estabelecer e avaliar um novo método de tratamento de lesões de pele, tendo como base a associação das CTMs derivadas da pele humana com substitutos dérmicos comerciais, utilizados atualmente em abordagens clínicas. Para isso, primeiramente, CTMs da derme humana (dCTMs) foram isoladas e sua potencialidade e características morfológicas, fenotípicas e migratórias analisadas. Os resultados obtidos mostram que as dCTMs possuem características semelhantes às CTMs derivadas da medula óssea, como: morfologia fibroblastóide, alta capacidade proliferativa, perfil de expressão de marcadores de superfície e potencial de diferenciação para fenótipos mesodermiais. Além disso, as células expressam marcadores de pluripotencialidade e de linhagens neurais e mesenquimais, sem indução específica, e possuem potencial de diferenciação para a linhagem epidermal. Ademais, as dCTMs mostram alta capacidade migratória *in vitro*.

Após esta caracterização das dCTMs, foi avaliado o crescimento e a manutenção destas células em um sistema de cultura tridimensional com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®. Os resultados mostram que ambos os substitutos dérmicos suportam igualmente a adesão, proliferação e migração das dCTMs, mantendo suas características fenotípicas, tais como o perfil de expressão de marcadores de superfície, de pluripotencialidade e de linhagens neurais e mesenquimais. Tendo em vista que a associação das dCTMs com os substitutos dérmicos mostrou-se eficiente, foi avaliado a seguir o potencial terapêutico destas células associadas ao substituto dérmico (SD) Integra® no reparo de lesões de pele em camundongos. Para isso, foi avaliada a inflamação, vascularização,

depósito de matriz extracelular e a re-epitelização em lesões tratadas com dCTMs associadas ao SD e em lesões mantidas apenas com o SD (controle). Os resultados demonstram que o tratamento com dCTMs + SDs aumenta o tecido de granulação, o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização, acelerando assim o reparo tecidual. Além disso, o tratamento com dCTMs + SDs modula a expressão de diferentes genes relacionados com o reparo tecidual na área da lesão. Em conclusão, o presente estudo isolou uma população de CTMs da pele humana, denominada de CTMs dermais (dCTM), e mostrou uma eficiente associação destas células com os SDs, representando assim uma nova ferramenta terapêutica para a engenharia tecidual. Esta associação, quando avaliada no tratamento de lesões cutâneas de camundongos, mostrou-se promissora, resultando em um reparo tecidual mais eficiente.

ABSTRACT

New strategies for skin regeneration are needed in order to provide effective treatment for cutaneous wounds and diseases. Among these possible strategies are the development of new biomaterials, cell therapy and the identification and application of factors involved in tissue repair. Advances in tissue engineering have provided the development of biomaterials similar to the skin such as dermal substitute (DS), for covering the lesion and to facilitate cell recolonization thereby supporting dermal regeneration. In addition, mesenchymal stem cells (MSCs) have been suggested as an attractive source of cells for tissue engineering because of their multipotentiality and ability to release active molecules for tissue repair. Therefore, the present study established and evaluated a new method for treatment of skin lesions, based on the association of MSCs derived from human skin with commercial dermal substitutes currently used in clinical procedures. Thus, MSCs from human dermis (dCTMs) were isolated and their morphologic, phenotypic migratory characteristics and potentiality analyzed. The results showed that dCTMs have characteristics similar to MSCs derived from bone marrow, such as: fibroblast-like morphology, high proliferative capacity, profile of surface markers and differentiation potential for mesodermal phenotypes. In addition, these cells express pluripotent and mesenchymal and neural lineages markers, without specific induction. Moreover, the dMSCs display the potential for epidermal lineage and show high migratory capacity *in vitro*.

It was also evaluated the growth and maintenance of these cells in three-dimensional (3D) culture system with the dermal substitutes Pelnac® and Integra®. The results showed that both dermal substitutes equally support the adhesion, spread and growth of human dMSCs in 3D-culture, maintaining MSC phenotype, expression of the pluripotent and neural and mesenchymal lineages markers. In view of these results, the therapeutic potential of these cells associated with the Integra DS in the repair of skin lesions in mice was evaluated *in vivo*. Inflammation, vascularization, deposition of matrix extracellular molecules and reepithelialization in skin lesions were analyzed. The results demonstrated that the treatment with dCTMs + DSs increases the granulation tissue, recruitment of inflammatory cells (neutrophils and macrophages), vascularization, collagen deposition and reepithelialization, thus accelerating tissue repair. In addition, the treatment with dCTMs + DSs modulates the expression of different genes related to tissue repair. In conclusion, the present study isolated a population of MSCs from human skin, named dermal MSCs (dMSCs), and

showed an efficient association of these cells with DSs, representing a new therapeutic tool for tissue engineering. This combination, when evaluated in the treatment of cutaneous lesions in mice, has shown to be promising, resulting in a more efficient tissue repair.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da pele e seus componentes.	25
Figura 2: Estágios clássicos do reparo tecidual: inflamação, proliferação e remodelamento.	26
Figura 3: Localização de CTs tronco na pele e seu potencial de reparo tecidual, após uma lesão.	33
Figura 4: Modelo pré-clínico de lesão cutânea.....	57
Figura 5: Esquema demonstrando os diferentes procedimentos e análises para a avaliação do reparo tecidual em camundongos.	58
Figura 6: Esquema representando as análises realizadas através da coloração com hematoxilina e eosina.	60
Figura 7: Morfologia e viabilidade das dCTMs.	66
Figura 8: Caracterização imunofenotípica e potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico das dCTMs.....	68
Figura 9: Expressão de marcadores de pluripotencialidade e de linhagens celulares diferenciadas (neural, mesenquimal e endotelial) nas dCTMs.....	70
Figura 10: Potencial de diferenciação das dCTMs para queratinócitos.....	72
Figura 11: Migração das dCTMs <i>in vitro</i> (ensaio de <i>wound healing</i>).....	73
Figura 12: Viabilidade celular e adesão das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos, Integra® e Pelnac®.....	75
Figura 13: Adesão e morfologia das dCTMs associadas ao Integra®.....	70

Figura 14: Adesão e morfologia das dCTMs associadas ao Pelnac®.....	78
Figura 15: Perfil imunofenotípico das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®.....	79
Figura 16: Perfil de expressão gênica das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®.....	80
Figura 17: Avaliação macroscópica da lesão no dia 21 pós-operatório.....	82
Figura 18: Formação do tecido de granulação e colonização celular no substituto dérmico, no dia 3, 7 e 14 de pós-operatório.....	84
Figura 19: Avaliação do tecido de granulação nas lesões cutâneas, nos dias 3, 7 e 14 dias de pós-operatório.....	85
Figura 20: Infiltração de neutrófilos nas lesões cutâneas, 3 dias pós-operatório.....	80
Figura 21: Infiltração de macrófagos nas lesões cutâneas, 7 dias pós-operatório.....	80
Figura 22: Vascularização nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 4 dias pós-operatório.....	89
Figura 23: Depósito de matriz extracelular (colágeno) nas lesões cutâneas, nos dias 14 e 21 pós-operatório.....	91
Figura 24: Expressão de colágeno do tipo I nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 21 pós-operatório.....	92
Figura 25: Re-epitelização e fechamento das lesões cutâneas, no dia 21 pós-operatório.....	94
Figura 26: Regulação da expressão gênica nas lesões cutâneas do grupo tratado com dCTMs + SD em relação ao grupo controle (SD), nos dias 7 e 14 pós-operatório.....	96

Figura 27: Regulação da expressão gênica nas lesões cutâneas tratadas com dCTMs + SD..	99
Figura 28: Esquema representativo da ação das dCTMs + SD nas lesões cutâneas.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mediadores presentes na lesão cutânea durante o processo de reparo tecidual.....	28
Tabela 2: Mediadores secretados pelas CTMs da medula óssea.	39
Tabela 3: Anticorpos utilizados na análise fenotípica através de citometria de fluxo.....	53
Tabela 4: Anticorpos utilizados na análise fenotípica através de imunocitoquímica.	54
Tabela 5: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.	55
Tabela 6: Anticorpos utilizados nas análises de imunohistoquímica.....	61
Tabela 7: Análise qualitativa da infiltração de células no substituto dérmico, nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório.....	85
Tabela 8: Análise qualitativa da infiltração de neutrófilos e macrófagos nas lesões cutâneas, após 3 e 7 dias do procedimento cirúrgico.....	80
Tabela 9: Regulação da expressão gênica (em vezes) nas lesões cutâneas tratadas com dCTMs +SD (comparada ao controle).....	92

ABREVIACÕES

3D: Tridimensional

ANOVA: Análise de variância

CT: Célula Tronco

CTGF: Fator de crescimento do tecido conjuntivo

CTM: Célula Tronco Mesenquimal

dCTM + SD: Células Tronco mesenquimais derivadas da derme associadas ao substituto dérmico

dCTM: Célula Tronco Mesenquimal derivada da derme

DNA: Ácido Desoxirrinonucléico

EGF: Fator de Crescimento Epidermal

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblastos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

HB-EGF: Fator de Crescimento Semelhante à EGF Ligado à Heparina

IGF: Fator de Crescimento semelhante à Insulina

IL: Interleucina

KGF: Fator de Crescimento de Queratinócitos

MEC: Matriz Extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

MMP: Metaloproteases ou Metaloproteínases

MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico)

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PE: Ficoeritrina

PE-Cy5: Ficoeritrina-cianina

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA: Ácido Ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RT-PCR: Transcriptase reversa seguida da Reação em cadeia da polimerase

SBF: Soro Bovino Fetal

SD: Substituto Dérmico

SKPs: Progenitores derivados da pele

SMA: Actina de Músculo Liso

TGF: Fator de Crescimento Transformante

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	23
1.1. Estrutura da Pele.....	20
1.2. Reparo Tecidual.....	21
1.2.1. Fase inflamatória.....	27
1.2.2. Fase proliferativa.....	28
1.2.3. Fase de Remodelamento	31
1.3. Células tronco e reparo tecidual	31
1.3.1. Nicho Dermal e Células Tronco Mesenquimais (CTM).....	33
1.3.2. Características <i>in vitro</i> das CTMs.....	30
1.3.3. Nicho das CTMs na pele	36
1.3.4. Propriedades biológicas das CTMs e sua utilização no reparo tecidual.....	37
1.4. Engenharia tecidual para o reparo de lesões de pele.....	40
1.4.1. Substitutos Dérmicos (SDs): Integra® e Pelnac®	41
1.5. Justificativa.....	42
2.OBJETIVOS	45
2.1 Objetivo Geral	45
2.2 Objetivos Específicos	45
3.METODOLOGIA	47
3.1. Obtenção das amostras de pele humana	47
3.2. Isolamento e Cultura das Células Tronco Mesenquimais obtidas da pele humana	47
3.3. Análise morfológica e da viabilidade/proliferação celular	48
3.4. Ensaio de migração celular (<i>Wound healing</i> ou <i>Cell scratch</i>).....	49
3.5. Diferenciação em fenótipos mesodermis e epidermis.....	49
3.5.1. Diferenciação adipogênica	49
3.5.2. Diferenciação osteogênica	50
3.5.3. Diferenciação em queratinócitos.....	50
3.6. Cultura 3D (tridimensional) de dCTMs em associação com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®	50
3.7. Análise da associação das dCTMs com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®	51

3.7.1. Análise da viabilidade/proliferação celular	51
3.7.2. Microscopia Confocal	51
3.7.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	52
3.8. Análises fenotípicas das dCTMs.....	52
3.8.1. Colorações.....	52
3.8.2. Citometria de fluxo.....	53
3.8.3. Ensaio de Imunocitoquímica	53
3.8.4. Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	54
3.9. Estudo pré-clínico: análise do reparo tecidual após o tratamento com dCTMs associadas ao substituto dérmico Integra® em lesões cutâneas.....	50
3.9.1. Animais	50
3.9.2. Procedimento cirúrgico para a realização de lesões de pele de espessura total e grupos experimentais	50
3.9.3. Grupos experimentais.....	58
3.9.4. Análise Macroscópica do reparo tecidual.....	58
3.9.5. Análises Histológicas do reparo tecidual.....	59
3.9.6. Análise de imunohistoquímica	61
3.9.7. Análise da expressão gênica.....	62
4.RESULTADOS	65
4.1. Caracterização das células derivadas da derme	65
4.1.1.Morfologia e viabilidade celular	65
4.1.2. Expressão de marcadores de superfície	60
4.1.3. Potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica.....	60
4.2. Expressão de marcadores de pluripotencialidade e de linhagens celulares diferenciadas nas dCTMs	69
4.3. Diferenciação em queratinócitos e migração celular das dCTMs	71
4.3.1 Diferenciação em queratinócitos	71
4.3.2. Migração celular das dCTMs – ensaio de <i>wound</i> <i>healing</i>	73
4.4. Biocompatibilidade e interação das dCTMs com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® <i>in vitro</i>	74
4.4.1. Viabilidade/proliferação celular das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos	74
4.4.2. Adesão e morfologia das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos	74

4.5. Perfil fenotípico das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® <i>in vitro</i>	79
4.6. Potencial de reparo tecidual das dCTMs associadas ao substituto dérmico Integra® em camundongos submetidos à lesões cutâneas.....	81
4.6.1. Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas.....	81
4.6.2. Formação do tecido de granulação nas lesões cutâneas.....	83
4.6.3. Colonização celular do substituto dérmico Integra®	83
4.6.4. Recrutamento de células inflamatórias – neutrófilos e macrófagos	86
4.6.5. Neovascularização	90
4.6.6. Depósito de matriz extracelular e remodelamento	90
4.6.7. Re-epitelização e fechamento da lesão.....	93
4.6.8. Perfil da expressão gênica nas lesões cutâneas	95
5. DISCUSSÃO	103
5.1. As células isoladas da derme possuem características de CTMs.....	103
5.2. As dCTMs possuem potencial de diferenciação em queratinócitos e alta capacidade migratória <i>in vitro</i>	105
5.3. Os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® suportam a sobrevivência, adesão e infiltração das dCTMs <i>in vitro</i>	106
5.4. As dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® mantém suas características fenotípicas.....	107
5.5. O tratamento com dCTMs associadas ao substituto dérmico (dCTMs + SD) acelera o reparo de lesões cutâneas em camundongos	108
5.5.1. O tratamento com dCTMs + SD aumenta a formação do tecido de granulação e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos	109
5.5.2. O tratamento com dCTMs + SD aumenta a neovascularização, o depósito de matriz extracelular e a re-epitelização	111
5.5.3. O tratamento com as dCTMs + SD modula a expressão gênica na lesão cutânea.	113
6. CONCLUSÕES.....	119

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXOS	131

1.INTRODUÇÃO

A habilidade de responder a lesões e reparar tecidos é uma propriedade fundamental para vários organismos multicelulares, mas há uma diversidade em relação a como estes processos ocorrem em cada espécie. No geral, as lesões teciduais desencadeiam várias respostas intracelulares e intercelulares que coordenam a restauração da integridade e a homeostase do tecido (GURTNER et al., 2008). O reparo pode ocorrer através da regeneração tecidual, com a recomposição da funcionalidade do tecido, ou pela cicatrização, com o restabelecimento da homeostasia do tecido e perda da sua atividade funcional (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; GURTNER et al., 2008).

A capacidade de regeneração tecidual tem sido demonstrada em inúmeras espécies de invertebrados e vertebrados, como poríferos, anfíbios, crustáceos e répteis. Nestes organismos a resposta à lesão pode recapitular completamente a arquitetura original do tecido, através de um processo regenerativo, que devido a sua complexidade ainda é pouco conhecido. A autotomia, por exemplo, que é a capacidade que alguns animais possuem de liberar partes específicas do corpo, pode ser seguida de uma total regeneração tecidual em várias espécies. Recentemente, um estudo relatou pela primeira vez a capacidade de autotomia de pele em mamíferos (ratos *Acomys*) e a posterior regeneração total deste tecido. Tal descoberta é de extrema importância, pois em mamíferos o potencial de regeneração é muito limitado, sendo que na maioria das vezes ocorre a cicatrização por fibrose, ao invés de regeneração completa (SEIFERT et al., 2012).

Os seres humanos possuem esta habilidade de regeneração durante o período pré-natal, entretanto, o perdem na vida adulta. Neste sentido, poucos tecidos como o fígado e a pele, possuem a capacidade de regeneração na vida adulta. No fígado, conforme o tipo de lesão, 70% do tecido pode ser regenerado sem a formação de fibrose. Na pele, a regeneração pode ocorrer, como em casos de amputação da ponta do dedo, embora o resultado típico após uma lesão significativa seja a formação de fibrose. Desta forma, tem sido aceito que a pele mantém sua habilidade de regeneração. A questão é como aproveitar este potencial para o tratamento de lesões cutâneas e doenças (WONG et al., 2012).

1.1. ESTRUTURA DA PELE

A pele dos mamíferos é um órgão complexo formado por vários tecidos e estruturas acessórias, como o folículo piloso e as glândulas. A função primária da pele é a proteção do organismo através do controle da regulação hídrica, servindo como uma barreira de permeabilidade. Além disso, a pele é responsável pela proteção contra agentes externos, como infecções por micro-organismos, raios solares, ações mecânicas e químicas. Possui, ainda, função termorreguladora e sensorial (BLANPAIN, 2010; FUCHS, 2008).

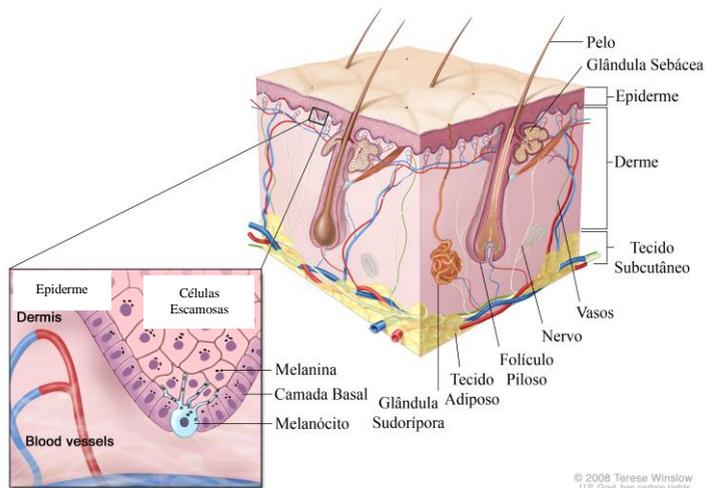
Estruturalmente, a pele é formada por dois componentes principais, a derme e a epiderme (Figura 1). A epiderme ou camada superficial, de origem ectodérmica, é uma fina camada estratificada com espessura variável de 0,05 a 1,5mm, composta principalmente por queratinócitos (NIEMANN; WATT, 2002). Além deste epitélio queratinizado, a epiderme é constituída de melanócitos (células pigmentares), células de Langerhans (envolvidas com o sistema imune) e Merkel (mecanoreceptores) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

A camada basal da epiderme a conecta com a derme subjacente através de proteínas da família das integrinas e compõe um dos nichos de células-tronco (CTs) epidermais da pele. Estas CTs são as responsáveis pela atividade proliferativa e pela formação das diferentes camadas de queratinócitos encontradas na epiderme (Figura 1). Os queratinócitos estão distribuídos linearmente em quatro camadas morfológicamente distintas, cujas alterações são decorrentes da diferenciação das CTs epidermais em células maduras queratinizadas, em um ciclo que leva de 12 a 48 dias em humanos, e de 5 a 11 dias na pele dorsal de camundongos (BARTHEL e ABERDAM, 2005; STRONG *et al.*, 2006; HSIEH *et al.*, 2004).

A derme, derivada do mesoderma, é constituída por matriz extracelular composta de colágeno, glicosaminoglicanos, elastina e uma variedade de outras matrizes proteicas. Ela é ricamente suprida de sangue, através de uma densa rede de capilares e a principal célula que a constitui é o fibroblasto. Células imunes (mastócitos e macrófagos), do endotélio vascular, além de uma rede de nervos também estão presentes em abundância (Figura 1) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999). Estruturalmente a derme é dividida em duas regiões, a papilar e a reticular. A derme papilar está localizada abaixo da epiderme, possuindo sistema circulatório associado, enquanto a derme reticular é localizada próxima do tecido subcutâneo e possui uma estrutura de matriz extracelular mais densa, podendo ser avascular e acelular. Na profundidade da derme estão os

anexos epidérmicos, que são os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Figura 1). O tecido subcutâneo subjacente á derme, chamado também de hipoderme, é formado por tecido adiposo que se conecta aos músculos e ossos do corpo (NIEMANN; WATT, 2002; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele e seus componentes.

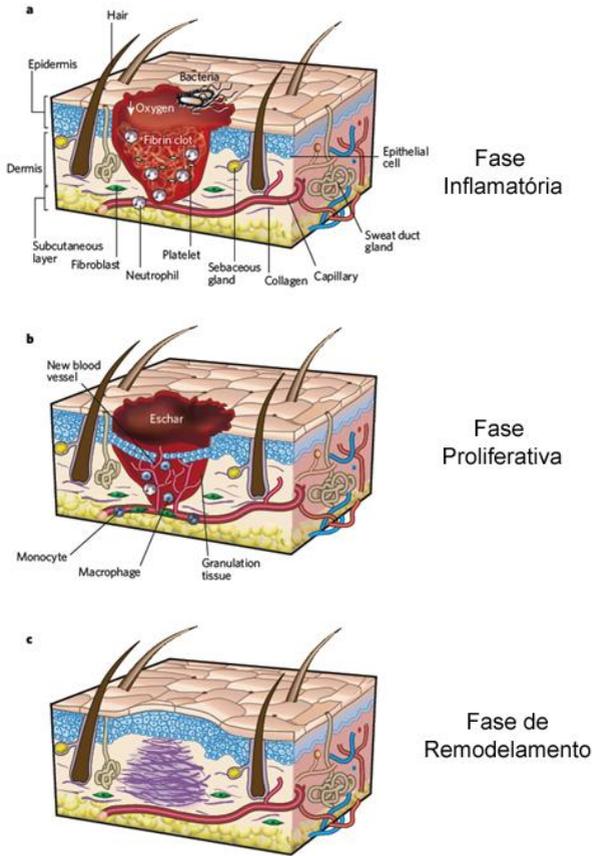


Adaptado de: <http://www.ccsb.org/Cancer/Summary/CDR0000258037/>.

1.2. REPARO TECIDUAL

Na pele normal, a epiderme e a derme mantêm a homeostasia do tecido, formando uma barreira protetora ao ambiente externo. Uma vez alterado este equilíbrio como em razão de uma lesão, o processo de reparo é imediatamente ativado. Esta resposta à lesão na pele, assim como em outros tecidos, é altamente complexa e envolve uma cascata de eventos, coordenados por interações entre diferentes tipos celulares, fatores solúveis e componentes da matriz extracelular (MEC) (KO et al., 2011). O processo de reparo tecidual foi separado didaticamente em três fases distintas, porém, sobrepostas: fase inflamatória, fase proliferativa (tecido de granulação e depósito de MEC) e fase de remodelamento (Figura 2) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; GURTNER et al., 2008; MARTIN, 1997).

Figura 2. Estágios clássicos do reparo tecidual: inflamação, proliferação e remodelamento.



(a) Fase Inflamatória: a lesão é caracterizada pela hipóxia, formação do coágulo de fibrina e presença de plaquetas, neutrófilos e bactérias. Na pele adjacente à lesão estão mostrados os componentes da pele normal. (b) Fase proliferativa: ocorre a formação de uma crosta (escara) na superfície da lesão. Várias células migram para a região lesionada, como macrófagos, fibroblastos, células epiteliais, e novos vasos são formados. (c) Fase de remodelamento: ocorre o depósito desorganizado de colágeno pelos fibroblastos e posterior remodelamento, contração da superfície da lesão e re-epitelização, geralmente sem a formação dos apêndices epidérmicos. Adaptado de: (GURTNER et al., 2008).

1.2.1. Fase inflamatória

A primeira fase, a inflamatória, ocorre imediatamente após a lesão, sendo que os componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imune são necessários para prevenir o extravasamento de sangue e fluidos, para remover células mortas dos tecidos e impedir a infecção (Figura 2A). A homeostase é restabelecida inicialmente pelo depósito de plaquetas e posterior formação de trombo rico em fibrina, que impede a hemorragia, concentra fatores de crescimento e serve como *scaffold* para a infiltração de células. Os neutrófilos são recrutados para a lesão em resposta à fatores liberados pela degranulação das plaquetas, à sinalização de neutrófilos retidos no trombo e à produtos de degradação bacteriana, sendo o tipo celular predominante entre o primeiro e segundo dia, após a lesão. Tais células, através de fagocitose, são responsáveis pela remoção de partículas e bactérias da área lesionada. Após exercer esta função os neutrófilos são removidos da lesão, juntamente com a crosta de fibrina ou são fagocitados por macrófagos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; DIEGELMANN; EVANS, 2004; MARTIN, 1997).

Os monócitos migram para a lesão em resposta a sinais quimioatrativos, e são estimulados a se diferenciar em macrófagos por ação de várias citocinas, produtos de bactérias e componentes da matriz extracelular (Tabela 1) (GURTNER et al., 2008). O número de macrófagos durante o processo de reparo tecidual aumenta durante a fase inflamatória, tem um pico durante a fase de formação do tecido de granulação (fase proliferativa) e diminui durante a fase de remodelamento (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Estas células exercem um papel crucial durante as várias etapas do processo de reparo, através da eliminação de fragmentos teciduais e neutrófilos que perderam a função e, principalmente, pela liberação de mediadores que intensificam a migração e ativação de outros tipos celulares na lesão (GURTNER et al., 2008).

Tem sido relato que os macrófagos podem possuir fenótipos diferentes, regulados pelo ambiente físico-químico da lesão, exercendo funções distintas durante o reparo tecidual (MANTOVANI et al., 2002). Os macrófagos M1 exibem propriedades antibacterianas e são pró-inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 suprimem a resposta inflamatória e possuem um importante papel no recrutamento de células endoteliais e fibroblastos. Neste sentido, tem sido sugerido que os macrófagos M2 contribuem para a resolução da inflamação e, conseqüentemente, promovem a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa (GORDON, 2003; MANTOVANI et al., 2002).

Tabela 1. Mediadores presentes na lesão cutânea, durante o processo de reparo tecidual.

Table 1. Growth factor signals at the wound site.

Growth factor	Source	Primary target cells and effect
EGF	Platelets	Keratinocyte motogen and mitogen
TGF- α	Macrophages; keratinocytes	Keratinocyte motogen and mitogen
HB-EGF	Macrophages	Keratinocyte and fibroblast mitogen
FGFs 1, 2, and 4	Macrophages and damaged endothelial cells	Angiogenic and fibroblast mitogen
FGF7 (KGF)	Dermal fibroblasts	Keratinocyte motogen and mitogen
PDGF	Platelets; macrophages; keratinocytes	Chemotactic for macrophages, fibroblasts; macrophage activation, fibroblast mitogen, and matrix production
IGF-1	Plasma; platelets	Endothelial cell and fibroblast mitogen
VEGF	Keratinocytes; macrophages	Angiogenesis
TGF- β 1 and - β 2	Platelets; macrophages	Keratinocyte migration; chemotactic for macrophages and fibroblasts; fibroblast matrix synthesis and remodeling
TGF- β 3	Macrophages	Antiscarring
CTGF	Fibroblasts; endothelia	Fibroblasts; downstream of TGF- β 1
Activin	Fibroblasts; keratinocytes	Currently unknown
IL-1 α and - β	Neutrophils	Early activators of growth factor expression in macrophages, keratinocytes, and fibroblasts
TNF- α	Neutrophils	Similar to the IL-1s

EGF: Fator de crescimento epidermal; TGF: Fator de crescimento transformante; HB-EGF: Fator de crescimento semelhante à EGF ligado à heparina; FGF: Fator de crescimento de fibroblastos; KGF: Fator de crescimento de queratinócitos; PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; IGF: Fator de crescimento semelhante a insulina; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral. Fonte: Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration (MARTIN, 1997)

1.2.2. Fase proliferativa

Com a presença local de macrófagos, a migração e ativação de diferentes tipos celulares é intensificada. As células recrutadas, como

fibroblastos e células endoteliais, são os principais componentes do tecido de granulação e após a influência dos fatores de crescimento e demais mediadores, derivados principalmente (mas, não exclusivamente) dos macrófagos (Tabela 1), migram para a região da lesão e proliferam, caracterizando assim, a segunda fase do processo de reparo: a proliferativa (GURTNER et al., 2008). Durante esta fase, diferentes eventos irão proporcionar a re-epitelização, angiogênese e depósito de MEC no tecido (Figura 2, B) (KO et al., 2011).

Fibroplasia

O aumento do número de fibroblastos na lesão promove modificações na composição da MEC, que é substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico. A matriz inicial, composta primariamente de fibrina e fibronectina (derivadas principalmente de plaquetas e plasma), é suplementada por glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras proteínas secretadas pelos fibroblastos recrutados na lesão (REINKE; SORG, 2012). Essa modificação na composição da MEC favorece a fixação das células estimulando a diferenciação para fenótipos mais maduros. Os fibroblastos são as células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas, que resultam em uma maior síntese e secreção de colágeno. Este aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina, tornando-se o principal componente da MEC em formação (BALBINO; PEREIRA; CURTI, 2005).

Os fibroblastos localizados na borda lesão passam também por mudanças fenotípicas, diferenciando-se em miofibroblastos (células com características funcionais similares às células do músculo liso). Estas células são encontradas alinhadas ao redor do depósito da nova MEC, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão. Com isso, o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima (RADKE; TELLER; WHITE, 2009). Tem sido relatado que o TGF- β (Fator de crescimento transformante) é um dos fatores mais importantes que influenciam a função, quimiotaxia e o depósito de MEC pelos fibroblastos, além da sua diferenciação para miofibroblastos (Tabela 1) (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011).

Este processo de depósito de MEC pelos fibroblastos é denominado de fibroplasia (BALBINO; PEREIRA; CURTI, 2005) e para a sua eficiência é necessário que ocorra em paralelo a formação de novos vasos sanguíneos, ou seja, é necessária a neovascularização da região para que ocorra o

fornecimento de nutrientes e oxigênio para o crescimento e proliferação celular (RADKE; TELLER; WHITE, 2009).

Neovascularização

A formação de novos vasos durante o reparo tecidual, representa um dos eventos da fase proliferativa, a angiogênese. Para que isto ocorra, primeiramente a MEC e a membrana basal dos vasos são degradados para facilitar a migração das células endoteliais. Este processo é mediado por MMP (metaloproteínas ou metalaproteases) produzidas por vários tipos celulares, como macrófagos e pelas próprias células endoteliais (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011). Após, as células endoteliais são atraídas para a lesão em resposta ao estímulo de vários fatores, entre eles VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos) e TGF- β (Tabela 1) (JANIS; KWON; LALONDE, 2010; MARTIN, 1997; RADKE; TELLER; WHITE, 2009), que além de atuar no recrutamento destas células promovem a diferenciação e a formação de tubos. Dentre estes fatores, o VEGF vem sendo descrito como um dos mais importante mediadores pró-angiogênicos, atuando desde a fase inicial do processo de reparo tecidual (HOWDIESHELL et al., 1998).

Re-epitelização

A re-epitelização corresponde ao re-estabelecimento da epiderme, após a lesão. A partir do momento que a organização da epiderme é alterada, o processo de restauração é iniciado imediatamente pelo mecanismo de “efeitos de vizinhança livre”. Através deste mecanismo, os queratinócitos migram e proliferam sobre o tecido de granulação em direção a borda oposta da lesão, até restabelecer contato. Este processo é facilitado pela contração do tecido conjuntivo subjacente, realizado por miofibroblastos. (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; RADKE; TELLER; WHITE, 2009; SANTORO; GAUDINO, 2005).

Além deste efeito de borda livre que estimula a atividade mitótica, vários fatores também promovem a proliferação dos queratinócitos, incluindo EGF (Fator de crescimento Epidermal), TGF- β e KGF (Fator de crescimento de queratinócitos) (Tabela 1). A migração é proporcionada também pela ação de MMP, que é necessária para remover e organizar a matriz provisória permitindo esta migração (MARTIN, 1997; SANTORO; GAUDINO, 2005).

Após o recobrimento da lesão com uma monocamada de queratinócitos, a migração destas células é inibida e o processo de diferenciação terminal é iniciado, gerando uma nova epiderme estratificada. Ao final desta etapa, a lesão apresenta-se constituída por um tecido de granulação vascularizado, com a nova MEC sintetizada, revestido com a camada epidérmica recém-formada. Lentamente o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas, o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). No entanto, o processo de reparo ainda continua durante meses, através do remodelamento da nova MEC.

1.2.3. Fase de Remodelamento

A terceira fase, de remodelamento, começa duas a três semanas após a lesão e pode permanecer durante anos (Figura 2, C). Durante esta fase, acentua-se o depósito de colágeno, a proliferação celular diminui e a maioria das células sofre apoptose ou migram da área lesionada, originando uma região constituída de poucas células e que consiste principalmente de colágeno e outras proteínas da MEC (WITTE; BARBUL, 1997). Os processos importantes durante o remodelamento são o rearranjo e o *cross-linking* de colágeno e a substituição do colágeno tipo III, depositado inicialmente de maneira desorganizada, por colágeno tipo I, que fornece mais resistência ao tecido. No tecido íntegro 80% do colágeno presente na derme é do tipo I e 20% de colágeno tipo III (RADKE; TELLER; WHITE, 2009; WITTE; BARBUL, 2003).

A degradação da MEC é fundamental para o remodelamento do tecido, e é resultado da atividade de MMPs e seus inibidores que são importantes mediadores da atividade proteolítica durante muitos processos fisiológicos e patológicos de remodelamento. A família das MMPs tem a capacidade de degradar praticamente todos os componentes da MEC e da membrana basal (RAVANTI; KÄHÄRI, 2000). A maturação e remodelamento desta MEC ocorre lentamente, e envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno.

1.3. CÉLULAS TRONCO E REPARO TECIDUAL

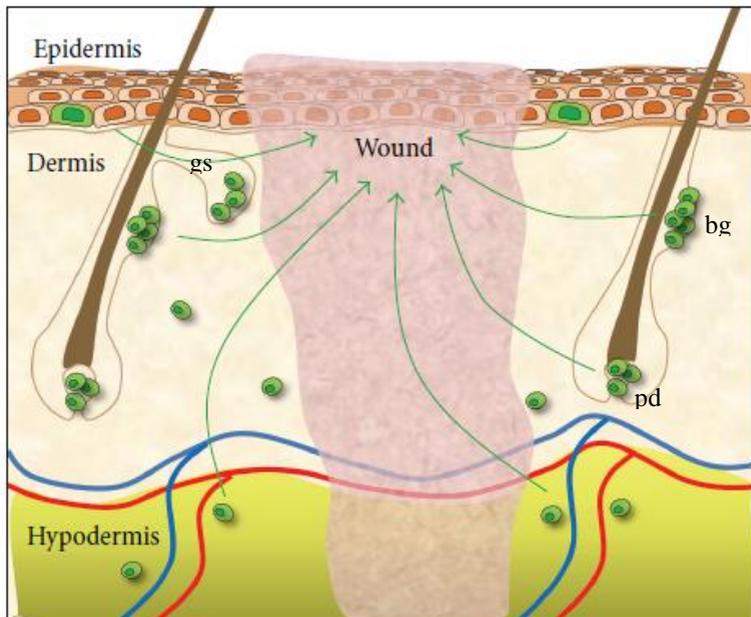
A manutenção da homeostase de qualquer tecido com poder de renovação e reparo tecidual após uma lesão depende principalmente da

presença e da integridade das CTs. Estas são células clonogênicas indiferenciadas, com capacidade de autorrenovação e de originar um ou mais tipos de linhagens celulares diferenciadas (LEROU; DALEY, 2005). Possuem alto potencial proliferativo, podendo ser estimuladas *in vivo* em resposta à fatores de crescimento e lesões (COTSARELIS et al., 1999). A autorrenovação pode acontecer por divisão simétrica, onde há geração apenas de novas CTs, ou assimétrica, na qual são originadas além das CTs, células progenitoras que são parcialmente comprometidas fenotipicamente (também conhecida como célula de amplificação). As células de amplificação apresentam divisões celulares limitadas e uma vez exaurido este potencial, se diferenciam (SANDERS et al., 2006).

As CTs podem ser isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários, fetais ou adultos (SANDERS et al., 2006). As CTs embrionárias, derivadas da massa celular interna do blastocisto, são pluripotentes e podem originar todos os tipos celulares do embrião (LEROU; DALEY, 2005). Diferentemente, as CTs adultas e fetais são multipotentes e possuem potencial de diferenciação mais restrito, contribuindo para a produção de apenas algumas linhagens celulares. Apesar da menor potencialidade, as CTs adultas mantêm as características de autorrenovação e alto potencial proliferativo (WISLET-GENDEBIEN et al., 2005).

Atualmente, têm-se levantado a hipótese de que todos os tecidos adultos possuem um “compartimento tronco” ou nicho onde estão localizadas as CTs, responsável pela reposição celular e pelo reparo de lesões. Assim sendo, praticamente todos os tecidos possuem capacidade de renovação, entretanto, com taxas diferenciadas. A pele, por exemplo, possui uma alta taxa de proliferação celular, apresentando capacidade de se regenerar a cada duas semanas como resultado da atividade de CTs adultas (ADOLPHE; WAINWRIGHT, 2005). Populações de CTs têm sido identificadas em vários nichos da pele, incluindo epiderme, derme e hipoderme (tecido adiposo) (Figura 3) (WONG et al., 2012).

Figura 3. Localização de CTs tronco na pele e seu potencial de reparo tecidual, após uma lesão.



Populações distintas de CTs na pele tem sido identificadas em vários nichos: no folículo piloso (*bulge* e papila dérmica); na glândula sebácea; na camada basal da epiderme; na derme e hipoderme. (bg) *bulge*; (pd) papila dérmica; (gs) glândula sebácea Adaptado de: (WONG et al., 2012).

1.3.1. Nicho Dermal e Células Tronco Mesenquimais (CTMs)

A existência de CTs dermais na pele de mamíferos ainda é pouco compreendida. Estudos recentes têm sugerido nichos distintos de CTs dermais como na papila dérmica do folículo piloso, em regiões perivasculares e na MEC. Estas células participam, assim como as CTs epidermais, da homeostase e do reparo tecidual. As CTs obtidas da derme possuem características fenotípicas e potencialidades distintas, mas no geral, podem se diferenciar *in vitro* em adipócito, osteócito e condrócitos e possuem marcadores de superfície semelhantes às CTMs da medula óssea (VISHNUBALAJI et al., 2012; WONG et al., 2012).

O conceito de CTMs, descrito pela primeira vez por Caplan (1991), surgiu a partir de experimentos clássicos realizados na década de 60, os quais demonstraram que transplantes de medula óssea para regiões

anatomicamente heterotópicas resultavam em osso ectópico. O trabalho de Tavassoli e Crosby (1968) claramente estabeleceu provas de um potencial osteogênico inerente associado com a medula óssea, entretanto não pode delinear a identidade dos progenitores destas células diferenciadas para osso (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

Foram Friedenstein e colaboradores (1968), que demonstraram que o potencial osteogênico, revelado pelo transplante heterotópico de medula óssea, estava associado com uma subpopulação de células da medula. Estas células eram distinguidas da maioria das células hematopoiéticas pela sua rápida aderência e pela aparência fibroblastóide de sua progênie em cultura, apontando para sua origem no compartimento estromal da medula óssea (STAGG, 2007). Além disso, eles demonstraram que estas células quando em suspensão em uma densidade clonal, resultavam na formação de colônias iniciadas por uma única célula, chamada de *colony-forming unit fibroblastic* (CFU-Fs). Transplantes *in vivo* mostraram que múltiplos tecidos esqueléticos, como osso, cartilagem, tecido adiposo e tecido fibroso, puderam ser experimentalmente gerados pela progênie de uma única célula do estroma medular (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008; ZIPORI, 2006). Na década de 80, Friedenstein e Owen chamaram estas células de CT osteogênica ou CT estromal da medula óssea (FRIEDENSTEIN et al., 1968).

Em resumo, estes trabalhos pioneiros de Travassoli, Friedenstein e Owen revelaram que um segundo tipo de CT (a primeira a ser identificada foi a CT hematopoiética), pode estar presente na medula óssea, mais especificamente no estroma que suporta a hematopoiese. Entretanto, o conceito de CTs não-hematopoiéticas na medula não foi bem aceito, apesar de a hipótese ser firmemente estabelecida e evidências experimentais serem publicadas e reproduzidas. Já o termo célula tronco mesenquimal (CTM), proposto previamente como uma alternativa para CTs estromais ou CTs osteogênicas, ganhou grande popularidade. O nome foi baseado na hipótese de que vários tecidos de origem mesenquimal, além da linhagem esquelética, podem ser gerados através de CTMs pós-natais (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008; CHAMBERLAIN et al., 2007).

1.3.2. Características *in vitro* das CTMs

Em adição à medula óssea, as CTMs têm sido isoladas do músculo esquelético (WILLIAMS et al., 1999), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), placenta (MARTINI et al., 2013), polpa dental (COURA et al., 2008),

fluido amniótico (IN 'T ANKER et al., 2004) assim como, sangue fetal, fígado e pulmão (NOORT et al., 2002). Na verdade, sugere-se que células com características de CTMs residem em todos órgãos e tecidos pós-natais (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Estas células são geralmente selecionadas em cultura pela sua característica de adesão ao plástico, sua morfologia fibroblastóide e por sua capacidade de proliferação, sendo que após uma fase inicial as células se dividem rapidamente atingindo confluência. O aumento no número das CTMs, originando assim uma cultura homogênea, pode ser obtida através da expansão e passagens (repiques) em meio de cultivo pobre em nutrientes para evitar contaminações com outros tipos celulares. Contudo, estudos clonais demonstraram que populações aderentes ao plástico isoladas da medula óssea são heterogêneas contendo, além de progenitores indiferenciados, precursores restritos a determinadas linhagens (ZIPORI, 2006). Esta heterogeneidade, juntamente com os diferentes métodos de obtenção das CTMs e avaliação da sua capacidade de diferenciação torna difícil a caracterização das CTMs em relação a sua fenotipagem e potencialidade.

Fenotipicamente, as CTMs expressam inúmeros marcadores *in vitro*, dos quais nenhum é específico. Geralmente é descrito que as CTMs adultas não expressam marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14, ou CD11. Também não expressam moléculas de adesão como, CD31, CD18 ou CD56. Mas, podem expressar CD105, CD44, CD90, e Stro-1, assim como moléculas de adesão, CD106, CD29 e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) (KRONENBERG, 2009).

Enfim, as CTMs podem exibir variações no seu padrão de expressão gênica entre diferentes fontes de obtenção, método de isolamento e cultura (confluência, número de passagens) e espécies (GREGORY; YLOSTALO; PROCKOP, 2005). Em adição à identificação das CTMs baseada nas suas características morfológicas e fenotípicas, outro método para identificá-las é através de sua capacidade de diferenciação em osso, cartilagem, e gordura, *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Vários grupos têm se dedicado a investigar a diferenciação das CTMs em linhagens celulares diferentes das de origem mesodérmica e tem sido relatado que as CTMs possuem potencialidade também para a diferenciação em tecidos endodérmicos e ectodérmicos (GOLDENBERG; CARVALHO, 2013).

Recentemente foram estabelecidos critérios para a identificação das CTMs, pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*. Segundo estes critérios, as CTMs correspondem a células aderentes com morfologia semelhante à

fibroblastos, com capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. Tais células são caracterizadas, ainda, por um padrão de expressão de marcadores de superfície, sendo positivas para CD105, CD 73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; DOMINICI et al., 2006).

1.3.3. Nicho das CTMs na pele

O nicho anatômico das CTMs obtidas da pele humana não está totalmente claro. A papila dérmica e a bainha radicular externa (nicho folicular) possuem CTs dermais multipotentes, chamadas de SKPs (do inglês, *skin derived precursors* - precursores derivados da pele) que compartilham propriedades com as células da crista neural embrionária. Estes nichos têm sido identificados também, como fontes de CTMs na pele. Contudo, pouco é conhecido sobre a distribuição destas células em derme livre de folículo piloso (JINNO et al., 2010).

Um estudo recente mostrou que as SKPs derivadas da região facial, dorsal e ventral da pele (com origens embrionárias diferentes), são distintas das CTMs derivadas da medula óssea de camundongos. Embora as SKPs e as CTMs possuam características semelhantes *in vitro*, quando transplantadas *in vivo* na derme, as CTMs não se integram as células da papila dérmica no folículo piloso, como fazem as SKPs. Além disso, as CTMs não induzem a morfogênese do folículo piloso. Desta forma, as CTMs e as SKPs podem ser consideradas populações celulares diferentes, apesar de compartilharem potencial de diferenciação semelhante. Curiosamente, estudos têm relatado que durante a embriogênese, as CTs da crista neural dão origem à células mesenquimais da medula óssea, sugerindo uma relação entre estes diferentes precursores e levantando a possibilidade de que precursores da CN, assim como outros precursores, originem CTMs em organismos adultos (JINNO et al., 2010).

Outra possibilidade é que as CTMs se localizem em região perivascular, estando relacionadas com os pericitos. Este modelo de localização perivascular propõe que as CTMs estabilizam os vasos sanguíneos e contribuam para a homeostase do tecido e do sistema imunológico sob condições fisiológicas, além de serem recrutadas durante o processo de reparo tecidual. Desde modo, as CTMs podem estar conectadas ao sistema imunológico e vascular, enfatizando o seu papel como um

integrador fisiológico e sua importância no reparo ou regeneração tecidual (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

De fato, estudos vêm demonstrando que células perivasculares, como os pericitos, possuem a capacidade de diferenciação em tipos celulares mesenquimais *in vitro* e *in vivo*, dando origem a adipócitos, condrócitos e osteócitos, além de possuírem marcadores de células mesenquimais e morfologia semelhante a estas (CRISAN et al., 2008). Os pericitos, também chamados de células periendoteliais, se encontram associados a microvasos, opostos às células endoteliais. Para ser considerada pericito, a célula precisa expressar um conjunto de marcadores típicos (como, α SMA, nestina, CD146) e não expressar marcadores de células endoteliais (CD31). Quando essa interação com os vasos é interrompida e o pericito é liberado da membrana basal, sugere-se que ele seja considerado uma CTM (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

1.3.4. Propriedades biológicas das CTMs e sua utilização no reparo tecidual

A presença de CTMs na pele e seu recrutamento no reparo de lesões sugere a aplicação de CTMs exógenas como uma solução promissora para o tratamento de feridas. Estas células são multipotentes, com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e, além disso, podem ser expandidas *in vitro*, sem perder sua capacidade de autorrenovação. Em adição a estas características, as CTMs regulam respostas imunes e inflamatórias e possuem um efeito reparador pela liberação de moléculas ativas que afetam a migração, proliferação e sobrevivência das células presentes na lesão (Tabela 2). Desta forma, as CTMs possuem um papel ativo nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelamento, e sua aplicação terapêutica pode acelerar e melhorar o reparo tecidual (MAXSON et al., 2012).

Durante a fase de inflamação, tem sido relatado que as CTMs coordenam os efeitos das células inflamatórias e inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de estimular a secreção de citocinas anti-inflamatórias. Em adição, as CTMs inibem a infecção pela secreção de fatores antimicrobianos e por estimular a fagocitose pelas células imunes presentes na lesão (SHARMA; SNEDEKER, 2012; WALTER et al., 2010; ZOU et al., 2012).

A diferenciação e a sinalização parácrina, são os possíveis mecanismos, pelos quais as CTMs atuam nas fases de reparo. Contudo, estudos recentes sugerem que a contribuição das CTMs no reparo através

da sua diferenciação seja limitada, devido a baixa sobrevivência das células na lesão. Desta forma, a sinalização parácrina (Tabela 2) é o provável mecanismo de atuação das CTMs, promovendo primariamente redução da inflamação, aumento da angiogênese e indução da proliferação e migração celular de fibroblastos e células epidermias, além de regular o remodelamento por atuar na organização do depósito de MEC (MAXSON et al., 2012; WU; ZHAO; TREDGET, 2010).

As CTMs, por suas características, configuram-se em uma potencial fonte para aplicações terapêuticas, sendo o tratamento de lesões teciduais uma das possibilidades de utilização destas células. Apesar de alguns trabalhos recentes terem isolado CTMs da pele (VISHNUBALAJI et al., 2012), é preciso ainda, estudar melhor esta população de CTs, suas características e potencialidades para sua posterior aplicação na regeneração de tecidos.

Tabela 2. Mediadores secretados pelas CTMs da medula óssea.

Table 3. Differentially expressed paracrine factors in bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus dermal fibroblasts

Paracrine factors	Dermal fibroblast	BM-MSC	Detection method
EGF	±	+	ABBPA
IGF-1	+	++	ABBPA
IGF-1	+	++++	ELISA
KGF	+	++	ELISA
Ang	+++	++++	ABBPA
OSM	+	++	ABBPA
TPO	+	++	ABBPA; ELISA
VEGF	++	++++	ABBPA
PDGF-BB	±	+	ABBPA
Leptin	±	+	ABBPA
BDNF	+	++	ABBPA
FGF-4	-	+	ABBPA
FGF-6	±	+	ABBPA
FGF-7	±	+	ABBPA
FGF-9	+	++	ABBPA
Fli-3 ligand	±	+	ABBPA
Fractalkine	+	++	ABBPA
GDNF	+	++	ABBPA
HGF	++	+++	ABBPA
IGFBP-1	±	+	ABBPA
IGFBP-3	+	++	ABBPA
IGFBP-4	+	++	ABBPA
LIF	+	++	ABBPA
GRO	++	+	ABBPA
IL-6	++++	+++	ABBPA
MIP-1 α	+	++++	ELISA
MIP-1 β	+	++	ABBPA
MIP-3 α	±	+	ABBPA
NAP-2	+	++	ABBPA
OPTGRN	++++	++	ABBPA
TGF- β 2	++	+	ABBPA
TGF- β 3	++	+	ABBPA

Human dermal fibroblast- or BM-MSC-conditioned medium under hypoxic conditions for 24 hours was analyzed with ABBPA and ELISA. The intensity of each dot was measured. “-”, not detected; ±, weakly detected; + to +++++, intensity of positive detection.

Abbreviations: ABBPA, antibody-based protein array; Ang; angiopoietin; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; BM-MSC, bone marrow-derived mesenchymal stem cell; EGF, epidermal growth factor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FGF, fibroblast growth factor; Fli-3 ligand, FMS-related tyrosine kinase 3 ligand; IL, interleukin; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor; GRO, growth-related oncogene; HGF, hepatocyte growth factor; IGF, insulin-like growth factor; IGFBP, IGF binding protein; KGF, keratinocyte growth factor; LIF, leukemia inhibitory factor; MIP, macrophage inflammatory protein; NAP-2, neutrophil-activating peptide; OPTGRN, osteoprotegerin; OSM, oncostatin M; PDGF-BB, platelet-derived growth factor-BB; TGF, transforming growth factor; TPO, thrombopoietin; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Fonte: Concise review: Bone-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration (WU; ZHAO; TREDGET, 2010).

1.4. ENGENHARIA TECIDUAL PARA O REPARO DE LESÕES DE PELE

Lesões graves na pele, como queimaduras extensas, trauma e úlceras crônicas, exigem uma cobertura que proporcione a reparação e restauração da função da pele. Esta cobertura, geralmente, corresponde ao enxerto autólogo de pele. Contudo, a remoção de pele saudável para a realização da cobertura é um processo altamente invasivo e doloroso para os pacientes, além de, em alguns casos, ser impossível a obtenção do enxerto, como em pacientes com queimaduras extensas. A fim de prover um tratamento mais efetivo e viável e que forneça o reparo tecidual, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas no que se refere à engenharia tecidual (WONG; CHANG; 2009).

A engenharia de tecidos é um dos campos da medicina regenerativa que utiliza métodos para promover o crescimento de células através da manipulação de vários biomateriais, artificiais ou naturais, que fornecem o suporte para o crescimento controlado em diferentes tipos de tecido. Fundamentalmente, os biomateriais devem fornecer um ambiente que favoreça a interação celular; 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). A formação do novo tecido pode ocorrer *in vivo* ou *in vitro*, sendo que o primeiro consiste em implantar o *scaffold* com ou sem células semeadas no local da lesão, com o objetivo de repará-la através da regeneração do tecido por respostas ao microambiente do organismo. Já *in vitro*, a regeneração do tecido é gerada em um ambiente controlado e propício ao crescimento celular, como em biorreatores e após a formação é implantado no paciente (SPECTOR, 2007).

A estratégia em relação ao componente celular possui basicamente dois objetivos: (1) identificar uma fonte adequada de células e (2) compreender como estas células podem interagir adequadamente com a matriz e com o tecido lesionado. Contudo, uma das principais limitações da engenharia tecidual é a disponibilidade de células para este tipo de aplicação, já que as células diferenciadas obtidas dos tecidos possuem uma baixa capacidade de diferenciação e proliferação durante a expansão *in vitro* (MANSBRIDGE, 2008). Neste sentido, as CTs podem representar um componente essencial na engenharia tecidual, em razão principalmente de sua plasticidade e da alta taxa proliferativa.

1.4.1. Substitutos Dérmicos (SDs): Integra® e Pelnac®

Em pacientes com lesões cutâneas profundas, o uso de substitutos artificiais para a MEC mostrou-se uma alternativa interessante. Os chamados substitutos dérmicos (SDs) permitem o recobrimento da lesão, a fim de evitar que o ferimento fique exposto, e facilitam a recolonização celular, neovascularização e, assim, auxiliam na regeneração do tecido dérmico (BURKE et al., 1981). O restabelecimento da derme é fundamental para dar suporte (tanto estrutural quanto nutricional) para a regeneração da epiderme. Existem no mercado diferentes tipos de SDs acelulares, incluindo o Integra® *Dermal Regeneration Template* (Integra Lifescience) e o Pelnac® (Gunze).

No começo dos anos 70, o cirurgião John Burke auxiliado pelo engenheiro Ioannas V. Yannas, iniciaram estudos para a elaboração de um tecido sintético capaz de substituir a pele lesionada. Desenvolveram então um material a base de colágeno e glicosaminoglicanos, com o qual cobriam a lesão. Este material permitia a migração celular e era biodegradável ao longo do tempo. Além disso, para cobrir este material no leito da lesão e evitar a perda de líquidos, utilizaram um silicone. Após vários experimentos, em 1980 lançaram o SD Integra® como uma nova ferramenta terapêutica no tratamento e lesões cutâneas profundas (BURKE et al., 1981).

O Integra® é uma membrana bilaminar, com a camada externa composta por uma lâmina de silicone com 0,1mm de espessura, que simula a função da epiderme, controlando a perda de fluidos e agindo como barreira mecânica contra microorganismos. A camada interna consiste de uma trama com poros de aproximadamente 80 µm de diâmetro de fibras de colágeno bovino unidas ao glicosaminoglicano condroitin 6-sulfato (derivado da cartilagem de tubarão) (BURKE et al., 1981).

Outro substituto dérmico desenvolvido, é o Pelnac®, que assim como o Integra®, é uma membrana bilaminar, composto por uma camada de silicone e um matriz esponjosa de colágeno porcino, com poros de aproximadamente 60mm e 110mm de diâmetro (SUZUKI et al., 1995). Em ambos SDs, a principal função da camada inferior é servir como estrutura para a recolonização por fibroblastos dérmicos, linfócitos e macrófagos, e para a neovascularização, permitindo assim a formação de uma derme autógena 14 a 21 dias após o implante do SD, em humanos. Após este período, a camada externa de silicone é removida e o enxerto de epiderme é realizado (BURKE et al., 1981; SUZUKI et al., 1995).

1.5. JUSTIFICATIVA

Em humanos, problemas com a regeneração e a cicatrização da pele podem se manifestar com o excesso de cicatrização, como ocorre nas cicatrizes hipertróficas e quelóides, e com a ausência dos apêndices epidérmicos. Esta cicatrização hipertrófica resulta em alterações na superfície do corpo que provocam deformações e retrações graves. Isto geralmente ocorre após grandes lesões como queimaduras profundas ou feridas extensas, nas quais há perda de tecido epidermal e dermal, podendo até lesionar o tecido muscular. Além disso, a perda hídrica e a suscetibilidade a infecções também são fatores críticos nas grandes lesões (MARTIN, 1997; REINKE; SORG, 2012).

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de identificar métodos de tratamento, que resultem em uma melhor cicatrização tecidual, e até mesmo em uma regeneração total da pele. Dentre estes possíveis tratamentos busca-se a identificação e aplicação de fatores (moléculas) envolvidos no reparo de tecidos, o desenvolvimento de novos biomateriais e a realização de terapia celular. Neste sentido, avanços na área de engenharia tecidual têm possibilitado o desenvolvimento de biomateriais que se assemelham a arquitetura tecidual da pele, e podem controlar a liberação de sinais em uma sequência temporal e espacial apropriada. Em paralelo, avanços recentes na biologia das CTs têm resultado no isolamento e caracterização de células progenitoras de diversos tecidos, inclusive da pele, e na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares destas células (GURTNER et al., 2008).

Tendo em vista estes novos estudos, uma das abordagens para o tratamento de lesões cutâneas é a associação de células progenitoras em biomateriais, e subsequente enxertia em tecidos lesionados. Essas células progenitoras podem, então, proporcionar uma sequência de eventos extracelulares e intracelulares que aceleram o reparo/regeneração tecidual. Sendo assim, a utilização destas células para integrar os sinais ambientais e traduzi-los em um efector biológico parece ser crucial para as novas abordagens no reparo de lesões.

Diante destas perspectivas, o presente trabalho busca estabelecer um novo método de tratamento de lesões de pele, tendo como base a associação das CTMs derivadas da pele em substitutos dérmicos comerciais, utilizados atualmente em abordagens clínicas. Para este fim, propõe-se isolar e caracterizar CTMs da derme de humanos e avaliar sua associação *in vitro* com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®, a fim de compreender suas características, potencialidades e interação com os SDs. Além disso, o

presente trabalho busca analisar, *in vivo*, o potencial destas células, associadas ao SD, no reparo de lesões de pele em camundongos, avaliando a inflamação, vascularização, depósito de MEC, re-epitelização e expressão gênica.

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico da associação de CTMs derivadas da derme humana (dCTMs) com substitutos dérmicos no reparo de lesões cutâneas de espessura total, *in vitro* e em ensaios pré-clínicos em modelo de camundongos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características morfológicas e a viabilidade das dCTMs, *in vitro*.
- Caracterizar fenotipicamente as dCTMs em relação aos critérios estabelecidos pela *International Society for Cellular Therapy* para células tronco mesenquimais (CTMs), tais como: expressão de marcadores específicos de superfície e potencial de diferenciação osteogênico e adipogênico, *in vitro*.
- Analisar a expressão gênica e proteica de marcadores de pluripotencialidade e de linhagens diferenciadas (neural, mesenquimal e endotelial) nas dCTMs, *in vitro*.
- Avaliar o potencial de diferenciação epidérmico (queratinócitos) das dCTMs, *in vitro*.
- Avaliar a migração das dCTMs, *in vitro*.
- Analisar *in vitro* a biocompatibilidade e interação das dCTMs com os substitutos dérmicos, Integra® e Pelnac®, avaliando: a sobrevivência, adesão, morfologia e migração celular.
- Avaliar o perfil fenotípico das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos, Integra® e Pelnac®, pela expressão de marcadores de superfície característicos de CTMs e da expressão gênica de marcadores de pluripotencialidade e de linhagens diferenciadas (neural, mesenquimal e endotelial), *in vitro*.

- Estabelecer um modelo pré-clínico de lesão cutânea de espessura total em camundongos da linhagem C57BL/6, juntamente com um método de inoculação das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos na lesão.
- Analisar o efeito da associação das dCTMs com o substituto dérmico no reparo tecidual em ensaios pré-clínicos de lesões cutâneas de espessura total em camundongos. Para isso, serão avaliados os seguintes parâmetros:
 - A integração do substituto dérmico e as características macroscópicas da lesão.
 - A formação do tecido de granulação e a colonização celular no substituto dérmico.
 - A infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos)
 - A neovascularização.
 - O depósito de matriz extracelular (fibrose).
 - A re-epitelização.
 - A expressão gênica de marcadores relacionados com as diferentes fases do reparo tecidual, na lesão cutânea.

3.METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE PELE HUMANA

As amostras de pele humana foram obtidas através de uma colaboração com o Ilha Hospital e Maternidade (Florianópolis), onde pacientes submetidos a cirurgias plásticas de *lifting facial* (ritidoplastias) doaram os fragmentos de pele, retirados durante o procedimento cirúrgico, após a apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). O fragmento de pele foi coletado e armazenado a 4°C em recipiente estéril, contendo DMEM-F12 (Vitrocell) acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina - PS) (1U/μg) (Gibco) e encaminhado para o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, onde foram realizados os procedimentos de cultura celular.

Os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tendo recebido certificado de aprovação (certificado N° 98) do Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (anexo 2).

3.2. ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DA PELE HUMANA

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, a epiderme e a hipoderme foram removidas do tecido e a derme foi incubada com 0,25% de tripsina e 0,02% EDTA (Gibco) durante 45 minutos, a 37°C. Após o bloqueio da reação enzimática com DMEM-F12 acrescido de 15% de SBF, a suspensão de células foi filtrada com *cell strainer* de 70 μm (BD) e centrifugada durante 7 minutos a 1.200 rpm. As células foram ressuspensas em DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF e antibióticos (PS) e mantidas em garrafas de cultura de 25cm² a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após 4 dias, o meio de cultivo foi trocado e as células não aderentes descartadas.

Ao atingir confluência de aproximadamente 80% a 90%, as células foram incubadas com 0,05% de tripsina/0,02% de EDTA durante 2 minutos a 37°C, e logo após a reação enzimática foi bloqueada. As células foram novamente mantidas em DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF a uma densidade de 5×10^4 células/25cm², sendo esta cultura denominada de passagem 1. O procedimento foi repetido até 20 vezes, sendo utilizadas nos experimentos culturas entre 1 e 20 passagens.

3.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA E DA VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células isoladas foram rotineiramente observadas através de microscópio invertido de contraste de fase (Olympus IX71) e fotografadas através de um sistema de captura de imagem acoplada ao microscópio, para a realização da análise morfológica.

A fim de analisar a sobrevivência das dCTMs foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico) (Sigma) e MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] (Promega). O MTT é um sal tetrazólico solúvel em água reduzido pela desidrogenase mitocondrial das células vivas resultando em um produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro. A mudança de coloração reflete a atividade celular e pode ser medida em termos de absorbância. Para isso, as 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após, 1,7 e 14 dias foram incubadas com MTT (2,5mg/mL) dissolvido em DMEM/F12/15%SBF por 3 horas a 37°C, em 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após este período, o meio foi removido e acrescentou-se à amostra 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma). A coloração obtida a partir dessa solubilização com DMSO foi quantificada por leitura de absorbância (470 nm) em leitor de microplacas Tecan Infinite M200.

O ensaio de MTS, semelhante ao MTT, é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTS, na presença de um acoplador de elétrons (etosulfato de fenanzina-PES) em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan). Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Em nossos experimentos, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após, 1,4 e 7 dias foram incubadas com MTS dissolvido em DMEM/F12/15%SBF durante 4 horas em estufa a 37°C, 95% de O₂ e 5%

CO₂, e logo após foi realizada a leitura da absorvância em leitora de microplacas (Tecan Infinite M200) em comprimento de onda ajustado para 490nm.

3.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR (*WOUND HEALING* OU *CELL SCRATCH*)

Para avaliar a migração das dCTMs, *in vitro*, foi utilizado o ensaio de *wound healing* ou *cell scratch* (ZHANG et al., 2013). Este método mimetiza a migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo*. O ensaio consiste na realização de uma raspagem na superfície de uma camada de células confluentes, e avaliação do fechamento desta “lesão” através da migração celular. Para isso, as células foram mantidas em placas de 24 poços nas condições padrões de cultivo, até atingirem confluência de aproximadamente 90%. Após este período foi realizada uma raspagem na camada de células utilizando uma ponteira de 100µL. As células foram lavadas com meio e a imagem da cultura fotografada. A migração celular foi observada em intervalos regulares (0, 6, 12, 24 e 48 horas), e as imagens obtidas comparadas e analisadas através do software ImageJava.

3.5. DIFERENCIAÇÃO EM FENÓTIPOS MESODERMAIS E EPIDERMAIS

3.5.1. Diferenciação adipogênica

Para indução da diferenciação adipogênica, as células (3×10^4) foram cultivadas em DMEM (Gibco) acrescido de 10% SBF, 10^{-8} M dexametasona (Sigma), 100 µM indometacina (Sigma), 2,5 µg/ml insulina (Sigma) e antibióticos (PS), em placas de 24 poços. Como controle, foi utilizado DMEM-F12 acrescido de 15% de SFB. As células foram mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca do meio a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído e submetidas à análise fenotípica através de coloração com vermelho sudan 5B lipídico (Oil red O) (Sigma).

3.5.2. Diferenciação osteogênica

Para indução da diferenciação osteogênica, as células (3×10^4) foram cultivadas em meio de cultura DMEM acrescido de 10% SFB, 10^{-8} M dexametasona, 50µg/ml ácido ascórbico (Sigma), 3,15mg/mL β-glicerofosfato (Sigma) e antibióticos (PS), em placas de 24 poços. Como controle, foi utilizado DMEM-F12 acrescido de 10% SFB. As células foram mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca do meio a cada 3 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído e submetidas à análise fenotípica através de coloração com Vermelho de Alizarina (Sigma).

3.5.3. Diferenciação em queratinócitos

Para indução da diferenciação em queratinócitos, as células foram cultivadas em meios de cultura comerciais CNT-07 (PCT Epidermal Keratinocyte Medium) e CNT-02 (Epidermal Keratinocyte Medium) (ambos Millipore) que atuam na proliferação e diferenciação de queratinócitos. Segundo informações dos fabricantes, o CNT-02 é indicado para isolamento e diferenciação de queratinócitos e o CNT-07 foi desenvolvido para isolamento e crescimento de queratinócitos, porém, sua fórmula causa atraso na diferenciação terminal das células. As células foram mantidas em três condições: (1) meio CNT-02 por 7 dias; (2) meio CNT-07 por 7 dias ou (3) meio CNT-02 por 3 dias e meio CNT-07 por mais 4 dias. A troca do meio foi efetuada a cada 2 dias. A presença de marcadores celulares específicos foi analisada por imunocitoquímica como descrito abaixo.

3.6. CULTURA 3D (TRIDIMENSIONAL) DE dCTMS EM ASSOCIAÇÃO COM OS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC®

As dCTMs foram obtidas como descrito no item 3.2 e semeadas sobre os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®. Para isso, as matrizes foram cortadas com auxílio de um *punch* cirúrgico em fragmentos de 6-8 mm e mantidas imersas em PBS durante 10 minutos e em DMEM-F12/15%SBF por mais 10 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, os substitutos dérmicos foram posicionados em placas de 96 poços ou de 35mm, com o 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 dCTMs (em 25 μL de meio) foi preparada de acordo com cada análise, e semeada sobre cada fragmento de matriz com auxílio de uma micropipeta e então incubadas durante uma hora em estufa a 37°C, 5% CO_2 e 95% de umidade. Logo após, o volume do meio foi complementado com DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF e antibióticos. Foram realizadas trocas do meio a cada 3 dias.

3.7. ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DAS dCTMS COM OS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC®

3.7.1. Análise da viabilidade/proliferação celular

A fim de analisar a sobrevivência das dCTMs associadas ao Integra® e Pelnac® foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico) (Sigma), conforme descrito no item 3.3. Para isso 1×10^4 células foram semeadas nos substitutos dérmicos. Após, 1, 4 e 7 dias as matrizes foram transferidas para novos poços e incubadas com MTS dissolvido em DMEM/F12/15%SBF durante 4 horas, a 37°C, 95% de O_2 e 5% CO_2 . Logo após foi realizada a leitura da absorbância em leitora de microplacas (Tecan Infinite M200) em comprimento de onda ajustado para 490nm.

3.7.2. Microscopia Confocal

Para verificar a associação e a capacidade de migração das dCTMs no Integra® e Pelnac®, foi realizada análise através de microscopia confocal. Para isso, 1×10^4 células foram cultivadas sobre as matrizes, como descrito no item 3.6 e, após 3 dias, fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, a temperatura ambiente. As células foram marcadas com o corante nuclear DAPI, durante 30 segundos, lavadas com PBS e visualizadas em microscópio Confocal Leica DMI6000 no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), UFSC.

3.7.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise através de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para verificar a capacidade de adesão e morfologia das dCTMs no Integra® e Pelnac®. Para isso, 2×10^4 células foram cultivadas sobre as matrizes, como descrito no item 3.6 durante 24 e 48 horas.

As amostras foram fixadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, contendo glutaraldeído (2,5%) (pH 7,2) durante 12 horas à 4°C. Em seguida, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio (0,1M) (3 lavagens de 30 minutos) e pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio (1%) durante 2 horas. A seguir o material foi submetido à desidratação progressiva em soluções de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, durante 30 minutos em cada solução. As amostras foram então submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD 030) e metalizadas com uma cobertura de ouro de 30nm (metalizador Sputter Leica EM SCD 500). As amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV através da captura de elétrons secundários em 15kV. Os procedimentos de secagem em ponto crítico, a metalização e as análises no MEV foram realizados no LCME.

3.8. ANÁLISES FENOTÍPICAS DAS dCTMS

A expressão de marcadores específicos para diferentes fenótipos celulares foi analisada através das técnicas de citometria de fluxo, imunocitoquímica, coloração e RT-PCR como descrito a seguir.

3.8.1. Colorações

Para a realização das colorações, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos, e posteriormente lavadas com água Mili-Q. As células foram incubadas com a solução de *Oil Red O* ou Vermelho de alizarina (anexo 3) durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso de corante e observadas em microscópio de contraste de fase Olympus IX71.

O fenótipo adipogênico foi confirmado pela presença de gotículas lipídicas intracelulares coradas de vermelho-alaranjado após coloração com *Oil Red O* (anexo 3). Já a diferenciação osteogênica, foi detectada pela

observação de depósitos de cálcio extracelular corados de vermelho através da coloração com *Alizarin Red S*.

3.8.2. Citometria de fluxo

Para a análise através de citometria de fluxo, as dCTMs cultivadas em monocamadas diretamente sobre o plástico das placas de cultura (cultura bidimensional) ou nos substitutos dérmicos (cultura tridimensional) foram tripsinizadas (conforme descrito acima) e ressuspensas em PBS acrescido de 10% de SBF a uma concentração de 1×10^5 células /100 μ L. Logo após, as células foram incubadas com anticorpos específicos (Tabela 3), durante 1 hora a 4°C. Para detecção da fluorescência inespecífica (células negativas), foram utilizados controles isotípicos específicos, constituídos por imunoglobulinas do mesmo isotipo e fluorocromo dos anticorpos utilizados (Tabela 3).

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS acrescido de 10% de SBF, centrifugadas a 1200 rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 100 μ L de PBS acrescido de 10% de SBF e posteriormente analisadas em citometro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience). Os dados foram gerados pelo *software* FACS Diva 6.0 e analisados pelo *software* FlowJo.

Tabela 3. Anticorpos utilizados na análise fenotípica através de citometria de fluxo.

<i>Anticorpo primário (marca)</i>	<i>Imunoglobulina</i>	<i>Fluorocromo</i>
Anti-CD105 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina-cianina (PE-Cy5)
Anti-CD90 (BD)	IgG1 de camundongo	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)
Anti-CD73 (BD)	IgG1 de camundongo	Ficoeritrina (PE)
Anti-CD45 (BD)	IgG1 de camundongo	FITC
Anti-CD34 (BD)	IgG1 de camundongo	PE-Cy5
Isotipo (BD) 1	IgG1 de camundongo	PE-Cy5
Isotipo (BD) 2	IgG1 de camundongo	FITC
Isotipo (BD) 3	IgG1 de camundongo	PE

3.8.3. Ensaio de Imunocitoquímica

Para a análise de imunocitoquímica, as dCTMs foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos, a temperatura ambiente, e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos,

apenas para o caso das marcações intracelulares. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF durante 40 minutos e em seguida, incubadas com anticorpos primários específicos descritos na Tabela 4. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período de 14 horas, a 4°C e, após este período, foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%). A seguir, foi realizada incubação com os anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos FITC, vermelho do texas (TXRD), Alexa 488 ou Alexa 594 (Tabela 4) durante 1 hora, a temperatura ambiente, e posteriormente lavadas com PBS Tween 20 (0,05%). Para a observação dos núcleos, as células foram coradas com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) durante 30 segundos, a temperatura ambiente.

As marcações fluorescentes para os diferentes fenótipos analisados foram visualizadas em microscópio epifluorescente Olympus IX71 e as imagens foram capturadas como câmera Olympus DP71.

Tabela 4. Anticorpos utilizados na análise fenotípica através de imunocitoquímica.

<i>Anticorpo primário (marca)</i>	<i>Diluição do Anticorpo primário</i>	<i>Anticorpo secundário (marca)</i>	<i>Diluição do Anticorpo secundário</i>
Anti-OCT-4 (Chemicom)	1:200	Anti-IgG de coelho (Invitrogen)	1:400
Anti-nanog (Chemicom)	1:200	Anti-IgG de coelho (Invitrogen)	1:400
Anti-SOX2 (Chemicom)	1:100	Anti-IgG2b de camundongo (Invitrogen)	1:400
Anti-CD105 (Sourthen Biotech)	1:100	Anti-IgG1 de camundongo (Invitrogen)	1:400
Anti-fibronectina (Dako)	1:400	Anti-IgG de coelho (Invitrogen)	1:400
Anti- α SMA (anti-alfa actina de músculo liso) (Sigma)	1:800	Anti-IgG1 de camundongo IgG2a (Invitrogen)	1:400
Anti- β -tubulina III (Promega)	1:1000	Anti-IgG1 de camundongo (Invitrogen)	1:400
Anti-Nestina (Abcam)	1:200	Anti-IgG de coelho (Invitrogen)	1:400
Anti-citoqueratina 15 (Abcam)	1:200	Anti- IgG2a de camundongo (Invitrogen)	1:400
Anti-citoqueratina 14 (Abcam)	1:200	Anti-IgG de coelho (Invitrogen)	1:400

3.8.4. Reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para a análise da expressão gênica, o RNA total das dCTMs cultivadas em monocamadas (cultura bidimensional) ou nos substitutos dérmicos (cultura tridimensional) foi extraído com *TRIzol[®] Reagent*

(Invitrogen), conforme especificações do fabricante, e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de reação com transcriptase reversa. Para isso, foi feita uma solução inicial contendo: 1 µg de RNA total e iniciador oligo dT (0,5mg/mL, Promega), a qual foi incubada por 5 minutos a 70°C, e logo após, resfriada a 4 °C por 10 minutos. Em seguida foram acrescentados nucleotídeos (dnTP) (0,5mM, Promega), cloreto de magnésio (MgCl₂) (50mM, Promega), tampão 5X (Promega), 1 µL de transcriptase reversa (Promega) e água livre de DNase-RNase, de forma que a solução final tivesse um volume final de 20 µL. Esta solução foi colocada em termociclador por 5 minutos a 25 °C, 1 hora a 42°C e 15 minutos a 70 °C.

A amplificação do cDNA de interesse foi realizada com a utilização de sequências de oligonucleotídeos iniciadoras (Tabela 5). Como controle interno da reação foi utilizado uma sequência de oligonucleotídeos iniciadoras para a amplificação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O kit utilizado para esta reação foi o *Master Mix* (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. As sequências amplificadas foram visualizadas em gel de agarose (2%) e coloração com *BlueGreen* (Promega).

Tabela 5. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de RT-PCR.

<i>Gene</i>	<i>Sequência de oligonucleotídeos iniciadores</i>	<i>Temperatura de anelamento (C°)</i>	<i>Tamanho do fragmento amplificado(pb*)</i>
α-SMA	CGATAGAACACGGCATCATC CATCAGGCAGTTCGTAGCTC	51	522
β-tubulina III	AGATGTACGAAGACGACGAGGAG GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA	55	312
CD31	GAGTCCTGCTGACCCCTCTG ATTTTGCACCGTCCAGTCC	56,5	107
CD90	GAGAATACCAGCAGTTCACCCATC AGGATCTCTGCACTGGAACCTTGAG	58	419
OCT-4	CTCCTGAAGCAGAAGAGGATCAC CTTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	54	398
Nanog	TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC	54	286
Nestina	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG CAGCTGGCGCACCTCAAGATG	62	208
GAPDH	ATCACTGCCACCCAGAAGAC ATGAGGTCCACCACCCTGTT	58	441

* pb: pares de base

3.9. ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: ANÁLISE DO REPARO TECIDUAL APÓS O TRATAMENTO COM dCTMS ASSOCIADAS AO SUBSTITUTO DÉRMICO INTEGRA® EM LESÕES CUTÂNEAS

3.9.1. Animais

Os animais do estudo foram disponibilizados pelo Biotério do LACERT, sendo que todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Animais (CEUA) da UFSC (Anexo 4). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, entre 3-6 meses e peso variando entre 20-30g. Os animais foram acondicionados 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”. A utilização dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.9.2. Procedimento cirúrgico para a realização de lesões de pele de espessura total e grupos experimentais

Todos os grupos de animais receberam anestesia geral com quetamina (100mg/Kg) e xilazina (10mg/Kg) por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada a tricotomia na região dorsal dos animais e a assepsia com solução de Iodopolvidona 10% e álcool 70°GL. Nesta região foi realizada a lesão na pele (excisão) de espessura total expondo a fáscia muscular. Foram utilizados 2 procedimentos (Figura 4):

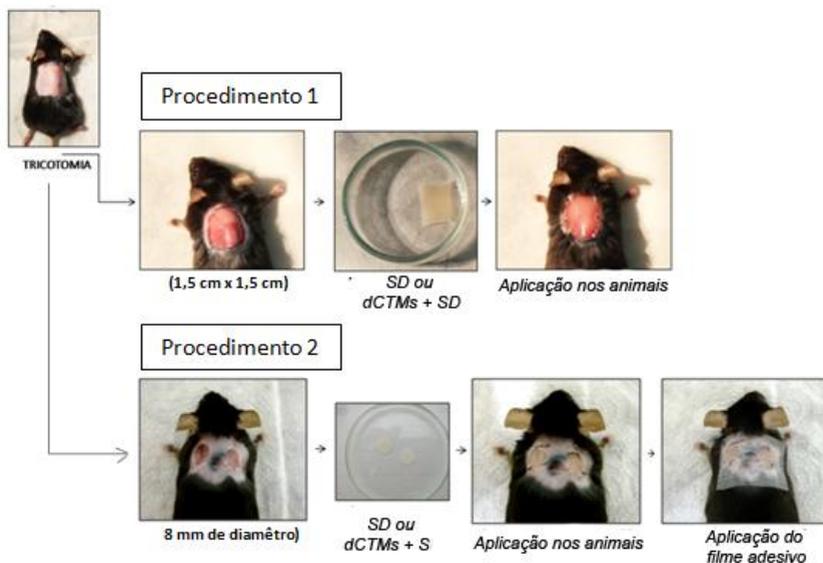
(1) Lesão de 1,5 x 1,5 cm localizada na região dorsal. Para realizar o procedimento cirúrgico foi utilizado um molde com o tamanho específico para demarcar a área da lesão, que foi cirurgicamente removida através de uma tesoura. Logo após, a lesão foi recoberta apenas com o Integra® (controle) ou com o Integra® contendo dCTMs previamente cultivadas na matriz. Para isso, uma suspensão de 5×10^5 células (em 150µl) foi semeada sobre um fragmento de substituto dérmico Integra® de 1.5 x 1.5 cm, durante 24 horas, conforme descrito no item 3.6. Este procedimento foi utilizado para as análises histológicas e imunohistoquímicas descritas a seguir.

(2) Lesão de 8mm de diâmetro localizada na região dorsal. Neste procedimento a pele da região dorsal do animal era dobrada e apoiada sobre a mesa cirúrgica e com um *punch* estéril de 0,8mm o fragmento de pele era excisionado. Como resultado deste procedimento, foram obtidas duas lesões

idênticas. Logo após, a lesão foi recoberta com o Integra® (controle) ou com o Integra® contendo dCTMs previamente cultivadas na matriz. Para isso, uma suspensão de $2,5 \times 10^5$ células (em $25 \mu\text{L}$) foi semeada sobre um fragmento do substituto dérmico de 8mm, durante 24 horas, conforme descrito no item 3.6. Este procedimento foi utilizado para as análises histológicas e imunohistoquímicas e para o ensaio de qPCR.

Antes da aplicação nos animais os substitutos dérmicos foram previamente lavados e mantidos com PBS, posicionadas na área da lesão e fixadas à pele normal adjacente com sutura utilizando o fio mononylon 6-0. Apenas no procedimento 2 a lesão foi coberta com um filme adesivo (Tegaderme™).

Figura 4. Modelo pré-clínico de lesão cutânea.



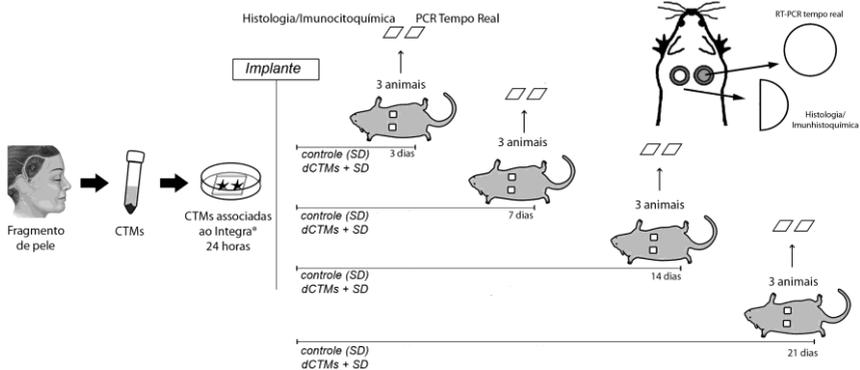
No procedimento 1 a área da lesão foi de 1,5 x 1,5 cm. As dCTMs foram cultivadas no substituto dérmico (SD) e mantidas em DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, durante 24 horas, a 37°C , 5% CO_2 e 95% DE O_2 . Logo após, a lesão foi recoberta apenas com o SD ou com dCTMs associadas ao SD. No procedimento 2 a área da lesão foi de 8 mm de diâmetro. As dCTMs foram também cultivadas no SD e mantidas em DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF durante 24 horas, a 37°C , 5% CO_2 e 95% DE O_2 . Logo após, a lesão foi recoberta apenas com o SD ou com dCTMs associadas ao SD. Fonte: (Talita da Silva Jeremias)

3.9.3. Grupos experimentais

Os grupos experimentais analisados foram os seguintes: (1) *Grupo controle (SD)* - animais mantidos apenas com o substituto dérmico (SD) Integra® na região da lesão; (2) *Grupo tratado com dCTMs + SD* - animais mantidos com dCTMs associadas ao substituto dérmico (SD) Integra®. Os substitutos dérmicos utilizados no grupo controle foram mantidos em cultura, nas mesmas condições dos associados com as dCTMs, porém sem as células.

Os animais de cada grupo (n=3) foram eutanasiados por inalação de CO₂ no dia 3, 7, 14 e 21 pós-operatório, e a área da lesão foi removida para análises posteriores, conforme esquema mostrado na Figura 5.

Figura 5. Esquema demonstrando os diferentes procedimentos e análises para a avaliação do reparo tecidual em camundongos.



Fonte: (Talita da Silva Jeremias)

3.9.4. Análise Macroscópica do reparo tecidual

As lesões foram avaliadas macroscopicamente, mediante os seguintes parâmetros: sinais de infecção, edema e presença de exsudato. Para isso, as lesões foram fotografadas com câmera digital logo após o procedimento e nos dias 3, 7, 14 e 21 pós-operatório.

3.9.5. Análises Histológicas do reparo tecidual

Coleta e processamento das amostras

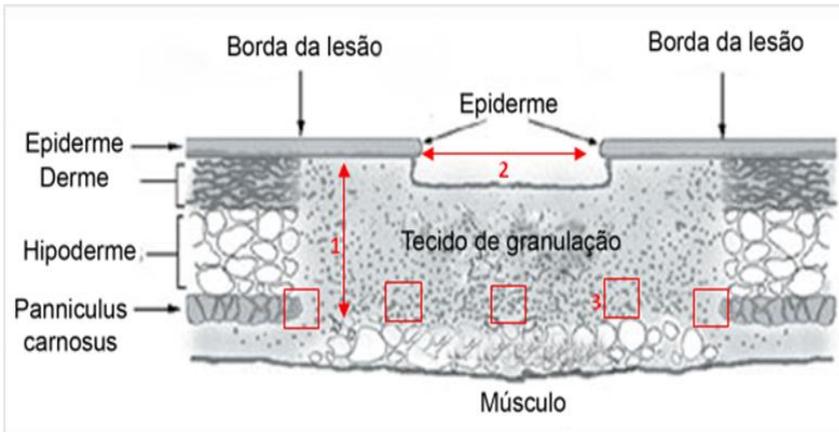
Após o sacrifício dos animais, a região submetida à lesão foi removida, fixada em paraformaldeído 4% por 72 horas, desidratada em uma série crescente de álcool (70%, 90% e 100 %) durante 10 minutos em cada, diafanizadas em xilol por 15 minutos. Após, as amostras foram imersas em parafina líquida à 54°C (overnight) e incluídas em parafina. Todos os blocos parafinados foram seccionados (5-7 μ m) em micrótomo (Leica), e os cortes obtidos posicionados sobre lâminas de vidro silanizadas.

Coloração com Hematoxilina e Eosina

Para a realização da análise histológica do tecido através da coloração com Hematoxilina/eosina as amostras seccionadas foram desparafinizadas em xilol por 15 minutos, reidratadas em uma série decrescente de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 5 minutos em cada, e lavadas com água destilada durante 15 minutos. Logo após, as amostras foram coradas com eosina (Anexo 3) durante 4 minutos, lavadas com água destilada, e coradas com Hematoxilina (Sigma) durante 2 minutos. As amostras coradas foram então lavadas em água destilada por 3 minutos, desidratadas em série crescente de álcool (70%, 90% e 100%) por 10 minutos cada, diafanizadas em xilol por 15 minutos e montadas com Entelam (Merck). A visualização das amostras foi realizada em microscópio Olympus IX71 e as imagens capturadas com a câmera Olympus DP71.

Esta coloração foi utilizada para as análises da formação do tecido de granulação, da colonização do substituto dérmico, da infiltração de neutrófilos e macrófagos, da vascularização e da re-epitelização (fechamento da ferida), conforme representadas no esquema da Figura 6.

Figura 6. Esquema representando as análises realizadas através da coloração com hematoxilina e eosina.



1. Formação do tecido de granulação: medida linear do tamanho do tecido de granulação (em 5 pontos). 2. Re-epitelização e fechamento da ferida: medida linear da ferida sem epiderme. As imagens obtidas foram sobrepostas representando assim toda a área lesionada. 3. Quantificação do número de células e vasos em diferentes campos, incluindo as bordas da lesão (6-10 campos).

Coloração de Mallory

A avaliação do depósito de matriz extracelular e a formação das fibras de colágeno foram realizadas através da coloração de Mallory. Para isso, as amostras seccionadas foram submetidas aos mesmos procedimentos de desparafinização e reidratação descritos acima. Logo após, as amostras foram coradas com o corante de Mallory (Anexo 3) durante 40 minutos, e logo após desidratadas em série crescente de álcool (90, 100%) por 5 minutos cada, diafanizadas em xilol por 15 minutos e montadas com Entelam. As amostras foram visualizadas em microscópio Olympus IX71 e as imagens capturadas com a câmera Olympus DP71.

3.9.6. Análise de imunohistoquímica

Para a realização do ensaio de imunohistoquímica as amostras seccionadas

foram desparafinadas em xilol, reidratadas em uma série crescente de álcool (70, 90, 80 e 100%) e lavadas com água destilada, conforme descrito no 3.9.5. Logo após, a peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com solução de peróxido de hidrogênio 3% diluído em metanol absoluto (Vetec) durante 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por calor, através da incubação em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 a 93-96°C, por 45 minutos. Após, o tecido foi lavado com PBS acrescido de 0,1% de Tween e os sítios inespecíficos bloqueados com solução de PBS acrescido de 20% de SBF, durante 30 minutos.

As amostras foram incubadas com os anticorpos primários, descritos na Tabela 5, durante 14 horas, em câmara úmida, a 4°C. Após esse período, foram lavadas com PBS Tween 0,1% durante 15 minutos e, incubadas com anticorpo secundário conjugado a biotina (Tabela 6) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas novamente com PBS Tween 0,1% (15 minutos) e incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:200) (Sigma), durante 30 minutos. A revelação da marcação foi realizada por reação colorimétrica com solução de 1% de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma) acrescido de peróxido de hidrogênio durante 10 segundos a 5 minutos (dependendo do anticorpo). A reação foi interrompida com incubação em água destilada, durante 5 minutos. Após a revelação, as amostras foram contracoradas com solução de Hematoxilina, durante 15 segundos, lavadas em água corrente e visualizadas em microscópio Olympus IX71. As imagens foram capturadas com a câmera Olympus DP71.

Tabela 6. Anticorpos utilizados nas análises de imunohistoquímica.

<i>Anticorpo primário (marca)</i>	<i>Diluição do Anticorpo primário</i>	<i>Anticorpo secundário (marca)</i>	<i>Diluição do Anticorpo secundário</i>
Anti-Citoqueratina 10 (Abcam)	1:200	Anti-IgG1 de camundongo conjugado a biotina	1:200
Anti-Colágeno I (Abcam)	1:200	Anti-IgG1 de camundongo conjugado a biotina	1:200
Anti-macrófago (Abcam)	1:100	Anti-IgG de coelho conjugado a biotina	1:200
Anti-mieloperoxidase (Abcam)	1:100	Anti-IgG1 de camundongo conjugado a biotina	1:200

3.9.7. Análise da expressão gênica

Extração de RNA

O RNA total do tecido proveniente das biópsias foi extraído utilizando-se o kit RNeasy-Fibrous Tissue Mini (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, 27 mg de tecido (correspondendo a biópsias de 3 animais diferentes, cada uma pesando cerca de 9 mg) foram armazenados no reagente RNALater (Qiagen), para estabilização do RNA. Em seguida, as amostras foram maceradas com o auxílio de um pistilo, na presença de 300 μL de tampão RLT. Após, adicionou-se 590 μL de água livre de nucleases e 10 μL de proteinase K às amostras, e estas foram incubadas por 10 minutos a 55 °C. As amostras foram então centrifugadas por 3 minutos a temperatura ambiente a 10.000g. O sobrenadante foi removido e a este foi adicionado cerca de 450 μL de etanol 99%. Esta solução foi transferida para uma coluna RNeasy mini spin que foi centrifugada a temperatura ambiente por 15 segundos a $> 8.000 \times g$. O eluído foi descartado e 350 μL de tampão RW1 foram adicionados à coluna, que foi então submetida a centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a $> 8000 \times g$. O novo eluído foi descartado e 80 μL de um mix de DNase produzido a partir de 10 μL de DNase e 70 μL de tampão RDD foi adicionado à coluna. Esta reação foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Logo após, 350 μL de tampão RW1 foram adicionados à coluna, que foi submetida a centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a $> 8000 \times g$. Então, adicionou-se 500 μL de tampão RPE a coluna, centrifugou-se a temperatura ambiente por 15 segundos a $> 8000 \times g$ e descartou-se o eluído. Novamente adicionou-se 500 μL de tampão RPE a coluna, que foi então centrifugada a temperatura ambiente por 2 minutos a $> 8000 \times g$. O eluído foi descartado e então adicionou-se 30 μL de água livre de RNases a coluna, para eluição do RNA adsorvido na membrana. A coluna foi centrifugada a temperatura ambiente por 1 minuto a $> 8000 \times g$. A quantidade de RNA na solução eluída foi então quantificada por espectrofotometria no aparelho Nanovue.

Síntese de cDNA

O cDNA das amostras foi sintetizado utilizando-se o kit RT² First strand kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, foi preparado o Mix de eliminação do DNA genômico, contendo 5 μg de RNA, 2 μL de tampão GE, e água livre de nucleases, em um volume final

de reação de 10 μL . Este mix foi incubado por 5 minutos a 42°C e imediatamente transferido para o gelo, onde permaneceu por pelo menos 1 minuto. Em seguida, 10 μL do mix de transcrição reversa (composto de 4 μL do tampão BC3; 1 μL de controle P2; 2 μL do mix da transcriptase reversa RE3 e 3 μL de água livre de nucleases) foi adicionado e misturado a cada tudo contendo o mix de eliminação do DNA genômico. As amostras foram então incubadas a 95°C por 5 minutos. Em seguida, 91 μL de água livre de nucleases foram adicionados a cada reação. As amostras foram então congeladas a -20°C para posterior reação de qPCR.

PCR em tempo real - qPCR

A técnica de qPCR foi utilizada para avaliar a expressão do mRNA de diversos genes envolvidos no reparo de feridas em camundongos. Este protocolo descreve o PCR em tempo real usando o kit RT² Profiler PCR Arrays em conjunto com o kit RT² SYBR Green Mastermix, seguindo as instruções do fabricante (Qiagen).

Resumidamente, foi preparado um Mix para o PCR contendo 1350 μL do reagente 2x RT² SYBR Green mastermix, 102 μL da reação de síntese de cDNA e 1248 μL de água livre de RNases, perfazendo um volume total de 2700 μL . Vinte e cinco microlitros desta solução foram adicionados a cada um dos 96 poços de uma placa contendo oligonucleotídeos específicos para os seguintes genes: IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, EGF, FGF-2, FGF-7, FGF-10, IGF, HGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , TNF, VEGF, Colágeno Ia1, Colágeno III, SMA (Acta2), MMP-1, MMP-2, MMP-9 e TIMP-1. As placas foram seladas e centrifugadas para a remoção de eventuais bolhas na solução e então inseridas no aparelho epRealplex 4 (Eppendorf) para início da reação de qPCR. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo - 10 minutos / 95°C; 40 ciclos - 15 segundos / 95°C; 1 minuto / 60°C. Ao final destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma reação para a produção de uma curva de dissociação.

4.RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DERIVADAS DA DERME

A fim de avaliar as características de CTM nas células isoladas da derme, foram realizadas análises tendo em vista os critérios propostos pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy”. Estes critérios definem as CTMs pela: (1) morfologia fibroblastóide, (2) expressão dos marcadores mesenquimais CD105, CD90 e CD73, ausência de expressão dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, e (3) potencial de diferenciação celular para adipócito, osteócito e condrócito.

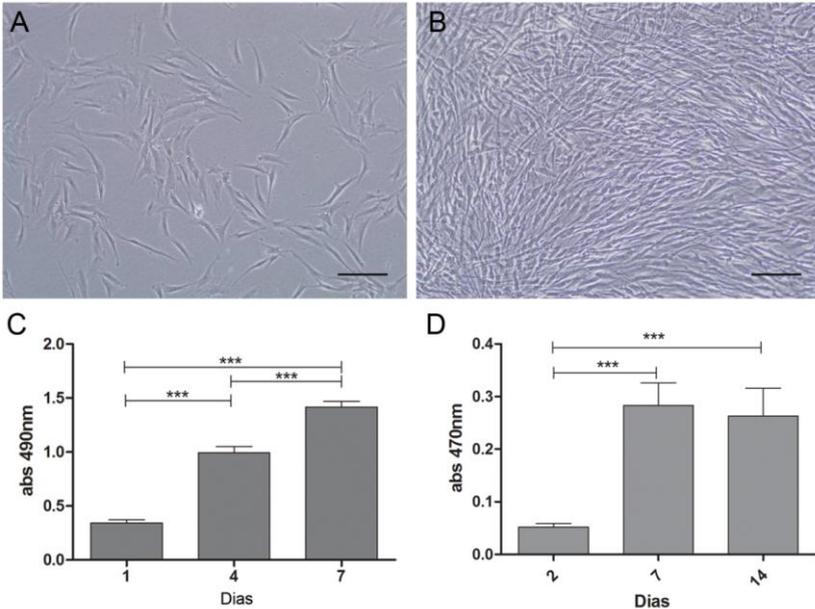
4.1.1. Morfologia e viabilidade celular

Os resultados demonstram que as células isoladas da pele são aderentes ao plástico e apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, com formato fusiforme (Figura 7 A e B).

A análise de viabilidade/proliferação celular através dos ensaios de MTS mostrou um significativo e progressivo aumento nos valores de MTS, no dia 4 e 7 de cultivo (Figura 7 C). No dia 4, foi observado um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando comparado ao dia 1. Já no dia 7, este aumento foi de aproximadamente 4,5 vezes, indicando uma aumento na proliferação celular.

Foi realizado também o ensaio de MTT para avaliar a viabilidade/proliferação celular, porém durante um período mais prolongado de cultivo (2, 7 e 14 dias) (Figura 7 D). As análises mostraram um aumento de aproximadamente 5 vezes no valor de MTT no dia 7 e 14 em relação ao dia 2 de cultivo. Não foram observadas diferenças significativas entre o dia 7 e 14. Estes resultados mostram uma alta capacidade de expansão *in vitro* das células aderentes isoladas da pele, sendo que estas puderam ser cultivadas e amplificadas até 20 passagens.

Figura 7. Morfologia e viabilidade das dCTMs.



(A-B) Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase das células aderentes derivadas da pele, (A) após 7 dias de cultivo e (B) em confluência, após 14 dias. (C -D) Representação gráfica da viabilidade celular realizada através dos ensaios de (C) MTS e (D) MTT . Os valores representam as médias \pm desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$ por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni. Escala: (A-B) 200 μ m.

4.1.2. Expressão de marcadores de superfície

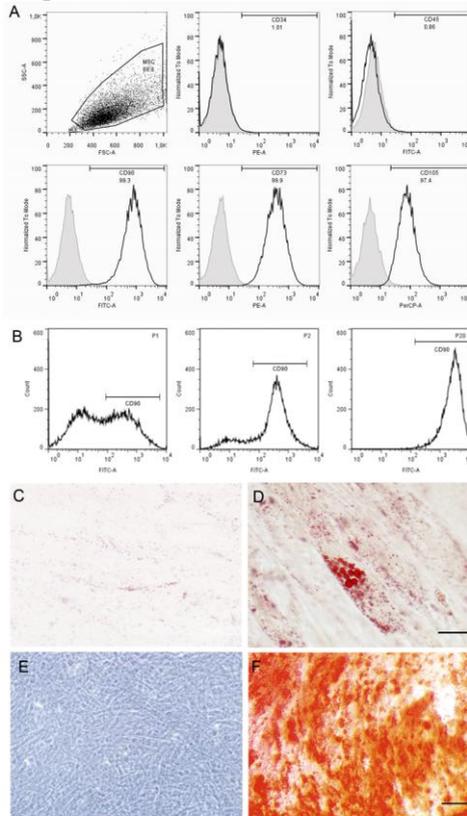
O perfil imunofenotípico das células derivadas da pele, quanto à expressão dos marcadores de superfície típicos de CTMs, foi avaliado nas células em passagens baixas (P1 a P3) e altas (a partir de P4), através de citometria de fluxo (Figura 8 A e B). A maioria das células expressa os marcadores de CTMs, CD90 (99.3%), CD73 (99.9%) e CD105 (97.4%), e são negativas para os hematopoiéticos, CD34 (1,01%) e CD45 (0,86%). Em algumas amostras foi constatado aumento progressivo na expressão de CD90 entre as células em passagens baixa (P1-P2) e alta (P20) (Figura 8 B). Tendo em vista esta variação, foi estabelecida a utilização de células entre P3 e P12 nos experimentos seguintes.

4.1.3. Potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica

A seguir foi avaliado o potencial de diferenciação das dCTM para fenótipos mesodermis, como o adipogênico e o osteogênico (Figura 8 C-F). As dCTMs apresentam diferenciação para o fenótipo osteogênico, evidenciado pela presença de depósitos de cálcio extracelular após coloração com *Alizarin Red S* (Figura 8 D). Já a diferenciação adipogênica foi comprovada pela presença de acúmulo de lipídios no interior de vacúolos intracelulares corados com *Oil Red O* (Figura 8 F) nas culturas tratadas com meio específico. Nas células mantidas com o meio de cultivo convencional (sem fatores indutores), não foi observada a marcação com os corantes (Figura 8 C e E).

Em conjunto, os resultados das análises morfológica, de viabilidade, perfil imunofenotípico e diferenciação celular obtidos neste estudo demonstraram que as células isoladas da pele humana são CTMs, sendo designadas neste trabalho de células tronco mesenquimais derivadas da derme (dCTMs).

Figura 8. Caracterização imunofenotípica e potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico das dCTM.



(A) Representação em histogramas do perfil imunofenotípico das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD34-PE, CD45-FITC, CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP. (B) Representação em histogramas das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD90-FITC demonstrando o aumento de expressão com as passagens 1 a 20 (P1 a P20). (C-D) Diferenciação adipogênica: Imagens representativas em microscópio de luz das células controle (C) ou mantidas em meio indutivo adipogênico (D), coradas com *oil red O*. (E e F) Diferenciação osteogênica: células controle (E) ou mantidas em meio indutivo osteogênico (F), coradas com *Alizarin red S*. Escala: 50 μ m.

4.2 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIALIDADE E DE LINHAGENS CELULARES DIFERENCIADAS NAS dCTMS

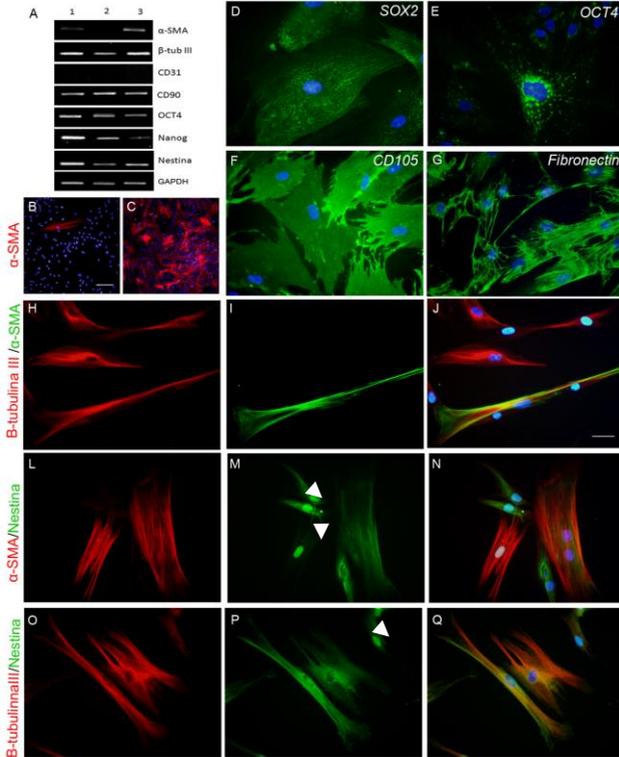
A seguir, o estado de diferenciação das dCTMs cultivadas em condição padrão (sem indução específica) foi investigado através da expressão dos marcadores de pluripotencialidade (Oct-4, Nanog, e Sox-2), marcadores neurais (Nestina e β -tubulina III), mesenquimais (CD105, α -SMA, Fibronectina) e endotelial (CD31) (Figura 9), em células de passagem baixa (P1) e alta (acima de P9).

A Figura 9A demonstra a expressão gênica destes marcadores em 3 amostras de dCTMs, analisadas através de RT-PCR, sendo estas: (1) Paciente 1, em passagem 13, (2) Paciente 2, em passagem 9 e (3) Paciente 3, em passagem 1. Os resultados mostram que todas as amostras de dCTMs expressam o RNAm para Nanog, Oct-4, Nestina, β -tubulina III, mas não expressam o RNAm de CD31. Em relação a expressão de α -SMA, foi observada variação na expressão gênica deste marcador entre as amostras analisadas, sendo que as células da amostra 2 (P9) não apresentaram tal expressão.

Através do ensaio de imunocitoquímica, foi observada uma baixa quantidade de células que expressam α -SMA na amostra 2 (Figura 9B), o que explica o fato de ter sido detectada sua expressão pela técnica de RT-PCR. Já, na amostra de células em baixa passagem (P1), a maioria das células expressam α -SMA (Figura 9C). Estas variações entre as amostras podem estar relacionadas com a diferença individual das amostras (pacientes diferentes) e/ou heterogeneidade das culturas, após o isolamento e purificação.

O ensaio de imunocitoquímica revelou ainda que a maioria das dCTMs, em todas as amostras analisadas, possui uma distribuição citoplasmática de Sox-2 (Figura 9D) e Oct-4 (Figura 9E). A expressão de CD105 (Figura 9F), fibronectina (Figura 9G), Nestina e β -tubulina III (figura 9H-Q), também foi constatada na maioria das células. Surpreendentemente, uma distribuição nuclear de Nestina foi visualizada em algumas células (Figura 9M-P, seta branca). Além disso, as amostras apresentam em média 40% das células positivas para α -SMA. A co-expressão de nestina, β -tubulina III e α -SMA são mostradas na Figura 9H-Q.

Figura 9. Expressão de marcadores de pluripotencialidade e de linhagens celulares diferenciadas (neural, mesenquimal e endotelial) nas dCTMs.



(A) Imagens representativas de produtos de RNAm em gel de agarose, demonstrando a expressão de α -SMA, β -tubulina III, CD31, CD90, Oct-4, Nanog, Nestina e Gapdh (padrão interno) em diferentes amostras de dCTMs. *Amostra 1*: passagem P13. *Amostra 2*: Passagem 9. *Amostra 3*: Passagem 1. (B-C) Expressão de α -SMA nas dCTMs em (B) passagem baixa (P1) e (C) alta (P13) por imunocitoquímica. (D-Q) Imagens representativas de imunocitoquímica para (D) Sox-2, (E) Oct-4, (F) CD105, (G) Fibronectina, (H e O) β -tubulina III, (I e L) α -SMA e (M e P) nestina. A sobreposição de β -tubulina III e α -SMA são mostradas na figura J, de α -SMA e nestina na figura N e de β -tubulina III e nestina na figura Q. Em azul, marcação do núcleo com DAPI. Seta branca em M e P: expressão nuclear de Nestina. Escala: 50 μ m.

4.3. DIFERENCIAÇÃO EM QUERATINÓCITOS E MIGRAÇÃO CELULAR DAS dCTMS

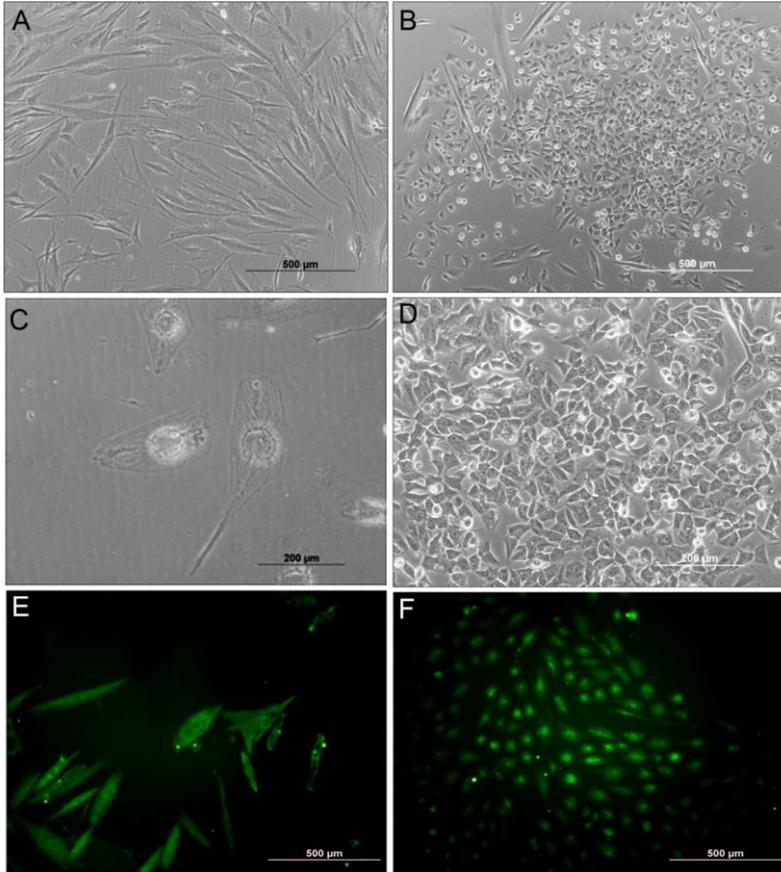
Tendo em vista que a re-epitelização e a migração celular são eventos cruciais no reparo de lesões cutâneas, foi analisado a seguir o potencial de diferenciação das dCTMs em queratinócitos e sua capacidade migratória *in vitro*.

4.3.1. Diferenciação em queratinócitos

Para avaliar o potencial de diferenciação das dCTMs em queratinócitos, as células foram mantidas nos meios indutivos específicos de diferenciação para queratinócitos, CNT-02 e CNT-07. Foram observadas, através de microscopia de contraste de fase, alterações morfológicas, referentes ao tamanho e formato celular (Figura 10). As células mantidas com ambos os meios, CNT-07 e CNT-02, tornaram-se menores, mais justapostas e com formato semelhante à queratinócitos (Figura 10B-D). Já as células mantidas em apenas um dos meios CNT-07 ou CNT-02, apresentaram morfologia mais alongada (Figura 10C), sugerindo uma transição entre a morfologia fibroblastoide típica das CTMs (Figura 10A) e de queratinócitos (Figura 10B).

O potencial de diferenciação em queratinócitos foi avaliado ainda pela expressão da citoqueratina 14 (marcador de queratinócitos diferenciados) e citoqueratina 15 (marcador de queratinócitos indiferenciados). Os resultados revelaram que as dCTMs, quando cultivadas nos meios indutivos expressam citoqueratina 14 (Figura 10E e F), porém não foi observada a expressão de citoqueratina 15 em nenhuma das condições analisadas (dados não mostrados).

Figura 10. Potencial de diferenciação das dCTMs para queratinócitos.

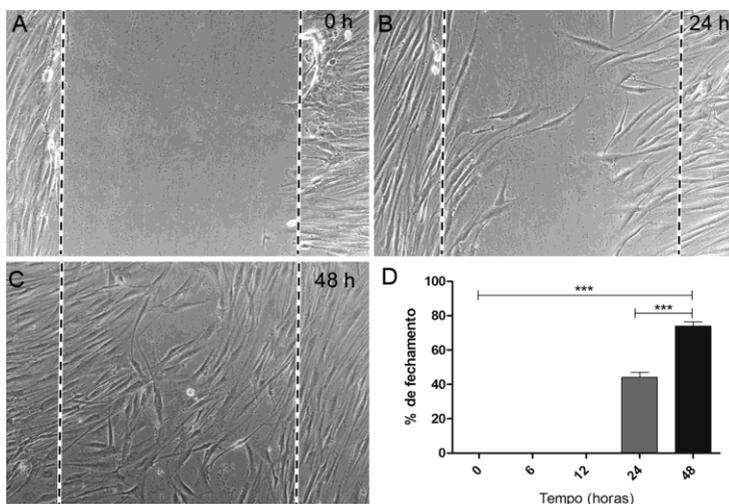


(A) Morfologia semelhante a fibroblastos das dCTMs cultivadas em meio padrão, visualizadas através de microscópio de fase. (B-D) Alterações morfológicas das dCTMs cultivadas em (B) ambos os meio CNT-02 e CNT-07 e (C) em apenas um dos meios (CNT-07 ou CT-02). (D) Ampliação da imagem B. (E-F) Imagens representativas da expressão de citoqueratina 14, por imunocitoquímica, das dCTMs cultivadas em (E) apenas um dos meios (CNT-07 ou CT-02) e em (F) ambos os meio CNT-02 e CNT-07.

4.3.2. Migração celular das dCTMs – ensaio de wound healing

O ensaio de *scratch* ou *wound healing* foi realizado para avaliar a habilidade de migração das dCTMs (Figura 11). Para isso, as células que migraram para a área raspada na monocamada celular foram analisadas após 6, 12, 24 e 48 horas. Não foi observada migração das dCTMs nas primeiras 12 horas. No entanto, após 24 horas a proporção de fechamento da área raspada foi de aproximadamente 45% e após 48 horas de 74% (Figura 11D). Estes resultados mostram que ocorre um fechamento significativo da área raspada após 48 horas e que as dCTMs possuem uma alta capacidade migratória *in vitro*.

Figura 11. Migração das dCTMs *in vitro* (ensaio de *wound healing*).



(A-C) Imagens representativas em microscópio de contraste de fase, entre 0 e 48 horas após a raspagem da monocamada celular. (D) Representação gráfica da porcentagem de fechamento após 0, 6, 12, 24 e 48 horas do procedimento de raspagem da monocamada. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de quadruplicatas de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$ por ANOVA uma via. Aumento: 100X.

4.4 BIOCMPATIBILIDADE E INTERAÇÃO DAS dCTMS COM OS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC® *IN VITRO*

A fim de estabelecer uma nova ferramenta terapêutica para o tratamento de lesões cutâneas que promova um melhor reparo ou regeneração do tecido, foi avaliada neste estudo a associação das dCTMs com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® *in vitro*. Para isso, foi avaliada a biocompatibilidade e interação destas células com os substitutos dérmicos, através das análises de viabilidade, adesão e morfologia.

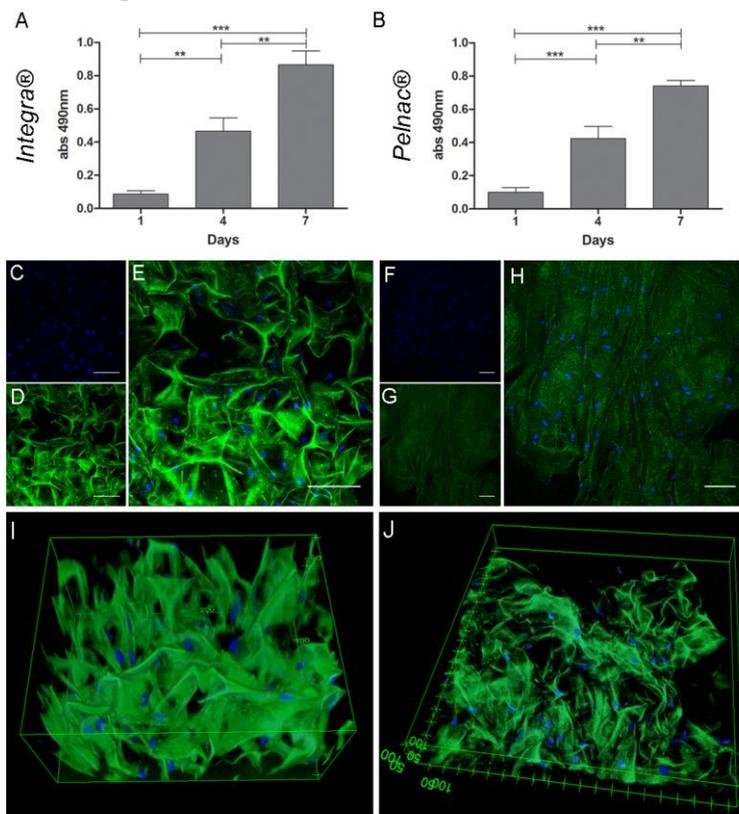
4.4.1. Viabilidade/proliferação celular das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos

A habilidade dos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® em suportar a sobrevivência e a proliferação das dCTMs em cultivo 3D, foi avaliada através do ensaio de MTS. Um aumento significativo e progressivo na viabilidade/proliferação das dCTMs foi observado durante os 7 dias de cultura, em ambas as matrizes (Figura 12A e B). Os resultados mostram uma diferença de aproximadamente 8 vezes nos valores de MTS entre os dias 2 e 7 de cultivo em ambas as matrizes. Não foram constatadas diferenças ($P > 0.05$) nos valores de MTS entre o Integra® e Pelnac® em nenhum dos pontos analisados (Figura 12A vs. B).

4.4.2 Adesão e morfologia das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos

As análises da adesão, migração e morfologia das dCTMs cultivadas nos substitutos dérmicos foi realizada através de microscopia confocal (Figura 12C-J) e eletrônica de varredura (Figuras 13 e 14). A avaliação através de microscopia confocal revelou que as dCTMs possuem capacidade de aderir e migrar para o interior de ambos os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®, embora apresentem maior distribuição e concentração na superfície das matrizes (Figura 12E e H). A reconstrução tridimensional das imagens mostra que as células apresentam uma maior migração para o interior do Integra® quando comparadas ao Pelnac® (Figura 12I e J).

Figura 12. Viabilidade celular e adesão das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos, Integra® e Pelnac®.

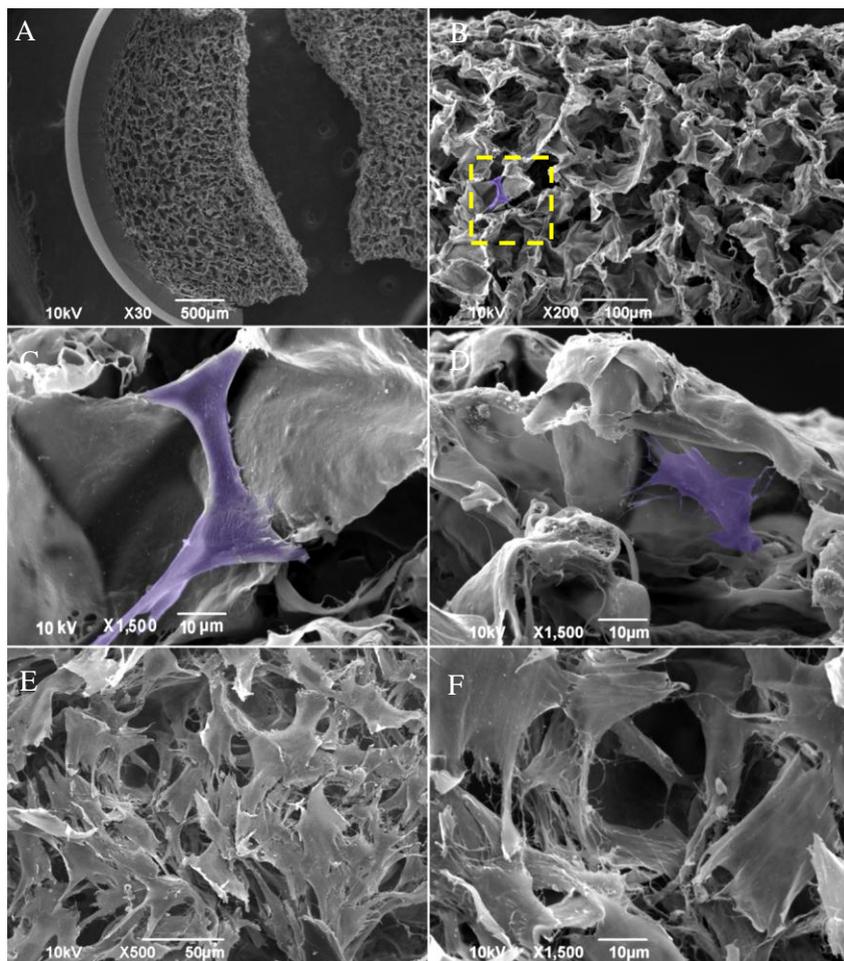


(A-B) Representação gráfica da viabilidade celular por ensaio de MTS, no dia 1, 4 e 7 de cultivo. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. (C-H) Imagens representativas de microscopia confocal das dCTMs cultivadas no Integra® (C-E) e Pelnac® (F-H), após 3 dias de cultivo. Em azul, os núcleos corados com DAPI (C e F) e em verde, a autofluorescência dos substitutos dérmicos (D e G). A sobreposição das imagens está representada nas imagens E e H. (I-J) Reconstrução 3D das imagens obtidas por microscopia confocal das dCTMs associadas Integra® e Pelnac®, através do programa ImageJava. Escala: 100 μ m.

A estrutura e porosidade da camada interna do Integra® e Pelnac® foi visualizada em detalhes através da microscopia eletrônica de varredura, revelando que o Integra® possui uma porosidade maior e mais homogênea que o Pelnac® (Figura 13 e 14). Esta análise microscópica demonstrou ainda que as dCTMs aderem e se distribuem uniformemente na superfície de ambas as matrizes (Figura 13 e 14, E e F). Contudo, 24 horas após a semeadura das células, foram observadas diferenças na morfologia e adesão das dCTMs cultivadas nos substitutos dérmicos. No Integra®, as células apresentam morfologia semelhante a fibroblastos, com projeções citoplasmáticas evidentes, lamelipódios e pontos de adesão focal (Figura 13C-F). Já no Pelnac®, além de células com estas características morfológicas, foram observadas células arredondadas, com pouca interação com a matriz (Figura 14C e D). Após 48 horas de cultivo, as células apresentam morfologia semelhante a fibroblastos em ambas as matrizes, o que pode indicar adesão celular inicial mais lenta no Pelnac® (Figuras 13 e 14E e F).

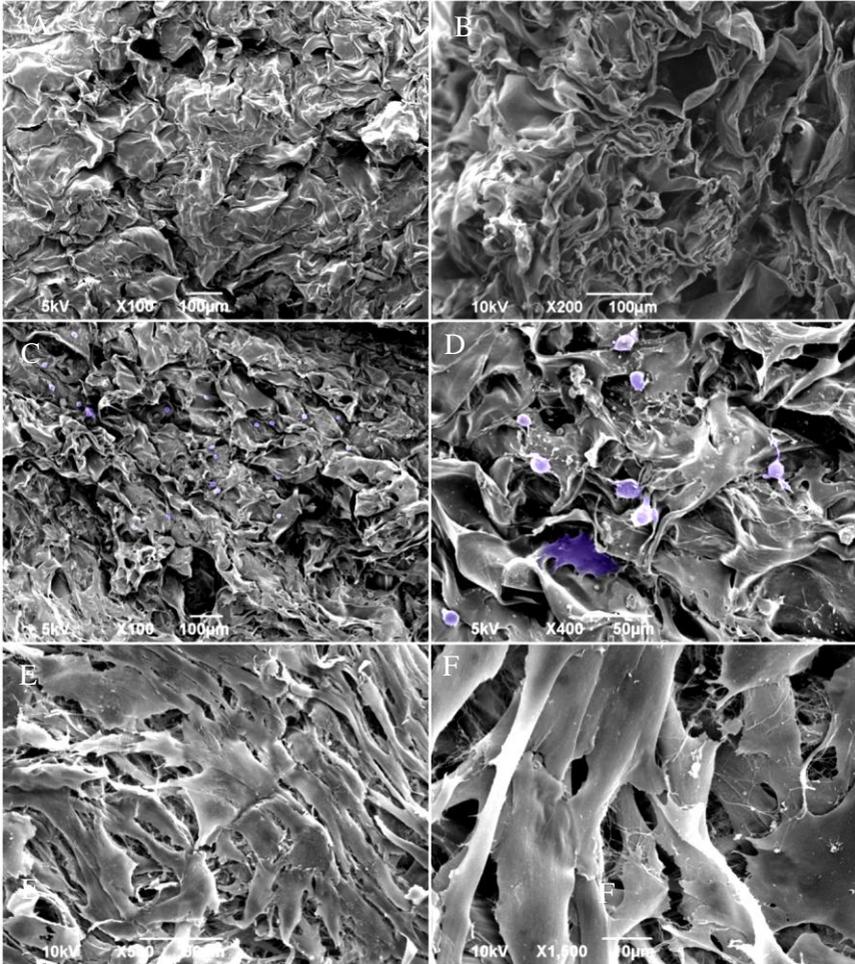
Estes resultados de microscopia confocal e eletrônica, juntamente com os de viabilidade celular demonstram que ambos os substitutos dérmicos são biocompatíveis com as dCTMs.

Figura 13. Adesão e morfologia das dCTMs associadas ao Integra®.



Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) visão transversal do Integra®, mostrando o silicone (*) e a camada interna composta de colágeno e glicosaminoglicanos. (B) Visão transversal do Integra® contendo CTMs (em destaque). (C e D) Adesão e morfologia das CTMs. (E e F) Visão superficial das CTMs aderidas no Integra®. As imagens foram coloridas através do programa Image Java.

Figura 14. Adesão e morfologia das dCTMs associadas ao Pelnac®.

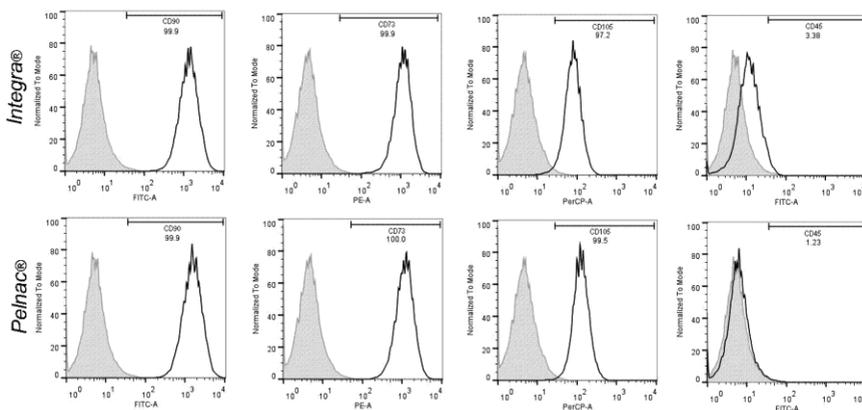


Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV). (A) visão da superfície do Pelnac®, mostrando a camada interna composta de colágeno e glicosaminoglicanos. (B) Visão transversal do Pelnac®. (C e D) Adesão e morfologia das CTMs após 24 horas de cultivo (visão da superfície). (E e F)) Adesão e morfologia das CTMs após 48 horas de cultivo (visão da superfície). As imagens foram coloridas através do programa Image Java.

4.5 PERFIL FENOTÍPICO DAS dCTMS ASSOCIADAS AOS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC® *IN VITRO*

A fim de avaliar se a interação com os substitutos dérmicos altera o perfil fenotípico das dCTMs, foi analisada a expressão dos marcadores de CTMs, de pluripotencialidade e de linhagens celulares diferenciadas (neural, mesenquimal e endotelial). A análise de citometria de fluxo revelou que, nestas condições de cultivo, a maioria das dCTMs associadas ao Integra® e Pelnac® foi positiva para CD90 (99.9% e 99.9%, respectivamente), CD73 (99.9% e 100%, respectivamente) e CD105 (97.2% e 99.5%, respectivamente) e negativas para CD45 (menos que 3.38% em ambas matrizes) (Figura 15).

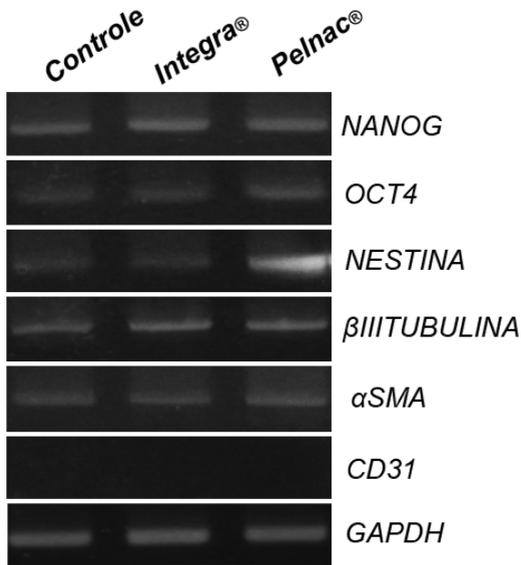
Figura 15. Perfil imunofenotípico das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®.



Representação em histogramas do perfil imunofenotípico das dCTMs submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP e CD45-FITC, após 3 dias de cultivo.

Além disso, o ensaio de RT-PCR, revelou que as dCTMs expressam o RNAm de Nanog, Oct4, Nestina, β -Tubulina III e α -SMA, e não expressam o de CD31 (Figura 16). Estes resultados indicam que as dCTMs cultivadas nos substitutos dérmicos mantêm as características fenotípicas de dCTMs, semelhante ao observado no cultivo bidimensional em monocamadas (plástico).

Figura 16. Perfil de expressão gênica das dCTMs associadas aos substitutos dérmicos Integra® e Pelnac®.



Imagens representativas de produtos de RNAm em gel de agarose, demonstrando a expressão de Nanog, Oct-4, Nestina, β -tubulina III, α -SMA, CD31 e GAPDH (padrão interno) após 3 dias. Controle: dCTMs cultivadas na condição padrão (plástico).

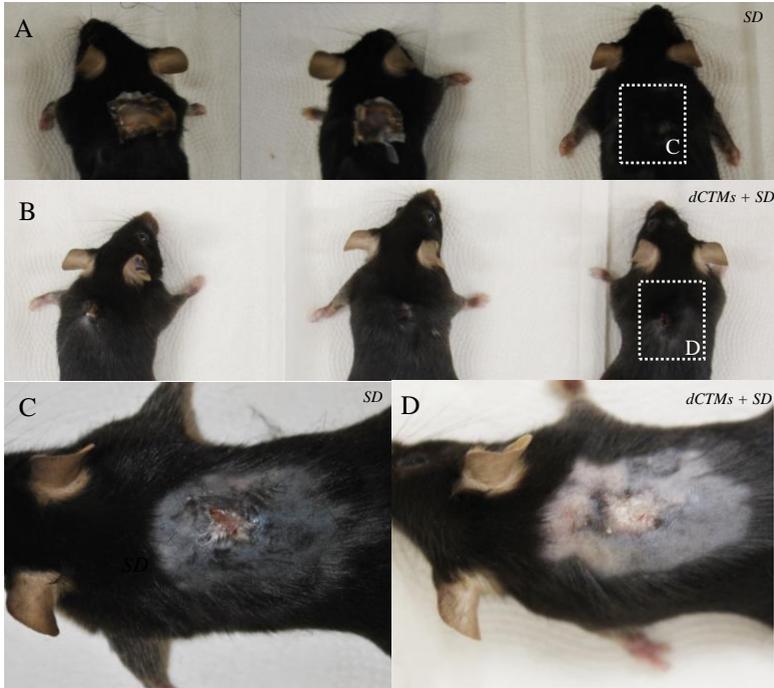
4.6. POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL DAS dCTMS ASSOCIADAS AO SUBSTITUTO DÉRMICO INTEGRA® EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À LESÕES CUTÂNEAS

Até o momento, os resultados apresentados neste estudo demonstram o isolamento de CTMs da derme com potencialidade semelhante as CTMs da medula óssea, e reportam com sucesso a sua associação com substitutos dérmicos e a potencial aplicação em lesões cutâneas. Assim, considerando que a associação destes elementos pode ocasionar um melhor reparo ou a regeneração do tecido lesionado, foi investigado neste estudo o efeito terapêutico do tratamento de dCTMs associadas ao substituto dérmico em lesões cutâneas de camundongos. Como não foram observadas diferenças entre a associação das dCTMs com o Integra® e o Pelnac®, foi escolhido apenas o substituto dérmico Integra® para a realização do estudo pré-clínico em camundongos, em razão da sua maior utilização no tratamento de lesões cutâneas.

4.6.1. Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas

A análise macroscópica dos animais do grupo tratado com dCTMs associadas ao substituto dérmico (dCTMs + SD) e do grupo controle (somente SD), durante 21 dias de pós-operatório revelou ausência de infiltrado purulento nas lesões, sem sinais de infecção em ambos os grupos. No grupo tratado com dCTMs + SD, a camada externa de silicone pertencente ao substituto dérmico estava ausente em todos os animais após 14 e 21 dias pós-operatório (Figura 17A), enquanto no grupo controle apenas em um animal o silicone não foi observado (Figura 17B). Esta ausência do silicone, não compromete a integração da camada interna do substituto dérmico, composta de uma matriz porosa de colágeno e glicosaminoglicanos, já que nesse período de estudo esta apresenta-se integrada ao tecido do animal. Em relação à cicatrização, não foi observada cicatrização hipertrófica em nenhum dos grupos analisados.

Figura 17. Avaliação macroscópica da lesão no dia 21 pós-operatório.



(A) Animais do grupo controle (SD) e (B) do grupo tratado com dCTMs + SD. (C) Único animal do grupo controle que apresentou re-epitelização total aos 21 dias de pós-operatório (ampliação da imagem A). (D) Animal do grupo tratado (ampliação da imagem B).

4.6.2 Formação do tecido de granulação nas lesões cutâneas

A formação do tecido de granulação durante o processo de reparo tecidual foi avaliada por análise histológica nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório (Figura 18 e 19). As análises revelaram que no grupo controle (SD) o tamanho do tecido de granulação foi similar nos três dias analisados (cerca de 0,15 mm), enquanto no grupo tratado com dCTM + SD foi observado um aumento significativo de 3,4 vezes no dia 14 em relação ao dia 7 (Figura 19).

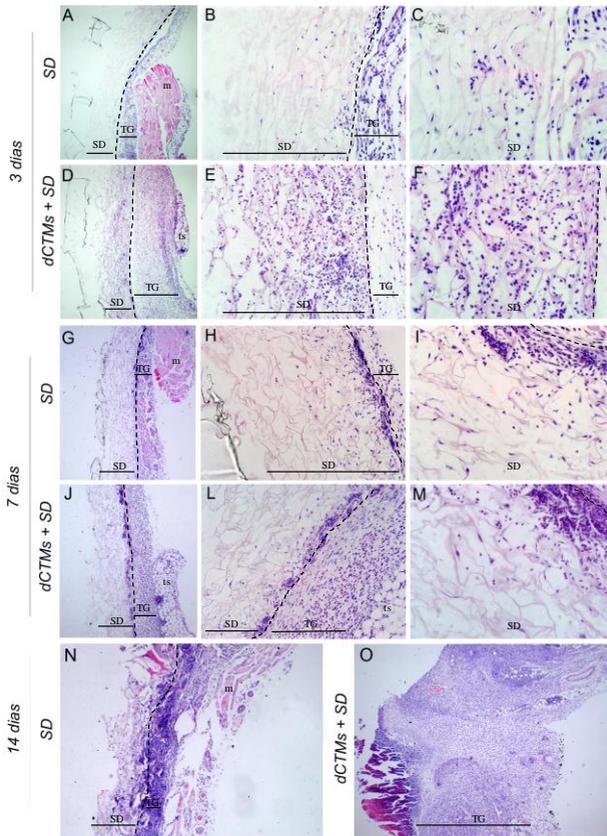
Os resultados mostram ainda um aumento na formação do tecido de granulação no grupo tratado com dCTM + SD em comparação ao controle nos três períodos analisados, embora os valores sejam estatisticamente diferentes apenas no dia 14 (8,4 vezes) (Figura 19), sugerindo uma ação das dCTMs na formação do tecido de granulação.

4.6.3. Colonização celular do substituto dérmico Integra®

Tendo em vista que a análise da formação do tecido de granulação não considerou a colonização celular no substituto dérmico, foi avaliada a seguir a infiltração de células na matriz (Figura 18 e Tabela 7). As análises histológicas do tecido nos dias 3 e 7 de pós-operatório revelou uma maior quantidade de células no substituto dérmico no grupo tratado com dCTMs + SD quando comparado ao controle (Figura 18A-F e G-M, e Tabela 7). No dia 14 pós-operatório, o substituto dérmico estava totalmente integrado ao tecido no grupo tratado, não podendo ser distinguido do tecido do animal, enquanto no controle a estrutura do substituto dérmico ainda pôde ser observada (Figura 18N-O).

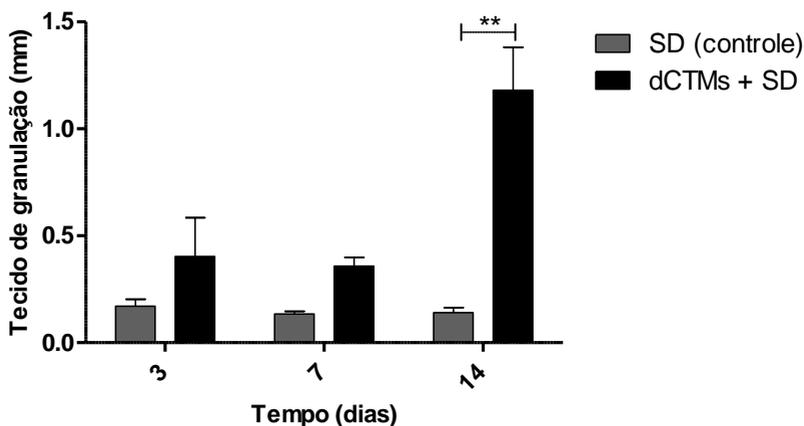
Estes resultados, juntamente com o da formação do tecido de granulação, sugerem um importante papel das dCTMs na regulação dos eventos celulares relacionados com a infiltração celular durante o processo de reparo tecidual. Então a seguir, foi avaliado o papel das dCTMs associadas ao substituto dérmico no recrutamento de células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos na área da lesão.

Figura 18. Formação do tecido de granulação e colonização celular no substituto dérmico, nos dia 3, 7 e 14 de pós-operatório.



Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. (A-C) Grupo controle (SD), no dia 3 de pós-operatório. (D-F) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 3 de pós-operatório. (G-I) Grupo controle, no dia 7 de pós-operatório. (J-M) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 7 de pós-operatório. (N-O) Grupo controle (N) e tratado com dCTMs + SD (O), no dia 14 de pós-operatório. Aumentos: (A, D, G, J, N e O) 40X; (B, E, H e L) 200X; (C, F, I e M) 400X. Abreviações: (s) silicone do substituto dérmico; (SD) Substituto dérmico; (TG) tecido de granulação; (m) tecido muscular; (ts) tela subcutânea (hipoderme).

Figura 19. Avaliação do tecido de granulação nas lesões cutâneas, nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório.



Representação gráfica da medida linear do tecido de granulação do grupo tratado com dCTMs + SD e do grupo controle (SD), após 3, 7 e 14 dias da realização do procedimento cirúrgico. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de 3 animais por grupo (4 medidas/animal). ** $P < 0,01$ por ANOVA duas vias seguido de teste de Bonferroni.

Tabela 7. Análise qualitativa da infiltração de células no substituto dérmico, no dia 3, 7 14 pós-operatório.

Tempo	Controle (SD)	dCTMs + SD
	Quantidade de células	
Dia 3	+	++++
Dia 7	+	++
Dia 14	++	I

Quantidade de células: (+) baixa; (++) moderada; (++++) alta; (+++++) muito alta. I: matriz integrada ao tecido.

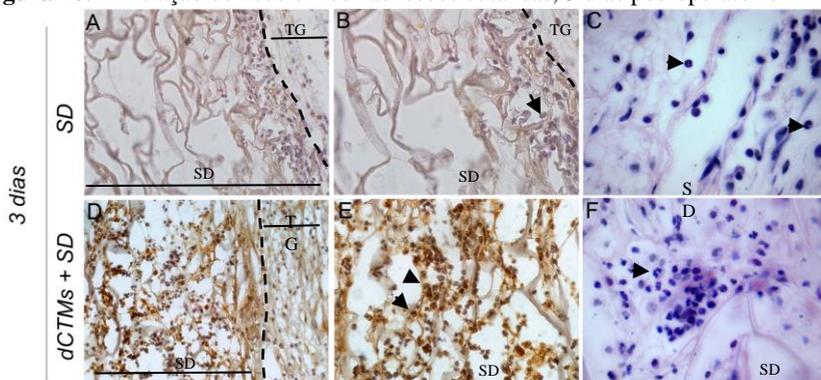
4.6.4. Recrutamento de células inflamatórias – neutrófilos e macrófagos

Como os neutrófilos são as primeiras células que migram para o local da lesão e promovem uma resposta inflamatória inicial para o reparo tecidual (MARTIN; LEIBOVICH, 2005), foi avaliado o recrutamento dessas células polimorfonucleares na lesão (Figura 20 e Tabela 8). A análise foi realizada através de ensaio de imunohistoquímica para o marcador de neutrófilo mieloperoxidase (MPO) e coloração com Hematoxilina/Eosina (Figura 20). Os resultados demonstraram um aumento na infiltração de neutrófilos tanto no substituto dérmico quanto no tecido de granulação e nas bordas da lesão, no grupo tratado com dCTMs + SD quando comparado ao controle, nos dias 3 e 7 pós-operatório (Tabela 8). O aumento observado no grupo tratado foi maior no dia 3 pós-operatório quando comparado ao dia 7.

O recrutamento de macrófagos, que ocorre em resposta a fase inflamatória inicial, foi avaliado através de imunohistoquímica para marcador específico e coloração com Hematoxilina/Eosina, no dia 3 e 7 pós-operatório (Figura 21 e Tabela 8). Os resultados mostram que no dia 7 há uma maior infiltração de macrófagos, tanto no grupo tratado com dCTMs + SD como no controle, em relação ao dia 3 pós-operatório. Além disso, comparando a infiltração destas células entre os grupos analisados, foi observado que no dia 3 pós-operatório a quantidade de macrófagos foi similar. Já no dia 7, houve um aumento no número de macrófagos no grupo tratado com dCTMs + SD quando comparado ao controle (Tabela 8).

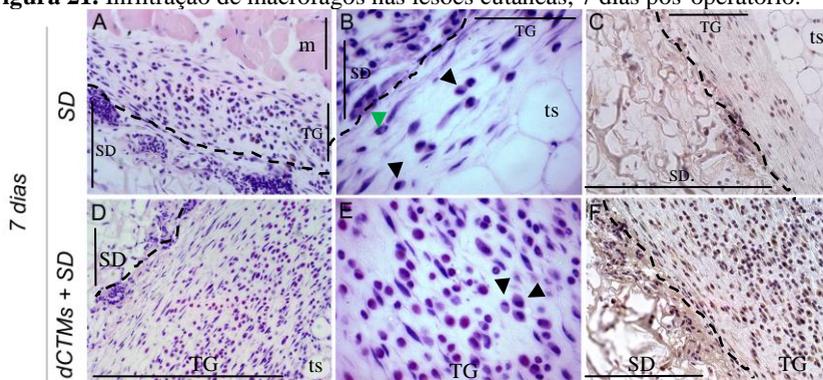
Esses resultados sugerem que o tratamento com dCTMs + SD promovem um aumento no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, estando de acordo com os dados de aumento do tecido de granulação e da infiltração de células na matriz.

Figura 20. Infiltração de neutrófilos nas lesões cutâneas, 3 dias pós-operatório.



Imagens representativas de cortes histológicos submetidos a análise imunohistoquímica para MPO (marrom) e coloração com Hematoxilina/Eosina (HE). (A-C) Grupo controle (SD) e (D-F) Grupo tratado com dCTMs + SD. Em A, B, D e E, imunohistoquímica para MPO, e em C e F, coloração com HE. As setas pretas indicam os neutrófilos. Aumentos: (A e D) 200X; (B e E) 400X; (C e F): 1000X. Abreviações: (SD) substituto dérmico; (TG) tecido de granulação.

Figura 21. Infiltração de macrófagos nas lesões cutâneas, 7 dias pós-operatório.



Imagens representativas de cortes histológicos submetidos à análise imunohistoquímica para marcador específico de macrófagos (marrom) e coloração com Hematoxilina/Eosina (HE). (A-C) Grupo controle (SD) e (D-F) Grupo tratado com dCTMs + SD. Em A, B, D e E, coloração com HE e em C e F, imunohistoquímica para macrófago. As setas pretas indicam os macrófagos e as verdes os neutrófilos. Aumentos: (A e D) 200X; (B e E) 1000X; (C e F): 200X. Abreviações: (SD) substituto dérmico; (TG) tecido de granulação; (m) músculo; (ts) tela subcutânea.

Tabela 8. Análise qualitativa da infiltração de neutrófilos e macrófagos nas lesões cutâneas, após 3 e 7 dias do procedimento cirúrgico.

<i>Tempo</i>	<i>Controle (SD)</i>		<i>dCTMs + SD</i>	
	Neutrófilo	Macrófago	Neutrófilo	Macrófago
Dia 3	+	+	++++	+
Dia 7	+	++	++	+++

Quantidade de células: (+) baixa; (++) moderada; (+++) alta; (++++) muito alta.

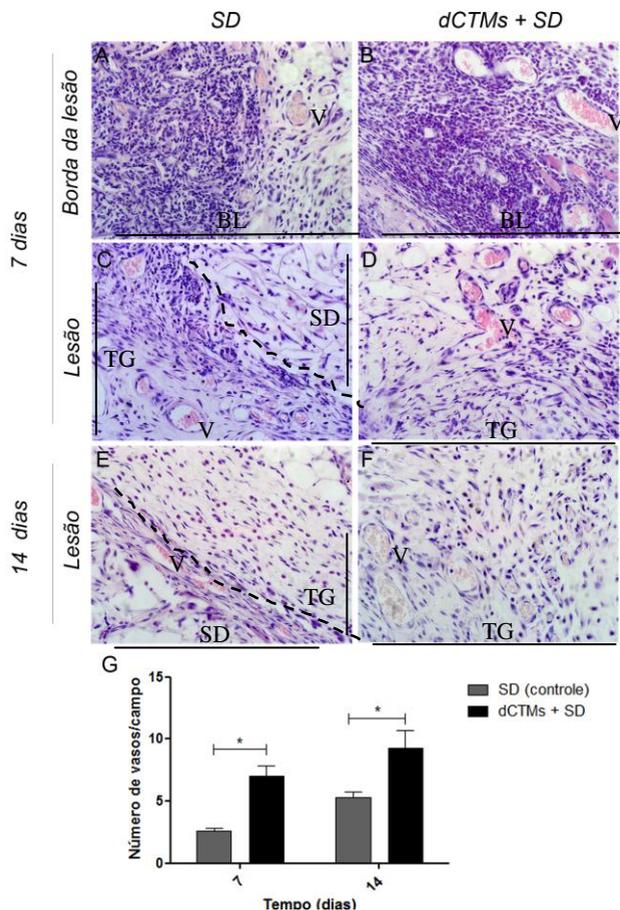
4.6.5. Neovascularização

O recrutamento de macrófagos, dentre outras células, que ocorre no local da lesão são eventos essenciais para que ocorra a angiogênese e a fibroplasia durante o processo de reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Desta forma, a influência da associação das dCTMs com o substituto dérmico na formação de neovasos, foi analisada histologicamente com Hematoxilina/Eosina, nos dias 7 e 14 pós-operatório (Figura 22).

Foi observado no grupo controle uma média de 2,6 e 5,3 vasos/campo nos dias 7 e 14 de pós-operatório, respectivamente (Figura 22G). No grupo tratado com dCTMs + SD a média de vasos/campo foi de 7 e 9,3 nos 7 e 14 dias pós-operatório, respectivamente. Estes resultados mostram um aumento significativo na vascularização no grupo tratado em relação ao controle, de aproximadamente 2,7 vezes e 1,7 vezes no dia 7 e 14, respectivamente (Figura 22G). No dia 7 pós-operatório, os neovasos estavam presentes em maior quantidade nas bordas da lesão (Figura 22A e B), e no dia 14 estavam presentes também no tecido de granulação e dentro do substituto dérmico (Figura 22C-F).

Esses dados sugerem um possível efeito das dCTMs no recrutamento de células endoteliais, estimulando assim a neovascularização do tecido lesionado.

Figura 22. Vascularização nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 4 pós-operatório.



Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina. (A-C) Grupo controle (SD) no dia 7 pós-operatório. (B-D) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 7 pós-operatório. (E) Grupo controle (SD), no dia 14 pós-operatório. (F) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 14 pós-operatório. As setas pretas indicam os vasos. (G) Representação gráfica do número de vasos no grupo tratado com dCTMs + SD e no grupo controle (SD), após 7 e 14 dias da realização do procedimento cirúrgico. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de 3 animais por grupo (10 campos/animal). Campo: aumento de 400X. * $p < 0,05$ por ANOVA duas vias seguido de teste de Bonferroni. Aumento de todas as imagens: 400X. Abreviações: (SD) substituto dérmico; (TG) tecido de granulação; (V) Vasos; (ts) tela subcutânea. (*) Substituto dérmico totalmente integrado ao tecido.

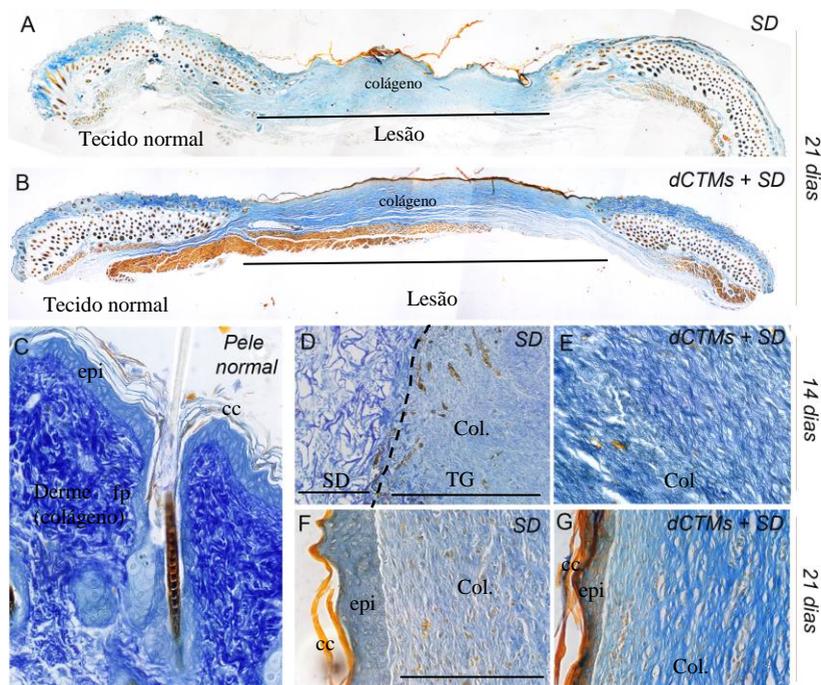
4.6.6. Depósito de matriz extracelular e remodelamento

Durante o processo de reparo tecidual os fibroblastos migram para o local da lesão e constituem o tecido de granulação, juntamente com outras células, além de depositar matriz extracelular. A matriz do tecido normal é caracterizada por uma grande quantidade de colágeno com fibras orientadas paralelamente, o que ocasiona maior resistência ao tecido (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; REINKE; SORG, 2012). Tendo em vista esses aspectos, foi analisado histologicamente o depósito de colágeno e a organização das fibras colágenas através da coloração com Mallory, nos dias 14 e 21 pós-operatório (Figura 23). A intensidade da cor azul, obtida através da coloração com Mallory indica a quantidade de depósito de colágeno na região analisada.

Os resultados mostram que a coloração azul do Mallory foi mais intensa no grupo tratado com dCTMs + SD quando comparado ao controle, indicando um depósito maior de colágeno, nos dias 14 e 21 pós-operatório. A Figura 23C mostra a coloração na pele normal, na qual é evidenciada a intensidade do azul no tecido conjuntivo (derme). Em relação à organização das fibras colágenas, no grupo controle o colágeno depositado após 14 dias não apresentava-se organizado em fibras (Figura 23D), ao contrário do grupo tratado com dCTMs + SD que apresentava esta organização (Figura 23E). No dia 21, o grupo tratado possuía fibras colágenas organizadas paralelamente (Figura 23G), enquanto no grupo controle esta organização não foi observada (Figura 23 F).

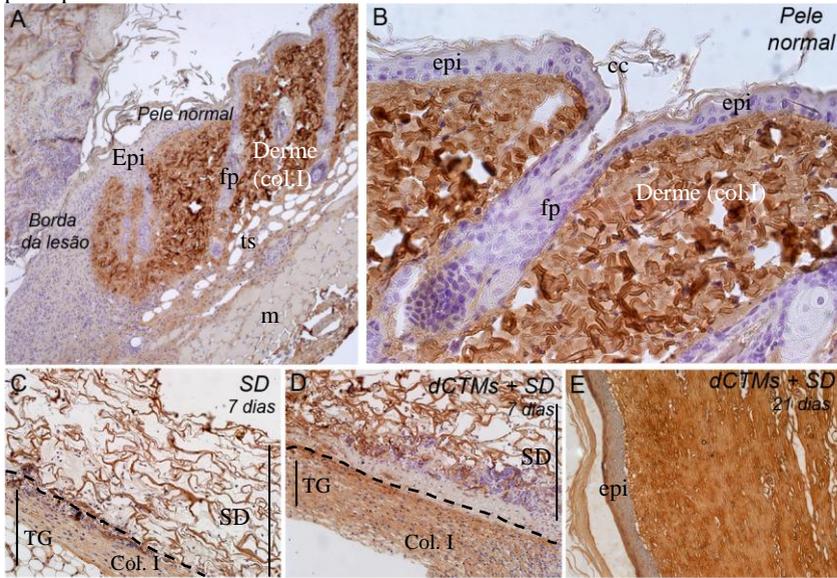
A fim de verificar se o depósito de colágeno observado pela coloração de Mallory corresponde ao colágeno do tipo I, foi realizada análise imunohistoquímica para esta proteína. A Figura 24A e B mostra a expressão de colágeno I na pele normal (derme). Os resultados mostram que no dia 7 pós-operatório os animais de ambos os grupos apresentam discreto depósito de colágeno do tipo I, situado abaixo do substituto dérmico (Figura 24C e D). Este depósito é intensificado no grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 14 pós-operatório (dados não demonstrados). No dia 21, a matriz formada no local da lesão possui uma grande quantidade de colágeno I, em ambos os grupos (dados demonstrados apenas no grupo tratado) (figura 24E).

Figura 23. Depósito de matriz extracelular (colágeno) nas lesões cutâneas, nos dias 14 e 21 pós-operatório.



Imagens representativas do depósito de colágeno na região da lesão, obtidas através da coloração com Mallory. (A) Grupo controle (SD), no dia 21 pós-operatório. (B) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 21 pós-operatório. (C) Pele normal. (D e F) Grupo controle, após 14 e 21 dias, respectivamente. (E e G) Grupo tratado, após 14 e 21 dias, respectivamente. Aumento : (A-B) 40X; (C-G) 400X. Abreviações: (SD) substituto dérmico; (TG) tecido de granulação; (epi) epiderme; (cc) camada córnea; (col.) colágeno; (fp) folículo piloso.

Figura 24. Expressão de colágeno do tipo I nas lesões cutâneas, nos dias 7 e 21 pós-operatório.



Imagens representativas do depósito de colágeno tipo I (marrom) na região da lesão, obtidas através de imunohistoquímica. (A) Borda da lesão, evidenciando a expressão de colágeno I na pele normal adjacente. (B) Pele normal. (C) Grupo cc controle (SD), no dia 7 pós-operatório. (D) Grupo tratado com dCTMs + SD, no dia 7 e (E) no dia 21 dia pós-operatório. Aumento: (A e C-E) 200X; (B) 400X. Abreviações: (SD) substituto dérmico; (TG) tecido de granulação; (epi) epiderme; (cc) camada córnea; (col.I) colágeno I; (fp) folículo piloso.

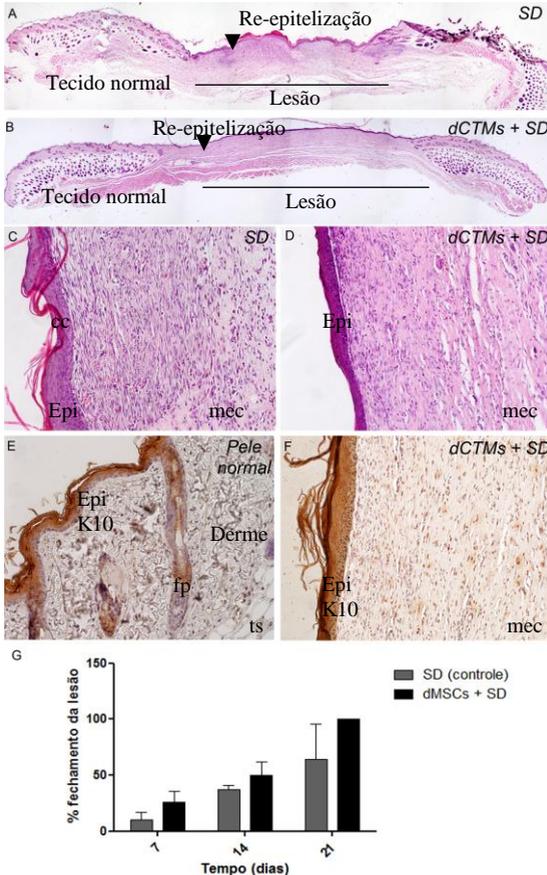
4.6.7. Re-epitelização e fechamento da lesão

O processo de re-epitelização e fechamento da lesão foram analisados a seguir através da coloração com Hematoxilina/Eosina, nos dias 7, 14 e 21 após o procedimento cirúrgico (Figura 25). Foi observado no grupo controle uma média de 10%, 37% e 64% de fechamento da lesão através da re-epitelização no dia 7, 14 e 21, respectivamente (Figura 25G). No grupo tratado com dCTMs + SD esta proporção aumentou em relação ao controle em todos os dias analisados (26%, 50% e 100%, no dia 7, 14 e 21, respectivamente). Estes resultados mostram um aumento no fechamento da lesão no grupo tratado em relação ao controle, de aproximadamente 2,5 vezes, 1,4 vezes, 1,5 nos dias 7, 14 e 21 pós-operatório, respectivamente (Figura 25G). Os resultados mostraram ainda que no grupo controle, apenas 1 animal teve a epiderme totalmente reconstituída após 21 dias (Figura 25B), ao contrário do grupo tratado com dCTMs + SD no qual todos animais apresentaram a epiderme re-epitelizada nesse período (Figura 25A-D).

A maturação do epitélio formado foi avaliada pela expressão de citoqueratina 10, marcador de queratinócitos diferenciados, nos dias 7, 14 e 21 pós-operatório (Figura 25E e F). Além disso, a estratificação do epitélio foi avaliada por coloração com Hematoxilina/Eosina, no dia 21 (Figura 25C e D). Foi observado que os queratinócitos que migram da borda da lesão nos períodos iniciais do processo de reparo expressam citoqueratina 10, em ambos os grupos animais (dados não demonstrados). Na epiderme totalmente reconstituída, visualizada no dia 21 após a lesão, de modo geral todos os queratinócitos expressam citoqueratina 10 em ambos grupos experimentais (Figura 25F). Em relação à estratificação deste epitélio, foi constatado que no grupo tratado com dCTMs + SD o epitélio apresenta-se menos estratificado, semelhante à pele normal, quando comparado ao grupo controle (Figura 25C vs D).

Em conjunto, os resultados sugerem que as dCTMs associadas ao substituto dérmico diminuem o tempo de re-epitelização, promovendo assim o fechamento mais rápido da lesão.

Figura 25. Re-epitelização e fechamento das lesões cutâneas, no dia 21 pós-operatório.



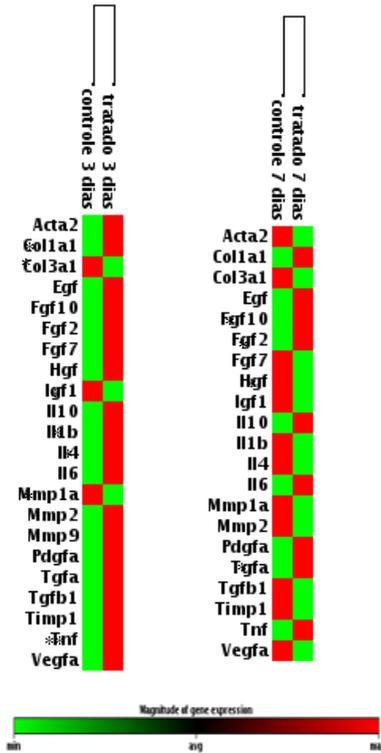
Imagens representativas da re-epitelização na região da lesão, obtidas através da coloração com Hematoxilina/Eosina (HE) e imunohistoquímica para citoqueratina 10 (marrom), marcador de queratinócito. (A e C) Grupo controle (SD) corado com HE, no dia 21 pós-operatório. (B e D) Grupo tratado com dCTMs + SD corado com HE, no dia 21 pós-operatório. (E) Expressão de citoqueratina 10 na pele normal e (F) no grupo tratado, no dia 21 pós-operatório. (G) Representação gráfica da re-epitelização/fechamento da lesão no grupo tratado com dCTMs + SD e no grupo controle (SD) no dia 7, 14 e 21 pós-operatório. Os valores representam as médias \pm desvio padrão de 3 animais por grupo. Aumento: (A-B) 40X; (C-G) 400X. Abreviações: (Epi) epiderme; (Epi-K10) expressão de citoqueratina 10 na epiderme (cc) camada córnea; (mec) depósito de matriz extracelular; (fp) folículo piloso; (ts) tela subcutânea.

4.6.8. Perfil da expressão gênica nas lesões cutâneas

Os resultados das análises histológicas e imunohistoquímicas indicaram que o tratamento com as dCTMs + SD estimula a formação do tecido de granulação, o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização. Desta forma, para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação desses diferentes eventos, foi realizado o ensaio de qPCR array. Nesse ensaio foi avaliada a expressão de genes (dos camundongos) importantes para o reparo tecidual, como os de citocinas inflamatórias (IL-interleucina-1, IL-4, IL-6 e IL-10), fatores de crescimento (EGF, FGF-2, FGF-7, FGF-10, IGF – Fator de crescimento semelhante a insulina, HGF- Fator de crescimento do hepatócito, PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas, TGF- α , TGF- β , TNF- Fator de necrose tumoral, VEGF), componentes do citoesqueleto (α -SMA) e da matriz extracelular (colágeno IaI e III), além de enzimas de remodelamento (MMP-1, 2 e 9, e TIMP-1-inibidor tecidual de metaloproteinases). Os dados obtidos foram analisados pela comparação da expressão desses genes entre o grupo tratado com dCTMs + SD e o controle (SD) nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório.

A Figura 26 demonstra a regulação desses genes no grupo tratado com dCTMs + SD, onde a cor vermelha representa o aumento da expressão (*upregulation*) e a verde a diminuição da expressão (*downregulation*) dos genes analisados, em relação ao controle. Os resultados mostram que no dia 3 pós-operatório a maioria dos genes do grupo tratado sofreu *upregulation*. Dentre os 22 genes analisados, 15 tiveram um aumento na expressão, 6 foram considerados iguais e 1 não foi expresso. Já no dia 7 pós-operatório, apenas 5 genes apresentaram aumento de expressão, 4 foram iguais e 13 diminuíram a expressão. A expressão da maioria dos genes (13) no dia 14 não foi observada, sendo que apenas 1 apresentou *upregulation*, enquanto 4 mantiveram-se iguais e 5 diminuíram a expressão. A variação na expressão desses genes no grupo tratado quando comparada ao controle é demonstrada na Figura 28 e na Tabela 7, sendo que os valores são expressos em “vezes”.

Figura 26. Regulação da expressão gênica nas lesões cutâneas do grupo tratado com dCTMs + SD em relação ao grupo controle (SD), nos dias 7 e 14 pós-operatório.



(A) Dados do qPCR array representados com *heatmap* do grupo tratado e do grupo controle. Os dados representam a expressão gênica diferencial entre o grupo tratado em relação ao controle. * Genes com expressão considerada similar, apesar do aumento ou da diminuição. ** Genes que não foram expressos. Vermelho representa *upregulation* e verde *downregulation* em relação ao controle. Acta: actina de músculo liso; Col: colágeno; Egf: Fator de crescimento epidermal; Fgf: fator de crescimento de fibroblastos; Hgf: fator de crescimento de hepatócito; Igf: fator de crescimento semelhante a insulina; Il: interleucina; Mmp: metaloprotease; Pdgf: fator de crescimento derivado de plaquetas; Tgf: fator de crescimento transformante; Timp: inibidor tecidual de metaloproteínas; Tnf: fator de necrose tumoral; Vegf: fator de crescimento endotelial vascular.

Em relação à expressão de citocinas inflamatórias foram avaliadas as interleucinas pró-inflamatórias, IL-1 e IL-6, e as anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10 (Figura 27A e Tabela 9). No dia 3 pós-operatório, foi observado um aumento de aproximadamente 30 vezes no RNAm de IL-6 no grupo tratado. Esse aumento, embora menor (4,5 vezes), foi mantido no dia 7. A expressão de IL-1 foi similar entre os grupos no dia 3, enquanto no dia 7 diminuiu em torno de 11 vezes. A análise da IL-10, citocina anti-inflamatória, mostrou que há um aumento na expressão, tanto do dia 3 como no dia 7 (em torno de 2,5 vezes). Já a IL-4 não foi alterada no dia 3 e diminuiu no dia 7 (3,8 vezes). No dia 14 apenas a IL-4 foi expressa, mas não houve variação entre os grupos.

Os fatores de crescimento analisados estão relacionados com o recrutamento de diferentes tipos celulares envolvidos nas fases do reparo tecidual, como na resposta inflamatória, na vascularização, depósito de MEC e re-epitelização. Os dados obtidos mostraram que no dia 3 após a lesão houve um aumento na expressão de todos os genes dos fatores de crescimento avaliados, com exceção do IGF (que permaneceu inalterado) e do TNF (que não foi expresso) (Figura 27B e Tabela 9). Nesse período, a expressão gênica do FGF-2, FGF-10, FGF-7 e EGF foi muito maior no grupo tratado com dCTMs + SD, sendo este aumento 10 vezes maior em relação ao controle. No dia 7, foi observado aumento na expressão apenas de EGF e TNF (4,4 e 6,2 vezes, respectivamente). Já a expressão de FGF-7, IGF, PDGF, TGF- β e VEGF diminuiu. Dentre estes, destaca-se a diminuição de 19 vezes na expressão de TGF- β . No dia 14, a maioria dos genes não foi expressa, sendo que houve variação apenas no FGF-7, que diminuiu sua expressão (3,7 vezes).

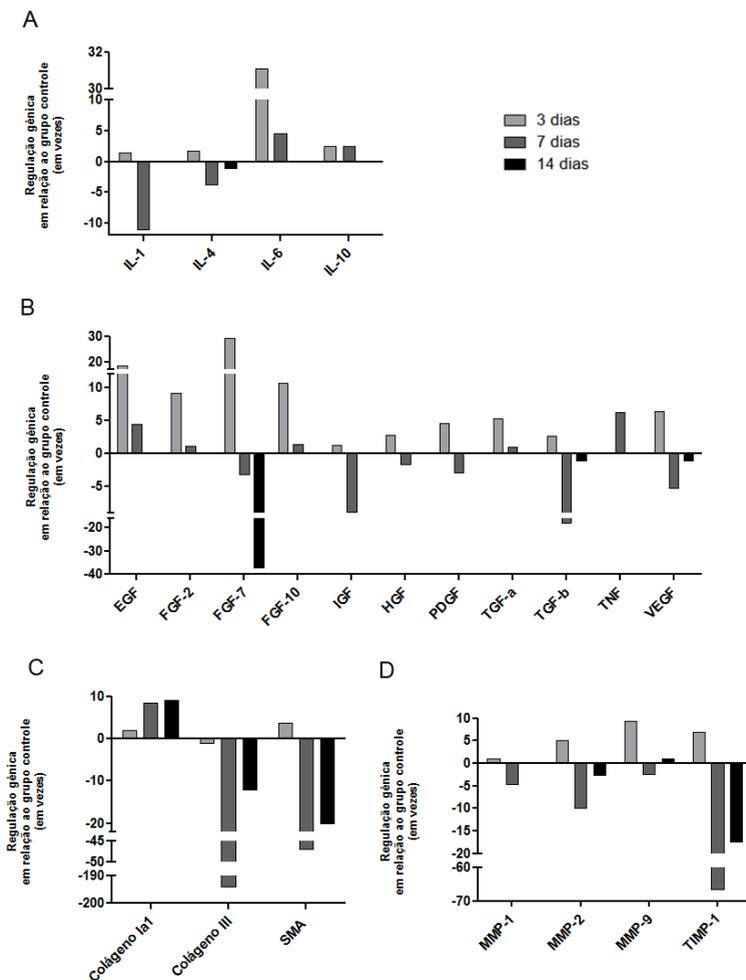
A expressão de act-a (α -SMA), marcador de miofibroblastos, aumentou no dia 3, entretanto mostrou uma grande redução nos dias 7 e 14 pós-operatório (47 e 20 vezes, respectivamente) (Figura 27C e Tabela 9). Essas células estão localizadas principalmente nas bordas da lesão e são responsáveis, juntamente com outros tipos celulares, pelo depósito de matriz extracelular, que também foi avaliada através da expressão de colágeno do tipo IaI e III. Os resultados mostraram que a expressão de colágeno tipo IaI aumentou nos dias 3, 7 e 14 (valores na Tabela 9), e que a expressão de colágeno do tipo III foi reduzida, principalmente no dia 7 (menos 194 vezes).

Em relação ao remodelamento da matriz extracelular sintetizada, foi avaliada a expressão de diferentes metaloproteases e do seu inibidor, TIMP-1 (Figura 28D e Tabela 9). Os dados obtidos mostram que no dia

3 houve um aumento na expressão de MMP-1, 2 e 9 (valores na Tabela 9), além de um aumento de 6,9 vezes no inibidor TIMP-1. Contrariamente, nos dias 7 e 14, a expressão desses genes diminuíram (valores na Tabela 9) com exceção da MMP-7 e MMP-9 que mantiveram-se iguais.

Em conjunto, estes resultados sugerem que as dCTMs modulam a expressão de diferentes genes relacionados com o reparo tecidual e isto pode elucidar como estas células alteram as repostas celulares, e consequentemente, os diferentes eventos que ocorrem durante este processo.

Figura 27. Regulação da expressão gênica nas lesões cutâneas tratadas com dCTMs + SD.



(A-D) Representação gráfica dos valores (em vezes) da regulação gênica no grupo tratado em relação ao controle, obtidos através do ensaio de qPCR, nos dias 3, 7 e 14. (A) Genes de citocinas inflamatórias. (B) Genes de fatores de crescimento. (C) Genes de moléculas e MEC e citoesqueleto. (D) Genes envolvidos com o remodelamento da MEC (metaloproteases e seu inibidor).

Tabela 9. Regulação da expressão gênica (em vezes) nas lesões cutâneas tratadas com dCTMs +SD (comparada ao controle).

<i>Genes</i>	<i>Genes</i>	<i>Dia 3</i>	<i>Dia 7</i>	<i>Dia 14</i>
<i>Citocinas inflamatórias</i>	IL-1	↑ 1,5	↓ 11,1	NE
	IL-4	↑ 1,7	↓ 3,8	↓ 1,1
	IL-6	↑ 31,1	↑ 4,5	NE
	IL-10	↑ 2,5	↑ 2,4	NE
<i>Fatores de crescimento</i>	EGF	↑ 18,6	↑ 4,4	NE
	FGF-2	↑ 9,1	↑ 1,1	NE
	FGF-7	↑ 29,4	↓ 3,2	↓ 37,0
	FGF-10	↑ 10,7	↑ 1,4	NE
	IGF	↑ 1,2	↓ 8,9	NE
	HGF	↑ 2,8	↓ 1,7	NE
	PDGF	↑ 4,6	↓ 2,9	NE
	TGF- α	↑ 5,3	↑ 1,0	NE
	TGF- β	↑ 2,6	↓ 18,0	↓ 1,1
	TNF	NE	↑ 6,2	NE
	VEGF	↑ 6,4	↓ 5,3	↓ 1,1
<i>Componentes da MEC</i>	Colágeno Ia1	↑ 1,9	↑ 8,4	↑ 9,0

<i>e citoesqueleto</i>	Colágeno III	↓ 1,1	↓ 194,0	↓ 12,0
	SMA (Acta2)	↑ 3,7	↓ 47,0	↓ 20,0
<i>Enzimas de remodelamento</i>	MMP-1	↑ 1,0	↓ 4,6	NE
	MMP-2	↑ 5,0	↓ 10,0	↓ 2,6
	MMP-9	↑ 9,3	↓ 2,5	↑ 1,0
	TIMP-1	↑ 6,9	↓ 66,7	↓ 17,4

Em vermelho: *upregulation*; em verde: *downregulation*; em preto: expressão considerada similar. NE: não foi observada expressão.

5. DISCUSSÃO

5.1. AS CÉLULAS ISOLADAS DA DERME POSSUEM CARACTERÍSTICAS DE CTMS

A pele possui nichos de diferentes tipos de células tronco, incluindo as SKPs (do inglês, *skin derived progenitors*) e as CTs da camada basal, glândulas sebáceas e do folículo piloso, que são responsáveis pela manutenção da homeostase do tecido e possuem habilidade em reparar lesões (ADOLPHE; WAINWRIGHT, 2005). Recentemente, populações com características de CTMs têm sido isoladas da pele, mais precisamente do tecido dérmico (VACULIK et al., 2012). No presente estudo, células isoladas da derme humana foram caracterizadas de acordo com os critérios estabelecidos pela *International Society of Cellular Therapy* (DOMINICI et al., 2006). Estas células isoladas demonstraram aderência ao plástico, morfologia semelhante a fibroblastos, alta capacidade de proliferação *in vitro*, diferenciação para fenótipos mesenquimais (adipócitos e osteócitos), expressão de marcadores de superfície típicos de CTMs (CD105, CD90 e CD73) e ausência de marcadores de células hematopoiéticas (CD45 e CD34), sendo similar à populações de CTMs descritas na medula óssea. Em conjunto, estes resultados demonstram que as células isoladas da pele possuem características de CTMs, confirmando assim a presença destas células no tecido dérmico. Estas células foram então designadas, neste trabalho, como CTMs derivadas da derme (dCTMs).

Além da potencialidade demonstrada pela diferenciação em adipócitos e osteócitos, estudos recentes reportam que as CTMs tem a capacidade de expressar *in vitro* marcadores de células indiferenciadas e diferenciadas, sem qualquer indução específica (GOODWIN et al., 2001). Resultados similares também foram encontrados no presente estudo, reforçando a plasticidade das CTMs. Foi demonstrado que as dCTMs expressam Oct-4, Nanog e Sox-2, proteínas transcricionais responsáveis pela auto-renovação e regulação da pluripotencialidade de CTs embrionárias (GUILLOT et al., 2007; OKUMURA-NAKANISHI et al., 2005). Embora a expressão destes marcadores estar relacionada com às CTs embrionárias, tem sido demonstrado que as CTs adultas de vários tecidos expressam estes marcadores e que estes podem ter um papel na regulação da multipotencialidade destas células (LERMEN et al., 2010; TAI et al., 2005; ILANCHERAN et al., 2007; JIANG et al., 2002; GUILLOT et al.,

2007). Além disso, estudos têm relatado a localização destes marcadores no citoplasma, e não no núcleo, onde exercem função como fator transcripcional (IZADPANAHA et al., 2006; RIEKSTINA et al., 2009; ZUK et al., 2001). Neste trabalho, o ensaio de imunohistoquímica revelou que as proteínas Oct-4 e Sox-2 estão localizadas no citoplasma das dCTMs. A existência de várias isoformas destes genes pode ser a explicação para as diferentes localizações destes fatores (ATLASI et al., 2008).

O estado multidiferenciado das dCTMs foi observado, neste estudo, pela co-expressão de Nestina, β -tubulina III e α SMA. Em mamíferos adultos, Nestina é comumente expressa em progenitores neurais, mas pode indicar também um fenótipo de células tronco, um aumento no potencial proliferativo ou uma condição patológica (KRUPKOVA et al., 2011; WIESE et al., 2004; TIEDE et al., 2009). Estudos recentes, revelaram a presença de Nestina em CTMs obtidas de diversos tecidos (FOUDAHA et al., 2012). Neste trabalho, foi observado que a maioria das dCTMs expressam Nestina, sem apresentar uma morfologia semelhante à neurônios, estando de acordo com estudos anteriores que sugerem que sua expressão é uma propriedade de progenitores multipotentes (BOSSOLASCO et al., 2006). Surpreendentemente, foi observada a expressão nuclear de Nestina em uma subpopulação de dCTMs. De fato, Nestina tem sido recentemente encontrada no núcleo de células de linhagens tumorais (glioblastomas, neuroblastomas e angiosarcomas), sugerindo um envolvimento na regulação da expressão gênica (KRUPKOVA et al., 2011).

A expressão de β -tubulina III, outro marcador associado com a linhagem neuronal (KATSETOS et al., 2003), foi observada também na maioria das dCTMs, sem estar associada a uma morfologia neuronal. Tem sido relatado que as CTMs possuem a capacidade de expressar marcadores neurais, sendo que esta expressão pode estar associada ao potencial de diferenciação nesta linhagem (GOODWIN et al., 2001; BLONDHEIM et al., 2006; FOUUDAHA et al., 2012). No entanto, vários estudos argumentam que a expressão de proteínas neurais pelas CTMs pode ocorrer como resultado de estresse celular, em resposta à remoção destas células de seu nicho (CROFT; PRZYBORSKI, 2006; ROONEY et al., 2009). Sendo assim, a presença de β -tubulina III e Nestina nas CTMs ainda não é clara e requer estudos futuros para determinar o papel destas proteínas nestas células (BIRBRAIR et al., 2013).

Em relação a expressão de α SMA, foi observado que uma subpopulação de dCTMs são positivas para este marcador. α SMA é considerado o primeiro marcador conhecido de células de músculo liso, sendo expresso durante a vasculogênese (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004). Entretanto, atualmente sabe-se que α SMA não é um marcador

exclusivo das células de músculo liso, sendo expresso em CTMs com potencial multi-linhagem. Há também evidências que marcadores de células de músculo liso podem estar associados à um estado de diferenciação-maturação das CTMs (LIU et al., 2013).

O perfil fenotípico das dCTMs demonstrado neste estudo pode estar relacionado também ao seu nicho. Esforços para rastrear a identidade das CTMs residentes em diferentes tecidos têm consistentemente sugerido uma origem perivascular destas células (CRISAN et al., 2012; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Características similares a de pericitos, como a capacidade de diferenciação em fenótipos mesenquimais, além de possuírem marcadores e morfologia semelhantes a estes, evidenciam essa hipótese (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011; DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). No momento, são descritos alguns marcadores de pericitos, embora nenhum seja exclusivo. α SMA, Nestina e, mais recentemente, β -tubulina III são alguns exemplos destes marcadores (CRISAN et al., 2008; 2012; ALLIOT et al., 1999). As dCTMs obtidas neste estudo possuem essas características fenotípicas, corroborando a hipótese de que as CTMs tenham um nicho perivascular.

5.2. AS dCTMS POSSUEM POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO EM QUERATINÓCITOS E ALTA CAPACIDADE MIGRATÓRIA *IN VITRO*

Tendo em vista que os processos de re-epitelização e migração celular são cruciais para o reparo de lesões cutâneas, foi avaliado neste estudo o potencial de diferenciação das dCTMs em queratinócitos e sua capacidade migratória *in vitro*. Estudos recentes vêm demonstrando que as CTMs possuem capacidade de diferenciação epidermal *in vitro* e *in vivo* (KIM et al., 2012; MAHDAVISHAHRI et al., 2012; FONG et al., 2013). No presente estudo, o potencial de diferenciação epidermal das dCTMs foi evidenciado pela aquisição de morfologia típica de queratinócitos e expressão de citoqueratina 14, corroborando assim com os dados da literatura. (MAHDAVISHAHRI et al., 2012).

Em relação a migração das CTMs, tem sido demonstrado que células da medula óssea administradas por via intravenosa ou próximas a lesão, migram para o local da inflamação e participam do reparo tecidual, diretamente pela sua diferenciação e/ou por seus efeitos parácrinos (HU et al., 2013). Uma das estratégias para avaliar a migração celular *in vitro*, é a realização do ensaio de *scratch wound healing*, que mimetiza o comportamento migratório das células após uma lesão (ZHANG et al.,

2013). Neste estudo, as dCTMs submetidas a este ensaio demonstraram uma elevada migração celular, permitindo o fechamento da área lesionada *in vitro*. Isto pode indicar sua capacidade de migração para uma área lesionada e sua subsequente participação no reparo tecidual, após eventual enxerto, *in vivo*.

Com base nestes resultados e nos discutidos anteriormente, o presente estudo demonstra a potencialidade das dCTMs e sua promissora utilização como uma fonte de células multipotentes regenerativas em terapia celular, como no reparo de lesões cutâneas.

5.3. OS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC® SUPORTAM A SOBREVIVÊNCIA, ADESÃO E INFILTRAÇÃO DAS dCTMS *IN VITRO*

O paradigma clássico da engenharia de tecidos envolve uma fonte apropriada de células associada à *scaffolds* que facilitem o crescimento, a organização e a diferenciação destas em tecidos funcionais. As CTMs correspondem a uma fonte de células particularmente atrativas para a engenharia tecidual em razão da sua capacidade de secreção de fatores bioativos e potencial de diferenciação (SCHNEIDER et al., 2010). No entanto, estudos recentes reforçam a necessidade de maiores investigações em relação à associação destas células em *scaffolds* apropriados, que além de servir como veículo, promovam o crescimento e manutenção das células, otimizando suas propriedades e validando seu potencial em terapias celulares (HONG et al., 2013).

Neste sentido, sabe-se que a composição e as propriedades mecânicas do ambiente extracelular regulam várias cascatas de sinais intracelulares que influenciam diferentes aspectos do comportamento celular, como a migração, sobrevivência e o destino fenotípico (BIRGERSDOTTER; SANDBERG; ERNBERG, 2005; GODIER et al., 2008). Logo, a efetiva aderência e manutenção das CTMs nos *scaffolds* são um passo crítico a ser considerado na engenharia tecidual (MASAELI et al., 2013). No presente estudo foi investigada a viabilidade e a eficácia da associação de dCTMs com os substitutos dérmicos Integra® e Pelnac® *in vitro*, visando o uso clínico no reparo de lesões cutâneas.

A biocompatibilidade das dCTMs com os substitutos dérmicos foi avaliada através da análise em microscopia confocal e pelo ensaio de MTS, que demonstraram a infiltração, distribuição e proliferação destas células em ambas as matrizes. A reconstrução 3D das imagens obtidas mostraram que as dCTMs estão mais concentradas na parte superior das matrizes, possivelmente como um resultado do processo de inoculação das células. O

aperfeiçoamento desta técnica de inoculação poderá permitir uma distribuição mais uniforme destas células nos substitutos dérmicos, já que a estrutura dos poros destas matrizes facilita esta infiltração celular. Resultados similares em relação à viabilidade/proliferação celular foram descritos com CTMs humanas da medula óssea e do tecido adiposo associadas ao Integra® (EGAÑA et al., 2009). Além disso, tem sido relatado que queratinócitos e fibroblastos podem sobreviver quando cultivados com substitutos dérmicos (OJEH; FRAME; NAVSARIA, 2001).

Os dados obtidos demonstraram ainda, que as dCTMs aderem em ambos os substitutos dérmicos e após 48 horas apresentam extensões citoplasmáticas e fortes conexões com as matrizes, além da morfologia fusiforme similar àquela comumente observada em um cultivo bidimensional em monocamadas (plástico). Isto mostra que as dCTMs mantêm sua típica morfologia semelhante a fibroblastos, nas culturas tridimensionais com ambos os substitutos dérmicos. Embora o Pelnac® seja amplamente utilizado, principalmente no Japão, sua combinação com CTMs foi demonstrada pela primeira vez no presente estudo.

É importante ressaltar que a diferença na composição e estrutura da camada interna destas matrizes, não modificou significativamente o comportamento das dCTMs, que mostraram proliferação, adesão e morfologia similares. Parenteau-Bareil e colaboradores, compararam a proliferação e infiltração de fibroblastos em matrizes obtidas de diferentes fontes de colágenos (ave, bovino e porcino) e não observaram diferenças entre estas (PARENTEAU-BAREIL et al., 2011). A pequena diferença observada no presente estudo foi em relação ao tempo de adesão das dCTMs no Pelnac®. As dCTMs mostraram pouca aderência ao substrato nas primeiras 24 horas em comparação ao Integra®. A presença de sulfato de condroitina-6 no Integra® pode explicar esta diferença, já que está relacionado com a adesão celular (ZOU, 2012).

De maneira geral, estes resultados confirmam a sobrevivência e proliferação das dCTMs em ambos os substitutos dérmicos, assegurando sua biocompatibilidade e adequada colonização no Integra® e Pelnac®.

5.4. AS dCTMS ASSOCIADAS AOS SUBSTITUTOS DÉRMICOS INTEGRA® E PELNAC® MANTÉM SUAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Embora os substitutos dérmicos forneçam um microambiente para o crescimento e adesão das CTMs, o efeito deste cultivo tridimensional no perfil fenotípico destas células tem sido pouco estudado. Para validar a eficiência do Integra® e Pelnac® em suportar a manutenção das dCTMs, o perfil fenotípico destas células associadas com os substitutos dérmicos foi avaliada. Os dados obtidos mostram que as dCTMs são positivas para os marcadores típicos de CTMs, CD105, CD90 e CD73, e negativas para os marcadores hematopoiéticos, CD34 e CD45. Além disso, as dCTMs expressam marcadores de pluripotencialidade (Oct-4 e Nanog), neurais (Nestina e β -tubulina III) e mesenquimais (α -SMA), e são negativas para o marcador endotelial CD31. Estes resultados mostram que o perfil fenotípico das dCTMs observado na cultura bidimensional em monocamadas é mantido no sistema de cultura 3D com os substitutos dérmicos. Resultados diferentes foram obtidos por Formigli e colaboradores (2012), que reportaram que as CTMs da medula óssea perdem a expressão de Oct-4 após 48 horas de cultivo no Integra® (FORMIGLI et al., 2012). Diferenças na origem destas populações de CTMs podem explicar estes resultados distintos.

Estes achados representam uma importante consideração no que diz respeito ao potencial de aplicação destas células associadas aos substitutos dérmicos *in vivo*, pois demonstram que as dCTMs mantêm suas características fenotípicas nestas condições. Dessa forma, o presente estudo fornece resultados importantes para uma nova estratégia terapêutica no reparo de lesões cutâneas, consistindo na combinação de dCTMs com biomateriais, representando assim uma potencial ferramenta para a engenharia tecidual.

5.5. O TRATAMENTO COM dCTMS ASSOCIADA AO SUBSTITUTO DÉRMICO (dCTMS + SD) ACELERA O REPARO DE LESÕES CUTÂNEAS, EM CAMUNDONGOS

O processo de reparo de lesões cutâneas é caracterizado por constantes mudanças no ambiente, no qual as células são expostas a um complexo padrão de sinalização que confere informações necessárias para o correto desenvolvimento do novo tecido. Estes sinais desencadeiam uma série de eventos que, em combinação, controlam o recrutamento, proliferação, diferenciação e morte celular (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007). Atualmente, as CTMs têm sido utilizadas no reparo tecidual com o propósito de modular estes eventos (SCHNEIDER et al.,

2010). No entanto, métodos que utilizam a injeção destas células na lesão (intravenosa ou no local da lesão), resultam em grande perda de células e em uma menor eficiência terapêutica (YEUM et al., 2013).

Tendo em vista este problema, o tratamento de lesões cutâneas com CTs requer uma matriz extracelular na qual as células possam interagir e ser inoculadas em conjunto (VATS et al., 2003). Estudos recentes reforçam que a combinação destes elementos pode fornecer um ambiente ainda mais receptivo para promover a regeneração/reparo tecidual (YEUM et al., 2013). No presente estudo, foi estabelecida com sucesso a associação de dCTMs com substitutos dérmicos, e este complexo (dCTMs + SD) foi implantado em lesões cutâneas de camundongos a fim de avaliar o potencial terapêutico desta associação no reparo tecidual. Os resultados obtidos através das análises histológicas (coloração com hematoxilina/eosina e Mallory) e imunohistoquímicas para marcadores específicos indicam que o tratamento com dCTMs + SD aumenta o tecido de granulação, o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização, acelerando assim o reparo tecidual.

5.5.1. O tratamento com dCTMs + SD aumenta a formação do tecido de granulação e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos

Em resposta ao tratamento com dCTMs + SD, foi observado nas lesões cutâneas um maior recrutamento de diferentes tipos celulares que, conseqüentemente, resultou em um aumento do tecido de granulação e da colonização do substituto dérmico. Sabe-se que o tecido de granulação formado nem sempre é benéfico, pois pode estar relacionado a cicatrizações hipertróficas (DIEGELMANN; EVANS, 2004; GURTNER et al., 2008; HONG et al., 2013). No entanto, não é fácil estabelecer se o tecido de granulação formado na fase inicial do reparo é benéfico ou não, devido a sua formação ser essencial durante o processo de cicatrização da lesão (HONG et al., 2013).

Do mesmo modo, o aumento de neutrófilos nas lesões também não é considerada benéfica e está associada com a não resolução do reparo tecidual, cicatrização hipertrófica e feridas crônicas (JANIS; KWON; LALONDE, 2010). De maneira geral, os neutrófilos são responsáveis em exercer uma resposta pró-inflamatória inicial no local da lesão. Neste sentido, o aumento de neutrófilos observados no grupo tratado com dCTMs

+ SD é contraditório às características anti-inflamatórias e imunomodulatórias descritas para as CTMs (MAXSON et al., 2012).

Entretanto, há evidências crescentes de que alguns tipos de neutrófilos podem apresentar características anti-inflamatórias e de reparo tecidual (ARNARDOTTIR; FREYSDOTTIR; HARDARDOTTIR, 2012). A remoção de bactérias e de células mortas por atividade fagocitária de neutrófilos limpa a área lesionada, executando importante papel no desbridamento da ferida. Além disso, o atraso na infiltração de neutrófilos pode resultar em feridas crônicas (WU; ZHAO; TREDGET, 2010). Os neutrófilos também podem exercer uma resposta pró-angiogênica, promovendo a revascularização do local lesionado e expressam várias proteases que degradam componentes da matriz extracelular. Segundo Mahdavian e colaboradores (2011), a ação dos neutrófilos em tecidos lesionados é inconclusiva, pois vários estudos sugerem um efeito positivo, enquanto outros um efeito negativo (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011).

A presença de neutrófilos na lesão facilita o recrutamento de monócitos que são convertidos em macrófagos em resposta a diferentes sinalizações (LO et al., 2012). A redução na infiltração de macrófagos está associada a um atraso no reparo tecidual, enquanto a sua ativação acelera este reparo (CHEN et al., 2008). No presente estudo, foi observado um aumento no número de macrófagos no grupo tratado com dCTMs + SD em relação ao controle. Estes resultados corroboram estudos recentes que mostram que CTMs inoculadas em tecidos lesionados aumenta a infiltração de macrófagos e sugerem que isto promova um reparo mais rápido da lesão (CHEN et al., 2008; HONG et al., 2013).

As CTMs secretam várias moléculas relacionadas com diferentes linhagens de células inflamatórias (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012; WU; ZHAO; TREDGET, 2010). Por isso, é importante entender a influência das CTMs no processo de inflamação durante o reparo tecidual. Estudos mostram que lesões no miocárdio que receberam injeção local de CTMs tiveram redução da infiltração de células inflamatórias, porém não foi analisada quais populações dessas células foram afetadas (AMADO et al., 2005). Já em lesões cutâneas tratadas com meio condicionado de CTMs foi observado um aumento no número de macrófagos, mas não houve alterações nos granulócitos (WU et al., 2007). Em geral, poucos estudos mostram o efeito das CTMs na infiltração de neutrófilos, porém é amplamente estudada a sua ação sobre outras células inflamatórias, como os linfócitos e monócitos (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012).

Como as CTMs secretam moléculas como IL-6, IL-1, PDGF e TGF- β (CHEN et al., 2008), que atuam no recrutamento e migração dos

neutrófilos, o aumento destas células observado nos animais tratados com dCTMs + SD pode ter ocorrido em resposta a estas citocinas e fatores de crescimento. No entanto, as CTMs liberam também citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (CHEN et al., 2008), que é um potente inibidor da infiltração de neutrófilo.

Estudos tem relado que o tratamento com CTMs, ou com o meio condicionado destas células, são potentes quimioatrativos para macrófagos, *in vitro* e *in vivo*. IL-6, IL-1, TGF- β , entre outros, são importantes quimioatrativos para monócitos/macrófagos e possuem um papel essencial na infiltração destas células durante o reparo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Sabe-se que as CTMs secretam grande quantidades destas moléculas (CHEN et al., 2008; MAXSON et al., 2012; ZOU et al., 2012), o que sugere seu efeito no aumento do recrutamento de monócitos/macrófagos no grupo tratado com dCTMs + SD no presente estudo. Levando em consideração que a presença de macrófagos no tecido lesionado tem um papel essencial no reparo, pode-se sugerir que o aumento do número destas células no grupo dCTMs + SD pode ter influenciado os outros eventos do reparo tecidual e, conseqüentemente, acelerado o reparo tecidual.

5.5.2. O tratamento com dCTMs + SD aumenta a neovascularização, o depósito de matriz extracelular e a re-epitelização

Estudos recentes indicam que vários tipos celulares, incluindo células epiteliais, endoteliais, queratinócitos e fibroblastos são responsivos aos fatores parácrinos secretados pelas CTMs, que regulam a proliferação, migração e expressão gênica destas células (NAKAMURA et al., 2013; ZOU et al., 2012). Análises do meio condicionado das CTMs mostram que estas secretam vários mediadores, como VEGF, PDGF, FGF, EGF, KGF e TGF- β , que atuam sobre estes diferentes tipos celulares (MAXSON et al., 2012).

Neste estudo, foi observado um aumento da vascularização no grupo tratado com dCTMs + SD, sendo que esta propriedade pró-angiogênica das CTMs tem sido relatada como um dos fatores mais importantes da sua ação e melhora dos tecidos lesionados (ZOU et al., 2012). As CTMs secretam altos níveis de citocinas pró-angiogênicas, como VEGF, IGF, PDGF e angiopoietina, que promovem angiogênese tanto *in vitro*, como *in vivo* (WU; ZHAO; TREDGET, 2010). Estudos mostram ainda que lesões tratadas com o meio condicionado de CTMs aumenta o número de células

endoteliais, sugerindo o recrutamento destas células em resposta ao tratamento (WU; ZHAO; TREDGET, 2010).

Além do efeito na neovascularização, foi observado no presente trabalho um aumento do depósito de colágeno e uma melhor organização das fibras no grupo tratado com dCTMs + SD. Esta fase de depósito e remodelamento da MEC é crítica, pois um grande depósito de matriz e pouca clivagem dos seus componentes resultam em cicatrização hipertrófica (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). A análise no dia 14 pós-operatório mostrou que o grupo dCTMs + SD apresenta um maior tecido de granulação, com grande depósito de colágeno tipo I, caracterizando um tecido mais fibroso que o controle. Isto pode ter sido ocasionado pelo recrutamento de fibroblastos, já que as CTMs liberam vários fatores, incluindo TGF- β , PDGF, FGF-2 e IGF, que ativam a proliferação e migração destas células (HONG et al., 2013; ZOU et al., 2012). Dentre estes fatores, o TGF- β é um dos mais importantes, já que influencia a função, quimiotaxia e depósito de matriz extracelular dos fibroblastos (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011).

No entanto, com 21 dias pós-operatório a cicatriz formada nos animais tratados com dCTMs + SD apresentou-se mais organizada (mais delgada e com fibras orientadas), sugerindo que houve o remodelamento desta matriz extracelular, comparada ao dia 14. Tem sido descrito que as CTMs provocam respostas celulares no local da lesão relacionadas com a inibição da formação de tecido fibroso durante o reparo (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). Uma delas é a atenuação da resposta inflamatória, através do aumento de IL-10 (PERANTEAU et al., 2008). Porém, há uma variedade de outros mecanismos pelos quais as CTMs podem suprimir a formação de tecido fibroso, como a secreção de fatores anti-fibróticos, incluindo o HGF e enzimas proteolíticas (MARTIN, 1997).

Outro aspecto analisado neste estudo foi a re-epitelização, que mostrou-se mais rápida no grupo tratado com dCTMs + SD comparada ao controle. Trabalhos recentes mostram um aumento da re-epitelização em resposta ao tratamento com CTMs, através de uma maior migração e proliferação de queratinócitos para a região lesionada (KIM et al., 2012). Tem sido relatado que fatores de crescimento como KGF, TGF- β , EGF e HB-EGF (fator de crescimento semelhante à EGF ligado a heparina) regulam a proliferação dos queratinócitos durante a lesão (CHEN et al., 2008). Sabe-se que as CTMs secretam estes fatores, podendo assim afetar a proliferação dos queratinócitos e, conseqüentemente, a re-epitelização do tecido (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011; SHARMA; SNEDEKER, 2012).

Além dos efeitos parácrinos das CTMs, elucidados acima, estudos sugerem que estas células podem participar diretamente da regeneração estrutural do tecido dérmico e epidermal, por meio de sua diferenciação em tipos celulares desses tecidos (SASAKI et al., 2008; WU et al., 2007). Este seria um mecanismo adicional pelo qual as CTMs podem promover o reparo de lesões na pele. Trabalhos recentes mostraram que CTMs da medula-óssea inoculadas em lesões cutâneas se diferenciam em queratinócitos funcionais (WU; ZHAO; TREDGET, 2010) e células endoteliais (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012), promovendo assim uma melhora no reparo tecidual. No presente estudo, em razão de problemas metodológicos, a diferenciação das dCTMs *in vivo* não pôde ser avaliada.

O modo de ação das dCTMs nas lesões cutâneas hipotetizado neste estudo pode ocorrer pela diferenciação destas células ou pela secreção de mediadores que atuam sobre o recrutamento de diferentes tipos celulares. Desta forma, para compreender como o tratamento com dCTMs + SD influencia os mecanismos moleculares das células residentes, foi avaliada a modulação da expressão gênica na área lesionada.

5.5.3. O tratamento com as dCTMs + SD modula a expressão gênica na lesão cutânea.

A interação das CTMs com as células residentes no ambiente da lesão, e especificamente os seus efeitos no fenótipo e na ativação destas células, vem sendo estudada, mas ainda continua incerta. No entanto, sabe-se que esta interação pode modular a liberação de moléculas mediadoras pelas células residentes. Neste trabalho, foi analisada a expressão gênica de fatores relacionados com o reparo da pele, comparando a diferença na expressão entre o grupo tratado com dCTMs + SD e o controle (somente SD) após 3, 7 e 14 dias pós-operatório. No dia 14 muitos genes não foram expressos, incluindo o padrão interno, o que pode indicar algum problema metodológico. Em razão disso, os resultados obtidos nesse período não foram discutidos, fazendo-se necessária a repetição desse ponto experimental.

As análises da expressão gênica indicam que o tratamento com dCTMs + SD modula a expressão de diferentes genes relacionados com o reparo tecidual na área lesionada. Estudos tem demonstrado que o tratamento com CTMs suprime a rápida expressão do RNAm de citocinas e fatores pró-inflamatórios (como IL-6, IL-1 e TNF), e aumenta a expressão de interleucinas anti-inflamatórias (como IL-10 e 4) no estágio inicial da

inflamação (YEUM et al., 2013). Contrariamente, neste estudo foi observado um aumento na expressão de IL-6 e TNF no grupo tratado com dCTMs + SD. Este aumento nas citocinas e fatores pró-inflamatórios pode estar relacionado com o maior recrutamento de células inflamatórias nos animais tratados com dCTMs + SD (observadas através de análise histológica). Porém, a expressão do RNAm de IL-10, uma importante molécula anti-inflamatória, também foi *upregulated* no grupo dCTMs + SD, podendo estar envolvida com a resolução da inflamação.

Bunnell e colaboradores (2010) têm relatado que as CTMs secretam uma variedade de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios que afetam inúmeros processos, como apoptose, angiogênese e inflamação. Este grupo tem definido um mecanismo pelo qual as CTMs podem ter fenótipos distintos, conforme a sinalização molecular: um fenótipo pró-inflamatório nas fases iniciais da lesão e anti-inflamatório em fases mais tardias (BUNNELL; BETANCOURT; SULLIVAN, 2010). Estes dados indicam que os mecanismos pelos quais as CTMs atuam na fase inflamatória são complexos, e mais estudos são necessários para compreender sua ação.

Em relação aos fatores de crescimentos importantes durante a fase proliferativa, a grande maioria dos genes no grupo dCTMs + SD foram *upregulated* no dia 3, mas não variaram ou diminuíram sua expressão no dia 7. O RNAm do EGF foi o único *upregulated* nos dois dias analisados. O aumento na expressão do RNAm destes fatores, principalmente FGF, EGF, KGF e VEGF, nas fases iniciais do reparo pode estar relacionada com a maior vascularização, depósito de matriz extracelular e re-epitelização observadas no grupo tratado com dCTMs + SD.

A expressão do RNAm das proteínas de matriz extracelular, colágeno IaI e colágeno III, foi regulada de forma distinta no grupo dCTM + SD. Enquanto a expressão de colágeno III foi altamente *dowregulated*, a de colágeno IaI aumentou. Estes dados são consistentes com o maior depósito de colágeno I observado através das análises imunohistoquímicas no grupo tratado com dCTMs + SD. Apesar da expressão de colágeno III não ter sido avaliada por imunohistoquímica, pode-se sugerir que esta diminuição na expressão do seu RNAm ocorre pelo amadurecimento da matriz extracelular, que inclui a substituição do depósito inicial de colágeno III pelo colágeno I (JANIS; KWON; LALONDE, 2010; RADKE; TELLER; WHITE, 2009).

A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos na área lesionada está relacionada à maior contração da ferida (RADKE; TELLER; WHITE, 2009). Neste trabalho, foi avaliada a expressão do RNAm de α -SMA, marcador de miofibroblastos, e os resultados obtidos revelaram que no grupo tratado com dCTM + SD a sua expressão aumentou no dia 3, mas no

dia 7 foi altamente *downregulated*. A diminuição no dia 7 pode indicar menor diferenciação e presença deste fenótipo na lesão tratada com dCTM + SD, e conseqüentemente melhor cicatrização da ferida. A diminuição da expressão do RNAm de TGF- β , no dia 7, pode estar relacionada com esta diminuição na expressão de α -SMA, já que esse fator de crescimento possui papel chave na diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos.

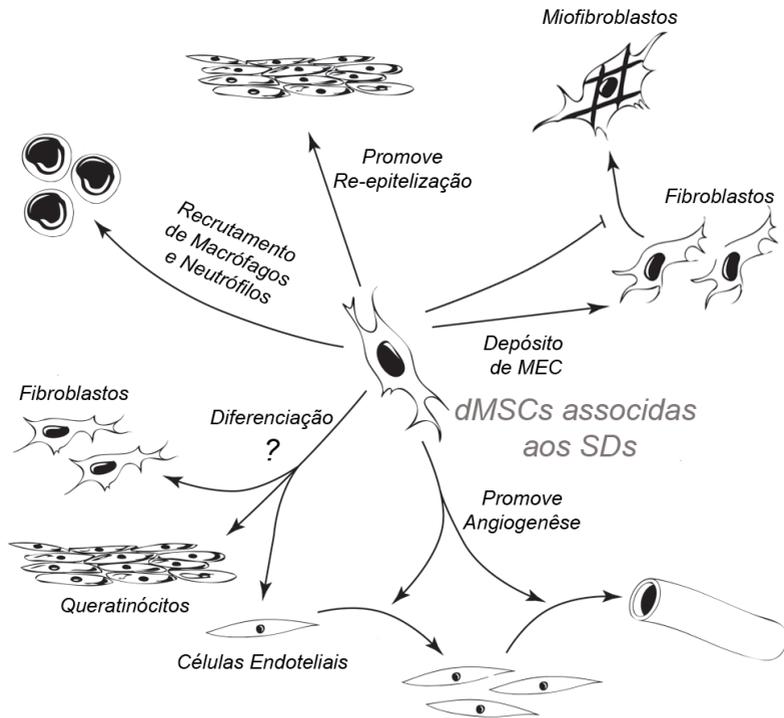
A expressão gênica das metaloproteases e seu inibidor, TIMP-1, no grupo tratado com dCTM + SD aumentou no dia 3, mas foi *downregulated* no dia 7. Estes resultados são coerentes, pois a expressão do RNAm das MMP pode regular a expressão do RNAm do seu inibidor, neste caso do TIMP-1. Além disso, a análise imunohistoquímica revelou um maior depósito de matriz extracelular no grupo dCTM + SD, nos dias 7 e 14, indicando uma menor atividade de MMP. No entanto, espera-se um aumento destas proteínas nas fases finais do reparo, não analisado neste estudo, já que foi observado que após 21 dias a cicatriz formada no grupo tratado com dCTMs + SD é mais organizada e delgada que no grupo controle.

Os resultados referentes à expressão gênica, mostradas neste estudo, confirmam que as células no ambiente da lesão são moduladas pelo tratamento com dCTMs + SD. Nesse sentido, levanta-se a pergunta: quais células tiveram sua expressão alterada no ambiente da lesão? Entre os genes analisados, alguns são expressos por fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, neutrófilos e células endoteliais. Porém, os dados analisados neste estudo não permitem responder com exatidão a esta pergunta. Estudos recentes têm relacionado o efeito das CTMs com a regulação de macrófagos (CHEN et al., 2008; ZHANG et al., 2010). Neste sentido, as CTMs promovem a ativação dessas células, modificando seu fenótipo e ocasionando a secreção de vários fatores modulatórios, que recrutam e modificam a atividade de outros tipos celulares. Assim, os macrófagos influenciam a resolução da inflamação e atuam na fase proliferativa e de remodelamento (ZHANG et al., 2010). Em um estudo *in vitro*, foi observado que macrófagos humanos após co-cultivo com CTMs adquiriram um fenótipo caracterizado pela alta expressão de IL-6 e IL-10, quando comparada ao controle (MAGGINI et al., 2010). Em um modelo de isquemia, o efeito neuroprotetivo das CTMs foi explicado pela ativação de macrófagos no sistema nervoso central (OHTAKI et al., 2008). Fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais são estimuladas pelos macrófagos durante a fase proliferativa e induzem a formação da matriz extracelular, re-epitelização e neovascularização. Subseqüentemente, os macrófagos podem alterar a composição da matriz extracelular durante a

fase de remodelamento pela liberação de enzimas proteolíticas (MAHDAVIAN DELAVARY et al., 2011; SHARMA; SNEDEKER, 2012). Estes dados sugerem que a ação das CTMs na modulação da expressão gênica e, conseqüentemente, na atividade dos macrófagos seria um passo crucial para o efeito reparador atribuído as CTMs.

Em resumo, os resultado experimentais obtidos no presente trabalho fornecem fortes evidências de que a presença das dCTMs na lesão está envolvida com o reparo tecidual mais efetivo (Figura 28). Pode-se afirmar, assim, que este estudo apresentou um método efetivo e viável de tratamento de lesões cutâneas através da associação de dCTMs com substitutos dérmicos, fornecendo um promissor tratamento para o reparo tecidual.

Figura 28. Esquema representativo da ação das dCTMs + SD nas lesões cutâneas, demonstradas neste estudos.



Os resultados deste estudo sugerem que o tratamento de lesões cutâneas com dCTMs associadas ao SD resultou no reparo tecidual mais eficiente, por promover uma maior vascularização, re-epitelização, depósito de MEC e recrutamento de macrófagos e neutrófilos na lesão. A inibição da diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos pode ter ocasionado uma menor contratura da lesão. Além disso, as dCTMs podem ter uma ação direta no reparo tecidual, pela sua diferenciação em fenótipos presentes na lesão, como queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais.

6. CONCLUSÕES

- As células isoladas da pele humana são CTMs, podendo ser designada de células tronco mesenquimais derivadas da derme (dCTMs).
- As dCTMs expressam marcadores de pluripotencialidade, neurais e mesenquimais, sem indução específica.
- As dCTMs possuem alta capacidade migratória *in vitro*.
- Ambos os substitutos dérmicos, Integra® e Pelnac® são biocompatíveis com as dCTMs, *in vitro*.
- As dCTMs cultivadas nos substitutos dérmicos mantém as características fenotípicas de CTMs, semelhante ao observado no cultivo bidimensional em monocamada.
- O tratamento com dCTMs associadas ao substituto dérmico aumenta o tecido de granulação, promove o recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), estimula a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização, acelerando assim o reparo tecidual.
- As dCTMs modulam a expressão de diferentes genes relacionados com o reparo tecidual na área da lesão, e isto pode elucidar como estas células alteram as repostas celulares, e consequentemente, os diferentes eventos que ocorrem durante este processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLPHE, C.; WAINWRIGHT, B. Pathways to improving skin regeneration. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 7, n. 20, p. 1–14, 23 set. 2005.

ALLIOT, F. et al. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. **Journal of neuroscience research**, v. 58, n. 3, p. 367–78, 1 nov. 1999.

AMADO, L. C. et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 32, p. 11474–9, 9 ago. 2005.

ARNARDOTTIR, H. H.; FREYSDOTTIR, J.; HARDARDOTTIR, I. Two circulating neutrophil populations in acute inflammation in mice. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 61, n. 9, p. 931–9, set. 2012.

ATLASI, Y. et al. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 12, p. 3068–74, dez. 2008.

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

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313–9, 10 abr. 2008.

BIRBRAIR, A. et al. Skeletal muscle pericyte subtypes differ in their differentiation potential. **Stem cell research**, v. 10, n. 1, p. 67–84, jan. 2013.

BIRGERSDOTTER, A.; SANDBERG, R.; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Seminars in cancer biology**, v. 15, n. 5, p. 405–12, out. 2005.

BLANPAIN, C. Stem cells: Skin regeneration and repair. **Nature**, v. 464, n. 7289, p. 686–7, 1 abr. 2010.

BLONDHEIM, N. R. et al. Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition. **Stem cells and development**, v. 15, n. 2, p. 141–64, abr. 2006.

BOSSOLASCO, P. et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell research**, v. 16, n. 4, p. 329–36, abr. 2006.

BUNNELL, B. A.; BETANCOURT, A. M.; SULLIVAN, D. E. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 5, p. 34, jan. 2010.

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, n. 4, p. 413–28, out. 1981.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 11, p. 2739–49, nov. 2007.

CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1886, jan. 2008.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018–29, maio 2007.

COTSARELIS, G. et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions. **Experimental dermatology**, v. 8, n. 1, p. 80–8, fev. 1999.

COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. **Journal of periodontal research**, v. 43, n. 5, p. 531–6, out. 2008.

CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 301–13, 11 set. 2008.

CRISAN, M. et al. Perivascular cells for regenerative medicine. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 12, p. 2851–60, dez. 2012.

CROFT, A. P.; PRZYBORSKI, S. A. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 8, p. 1841–51, ago. 2006.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 9, p. 2287–99, set. 2008.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 9, p. 283–9, 1 jan. 2004.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

EGAÑA, J. T. et al. Use of human mesenchymal cells to improve vascularization in a mouse model for scaffold-based dermal regeneration. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 5, p. 1191–200, maio 2009.

FONG, C.-Y. et al. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. **Journal of cellular biochemistry**, 29 ago. 2013.

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. 6, n. 2, p. 125–34, fev. 2012.

FOUDAH, D. et al. Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2012, p. 820821, jan. 2012.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230–47, mar. 1968.

FUCHS, E. NIH Public Access. **New York**, v. 445, n. 7130, p. 834–842, 2008.

GODIER, A. F. G. et al. Engineered microenvironments for human stem cells. **Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews**, v. 84, n. 4, p. 335–47, dez. 2008.

GOODWIN, H. S. et al. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 7, n. 11, p. 581–8, jan. 2001.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23–35, jan. 2003.

GREGORY, C. A.; YLOSTALO, J.; PROCKOP, D. J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental “niches”

in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2005, n. 294, p. pe37, 26 jul. 2005.

GUILLOT, P. V et al. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 3, p. 646–54, mar. 2007.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–21, 15 maio 2008.

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, p. e55640, jan. 2013.

HOWDIESHELL, T. R. et al. Normoxic wound fluid contains high levels of vascular endothelial growth factor. **Annals of surgery**, v. 228, n. 5, p. 707–15, nov. 1998.

HSIEH, E. A. et al. Dynamics of keratinocytes in vivo using HO labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation state. **The Journal of investigative dermatology**, v. 123, n. 3, p. 530–6, 6 set. 2004.

HU, C. et al. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. **The Journal of surgical research**, v. 183, n. 1, p. 427–34, jul. 2013.

ILANCHERAN, S. et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 3, p. 577–88, set. 2007.

IN 'T ANKER, P. S. et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 7, p. 1338–45, jan. 2004.

IZADPANA, R. et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1285–97, 1 dez. 2006.

JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. **Stem cell research & therapy**, v. 3, n. 3, p. 20, jan. 2012.

JANIS, J. E.; KWON, R. K.; LALONDE, D. H. A practical guide to wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 125, n. 6, p. 230e–44e, jun. 2010.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41–9, 4 jul. 2002.

JINNO, H. et al. Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 11, p. 2027–40, nov. 2010.

KATSETOS, C. D. et al. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. **Journal of child neurology**, v. 18, n. 12, p. 851–66; discussion 867, dez. 2003.

KIM, S.-W. et al. Amniotic mesenchymal stem cells enhance wound healing in diabetic NOD/SCID mice through high angiogenic and engraftment capabilities. **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e41105, jan. 2012.

KO, S. H. et al. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? **Plastic and reconstructive surgery**, v. 127 Suppl, p. 10S–20S, jan. 2011.

KRONENBERG, H. Adult mesenchymal stem cells. **StemBook**, p. 1–12, 2009.

KRUPKOVA, O. et al. Analysis of nuclear nestin localization in cell lines derived from neurogenic tumors. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 32, n. 4, p. 631–9, ago. 2011.

LERMEN, D. et al. Neuro-muscular differentiation of adult porcine skin derived stem cell-like cells. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8968, jan. 2010.

LEROU, P. H.; DALEY, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. **Blood reviews**, v. 19, n. 6, p. 321–31, nov. 2005.

LIU, Y. et al. Differentiated markers in undifferentiated cells: Expression of smooth muscle contractile proteins in multipotent bone marrow mesenchymal stem cells. **Development, growth & differentiation**, 4 abr. 2013.

LO, D. D. et al. Scarless fetal skin wound healing update. **Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews**, v. 96, n. 3, p. 237–47, set. 2012.

MAGGINI, J. et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9252, jan. 2010.

MAHDAVIAN DELAVARY, B. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753–62, jul. 2011.

MAHDAVISHAHRI, N. et al. In vitro Assay of Human Gingival Scaffold in Differentiation of Rat's Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Keratinocystes. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 15, n. 6, p. 1185–90, nov. 2012.

MANSBRIDGE, J. Skin tissue engineering. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**, v. 19, n. 8, p. 955–68, jan. 2008.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–55, nov. 2002.

MARTIN, P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75–81, 4 abr. 1997.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, nov. 2005.

MARTINI, M. M. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under the appropriate niche conditions. **DNA and cell biology**, v. 32, n. 2, p. 58–65, fev. 2013.

MASAEI, E. et al. Fabrication, characterization and cellular compatibility of poly(hydroxy alkanate) composite nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e57157, jan. 2013.

MAXSON, S. et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–9, fev. 2012.

NAKAMURA, Y. et al. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9393–400, dez. 2013.

NIEMANN, C.; WATT, F. M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 4, p. 185–192, 2002.

NIEMANN, C.; WATT, F. M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 4, p. 185–92, abr. 2002.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 2, p. 126–31, fev. 2011.

NOORT, W. A. et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. **Experimental hematology**, v. 30, n. 8, p. 870–8, ago. 2002.

OHTAKI, H. et al. Stem/progenitor cells from bone marrow decrease neuronal death in global ischemia by modulation of inflammatory/immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14638–43, 23 set. 2008.

OJEH, N. O.; FRAME, J. D.; NAVSARIA, H. A. In vitro characterization of an artificial dermal scaffold. **Tissue engineering**, v. 7, n. 4, p. 457–72, ago. 2001.

OKUMURA-NAKANISHI, S. et al. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5307–17, 18 fev. 2005.

OWENS, G. K.; KUMAR, M. S.; WAMHOFF, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiological reviews**, v. 84, n. 3, p. 767–801, jul. 2004.

PARENTEAU-BAREIL, R. et al. Comparative study of bovine, porcine and avian collagens for the production of a tissue engineered dermis. **Acta biomaterialia**, v. 7, n. 10, p. 3757–65, out. 2011.

PERANTEAU, W. H. et al. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 7, p. 1852–60, jul. 2008.

RADKE, F.; TELLER, P.; WHITE, T. K. The Physiology of Wound Healing: Injury Through Maturation. **Surgical Clinics of North America**, v. 89, n. 3, p. 599–610, 2009.

RAVANTI, L.; KÄHÄRI, V. M. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). **International journal of molecular medicine**, v. 6, n. 4, p. 391–407, out. 2000.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes**, v. 49, n. 1, p. 35–43, jan. 2012.

RIEKSTINA, U. et al. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 378–386, 22 set. 2009.

ROONEY, G. E. et al. Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. **Stem cells and development**, v. 18, n. 3, p. 387–98, abr. 2009.

SANDERS, R. C. et al. Stem cell research. **Paediatric respiratory reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–40, jun. 2006.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental cell research**, v. 304, n. 1, p. 274–86, 10 mar. 2005.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 4, p. 2581–7, 15 fev. 2008.

SCHNEIDER, R. K. et al. The role of biomaterials in the direction of mesenchymal stem cell properties and extracellular matrix remodelling in dermal tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 31, p. 7948–7959, 2010.

SEIFERT, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (Acomys). **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 561–5, 27 set. 2012.

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. 3978–87, out. 2010.

SHARMA, R. I.; SNEDEKER, J. G. Paracrine interactions between mesenchymal stem cells affect substrate driven differentiation toward tendon and bone phenotypes. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31504, jan. 2012.

STAGG, J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. **Tissue antigens**, v. 69, n. 1, p. 1–9, jan. 2007.

SUZUKI, S. et al. Further applications of “bilayer artificial skin”. **British journal of plastic surgery**, v. 48, n. 4, p. 222–9, jun. 1995.

TAI, M.-H. et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 495–502, fev. 2005.

TIEDE, S. et al. Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 11, p. 2711–20, nov. 2009.

VACULIK, C. et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. **The Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 3 Pt 1, p. 563–74, mar. 2012.

VATS, A. et al. Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. **Clinical otolaryngology and allied sciences**, v. 28, n. 3, p. 165–72, jun. 2003.

VISHNUBALAJI, R. et al. Skin-derived multipotent stromal cells--an archrival for mesenchymal stem cells. **Cell and tissue research**, v. 350, n. 1, p. 1–12, out. 2012.

WALTER, M. N. M. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. **Experimental cell research**, v. 316, n. 7, p. 1271–81, 15 abr. 2010.

WIESE, C. et al. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 61, n. 19-20, p. 2510–22, out. 2004.

WILLIAMS, J. T. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **The American surgeon**, v. 65, n. 1, p. 22–6, jan. 1999.

WISLET-GENDEBIEN, S. et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 3, p. 392–402, mar. 2005.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **The Surgical clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 509–28, jun. 1997.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Repair of full-thickness bowel injury. **Critical care medicine**, v. 31, n. 8 Suppl, p. S538–46, ago. 2003.

WONG, D. J.; CHANG, H. Y.; BIOLOGY, E. Skin tissue engineering. **StemBook**, p. 1–9, 2009.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International journal of biomaterials**, v. 2012, p. 926059, jan. 2012.

WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 10, p. 2648–59, out. 2007.

WU, Y.; ZHAO, R. C. H.; TREDGET, E. E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 5, p. 905–15, maio 2010.

YEUM, C. E. et al. Quantification of MSCs involved in wound healing : use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. n. January 2012, p. 279–291, 2013.

ZHANG, M. et al. A simple microfluidic strategy for cell migration assay in an in vitro wound-healing model. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, 17 out. 2013.

ZHANG, Q.-Z. et al. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 10, p. 1856–68, out. 2010.

ZIPORI, D. The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm. **Current stem cell research & therapy**, v. 1, n. 1, p. 95–102, jan. 2006.

ZOU, J.-P. et al. Mesenchymal stem cells/multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs): potential role in healing cutaneous chronic wounds. **The international journal of lower extremity wounds**, v. 11, n. 4, p. 244–53, dez. 2012.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–28, abr. 2001.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Avaliação do potencial de diferenciação das células tronco derivadas da pele humana e seu potencial terapêutico para o tratamento de Acidente Vascular Cerebral.”

Pesquisador Responsável: Prof^ª Dr^ª Andréa Gonçalves Trentin.

RG:4518154-3

Pesquisador participante: Talita da Silva Jeremias.

Telefones para contato: (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário(a), do trabalho de pesquisa “Avaliação do potencial de diferenciação das células tronco derivadas da pele humana e seu potencial terapêutico para o tratamento de queimaduras”, de responsabilidade da pesquisadora Prof^ª Dr^ª Andréa Gonçalves Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr(a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele. Atualmente as células tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados fragmentos de pele retirados durante as cirurgias plásticas, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células tronco da pele para compreendermos melhor o comportamento destas células. Estudos como estes são necessários, uma vez que nos proporcionarão conhecimentos que

futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias, como por exemplo, no tratamento de pacientes com lesões cutâneas. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o(a) Sr(a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, entre em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o(a) Sr(a) assine esse documento (verso).

Assinatura do pesquisador : _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____,
RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Avaliação do potencial de diferenciação das células tronco derivadas da pele humana e seu potencial terapêutico para o tratamento de queimaduras” e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável:

Florianópolis, ____ de _____ de 20 .

ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO N°

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584 GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

PROCESSO:

FR:

TÍTULO:

AUTOR:

APROVADO

FLORIANÓPOLIS, ____ de _____ de _____.

Coordenador do CEPSH/UFSC

Colorações***Oil Red 0 – marcador de triglicerídeos, lipídeos e algumas lipoproteínas******Solução-mãe:***

- Vermelho de óleo 0 (Oil red 0) - 3,75 g
- Álcool isopropílico 99° - 100 mL

Solução de uso:

- Solução-mãe de Oil Red 0 - 3 mL
- Água destilada - 6,67 mL

Vermelho de alizarina (Schrotter)

- Vermelho de Alizarina S - 3 g
- Água destilada - 100 mL

Eosina

- Eosina - 5g
- Água destilada - 100 mL

Coloração de Mallory

- Azul de anilina - 0,5g
- Orange G - 2 g
- Ácido Fosfotúngstico - 1 g
- água destilada - 100 mL

23/04/13

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf/48fc5b9fe9931c868325702e0075533b/623e0c87568b4e7d83257ac5004e428e?OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00810

Título

Protocolos 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**

[Abrir Solicitação](#)

[Criar Relatório](#)



[Parecer_PP00810.pdf](#)