



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM SUÍNOS**

VERÔNICA LOURENÇA DE SOUZA ARGENTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2022



VERÔNICA LOURENÇA DE SOUZA ARGENTA

**AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM SUÍNOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL

APROVADA POR:

DR. FÁBIO HENRIQUE BEZERRA XIMENES

Professor associado (Universidade de Brasília) - (ORIENTADOR)

DR. ANTÔNIO CARLOS LOPES CÂMARA

M. V. associado (Universidade de Brasília) - (EXAMINADOR)

DR. MARCELO BUZZI

Cientista Chefe da Empresa (Innovacorium Inc - EUA) - (EXAMINADOR)

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2022



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES NA CICATRIZAÇÃO DE
FERIDAS CUTÂNEAS EM SUÍNOS**

VERÔNICA LOURENÇA DE SOUZA ARGENTA

ORIENTADOR: PROF. DR. FÁBIO HENRIQUE BEZERRA XIMENES
COORIENTADOR: JOSÉ RENATO JUNQUEIRA BORGES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF
DEZEMBRO/2022

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ARGENTA, V. L. S. **Avaliação do uso tópico de vesículas extracelulares na cicatrização de feridas cutâneas em suínos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 104 p. Dissertação de Mestrado

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

LS729a

Lourença de Souza Argenta, Verônica
Avaliação do uso tópico de vesículas extracelulares na cicatrização de feridas cutâneas em suínos / Verônica Lourença de Souza Argenta; orientador Fábio Henrique Bezerra Ximenes; co-orientador José Renato Junqueira Borges. -- Brasília, 2022.
104 p.

Tese (Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2022.

1. Células tronco mesenquimais . 2. Vesículas extracelulares. 3. Suíno como modelo experimental. 4. Feridas cutâneas em suínos. 5. Terapia celular. I. Henrique Bezerra Ximenes, Fábio , orient. II. Junqueira Borges, José Renato, co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente nas horas de angústias, meu pai e fonte de vida. Sempre atendeu minhas orações e nunca me abandonou. E a Nossa Senhora, por ter zelado tão bem de minhas súplicas.

Aos meus pais Antônio Alves e Valcy Alves, que sempre estiveram ao meu lado, lutaram para que eu chegasse onde cheguei, me deram princípios que levo para a vida toda. Ele sempre segurou as pontas, fez de tudo para me agradar e nunca me desapontar. E ela, meu porto seguro, cuida de mim de uma forma inexplicável, me apoia e está ao meu lado, são pessoas que tenho tanto orgulho, e me fazem ser a filha mais feliz do mundo.

Ao meu marido, Wagner Argenta, por todo apoio, por estar ao meu lado, pela compreensão e pelo incentivo.

Aos meus irmãos, Anderson Alves, Valéria Lourença, que me apoiaram e sei que se orgulham de mim, e agradeço a Deus por ter me dado os melhores. Por sermos sempre unidos e parceiros, cuidam de mim como a irmã caçula, estão sempre ao meu lado e sei que posso contar com eles.

À família “HVETÃO”, residentes, funcionários, tratadores e médicos veterinários, atuais e que já passaram por lá, que são pessoas que significam muito para mim e para minha trajetória na UnB, que me apoiaram, incentivaram, aconselharam e acreditaram em mim. Eu sempre serei eternamente apaixonada por aquele lugar e por toda história que construí ao longo de 10 anos de “HVETÃO”, com todos os envolvidos.

Aos residentes de anestesiologia, aos meus colegas de profissão João Vitor Guedes, Matheus Perreira Cordeiro, Adilson Wandson, Gabriel Menezes e em especial ao meu amigo, Samuel Freitas Bastos, que estiveram comigo na execução desse trabalho.

Ao Laboratório Bio Cell e toda sua equipe, pelo imenso suporte que me foi prestado para execução desse projeto, por toda a disposição e profissionalismo.

Ao Guilherme Reis M.V. do laboratório Histopato Análise Anatomopatológica Veterinária, que contribuiu com excelentes imagens histológicas para o estudo.

Agradeço ao professor Fabiano José Ferreira de Sant'Ana e por toda sua equipe, pelo excelente trabalho na realização das lâminas de histologia do estudo.

Agradeço a todos os adultos e professores com quem tive o privilégio de trabalhar na UnB e em especial ao meu orientador Prof. Fábio Henrique Bezerra Ximenes por todo ensinamento e paciência. As amizades, experiências e conhecimentos adquiridos jamais serão esquecidos, devo a vocês parte do meu crescimento profissional.

O sentimento de gratidão por esses anos de evolução pessoal e profissional é tão imenso, que não caberia neste espaço. Um ciclo se encerra para que um novo se inicie, OBRIGADA UnB e meu MUITO OBRIGADA HVETÃO!

*“Enquanto a cor da pele for mais importante que o
brilho dos olhos, haverá guerra”.*

(Bob Marley)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 - ANATOMIA DA PELE	21
2.2 - FASES DA CICATRIZAÇÃO.....	24
2.2.1 FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS AGUDA.....	24
2.2.2 FASE INFLAMATÓRIA.....	25
2.2.3 FASE PROLIFERATIVA.....	27
2.2.4 FASE DE MATURAÇÃO OU REMODELAMENTO.....	29
2.2.5 FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS.....	30
2.3 - O PORCO COMO MODELO DE CICATRIZAÇÃO	33
2.4 - TERAPIA CELULAR COM CELULAS-TRONCO	36
2.4.1 CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs).....	38
2.4.2 MEDULA ÓSSEA (MO).....	40
2.4.3 CORDÃO UMBILICAL (UC)	41
2.4.4 TECIDO ADIPOSEO (TA).....	41
2.4.5 IMPORTANCIA DAS CTMs NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....	43
2.5 - COMPONENTES DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS TRONCO ...	44
2.5.1 SECRETOMAS	44
2.5.2 VESICULAS EXTRACELULARES (VEs).....	46
2.5.3 EXOSSOMOS (Exos).....	48
2.5.4 MICROVESÍCULAS (MVs).....	49
2.5.5 CÉLULAS APOPTÓTICAS.....	50
3. OBJETIVO	52
3.1 - OBJETIVO GERAL	52
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4. MATERIAIS E MÉTODOS	52
4.1 - RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA	52
4.2 - COLETA DE MATERIAL PARA PRODUÇÃO DE CT	52
4.3 - PROCESSAMENTO, ISOLAMENTO E CULTIVO DAS VEs.....	53
4.4 - ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	54
4.5 - PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	55
4.6 - DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS.....	58
4.7 - CURATIVO E MANEJO DAS FERIDAS.....	61
4.8 - COLETA DE DADOS	63
4.8.1 DISCOS EXCISIONAIS CUTÂNEOS RETIRDOS DURANTE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	63
4.8.2 IMAGENS FOTOGRÁFICAS.....	64
4.8.3 BIÓPSIAS.....	65
4.8.4 PROCESSO HISTOLÓGICO	66
4.8.5 TEMPERATURA AMBIENTAL.....	66
4.8.6 TEMPERATURA DOS SUÍNOS.....	66
4.8.7 PESAGEM.....	67
4.8.8 ANÁLISES CLÍNICAS	67
4.8.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5. RESULTADOS	68
5.1 - PESAGEM E MENSURAÇÃO DOS DISCOS EXCISIONAIS CUTÂNEOS.....	68
5.2 - TEMPERATURA E UMIDADE LOCAL.....	69

5.3	- TEMPERATURA RETAL, LOMBO E DORSO DOS SUÍNOS EXPERIMENTAIS	71
5.4	- PESAGEM SEMANAL DOS SUÍNOS EXPERIMENTAIS	73
5.5	- ANÁLISES CLÍNICAS	73
5.6	- ANÁLISE VISUAL	73
5.7	- ÁREA DA FERIDA	74
5.8	- ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	85
6.	DISCUSSÃO.....	91
7.	CONCLUSÕES.....	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	ANEXO I.....	103
	ANEXO II.....	104

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Representação esquemática das fases da cicatrização e presença de células imunes.....	25
GRÁFICO 2. Temperatura local aferida diariamente durante os 28 dias de experimento.....	69
GRÁFICO 3. Umidade local aferida diariamente durante os 28 dias de experimento.....	70
GRÁFICO 4. Média das retrações de feridas excisionais em dorso de suínos hígido.....	76
GRÁFICO 5. Porcentagem das retrações de feridas excisionais em dorso de suínos hígido.....	76

LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1. Identificação e concentrações das vesículas, base cicatrizante e meio condicionado, pomada comercial e soro fisiológico.....59
- QUADRO 2. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) dos discos excisionais cutâneos, retirados no momento da cirurgia.....68
- QUADRO 3. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) das temperaturas, retal, região de dorso e lombo dos suínos experimentais.....71
- QUADRO 4. Peso semanal dos suínos experimentais.....73
- QUADRO 5. Resultados de hematologia e bioquímica sérica dos animais de experimento.....73
- QUADRO 6. Teste de Bonferroni's comparando o controle negativo com todos os outros tratamentos.....75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) da temperatura e umidade local, durante os 28 dias de experimento.....	69
TABELA 2. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 1.....	77
TABELA 3. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 2.....	78
TABELA 4. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 3.....	79
TABELA 5. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 4.....	80
TABELA 6. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 5.....	81
TABELA 7. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 6.....	82
TABELA 8. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 7.....	83
TABELA 9. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do tratamento 8.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação da biogênese de diferentes classes de vesículas extracelulares.....	51
FIGURA 2. Etapas da purificação das vesículas extracelulares dos meios de cultivo das células-tronco mesenquimais.....	54
FIGURA 3. Suíno experimental em sua baia individual, devidamente identificada.....	55
FIGURA 4. Medida do gabarito de aço cirúrgico para demarcação dos discos excisionais cutâneos, contendo 4 círculos de 20mm com espaçamento de 40mm.....	56
FIGURA 5. Procedimento cirúrgico de retirada de discos excisionais cutâneos de suíno.....	57
FIGURA 6. Hemostasia das feridas cirúrgicas e curativo final.....	58
FIGURA 7. Suínos distribuídos aleatoriamente em duplicata dos tratamentos propostos no estudo. (P1) primeiro, (P2) segundo e (P3) terceiro.....	60
FIGURA 8. Material processado e armazenados em frascos de vidro para administração em spray, acondicionados em caixa de isopor.....	61
FIGURA 9. Mesa de curativo utilizada durante os 28 dias experimentais.....	62
FIGURA 10. Feridas cirúrgicas antes e depois do curativo e aplicação do curativo filme transparente.....	63
FIGURA 11. Pesagem e mensuração dos discos excisionais cutâneos.....	63
FIGURA 12. Gabarito circular adesivo de cor verde durante mensuração de retração de ferida, delimitando o gabarito e a ferida.....	64
FIGURA 13. Biópsia cutânea destinada a processamento histológico.....	65

FIGURA 14. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 1. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	77
FIGURA 15. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 2. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	78
FIGURA 16. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 3. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	79
FIGURA 17. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 4. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	80
FIGURA 18. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 5. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	81
FIGURA 19. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 6. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	82
FIGURA 20. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 7. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	83
FIGURA 21. Feridas excisionais em pele suína tratadas com tratamento 8. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.....	84
FIGURA 22. Pele hirsuta sem alterações histológicas, com epiderme normal e derme com tecido conjuntivo denso não modificado com feixes de fibras de colágeno maduro, ausência de infiltrado celular atípico e/ou inflamatório. (H&E, 4x).....	86
FIGURA 23. Espessamento moderado da camada espinhosa da epiderme (acantose) e derme com infiltrado multifocal moderado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. (H&E, 20x).....	86
FIGURA 24. Perda da epiderme (úlceras) com derme apresentando necrose e infiltrado multifocal acentuado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. (H&E, 20x).....	87
FIGURA 25. Perda da epiderme (úlceras) com derme apresentando necrose e infiltrado multifocal acentuado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. (H&E, 20x).....	87

FIGURA 26. Espessamento moderado da camada espinhosa (acantose) e córnea (hiperqueratose) da epiderme e derme com infiltrado multifocal discreto de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. (H&E, 20x).....	88
FIGURA 27. Epiderme com presença de acantose, hiperqueratose e derme com tecido de granulação e células inflamatórias. (H&E, 20x).....	88
FIGURA 28. Derme com tecido de granulação, caracterizado por proliferação de vasos sanguíneos, fibroblastos dispostos de forma perpendicular aos vasos, tecido conjuntivo fibroso e células inflamatórias. (H&E, 20x).....	89
FIGURA 29. Espessamento moderado da camada espinhosa (acantose) e córnea (hiperqueratose) da epiderme e derme com infiltrado multifocal moderado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e formação de novos vasos (angiogênese). (H&E, 10x).....	89
FIGURA 30. Derme com presença de colágeno maduro. (H&E, 20x).....	90
FIGURA 31. Derme com presença de colágeno maduro. (H&E, 40x).....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PP	Adesivo plaquetário
BC	Base cicatrizante
EPCS	Células progenitoras endoteliais
ESC	Células tronco embrionárias
CT	Células-tronco
ASCS	Células-tronco derivadas do tecido adiposo
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CV	Coeficiente de variação
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
UC	Cordão umbilical
CA	Corpos apoptóticos
CMV	Corpos multivesiculares
D14	Decimo quarto dia
DV	Desvio-padrão
D0	Dia da cirurgia
DMEM	Eagle modificado por Dulbecco
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Exos	Exossomos
MAF	Fator de ativação de macrófago
TGF- β	Fator de crescimento de transformação beta
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
FGF	Fator de crescimento derivado dos fibroblastos
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
EGF	Fator de crescimento epidérmico
MIF	Fator de inibição da migração
IFATS	Federação Internacional de Terapêutica Adiposa
PRF	Fibrina rica em plaquetas
Fig	Figura
SVF	Fração vascular estromal
CO ²	Gás carbônico
HE	Hematoxilina e Eosina
IL-2	Interleucina-2
MEC	Matriz extracelular

MO	Medula óssea
MC	Meio condicionado
MVs	Microvesículas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NFD	Nifedipina
PRP	Plasma rico em plaquetas
P1	Primeiro suíno
P2	Segundo suíno
P3	Terceiro suíno
D7	Sétimo dia
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
PBS	Tampão de fosfato padrão
DMPBS	Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco
TA	Tecido adiposo
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
T5	Tratamento 5
T6	Tratamento 6
PC	Tratamento 7
SAL	Tratamento 8
UnB	Universidade de Brasília
VEs	Vesículas extracelulares
CTMs-VEs	Vesículas extracelulares de célula tronco mesenquimais
D21	Vigésimo primeiro dia
D28	Vigésimo oitavo dia

RESUMO

Presente na terapia celular, as células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas, definidas por sua grande capacidade de proliferação, autorrenovação e regeneração após uma injúria. Podendo ser classificadas de diferentes formas, de acordo com seu tecido de origem como embrionárias, adultas e células-tronco pluripotentes induzidas e por sua capacidade de diferenciação celular, como células totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. Inicialmente pensava-se que as CTMs exerciam seu efeito terapêutico migrando para o local da lesão, inserindo-se e, posteriormente, diferenciando-se em células desejadas para regeneração tecidual. No entanto, estudos indicaram que o benefício terapêutico das CTMs é atribuído não apenas à sua diferenciação, mas também aos fatores que elas secretam, como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, além liberar numerosas vesículas extracelulares que participam da regeneração tecidual por meio da transferência de informações para células ou tecidos danificados. O presente trabalho tem como objetivo, avaliar o efeito da cicatrização de feridas cutâneas, produzidas no dorso de três suínos hígidos, obtidas em concentrações diferentes de vesículas extracelulares isoladas, cultivar e caracterizadas através de CTMs de tecido adiposo de suíno, durante vinte e oito dias. Sendo realizadas dezesseis feridas cutâneas no dorso de cada suíno, em forma de duplicata, utilizamos, duas concentrações distintas de vesículas extracelulares, uma de base cicatrizante, uma de meio condicionado, controle positivo que foi utilizado uma pomada comercial e o controle negativo, utilizando solução salina. Os dados quantitativos foram mensurados através de retração das feridas e os dados qualitativos foram realizados através de lâminas histológicas. Concluindo efeito terapêutico significativo no reparo tecidual das vesículas extracelulares.

PALAVRAS-CHAVE: Terapia celular; células-tronco mesenquimais; vesículas extracelulares; feridas cutâneas em suínos; porco como modelo experimental.

ABSTRACT

Present in cell therapy, mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells, defined by their great capacity for proliferation, self-renewal and regeneration after injury. They can be classified in different ways, according to their tissue of origin, such as embryonic, adult, and induced pluripotent stem cells, and their capacity for cell differentiation, such as totipotent, pluripotent, or multipotent cells. Initially, it was thought that MSCs exerted their therapeutic effect by migrating to the site of injury, inserting themselves and subsequently differentiating into cells desired for tissue regeneration. However, studies have indicated that the therapeutic benefit of MSCs is attributed not only to their differentiation, but also to the factors they secrete, such as growth factors, chemokines and cytokines, in addition to releasing numerous extracellular vesicles that participate in tissue regeneration through transfer information to damaged cells or tissues. The present work aims to evaluate the healing effect of cutaneous wounds, produced on the back of three healthy pigs, obtained in different concentrations of isolated extracellular vesicles, cultivated and characterized through MSCs of swine adipose tissue, during twenty-eight days . Sixteen cutaneous wounds were made on the back of each pig, in duplicate, we used two different concentrations of extracellular vesicles, one of healing base, one of conditioned medium, positive control that was used a commercial ointment and negative control, using solution saline. Quantitative data were measured through wound retraction and qualitative data were performed through histological slides. Concluding significant therapeutic effect on tissue repair of extracellular vesicles.

KEY WORDS: Cell therapy; mesenchymal stem cells; extracellular vesicles; skin wounds in pigs; pig as an experimental model.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de nossas vidas, órgãos e tecidos vão perdendo sua função, seja por consequência de alguma doença ou pelo processo natural de envelhecimento, e com o passar dos anos os mesmos sofrem perdas irreversíveis. Com o avanço da tecnologia e o aumento de estudos científicos sobre o emprego de células tronco (CT), é possível reverter ou reparar estes danos que sofremos ao longo dos anos, seja eles causados por envelhecimento ou por lesões no tecido. As CT, são caracterizadas por serem células indiferenciadas que apresentam como características a alta capacidade de proliferação, autorrenovação, diferenciação em linhagens celulares especializadas, além de regeneração dos tecidos. Podem ser classificadas de diferentes formas, como de acordo com seu tecido de origem e capacidade de diferenciação celular, conseguindo ser isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários, fetais ou adultos (SILVA, 2017; ALVES et al., 2019; MORAES et al., 2021).

Dentre os tipos celulares de CT, existem as células-tronco mesenquimais (CTMs), que são células multipotentes isoladas a partir de tecido adulto, e podem ter a capacidade de originar tecidos semelhantes aos das células tronco embrionárias. (ALVES et al., 2019). As células tronco adultas podem ser desenvolvidas a partir de células especializadas do ectoderma (células epidérmicas da pele, neurônios e células pigmentadas), mesoderma (células do músculo cardíaco, músculo estriado, músculo liso, tubulares do rim, sanguíneas, tecido adiposo) e endoderma (células pancreáticas, da tireoide, alveolares) e células germinativas (óvulo e espermatozóide). Com base nisso células do tecido adiposo e da pele se tornaram fontes de obtenção e diferenciação de CT, fornecendo perspectivas novas de tratamento em inúmeras especialidades. Devido sua capacidade de expansão e diferenciação, o tecido adiposo é uma fonte promissora de CT com aplicação satisfatória na terapia regenerativa. Além do mais, esta fonte de tecido é de fácil obtenção através de procedimento cirúrgico simples. Ainda pode ser obtido continuamente em grandes quantidades sob anestesia local promovendo desconforto mínimo ao paciente (QUEIROZ, 2017; MORAES et al., 2021).

As CTMs atuam predominantemente através de mecanismos parácrinos, como secreção de vesículas extracelulares (VEs) e fatores solúveis. As VEs compreendem os exossomos e as microvesículas que possuem potencial para

mediar comunicação entre células, envolvendo-se em processos como angiogênese, proliferação celular, diferenciação celular, resposta ao estresse e resposta imunológica, além de serem conhecidas por carregar um repertório de mRNAs, miRNAs, DNA, proteínas e lipídios que podem ser transferidos para células vizinhas, modificando seu fenótipo, bem como o microambiente (NAWAZ et al., 2016; QUEIROZ, 2017).

Modelos animais são úteis para ajudar a entender a evolução de doença, além de descobrir, avaliar e validar drogas terapêuticas, sua farmacodinâmica e seus efeitos colaterais tóxicos. Deve-se considerar vários aspectos nesse contexto como a padronização, reprodutibilidade, validade entre estudos e tradução bidirecional entre espécies e entre diferentes níveis de pesquisa para chegar a conclusões eficientes e pertinentes. O porco, além de ter tamanho e homologia semelhantes aos humanos, é um modelo médico adequado em muitas áreas de pesquisa por diversos motivos, como, por exemplo, espessura epidérmica e dérmica, tempo de renovação epidérmica, padrão e estrutura dos folículos pilosos, conteúdo e estrutura do colágeno e elastina dérmicos, metabolismo dérmico, tipos de células imunes presente e resposta biológica aos fatores de crescimento. Além disso, na pele de suínos e humanos, o processo de cicatrização ocorre por reepitelização, diferentemente de mamíferos menores, onde ocorre por contração (BASSOLS et al., 2014; GRADA et al., 2018; BRASILEIRO et al., 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo isolar, cultivar e caracterizar as CTMs de tecido adiposo suíno, obter vesículas extracelulares (VEs), base cicatrizante (BC) e meio condicionado (MC) do cultivo celular. Com a finalidade de avaliar seu potencial terapêutico na cicatrização de feridas cutâneas produzidas na pele de suínos hígidos. Existindo pouco trabalhos publicados que discorrem sobre a utilização de VE na cicatrização de feridas cutâneas e sendo este, o primeiro trabalho que produziu VE derivadas de CTMs e as utiliza de forma tópica em cicatrização de feridas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - ANATOMIA DA PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano, sendo um órgão externo é considerado uma barreira, pela sua natureza de interface entre o organismo e o meio ambiente. Possui como principal função isolar as estruturas internas do ambiente externo, além de desempenhar funções, como regulação térmica, controle do fluxo sanguíneo, continuamente encontra desafios mecânicos, biológicos, químicos e físicos requerendo uma barreira eficaz que seja mecanicamente resistente, mas ainda flexível, um escudo contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta emitida pelo sol e funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). Além de possuir vários tipos de células imunes que residem ou são recrutadas na pele para manter a homeostase da pele em desafios inflamatórios (SOUTO et al., 2005; BERNARDO et al., 2019; KABASHIMA et al., 2019; SALES, 2019). Responsável por cerca de 16% do peso corporal com dimensões que variam, no adulto, de 1,5 a 2,0 m² e peso que oscila entre 8,0 e 10,0 Kg (SOUTO et al., 2005; BERNARDO et al., 2019).

A pele é constituída por três camadas distintas: a tela subcutânea, a derme e a epiderme, sendo as duas últimas consideradas camadas principais. Constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme é uma porção conjuntiva de origem mesodérmica (derme), na derme encontra-se a hipoderme que serve de contato com os órgãos subjacentes. Cada camada da pele apresenta uma função específica para renovação e manutenção da sua vitalidade (SOUTO et al., 2005; BERNARDO et al., 2019; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021). A camada externa da pele é a epiderme, avascular com espessura de 75 a 150 µm, sendo de 0,4 a 0,6mm de espessura na palma das mãos e planta dos pés, tendo como função principal, proteção contra agentes externos devido a sua localização. Constituída de epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com escassa matriz extracelular, a qual consiste, principalmente, de uma camada relativamente fina e resistente, denominada lâmina basal, que se situa subjacente ao epitélio. Sendo a diferenciação terminal e a reticulação dos queratinócitos epidérmicos externos os principais responsáveis pela criação da barreira real (BERNARDO et al., 2019; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021).

São vários os tipos de células que compõem a epiderme: os queratinócitos (ceratinócitos) sendo as células mais abundantes nesse epitélio e constitui a camada mais inferior, com função de sintetizar queratina e a medida com que migram para a superfície origina-se a camada córnea, a queratina que é uma proteína fibrosa filamentosa que dá firmeza a epiderme, garantindo proteção, impermeabilização da pele, além de protegê-la da desidratação (BERNARDO et al., 2019; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021). No entanto, a epiderme apresenta ainda três tipos celulares distintos – os melanocitos formada por células responsáveis pela síntese de melanina, um contribuinte para a cor da pele, com função de filtra a radiação ultravioleta da luz solar, que pode danificar o DNA, as células de Langherans são as células responsáveis pela ativação do sistema imunológico atuando como macrófagos contra partículas estranhas e microrganismos, reconhecendo antígenos e os apresentando aos linfócitos T e as células ou discos de Merkel, dispostas entre a epiderme e derme, ligando-se as terminações nervosas sensitivas atuando como receptores de tato ou pressão (SOUTO et al., 2005; BERNARDO et al., 2019; SALES, 2019).

A derme é a segunda camada da pele, tendo como principal célula os fibroblastos que são responsáveis pela síntese de fibras de elastina, colágeno, reticulares e conteúdo da matriz extracelular, cujas características e distribuição garantem-lhe a consistência física (SOUTO et al., 2005; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021). É capaz de promover a sustentação da epiderme e tem participação nos processos fisiológicos e patológicos do órgão cutâneo. Sua espessura pode variar de 0,6 mm (regiões mais finas) até 3 mm, localizada logo abaixo da epiderme, é constituída por três regiões distintas: região superficial ou papilar, que mantém contato com a epiderme, composta por tecido conjuntivo frouxo, com predominância de feixes de fibras colagenosas mais espessas onduladas e em disposição horizontal, guarda pequenos vasos linfáticos e sanguíneos, terminações nervosas, colágeno e elastina, corpúsculo de Meissner, com função de favorecer nutrientes; a segunda camada é a profunda ou reticular, composta por tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras de colagenosas mais espessas em disposições horizontais, onde estão presentes os anexos cutâneos, vasos sanguíneos e linfáticos, receptores sensoriais, glândulas, músculos lisos e folículos pilosos, essa camada fornece oxigênio e nutrientes para a pele; e a terceira região

é a adventicial, circundada por folículos pilossebáceos, glândulas e vasos que tem a função de recrutar constantemente células imunes, sendo formada por feixes finos de colágeno, e na derme estão presentes os anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, pelos e unhas (BERNARDO et al., 2019; KABASHIMA et al., 2019; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021). Além de existir vários tipos de células imunes inatas, incluindo células dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos, células T com funções imunológicas. Os mastócitos reagem a estímulos inflamatórios e participam da cicatrização de feridas. Os vasos sanguíneos dérmicos, além de fornecerem nutrientes para a pele, estão envolvidos na termorregulação, função que é compartilhada com as glândulas sudoríparas. Pequenos e grandes plexos nervosos participam da inervação de diferentes órgãos cutâneos que são responsáveis pela detecção de dor, pressão e variações de temperatura (SOUTO et al., 2005; KABASHIMA et al., 2019).

Logo abaixo da derme, existe ainda um tecido adiposo, denominado hipoderme ou tela subcutânea, considerada um órgão endócrino é a porção mais profunda da pele, que tem origem mesodérmica, cujas funções são armazenar energia, proteção contra choques mecânicos, tem a função de permitir mobilidade sobre estruturas profundas e atuando como isolante térmico. Composta por feixes de tecido conjuntivo que envolvem células gordurosas (adipócitos) e formam tubos de gordura (BERNARDO et al., 2019; SALES, 2019; SIVIERI et al., 2021).

E entre a epiderme e a derme, está presente a lâmina dermo-epidérmica, a qual permite que essas duas camadas estejam ancoradas, é sintetizada pela camada basal e tendo como função, barreira e filtro de nutrientes entre as camadas (BERNARDO et al., 2019).

Quando lesada, a pele se repara através da proliferação e crescimento das células da derme (fibroblastos e outras células estromatosas) e/ou epiderme (queratinócitos e melanócitos) remanescentes. Podendo ocorrer em caso de lesões extensas e profundas da pele e mucosas, uma destruição da derme e dos elementos epidérmicos, tendo como resultado um processo de reparo lento e complexo (SOUTO et al., 2005).

Desde o início da história da civilização há relatos de tentativas para se curar feridas abertas na pele. O homem de Neanderthal da região do Iraque já tratava de queimaduras com extratos de plantas, cerca de 60.000 anos a.C.

(SCARBOROUGH, 1983). Os egípcios fizeram uso de uma mistura de látex, leite de cabra e leite humano. Nos papiros Smith, que datam de 1.500 anos a.C., há relatos de misturas de vários tipos de cascas de limão molhadas em preparações oleosas. Entre o sexto e quinto séculos a.C., os chineses usaram tinturas e extratos feitos de folhas de chá (SOUTO et al., 2005).

2.2- FASES DA CICATRIZAÇÃO

2.2.1 FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS AGUDA

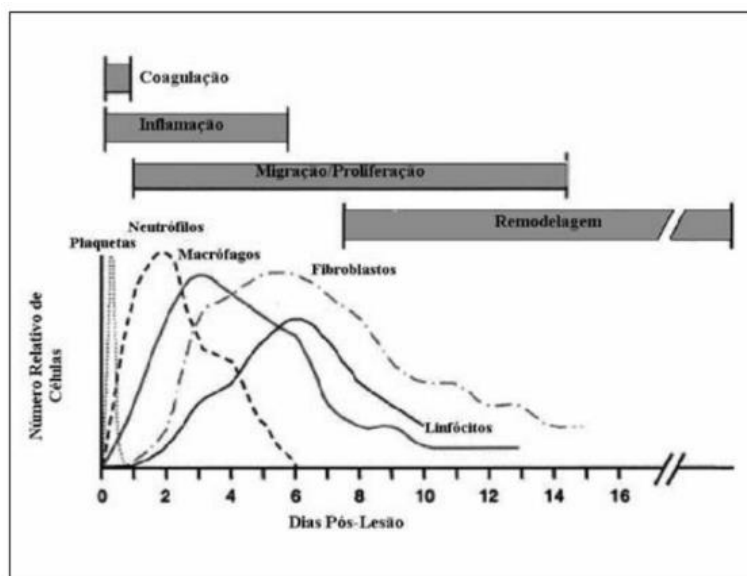
A manutenção da homeostase é fundamental para a sobrevivência do organismo; por isso, a pele necessita e possui um mecanismo de reparação robusto e eficaz. A cicatrização de feridas cutâneas é o processo pelo qual a pele se repara após lesão causada por cirurgia, trauma e queimaduras. É um dos processos mais complexos do corpo humano, dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo, envolvendo inúmeras fases ativadas por vias bioquímicas intra e intercelulares e coordenadas de forma harmoniosa para restaurar a integridade e a homeostase dos tecidos. Também fazem parte desse processo, elementos celulares como a cascata de coagulação e as vias inflamatórias, além de várias células imunes como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas* que orquestram as fases da cicatrização (OLIVEIRA & DIAS, 2012; SHEDOEVA et al., 2019; TOTTOLI et al., 2020; RAZIYEVA et al., 2021).

Após uma lesão, um conjunto de eventos bioquímicos se estabelece para reparar o dano e promover a cicatrização. Todos esses eventos ocorrem para evitar uma perda excessiva de sangue, fluidos e o desenvolvimento de infecções, além de facilitar a remoção de tecidos mortos ou desvitalizados. Qualquer fator que cause interrupção, alteração, ou acréscimo no processo podem levar à cicatrização atrasada ou a uma ferida crônica que não cicatriza (GUO & DIPIETRO, 2010; OLIVEIRA & DIAS, 2012; LEAL & CARVALHO, 2014; TOTTOLI et al., 2020).

A cicatrização ideal de feridas é tradicionalmente dividida em quatro estágios sequenciais: hemostasia, que dura de minutos a horas após o dano à pele, inflamação aguda, que leva de 1 a 3 dias, diferenciação, proliferação e migração de CTMs para o local da ferida, que geralmente dura de alguns dias a um mês e,

finalmente, remodelação da pele ou formação de cicatriz, também conhecida como maturação (Gráfico 1) (GUO & DIPIETRO, 2010; SHEDOEVA et al., 2019; RAZIYEVA et al., 2021).

GRÁFICO 1. Representação esquemática das fases da cicatrização e presença de células imunes.



FONTE: MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, (2009)

2.2.2 FASE INFLAMATÓRIA

Após um dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes, compostos vasoativos são estimulados a promoverem uma vasoconstrição imediata, com o objetivo de diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular e preenchendo a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que irão estabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra a invasão de microrganismos, além de organiza matriz provisória necessária para a migração celular. Essa matriz servirá também, como reservatório de citocinas e fatores de crescimento que serão liberados durante as fases seguintes do processo cicatricial (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO; OLIVEIRA & DIAS, 20120).

Visando a hemostasia, ocorre a ativação da cascata de coagulação e do complemento, juntamente com a liberação de grânulos das plaquetas, esses

grânulos é composto por fator de crescimento de transformação beta (TGF- β), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), além de ocorrer liberação de glicoproteínas adesivas como a fibronectina, trombospondina, prostaglandinas e tromboxanas, importantes constituintes da matriz extracelular provisória (CAMPOS et al., 2007). Transcorre também a produção de numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que atraem as células inflamatórias para o local da ferida como neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. O processo inflamatório caracteriza-se por migração celular intensificada através das vênulas e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares. O aumento do suprimento sanguíneo e da permeabilidade capilar controlam esses eventos, além de vasodilatação presente (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

As primeiras células a chegar à ferida são os neutrófilos, com maior concentração 24 horas após a lesão. Sendo atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana). Além de produzir radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana e são gradativamente substituídos por macrófagos (CAMPOS et al., 2007).

Tanto inicialmente quanto durante o transcorrer do processo cicatricial, os monócitos do sangue periférico, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF, por exemplo. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas, assim como a fagocitose dos componentes celulares, como fibronectina ou colágeno, auxiliam também para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo, migrando para a ferida após 48 - 96 horas da lesão. Os macrófagos liberam citocinas que promovem a resposta inflamatória recrutando e ativando leucócitos adicionais. Sendo responsáveis também por induzir e eliminar células apoptóticas (incluindo neutrófilos), abrindo caminho para a resolução da inflamação. À medida que os macrófagos eliminam essas células apoptóticas, eles passam por uma transição fenotípica para um estado reparador que estimula queratinócitos, fibroblastos e angiogênese para

promover a regeneração tecidual. Desta forma, os macrófagos promovem a transição para a fase proliferativa da cicatrização (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; GUO & DIPIETRO, 2010).

Os linfócitos T migram para o local das feridas com as células inflamatórias e macrófagos, e essa migração é máxima durante a fase final proliferativa ou fase inicial de remodelação. O papel dos linfócitos na cicatrização não está bem definido e permanece controverso. Porém, sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. Aproximadamente, entre seis a sete dias após a lesão inicial, a quantidade de linfócitos que aparece na ferida é menor que na circulação. Com função de secretar fator de inibição da migração (MIF), interleucina-2 (IL-2), fator de ativação de macrófago (MAF) e fatores quimiotáticos, aumentando o estágio inicial da cicatrização através da estimulação de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Porém, sugere-se que os linfócitos T possam equilibrar a atividade fibroblástica exuberante a qual poderia, caso esta regulação não existisse, ocorrer tardiamente na reparação cicatricial (Neto, 2003; OLIVEIRA & DIAS, 2012; LEAL & CARVALHO, 2014).

2.2.3 FASE PROLIFERATIVA

A fase proliferativa normalmente segue e sobrepõe-se parcialmente à fase inflamatória, e é caracterizada pela proliferação epitelial e migração sobre a matriz provisória do interior da ferida (reepitelização), ou seja, é responsável pelo fechamento do tecido lesado propriamente dito. Esta fase tem início ao redor do 4^o dia após a lesão e se estende aproximadamente até o término da segunda semana. Sendo constituída por quatro etapas fundamentais: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; GUO & DIPIETRO, 2010; LEAL & CARVALHO, 2014; SHEDOEVA et al., 2019).

Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são reconstituídas em três dias. Se a membrana basal for lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (CAMPOS et al., 2007).

O fibrinogênio do exsudato inflamatório é transformado em fibrina, formando uma rede, onde os fibroblastos irão depositar-se e iniciar sua multiplicação além de realizar a secreção de componentes proteicos do tecido cicatricial, iniciando então síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno de novos vasos sanguíneos que irão carrear oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (angiogênese). Como consequência da angiogênese, o tecido conjuntivo é formado, recebendo a denominação de tecido de granulação, devido a sua aparência granular, pela presença de inúmeros capilares (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; GUO & DIPIETRO, 2010; OLIVEIRA & DIAS, 2012). Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Ocorrendo então a migração dos fibroblastos dos tecidos vizinhos para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência, onde irão ser ativados pelo PDGF que é o fator de crescimento mais importante na proliferação. Em seguida é liberado o TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a transformarem-se em miofibroblastos, os miofibroblastos é uma célula presente no tecido de granulação, que contém fibras intracelulares de actina e miosina e forma conexões especializadas, conferindo contração da ferida, reduzindo a área de sangramento e facilitando a reepitelização, realizando também a aproximação das margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões. Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese é a redução dos vasos neoformados (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

A proliferação e migração de queratinócitos em direção à parte central da lesão, correspondente ao processo de reepitelização, tem origem nessa fase, pois a área entre o fundo e as bordas da ferida é preenchida com tecido de granulação. Isso caracteriza a matriz na qual os queratinócitos, que se encontram nas bordas das lesões, migram e proliferam. A regeneração da camada basal leva os queratinócitos a proliferarem e se diferenciarem verticalmente, restaurando as características fisiológicas do tecido epitelial multicamadas (TOTTOLI et al., 2020).

2.2.4 FASE DE MATURAÇÃO OU REMODELAMENTO

Após a proliferação robusta e síntese dos componentes da matriz extracelular (MEC), a cicatrização de feridas entra na fase de remodelação final, que começa cerca de três semanas após lesão inicial e pode durar meses e até anos. Nesta fase, ocorre a regressão de muitos dos capilares recém-formados de modo que a densidade vascular da ferida e a recuperação da estrutura tecidual tendem a volta ao normal, além de ser responsável pelo aumento da força de tensil e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Durante esta fase, todos os processos ativados nas fases anteriores são silenciados, macrófagos, células endoteliais isoladas e miofibroblastos entram em apoptose ou são realocados da ferida, deixando uma região rica em colágeno e outras proteínas de deposição de MEC (OLIVEIRA & DIAS, 2012; LEAL & CARVALHO, 2014; TOTTOLI et al., 2020). A característica mais importante desta fase é a deposição de colágeno de maneira organizada. O colágeno produzido inicialmente é mais fino do que o colágeno presente na pele normal, e tem orientação paralela à pele (CAMPOS et al., 2007). As fibras de colágeno, dispostas paralelamente às linhas de tensão, formam feixes de várias unidades inter cruzadas, enquanto as fibras orientadas aleatoriamente são digeridas pela colagenase. Aos poucos os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Consequentemente a lesão irá se tornar mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Fibroblastos e leucócitos irão secretar colagenases e promover lise da matriz antiga. O êxito da cicatrização ocorre quando há estabilidade entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, mesmo após um ano a ferida apresentará um colágeno menos organizado do que o da pele sã, e a força tênsil jamais retornará a 100%, atingindo em torno de 80% após três meses (CAMPOS et al., 2007).

A reepitelização, que é o recobrimento da ferida por novo epitélio também consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão, assim como ocorre durante a fase proliferativa. Esses eventos são regulados por três principais agentes: fatores de crescimento, integrinas e metaloproteases. As interações entre a epiderme e a derme, juntamente com

feedback adicional, permitem a regulação contínua da integridade e homeostase da pele (MENDONÇA & COUTINHO-NETTO, 2009; TOTTOLI et al., 2020).

Vários tipos de células estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas e, como descrito acima, as atividades celulares de qualquer tipo de célula em particular também podem variar durante os diferentes estágios de reparo. A complexidade e a coordenação do processo de cura são os principais obstáculos para as abordagens terapêuticas, uma vez que qualquer terapêutica deve ser efetivamente sequenciada para o estágio apropriado (GUO & DIPIETRO, 2010; LEAL & CARVALHO, 2014).

2.2.5 FASES DA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo à ruptura da estrutura fisiológica da barreira protetora da pele. A maioria das feridas cicatrizam sem complicações e restabelece a homeostase, função de barreira da pele, flexibilidade e a integridade anatômica e funcional em um intervalo de tempo fisiológico de 6 semanas. Sendo definidas como feridas crônicas, as feridas que não passam por esse processo organizado e uma maneira ordenada, a cicatrização do tecido da pele se atrasa, e isso acaba resultando em feridas crônicas, muitas vezes, parando na fase de inflamação da cicatrização (LAUREANO & RODRIGUES, 2011; FRYKBERG & BANKS, 2015; GORECKA et al., 2019; SHEDOEVA et al., 2019; RAZIYEVA et al., 2021).

São várias as razões que podem tornar uma ferida com cicatrização difícil, incluindo condições subjacentes, como úlceras venosas de perna, úlceras arteriais, úlceras do pé diabético, úlceras de pressão, doença vascular, hiperglicemia, isquemia e neuropatia, imobilidade prolongada, neoplasias e alterações nutricionais. Essas condições possuem algumas características comuns compartilhadas, incluindo inflamação prolongada ou excessiva, infecções persistentes, formação de biofilmes microbianos, exsudação, necrose tecidual, reepitelização defeituosa, angiogênese prejudicada, superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS), proteases, células senescentes, bem como a deficiência de CT que são muitas vezes também disfuncionais (FRYKBERG & BANKS, 2015; OLIVEIRA et al., 2019; SHEDOEVA et al., 2019; LAS HERAS et al., 2020; RAZIYEVA et al., 2021). Além de níveis desregulados de citocinas/fatores de

crescimento, e pela presença prolongada de populações de células mieloides, como macrófagos, neutrófilos e monócitos na fase tardia da inflamação. Sendo essa cronicidade nas feridas merecedoras de uma atenção especial, uma vez que são mais frequentes e tendem a estar associadas a doenças comuns na população idosa, que sofrem de condições patológicas, como diabetes mellitus, doença vascular e obesidade, sendo a Diabetes mellitus responsável por afeta todas as quatro etapas no reparo da lesão da pele, fatores esses responsáveis por obstáculos que tem se mostrado habitual na saúde pública do Brasil (VIEIRA & ARAÚJO, 2018; LAS HERAS et al., 2020; RAZIYEVA et al., 2021).

As proteases são fortemente reguladas por seus inibidores em feridas agudas. Já nas feridas crônicas, os níveis de protease ultrapassam os de seus respectivos inibidores, levando à destruição da MEC e degradação dos fatores de crescimento e seus receptores. A destruição proteolítica da MEC além de impedir que a ferida avance para a fase proliferativa, também atrai mais células inflamatórias, acarretando assim o ciclo inflamatório (FRYKBERG & BANKS, 2015).

Os neutrófilos apresentam alterações fenotípicas, diminuição da infiltração e migração celular transendotelial e maior permanência na ferida. Além disso, irá ocorrer uma indução diminuída do perfil de macrófagos nas feridas crônicas, menor atividade antibacteriana e uma falha na comunicação entre os macrófagos e outros fatores importantes, incluindo células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos e CT ou progenitoras do tecido (LAS HERAS et al., 2020).

Além, disso, as células imunes produzem ROS, que irá fornecer defesa contra microrganismos, em baixas concentrações. Em feridas crônicas, no entanto, a prevalência de um ambiente hipóxico e inflamatório aumenta a produção de ROS, que danifica as proteínas da MEC e causa danos celulares. Essa sequência de eventos leva a uma maior excitação de proteases e citocinas inflamatórias (FRYKBERG & BANKS, 2015).

Finalmente, os fibroblastos que são as células incapazes de responder a mediadores inflamatórios e fatores de crescimento, resultando em uma capacidade proliferativa reduzida. Essas anormalidades moleculares e celulares impedem a deposição de MEC e a formação de tecido de granulação, tendo como consequência à formação de feridas crônicas (LAS HERAS et al., 2020).

O tratamento dessas feridas pode ser longo, requer competências médicas específicas e constitui um grande desafio para a medicina moderna. O problema afeta cerca de vinte a 40 milhões de pessoas em todo o mundo, somente nos Estados Unidos, essas feridas afetam cerca de 2,4 a 4,5 milhões de pessoas, atingindo proporções epidêmicas, causando um enorme impacto econômico nos sistemas de saúde e, em última análise, na economia do país e do mundo (FRYKBERG & BANKS, 2015; KUCHARZEWSKI et al., 2019; LAS HERAS et al., 2020). Esse número pode aumentar significativamente devido ao envelhecimento da população e à crescente incidência de doenças da população desenvolvida, como obesidade e diabetes. No Brasil, estudos apontam alta prevalência e incidência de feridas em pessoas idosas. Sendo um fato que preocupa profissionais dos sistemas de atenção à saúde, uma vez que “o envelhecimento da população é acompanhado pelo aumento na prevalência de doenças e agravos crônicos”. Além da cicatrização de feridas prejudicada aumentar o número de procedimentos cirúrgicos, prolonga o tempo de internação e aumenta a suscetibilidade do paciente à infecção, se torna mais prevalentes e mais difíceis de tratar e estão associadas a altos custos de tratamento (FRYKBERG & BANKS, 2015; VIEIRA & ARAÚJO, 2018; KUCHARZEWSKI et al., 2019).

De fato, tem sido descrito que feridas crônicas podem impactar a qualidade de vida tão profundamente quanto doenças cardíacas e renais. Enfrentando alterações na imagem corporal, prejuízos na mobilidade, carência no autocuidado, exercício de atividades diárias limitantes, presença de dor e de desconforto, mau cheiro e restrição de vida social. Além disso, a mortalidade de alguns pacientes com feridas crônicas hoje rivaliza com a de pacientes com câncer (SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019; SHEDOEVA et al., 2019; LAS HERAS et al., 2020).

Assim, não é de surpreender que, nas últimas décadas, um manejo correto e elaborado de feridas crônicas tenha se tornado importante tanto pelo aumento da expectativa de vida quanto pela melhoria da qualidade de vida do ser humano (LAS HERAS et al., 2020).

O modelo de manejo de feridas crônicas envolve diagnóstico cuidadoso da etiologia, controle da infecção, otimização do fluxo vascular para reduzir a isquemia, desbridamento de tecido inviável e alívio da pressão. No entanto, os procedimentos tradicionais de tratamento de feridas com desbridamento, controle

de infecção e curativos tópicos têm uma limitada eficácia, principalmente para o tratamento de feridas crônicas, o que ainda é uma tarefa trabalhosa para profissionais da saúde (GORECKA et al., 2019; KUCHARZEWSKI et al., 2019).

A terapia com CT surgiu como um excitante potencial para a cicatrização de feridas. As CT quando recrutadas em uma ferida, atuam de maneira direta promovendo a mobilização celular, imunomodulação, remodelação da matriz extracelular e angiogênese por secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de melhorar a suprimento sanguíneo para o tecido em desenvolvimento, o que acelera o crescimento da epiderme (GORECKA et al., 2019; KUCHARZEWSKI et al., 2019).

Logo torna-se um desafio o tratamento de feridas, principalmente feridas consideradas crônicas, já que estas, não avançam através de um processo alinhado e propício para promover a integridade anatômica e funcional, perdurando por muitos meses e até anos, possuindo reincidivas frequentes (SILVA et al., 2014).

2.3- O PORCO COMO MODELO DE CICATRIZAÇÃO

Modelos animais são de grande importância para auxiliar no conhecimento da progressão de doenças, além de descobrir e validar drogas terapêuticas, bem como avaliar a farmacodinâmica e seus efeitos colaterais tóxicos. Várias perspectivas devem ser consideradas nesse contexto, como por exemplo, padronização, reprodutibilidade, validade entre estudos e interpretação bidirecional entre espécies e entre diferentes níveis de pesquisa para chegar a conclusões eficientes e importantes. Os modelos animais devem imitar com precisão a função e/ou doença pretendida, ter progênes maiores e sobreviver tempo suficiente para reproduzir o efeito desejado, além de ser relevante ter um acesso facilitado para diferentes grupos de pesquisa. A utilização de animais em um experimento é principalmente para observar a eficácia de uma terapia ou determinar novas opções terapêuticas que possam acelerar o processo de cicatrização de feridas em pacientes humanos (BASSOLS et al., 2014; SESWANDHANA et al., 2021).

Os processos críticos subjacentes à cicatrização de feridas foram inicialmente descritos usando modelos animais (EMING et al., 2014). Embora o surgimento das feridas crônicas que os humanos desenvolvem não sejam

semelhantes as feridas crônicas dos animais, os modelos animais forneceram informações importantes sobre os princípios do manejo de feridas. Como por exemplo, a noção agora aceita de que as feridas que forem mantidas úmidas cicatrizam em um menor espaço de tempo, sendo essa informação apresentada em experimentos de pesquisa com porcos domésticos (HELFMAN et al., 1994; GRADA et al., 2018).

Pequenos mamíferos, como ratos, coelhos, cobaias e camundongos, são frequentemente usados em estudos de cicatrização de feridas devido ao custo, tamanho pequeno e relativa facilidade de cuidado e manuseio. No entanto, a anatomia e a fisiologia dos pequenos mamíferos diferem dos humanos de muitas maneiras (WANG et al., 2001) A resposta de cicatrização dos roedores é semelhante à dos humanos, com a deposição de colágeno levando à formação de cicatrizes. No entanto, o fato de queloides, formação de cicatrizes hipertróficas e aderências intra-abdominais não se desenvolvem, indica que a cicatrização em tais animais não é idêntica à cicatrização de feridas humanas, além de terem características fisiológicas e expressão gênica diferentes. Assim, os modelos de camundongos não podem imitar suficientemente as doenças humanas em alguns casos. Embora também os primatas sejam filogeneticamente próximos dos humanos, eles diferem pelo fato de que a exuberante formação de cicatrizes não é característica de sua resposta de cura, pelo fato de terem muito menos deposição de colágeno do que os humanos (WANG et al., 2001; VELANDER et al., 2008; FAN et al., 2013; GRADA et al., 2018).

No século passado, os suínos tornaram-se altamente relevantes para a pesquisa devido às suas inúmeras semelhanças fisiológicas com os humanos. Reconhece-se que os modelos animais devem não apenas ser fisiologicamente relevantes, mas que as feridas criadas também representam com precisão a condição clínica humana que está sendo examinada. Semelhanças entre pele de porco e humana, modelos de feridas, tamanhos de feridas, bem como métodos de análise empregados são variáveis importantes que influenciam a cicatrização (WANG et al., 2001; SHEU et al., 2014; HAMILTON et al., 2022).

A pele de porco é considerada o melhor modelo experimental para comparações com a pele humana por ter tamanho e homologia semelhantes aos humanos, com espessura da epiderme humana variando de 50 a 120 μm , em

comparação com o porco em 30-140 μm . É um modelo médico adequado em muitas áreas de pesquisa por diversos motivos, devido às suas grandes semelhanças significativas histológicas e funcionais. Esses dois tipos de pele têm espessura semelhante, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, tecido celular subcutâneo e estrutura, além de densidade dos folículos pilosos, conteúdo e estrutura do colágeno e elastina dérmicos, semelhança em algumas células imunes presente e resposta biológica aos fatores de crescimento. Seu tempo de regeneração é de cerca de trinta dias. Talvez o mais importante, na pele de suínos e humanos é que o processo de cicatrização ocorre por reepitelização, diferentemente de mamíferos menores, onde ocorre por contração (FAN et al., 2013; BASSOLS et al., 2014; GRADA et al., 2018; BRASILEIRO et al., 2020; HAMILTON et al., 2022).

Os porcos domésticos mais jovens são geralmente usados pelo fato de serem menores em tamanho, tornando-os relativamente fáceis de manusear e abrigar. Embora as feridas em um animal jovem tende a ter um processo de cicatrizar mais rápido, o processo de cicatrização prossegue ao longo de algumas semanas, o que é suficiente para avaliar aspectos temporais da biologia molecular e celular do processo de cicatrização (WANG et al., 2001).

O modelo de porco é usado para estudar uma variedade de feridas cutâneas, incluindo feridas excisionais de espessura parcial e total, feridas incisionais, feridas induzidas por laser, feridas isquêmicas e queimaduras de segundo grau (GRADA et al., 2018).

O acesso fácil a populações de suínos comerciais, oferece uma oportunidade de usar diferentes fenótipos (e genótipos associados) para finalidade em pesquisas específicas. Diferentes raças de produção comercial (como Large White, Landrace, Iberian e Duroc) podem ser usadas para estudos gerais pela sua facilidade de reprodução, e pelo fato de ter uma maior disponibilidade no mercado de grande variedade de linhagens de suínos naturalmente selecionadas ou transgênicas (BASSOLS et al., 2014).

Sullivan et al. 2001 avaliaram 25 terapias de feridas diferentes e mostraram que, em estudos que podem ser comparados com estudos humanos, os resultados em modelos suínos concordaram com os de estudos humanos em 78% das vezes,

enquanto os resultados de modelos de pequenos mamíferos mostraram apenas 53 e 57% para estudos *in vitro*.

Já Tsai et al. 2019, usaram um modelo de mini porco para avaliar a eficácia do adesivo plaquetário (PP) feito em laboratório na cicatrização de feridas de espessura total induzida. Tendo resultados suficientes na aplicação de um pedaço de PP para obter eficácia comparável versus utilização geral de plasma rico em plaquetas (PRP) ou fibrina rica em plaquetas (PRF) para tratamento de feridas. O desenvolvimento do primeiro modelo de cicatrização de feridas com deficiência diabética para estudos em animais de grande porte foi descrito por (VELANDER et al 2008).

Brasileiro et al. 2020, descobriram que a Nifedipina (NFD) tópica pode ter impacto nos mecanismos de cicatrização de feridas cutâneas, uma vez que o estudo em questão mostrou que as células polimorfonucleares e a proliferação vascular aumentaram e a formação de colágeno diminuiu. Concluindo no trabalho que o NFD tópico pode ter um impacto positivo na cicatrização de feridas cutâneas.

Estudo recente apresenta sucesso no desenvolvimento de um adesivo de hidrogel GelMA impresso em 3D com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) incorporado para ser usado como curativo, mostrando uma aceleração na cicatrização de feridas, promovendo a deposição de colágeno e a angiogênese no local da ferida (JANG et al., 2021). Outro estudo recente discute que a pomada de extrato de *Chlorella vulgaris* contendo 15% de extrato dá os melhores resultados na aceleração do processo de cicatrização de feridas na orelha do porco por ter um aumento no número de células fibroblásticas (MACHMUD et al 2020).

Essas e outras descobertas mostram que o porco é mais adequado do que os modelos de pequenos animais para simular a cicatrização de feridas humanas (VELANDER et al., 2008).

2.4- TERAPIA CELULAR COM CELULAS-TRONCO

Centenas de células compõem o organismo do ser humano, desde o processo de fecundação onde existe uma intensa produção celular, até as células que dão origem a tecidos que formam os órgãos do indivíduo. Essas células são denominadas de CT que são definidas como células indiferenciadas que tem a capacidade de se proliferar, produzir células funcionais diferenciadas e se

regenerar após uma lesão. Além disso são capazes de autorrenovação prolongada através de consecutivas segmentações mitóticas do tipo assimétrica, sendo suscetível de criar pelo menos uma variedade celular em fase mais avançada de diferenciação. Essa capacidade é dependente da origem e potencialidade das CT, podendo ser isoladas e caracterizadas por sua origem como embrionárias, adultas e CT pluripotentes induzidas (SILVA, 2017; ALVES et al., 2019; VOGA et al., 2020; MORAES et al., 2021). As primeiras derivam da massa celular de um embrião, possuem a habilidade de se especializar em diferentes tipos celulares. São encontradas nos primeiros dias de vida de um embrião, extraídas de blastocistos, embriões pré-implantação compostos de dois tipos de células: aquelas que vão dar origem a placenta, e as que darão origem a todos os tecidos do indivíduo adulto. As CT adultas que não apenas têm potencial semelhante a outras CT, mas também são as responsáveis pela renovação, reparo e remodelagem dos tecidos (SILVA, 2017; ALVES et al., 2019). A capacidade destas células de regular suas taxas de proliferação e diferenciação conforme a necessidade dos tecidos nos quais residem é um ponto central para a manutenção da homeostase dos órgãos, encontram-se em locais específicos no organismo adulto, como gordura, pele, medula óssea, sangue, fígado, polpa dentária, pele ou músculo esquelético, podendo gerar subtipos celulares de tecidos dos quais derivam. Considerando sua fase de desenvolvimento e diferenciação, são ainda classificadas como células totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (SILVA, 2017; ALVES et al., 2019; MAZINI et al., 2019; VOGA et al., 2020).

As CT totipotentes apenas estão presentes em um embrião muito precoce durante o estágio de mórula antes do início da gastrulação. Eles são capazes de originar um organismo totalmente funcional e possuem a capacidade de originar todos os tecidos do organismo incluindo anexos embrionários, além do sistema nervoso central e periférico. As divisões subsequentes de células durante o desenvolvimento embrionário inicial levam ao surgimento do blastocisto com células tronco embrionárias (ESC) pluripotente presente na massa celular interna que são capazes de originar qualquer tipo de tecido, porém não originam um organismo completo, já que não são capazes de gerar tecidos embrionários (SILVA, 2017; VOGA et al., 2020; MORAES et al., 2021). Com o desenvolvimento da célula, as ESC pluripotentes perdem gradualmente sua pluripotência e se tornam

multipotentes. O estágio multipotente é caracterizado pela capacidade das células de se diferenciarem em células específicas limitadas. Estas são caracterizadas de acordo com o órgão do qual provém e podem criar apenas células deste órgão, possibilitando a regeneração tecidual local. Essas células multipotentes podem se diferenciar em diferentes células do sistema imunológico, eritrócitos e plaquetas (VOGA et al., 2020; MORAES et al., 2021).

2.4.1 CELULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

Dentre os tipos celulares de CT, existem as CTMs, que são CT adultas caracterizadas por apresentar morfologia fusiforme, aderência ao plástico, alta taxa proliferativa e pela habilidade de se diferenciar em tipos celulares especializados, como osteoblastos, adipócitos, condrócitos e mioblastos. Além disso, as CTMs apresentam perfil de marcadores positivos para CD29+, CD44+, CD71+, CD73+, CD105+, CD90+, CD166+ e negativos para marcadores hematopoiéticos CD45-, CD14-, CD34-, CD133- e HLA-DR- (SILVA, 2017; ALVES et al., 2019). São células multipotentes e podem ter a capacidade de originar tecidos semelhantes aos das ESC. Também possui função de modulação imunológica; as CTMs são grandes secretoras hormonais e são muito importante no processo inflamatório por secretar substâncias de caráter anti-inflamatório (ALVES et al., 2019).

A capacidade das CTMs de atingir o local da lesão, vai depender do efeito terapêutico, o que é possível devido à sua capacidade de migrar, aderir e enxertar em um tecido-alvo. Vários fatores prejudicam a eficácia terapêutica do transporte das CTMs. Entre eles, as condições da cultura, o número de passagens, a idade do doador, o método de entrega e a receptividade do hospedeiro são fatores que exercem papéis importantes. Tem sido evidenciado que células recém-isoladas em comparação com células cultivadas *in vitro* têm maior eficiência de enxerto, fato que pode ser resultado do processo de envelhecimento/diferenciação que as células sofrem em situações de cultura *in vitro*. As condições de cultivo também têm um impacto significativo na capacidade de transporte, podendo modificar a expressão dos marcadores de superfície envolvidos nesse processo (MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019).

Para evitar a confusão no campo da pesquisa com CT adultas, em 2006, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e de Tecidos da Sociedade Internacional

de Terapia Celular (ISCT) propôs critérios básicos para a definição de células estromais mesenquimais humanas multipotentes, cujo nome evoluiu para CTMs, estabelecendo vários critérios de definição para a identificação de MSCs: (1) devem ser aderentes ao plástico em condições de cultura padrão, (2) expressar a superfície marcadores CD105, CD90 e CD73; (3) não expressam outros marcadores de linhagem CD45 (panleucócito), CD34 (hematopoiético e endotelial), CD14/CD11b (monocítico), CD79a/CD19 (célula B) ou antígeno leucocitário humano (HLA) classe II; e (4) mostram a clássica diferenciação da trilha em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019; ULLAH et al., 2019; VOGA et al., 2020).

A presença de CTMs nos tecidos adultos é suportada pelos microambientes especializados, denominados nichos. Sendo esses, compostos por células vizinhas, matriz extracelular e fatores de sinalização derivados desses compartimentos, entretanto, a complexidade e inclusão destes elementos não estão ainda bem estabelecidas. O nicho ajusta o comportamento das CTMs às necessidades do organismo, ocorrendo a reprogramação de CT e progenitores comprometidos, para restringir a expansão excessiva das células no tecido circundante evitando sua depleção (SILVA, 2017).

A propósito as CTMs secretam diferentes quimiocinas e citocinas e proteínas da MEC envolvidas em vários processos biológicos, incluindo hematopoiese, angiogênese, tráfico de leucócitos, respostas imunes e inflamatórias. Sendo muito promissoras as evidências na terapia baseada em CTMs, proporcionando o transplante alogênico sem a necessidade de imunossupressão (MAZINI et al., 2019).

As CTMs podem ser extraídas de diferentes tipos de tecidos principalmente osso, cartilagem e tecido adiposo (ULLAH et al., 2019). Sendo isoladas pela primeira vez em cobaias (*Cavia porcellus*) por Friedenstein et al. (1974). Eles depositaram medula óssea em placas de cultivo e após algumas horas removeram as células não aderentes, descartando, portanto, a maioria das células hematopoiéticas. Observando que as células possuíam alta clonicidade e morfologia fibroblástica e aderência ao plástico (QUEIROS, 2017). Desde então, as CTMs foram isoladas de uma variedade de outros tecidos, como em tecido perivasculatura (Crisan et al., 2008), polpa dentária (Gronthos et al., 2000),

músculo, derme (Young et al., 2001), tecido fetal (Campagnoli et al., 2001), incluindo a geléia de Wharton de cordões umbilicais (Wang et al., 2004) e tecido adiposo (Zuk et al., 2002). Tendo em vista o isolamento em CTMs, dessa variedade de tecidos, sugere-se que esse tipo celular esteja presente em todos os tecidos e órgãos pós-natais (SILVA, 2017).

O fato das CTMs manterem a capacidade de se diferenciar em linhagens celulares especializadas *in vitro*, apresentarem relativa facilidade de obtenção, podendo ser isoladas de várias fontes, seu alto rendimento de células na coleta e suas propriedades imunológicas especiais tornam as CTMs uma ferramenta promissora para terapia celular e regeneração tecidual. Foram conduzidos até agora muitos estudos para investigar a segurança das terapias baseadas em CTMs. Sendo observado em ensaios clínicos com CTMs humanas, cultivadas *in vitro*, que essas são menos suscetíveis a alterações adversas (SILVA, 2017; MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019; VOGA et al., 2020).

LALU et al., 2012 analisaram ensaios clínicos em que foram utilizadas CTMs derivadas de medula óssea (MO), após uma revisão sistemática de 36 estudos, eles descobriram que não havia relação entre o uso de CTMs e o potencial tumorigênico, não sendo relatado nenhum efeito colateral grave da terapia. Em um outro estudo com duração de 25 meses, foram examinados 34 pacientes, com o objetivo de avaliar a viabilidade, segurança e efeitos imunológicos da administração intratecal e intravenosa de CTMs autólogas afirmando não ter sido observados efeitos adversos graves resultantes da terapia utilizada (KARUSSIS et al., 2011; MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019)

As CTMs são originadas de diferentes lugares do corpo e são formadas em diferentes momentos de nossas vidas, sendo apresentada seus principais meios de obtenção: medula óssea, cordão umbilical e tecido adiposo (MAZINI et al., 2019).

2.4.2 MEDULA ÓSSEA (MO)

A MO é uma das principais fontes de isolamento de CTMs, além de ser o tecido no qual essas células foram identificadas pela primeira vez, no entanto as CTMs derivadas da MO têm menor potencial de diferenciação e tempo de vida máximo, que diminui com o passar dos anos do indivíduo. A coleta de medula óssea

é um procedimento altamente invasivo e doloroso que implica anestesia geral ou bloqueio regional. As CTMs derivadas da MO constituem uma população rara, com apenas 0,002% da população total de CT, e seu isolamento depende do estado do paciente e do volume de aspirados. Essas células foram relatadas como CT multipotentes sendo capazes de se diferenciar em adipogênicas, condrogênicas e são mais prováveis de progenitores osteogênicos (MAZINI et al., 2019; MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019; MORAES et al., 2021).

2.4.3 CORDÃO UMBILICAL (UC)

Curiosamente, fontes ricas de CTMs incluem tecidos associados ao nascimento que são tratados como lixo médico, como placenta, cordão umbilical, líquido amniótico e membrana amniótica. Acredita-se que entre esses tecidos, o sangue do cordão umbilical contenha CTMs, porém o uso dessa fonte é questionado por alguns pesquisadores devido a presença de um isolamento de baixa eficiência (MUSIAŁ-WYSOCKA et al., 2019). O UC é uma grande fonte de CT, no entanto, pode ser obtido apenas em um único momento da vida e possui características semelhantes às células da MO. A obtenção do UC é uma alternativa mais segura, livre de risco e que não oferece dor para mãe ou para o neonato (MORAES et al., 2021). Essas células podem ser isoladas de diferentes partes da UC, incluindo geléia de Wharton, revestimento do cordão e região perivascular. Em comparação com o MO, a frequência das CTMs foi limitada, no sangue do UC, enquanto foi mantida sua multipotência por períodos mais longos. Sendo as CT derivadas do UC conhecidas por secretar fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, aperfeiçoando diferentes mecanismos de reparo celular (MAZINI et al., 2019).

2.4.4 TECIDO ADIPOSEO (TA)

O TA subcutâneo corresponde a uma fonte de obtenção expressiva de CTMs devido à grande quantidade destas no mesmo, se originam das camadas mesodérmicas, são CT adultas que não apenas têm potencial semelhante a outras CT, mas também se diferenciam em células das outras duas camadas germinativas. Possuindo alta variedade celular, esses tecidos são formados por

adipócitos maduros em sua maior parte, pré-adipócitos, fibroblastos, células de músculo liso da fração vascular, células endoteliais, monócitos, macrófagos e linfócitos. Deste modo, exibe um alto potencial de uso na terapia celular, uma vez que apresenta alta capacidade de autorrenovação e grande habilidade de se diferenciar em variados tipos celulares (LI & GUO, 2018; MORAES et al., 2021).

O TA corresponde em um número 100 a 500 vezes maior de CT em comparação com a MO, o que torna as CT derivadas do tecido adiposo (ASCs) uma fonte atraente para a utilização em humano. As ASCs mostram impactos terapêuticos na angiogênese, cicatrização de feridas e no sistema imunológico. Os estudos sobre testes em humanos utilizando ASCs vêm aumentando gradativamente, desde de seu primeiro isolamento e classificação no ano de 2001. Comumente, as ASCs podem ser isoladas do TA coletado em pacientes e injetadas diretamente nas feridas, na corrente sanguínea ou encapsuladas em biomateriais e introduzidas nas feridas. Muitos trabalhos mostraram que as ASCs podem aumentar a taxa de cicatrização e diminuir o tempo de cicatrização *in vitro* e *in vivo* (HASSAN et al., 2014; CHU et al., 2019; SI et al., 2019). Atualmente essas células são isoladas do TA subcutâneo, o que permite que sejam rapidamente obtidas em grande número e com alta atividade celular. Sua frequência abriga cerca de 2% em sua fração vascular estromal (SVF), e é considerada a maior em todos os tecidos, às vezes chegando a 30%. A Federação Internacional de Terapêutica Adiposa (IFATS) junto com o Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) concordam com o menor nível de expressão dos marcadores associados ao estroma CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD106 na SVF, ao contrário das ASCs cultivadas (MAZINI et al., 2019).

ASCs de doadores mais jovens exibiram maior taxa de proliferação quando comparados a idosos, mas a capacidade de diferenciação foi mantida com o envelhecimento, tendo vantagens sobre as CTMs derivadas da MO. Também foi mantido das ASCs o seu potencial de diferenciação em células de origem mesodérmica, comumente conhecidas por sua baixa imunogenicidade e efeitos moduladores. A qualidade das ASCs depende do método de purificação e das condições de armazenamento. As células devem ser avaliadas cuidadosamente com base na estabilidade, toxicidade, contaminações e senescência em cultura (CHU et al., 2019; MAZINI et al., 2019).

2.4.5 IMPORTANCIA DAS CTMs NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Sendo a cicatrização de feridas um processo complexo e multicelular onde fibroblastos e queratinócitos desempenham um papel fundamental na regeneração de feridas, remodelação de tecidos e deposição de matriz extracelular. Além das CTMs conseguirem se diferenciarem em fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, elas secretam algumas citocinas que podem promover sua proliferação e migração, podendo também inibir a proliferação e migração excessiva de fibroblastos da cicatriz hipertrófica e reduzir a expressão de citocinas relacionadas (LI & GUO, 2018).

Alcançando o tecido alvo, as CTMs secretam uma variedade de fatores com importantes efeitos imunomoduladores, angiogênicos e antiapoptóticos. Quando os tecidos são lesionados, são liberadas naturalmente na circulação, CTMs que irão migrar para o local da lesão e liberar moléculas para criar um microambiente que possibilita a regeneração. Deste modo, o conceito por trás de seu potencial terapêutico é que as CTMs transplantadas alogênicamente podem alojar tecidos danificados e atuar como uma “drogaria” para auxiliar na regeneração ou servir como um efector para a recuperação de tecidos (ULLAH et al., 2019).

A cicatrização retardada de feridas é muitas vezes recorrente de uma variedade de mecanismos celulares e moleculares inapropriados. Muitas vezes leva à presença de feridas crônicas, acompanhada de desconforto para o paciente. Devido ao seu potencial anti-inflamatório e regenerativo, as CTMs podem ser potencialmente uma opção de tratamento viável, para o tratamento de feridas crônicas com inflamação grave e resposta hiperplástica. Diversos estudos utilizando modelos animais demonstram benefícios no tratamento com CTMs na cicatrização de feridas em cabras (PRATHEESH et al., 2017), ovelhas (MARTINELLO et al., 2018), cavalos (TEXTOR et al., 2018) e cães (JOHNSON et al., 2017). A melhora significativa de feridas foi documentada em vários estudos usando terapia com CT (VOGA et al., 2020).

Com envelhecimento natural, nossas células e órgãos vão perdendo suas funções, sofrendo perdas irreversíveis com o passar dos anos. Com o progresso da tecnologia e os crescentes estudos científicos sobre o emprego de CT, é possível reverter ou reparar estes danos que sofremos ao longo dos anos, sendo

estes causados por envelhecimento ou por injúria no tecido. O uso de CTMs de diferentes fontes surgiu como uma alternativa única para estratégias de tratamento de feridas para vários distúrbios relacionados à pele para ter uma pele quase natural em termos de aparência, textura, cor e propriedades metabólicas (ALVES et al., 2019; MAZINI et al., 2019).

2.5- COMPONENTES DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS TRONCO

Inicialmente, considerava-se que os efeitos terapêuticos das CTMs eram exercidos através de migração para locais de injúria tecidual, e em seguida, diferenciava-se em células desejadas para regeneração tecidual, agora é aceito que as CTMs transplantadas não sobrevivem por muito tempo e que os efeitos das terapias baseadas em CTMs são devido a um conjunto extenso de fatores bioativos secretados, denominados coletivamente como secretoma. O reconhecimento de que os fatores secretados pelas CTMs são responsáveis pelos efeitos favoráveis das CTMs no reparo tecidual é significativo, pois estimula a configuração de terapias baseadas em CTMs que não requerem a administração das próprias células, evitando assim crescimento tumoral indesejado ou reações imunes negativas (KESHTKAR et al., 2018; HARMAN et al., 2021).

Vários estudos investigaram os efeitos terapêuticos positivos atribuídos aos fatores parácrinos derivados de CTMs em diferentes distúrbios, como neuroproteção, neurogênese, proteção miocárdica, inflamação, regeneração óssea e cartilaginosa em doenças imunológicas, doenças neurológicas, lesão hepática, insuficiência renal aguda e doenças cardiovasculares. Desta forma, através da secreção parácrina ou diretamente, as CTMs induzem a regeneração para resgatar células lesadas, diminuindo a lesão tecidual e, finalmente, acelerando o reparo de órgãos (KESHTKAR et al., 2018; GOWEN et al., 2020).

2.5.1 SECRETOMAS

O secretoma é definido como o conjunto de moléculas e fatores biológicos que são secretados por praticamente todos os tipos de células, incluindo as CT, para o espaço extracelular, em geral é uma mistura de fatores solúveis e moléculas

associadas a vesículas extracelulares VEs, são partículas delimitadas por bicamadas lipídicas de vários tamanhos e complexidades que são compostas por proteínas e ácidos nucleicos. Fatores solúveis, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, podem ser identificados no secretoma celular, em várias concentrações e níveis de atividade, estabelecidos pelo tipo de célula e ambiente. Além disso, ainda são compostos por fatores de crescimento, fatores angiogênicos, hormônios, citocinas, proteínas da MEC e proteases, mediadores lipídicos e material genético, sendo os dois últimos observados em baixa abundância (FERREIRA & GOMES, 2018; DANESHMANDI et al., 2020; HARMAN et al., 2021).

É altamente funcional a composição do secretoma, de acordo com o tipo celular e dos estímulos microambientais. Entretanto, na maioria das vezes, o secretoma de CT é conhecido por ter benefícios terapêuticos para o reparo tecidual, abrangendo efeitos pró-angiogênicos, antiapoptóticos, antifibróticos, anti-inflamatórios e imunomoduladores (DANESHMANDI et al., 2020).

Primeiramente, é importante ressaltar que as CTMs isoladas de diferentes origens teciduais apresentam variações em seu perfil secretor que podem ser utilizadas com vantagem para suas aplicações. Tal como, o secretoma das ASC consiste em um conjunto extenso de fatores angiogênicos, conseqüentemente, pode ser favorito sobre o secretoma de CTMs da MO para a regeneração de tecidos mediada pela angiogênese. Também o secretoma das ASC pode ser escolhido para aplicações neurorregenerativas devido às suas maiores capacidades na melhoria do crescimento axonal neuronal. O secretoma de CTMs da geléia de Wharton é considerado mais apropriado para neurogênese e angiogênese em relação ao uso de CTMs da MO. Já o secretoma de CTMs isoladas tanto da MO quanto da placenta tem efeitos divergentes nas propriedades funcionais das células progenitoras endoteliais (EPCs); uma das populações celulares essenciais na neovascularização (DANESHMANDI et al., 2020).

Embora as classes de moléculas existente especificamente no secretoma das CTMs sejam similares às encontradas em outros tipos celulares, seu potencial terapêutico é único. Sendo as VEs a parte mais bem estudada e dinâmica do crescente campo dos secretomas (FERREIRA & GOMES, 2018).

2.5.2 VESICULAS EXTRACELULARES (VEs)

VEs são vesículas de membrana secretadas por vários tipos de células em vários fluidos fisiológicos, como urina normal, sangue, líquido de lavagem brônquica, leite materno, saliva, líquido cefalorraquidiano, líquido amniótico, líquido sinovial e ascite maligna, e podem ser isoladas por meio de várias tecnologias convencionais e de alto rendimento. Elas são conhecidas por carregar uma variedade de tipos de RNA, incluindo mRNA e miRNA, proteínas solúveis e proteínas transmembrana que podem ser transferidos para células vizinhas, modificando seu fenótipo e o microambiente. As assinaturas moleculares dos VEs são seletivas para cada tipo de célula/tecido, transformando-as em uma fonte ideal para aplicações clínicas (NAWAZ et al., 2016; QUEIROZ, 2017; KESHTKAR et al., 2018).

Essas VEs são secretadas por diversos tipos de células, incluindo células T, células B, células dendríticas, plaquetas, mastócitos, células epiteliais, células endoteliais, células neuronais, células cancerosas, oligodendrócitos, células de Schwann, células embrionárias, e também por CTMs. Elas executam suas funções em muitos processos incluindo comunicação intercelular, reciclagem de proteínas de membrana e lipídios, imunomodulação, senescência, angiogênese, proliferação celular e diferenciação, além de melhorar a vascularização, a regeneração do sistema nervoso central e cardíaco, também foi descrito seu potencial no auxílio das terapias contra o câncer. Em algumas situações, como coagulação ou inflamação, as VEs não são apenas mensageiras, mas necessárias para coordenar o desenvolvimento de processos de sinalização (QUEIROZ, 2017; FERREIRA & GOMES, 2018; KESHTKAR et al., 2018).

Apesar de terem sido atribuídas muitas funções as VEs, especialmente o envolvimento na comunicação celular, ainda são pouco compreendidas suas funções *in vivo*. Provavelmente ainda existem funções e efeitos relevantes que permanecem anônimos, ainda sendo pouco estudados os efeitos imunológicos das VEs liberadas por diferentes células em estados patológicos. Em contrapartida, como se sabe que a classificação de moléculas para essas vesículas e os padrões de liberação de VEs refletem seu tipo de célula de origem e estado fisiológico, a

parte das VEs dos fluidos extracelulares pode ser muito esclarecedora (PARK et al., 2019).

As CTMs também são muito flexíveis a mudanças ambientais, apresentando diferentes características de secreção e fenótipos diante de diferentes estímulos *in vitro*, o que pode estar relacionado ao seu grande desempenho em responder a diferentes ambientes inflamatórios ou lesados, *in vivo*. Estudos mostram que vesículas extracelulares de célula tronco mesenquimais (CTMs-VEs) têm propriedades regenerativas e antiinflamatórias em modelos animais de cicatrização de feridas. Além disso, VEs liberadas de osteoblastos ajuda no mecanismo de informação entre osteoblastos e osteoclastos por meio de interações receptor-ligante para favorecer a formação de osteoclastos, representando um novo mecanismo de remodelação óssea (NAWAZ et al., 2016; PARK et al., 2019; GOWEN et al., 2020).

São liberados no microambiente extracelular das células, inclusive nos fluidos corpóreos, vários tipos de vesículas com propriedades fisiológicas, conteúdo e funções diferentes. Dentre elas estão os exossomos (Exos), microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos (CA) (Fig. 1). Estas vesículas têm sido estudadas com o auxílio de uma variedade de processos de isolamento e foram categorizadas de acordo com suas propriedades estruturais e bioquímicas distintas. O mecanismo pelo qual a vesícula é liberada da célula consiste no primeiro passo para padronização de nomenclatura, que consiste em ser por fusão e exocitose dos corpos multivesiculares, por protrusão da membrana plasmática ou se for por liberação vesicular após morte ou apoptose da célula (QUEIROZ, 2017).

Infelizmente, é bastante aceito que nenhum dos métodos atuais para isolamento de VEs pode seguramente purificar uma classe da outra. Além de que, a busca por biomarcadores exclusivos definitivos para cada subtipo é desafiadora. Com isso, recentemente, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares recomenda o uso do termo VEs de forma abrangente, apesar disso, ainda é comum observar na literatura uma desorganização sobre os termos Exos e MVs. No entanto, como essa área de pesquisa ainda é precoce, essas definições são flexíveis, pois é provável que a comunidade científica esteja trabalhando com misturas de subtipos. Particularmente, o termo microvesículas tem sido frequentemente usado largamente para vesículas de membrana,

independentemente de sua origem intracelular, incluindo Exos e vesículas de desprendimento. Apesar dos Exos serem menores e homogêneos em tamanho, enquanto que as MVs e CA possuem tamanhos heterogêneos (KATSUDA et al., 2013; QUEIROZ, 2017; FERREIRA & GOMES, 2018).

2.5.3 EXOSSOMOS (Exos)

Os Exos são nanovesículas com 30 a 150nm de tamanho e se formam a partir de corpos multivesiculares (CMV). Estes CMV são oriundos do endossomo tardio da célula e se fundem com a membrana plasmática liberando seu conteúdo. Enquanto pesquisadores cultivavam reticulócitos, eles foram observados e descritos pela primeira vez. Os Exos estão envolvidos na comunicação intercelular possibilitando troca de proteínas e lipídios entre as células produtoras e alvo (QUEIROZ, 2017).

Durante sua biogênese os Exos são preenchidos com proteínas, RNA e lipídios derivados da célula hospedeira, sendo realizado pela via endocitose-exocitose quando as células absorvem pequenas quantidades de fluido intracelular em uma região específica da membrana e compoem endossomos precoces. Inicialmente o endossoma inicial amadurece e se expande em um endossoma tardio; então são formados por brotamento interno da membrana endossomal, vesículas intraluminais ou MVBs. Posteriormente os MVBs se fundem à membrana celular e são liberados no ambiente extracelular. Sendo as vesículas então denominadas de Exos, A comunicação intercelular mediada por Exos é atingida por fusão direta da membrana, endocitose mediada por receptor, fagocitose, cavéolas e micropinocitose (QUEIROZ, 2017; KESHTKAR et al., 2018; KOU et al., 2022).

Em condições normais e patológicas, diversos tipos de células em vários fluidos corporais e sobrenadantes celulares podem secretar Exos. Essas minúsculas vesículas contêm proteínas, lipídios e ácidos nucléicos específicos que podem ser transmitidos e servem como moléculas de sinalização para modificar a função de outras células (KOU et al., 2022).

Como não há nenhum marcador específico de Exos, as proteínas presentes em grande quantidade são usadas para sua detecção, e liberadas por exocitose regulada por p53 e sob o controle da via de ativação do citoesqueleto, não sendo

afetada pelo cálcio. Os Exos contêm grandes quantidades de anexinas, tetraspaninas, como CD63, CD81 e CD9, e proteínas de choque térmico, incluindo Hsp60, Hsp70 e Hsp90. Expressando também, Alix, gene de suscetibilidade tumoral 101 (Tsg101) e clatrina. São encapsulados em uma membrana de dupla camada que protege seu conteúdo, permitindo assim que eles se movimentem por longas distâncias nos tecidos. Essa membrana possui porções pequenas de fosfatidilserina, mas grandes porções de colesterol, ceramida e esfingolipídios. Também sendo responsável por carrear mRNAs e miRNAs funcionais que podem ser transportados entre as células. Exos liberados por tumores contêm DNA genômico de DNA de fita simples, cDNA e um elemento transponível (QUEIROZ, 2017; KESHTKAR et al., 2018; KOU et al., 2022).

Quando os Exos são liberados no ambiente extracelular, os possíveis mecanismos pelos quais os Exos se comunicam com as células alvo incluem, entrar nas células por captação endocítica ou por fusão direta das vesículas com a membrana celular. Podendo também transmitir seu conteúdo através da adesão à superfície celular mediada pela interação de um receptor lipídico-ligante. Sendo essas interações indicação de que os Exos possuem papéis fundamentais na comunicação célula a célula e na modulação imunológica em diferentes condições fisiológicas e patológicas (QUEIROZ, 2017; KESHTKAR et al., 2018).

2.5.4 MICROVESÍCULAS (MVs)

As MVs ou vesículas de descamação, são formadas por brotamento externo da membrana celular em diferentes tipos de células que envolve a reorganização do citoesqueleto além de também ser dependente da concentração de cálcio intracelular. São grandes vesículas membranosas com mais de 100 nm (100 – 1000nm) de diâmetro que após a protrusão da membrana plasmática, ocasionando o seu desprendimento que irá resultar na formação das MVs (QUEIROZ, 2017; KESHTKAR et al., 2018). A diferença da biogênese das MVs daquela dos Exos, é que uma vez que são liberadas do brotamento externo e da fissão da membrana plasmática, a célula é estimulada ou apoptótica. Porém, eles compartilham características de alta biocompatibilidade, baixa imunogenicidade e

direcionamento, além de poderem ser usadas como carreadores de drogas (KOU et al., 2022).

Notavelmente, as MVs contêm grandes quantidades de proteínas contendo fosfatidilserina e são ricas no marcador de superfície CD40, bem como em colesterol, esfingomiéline e ceramida. Eles carregam uma carga de proteínas, lipídios, mRNAs e microRNAs e se comunicam com as células receptoras por interações receptor-ligante específicas. Conseqüentemente, as VEs de CTMs transmitem informações e se comunicam com as células-alvo por meio de substâncias internas, alterando assim a atividade e a função das células-alvo (KESHTKAR et al., 2018; KOU et al., 2022).

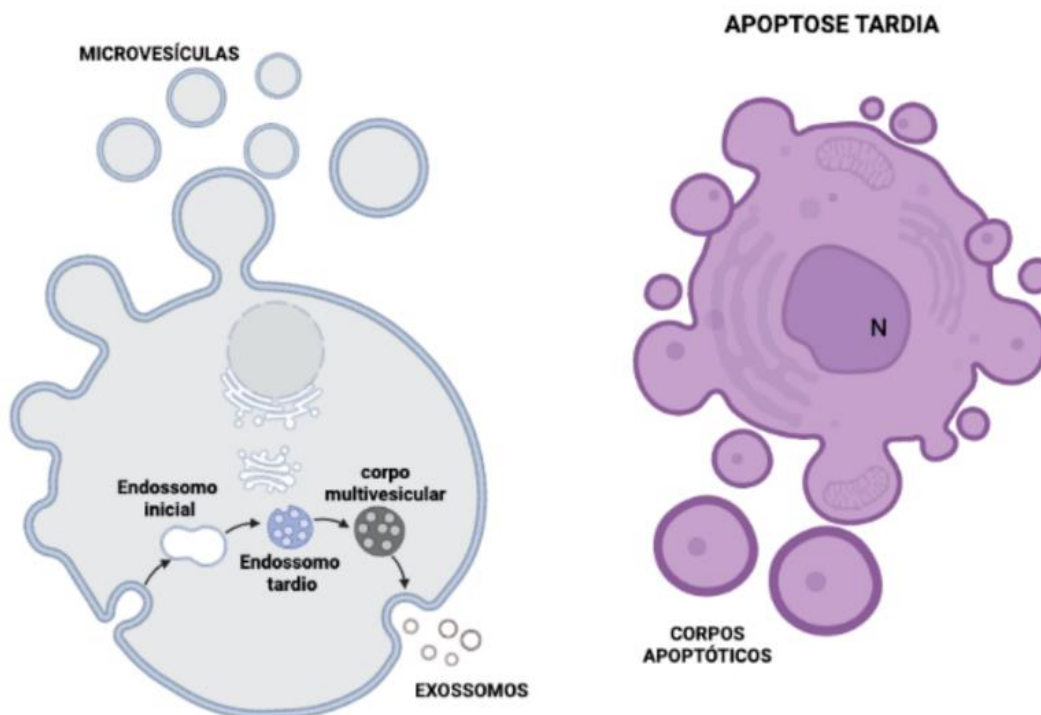
Já foi comprovada através de estudos, a presença de proteínas específicas nas MVs, além das proteínas presentes na membrana plasmática e citosol. Células em repouso podem liberar MVs, apesar da taxa de liberação aumentar dramaticamente após estímulo. Além disso, o cálcio induz grade resposta de liberação de MVs (QUEIROZ, 2017).

As MVs podem alterar as células-alvo funcionais ao fornecer proteínas intracelulares; por exemplo, as MVs liberadas das células endoteliais podem propiciar a angiogênese por meio da transferência de moléculas pró-angiogênicas, como fatores de crescimento e seu ativador. Podendo também transferir informações genéticas horizontalmente para células-alvo (KESHTKAR et al., 2018).

2.5.5 CÉLULAS APOPTÓTICAS

Células apoptóticas ou em processo de morte liberam vesículas que são condensados remanescentes das células abordados como CA. Os CA são um produto da apoptose e contêm o biomaterial da célula que está morrendo. Seu tamanho varia de 50 a 5000 nm. O termo CA surgiu em 1972 e são definidos por externalização de fosfatidilserina, podendo conter fragmentos de DNA. Transferência horizontal de oncogenes transferência horizontal de DNA e apresentação de epítomos de células T para células fagocíticas são exemplos de funções dos CA (QUEIROZ, 2017; FERREIRA & GOMES, 2018).

FIGURA 1. Representação da biogênese de diferentes classes de vesículas extracelulares.



FONTE: Imagem cedida gentilmente por BRAVO et al., (2022).

3. OBJETIVO

3.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o envolvimento das vesículas extracelulares extraídas de CT do tecido adiposo, na cicatrização de lesões cutâneas excisionais produzidas cirurgicamente no dorso de suínos hípidos.

3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Esse trabalho busca elucidar a importância da utilização das vesículas extracelulares na cicatrização de feridas, em lesões realizadas na pele de suínos hípidos. Analisando a taxa de cicatrização por redução da área de lesão em diferentes concentrações do princípio ativo, além de avaliação histológica do tecido cicatricial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - RESPALDO ÉTICO DA PESQUISA

Este experimento seguiu os princípios éticos e legais de conduta de experimentação animal da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da UnB, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), desta Instituição pelo SEI n.º 23106.104828/2021-96 (Anexo I), encontrando-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.

4.2- COLETA DE MATERIAL PARA PRODUÇÃO DE CT

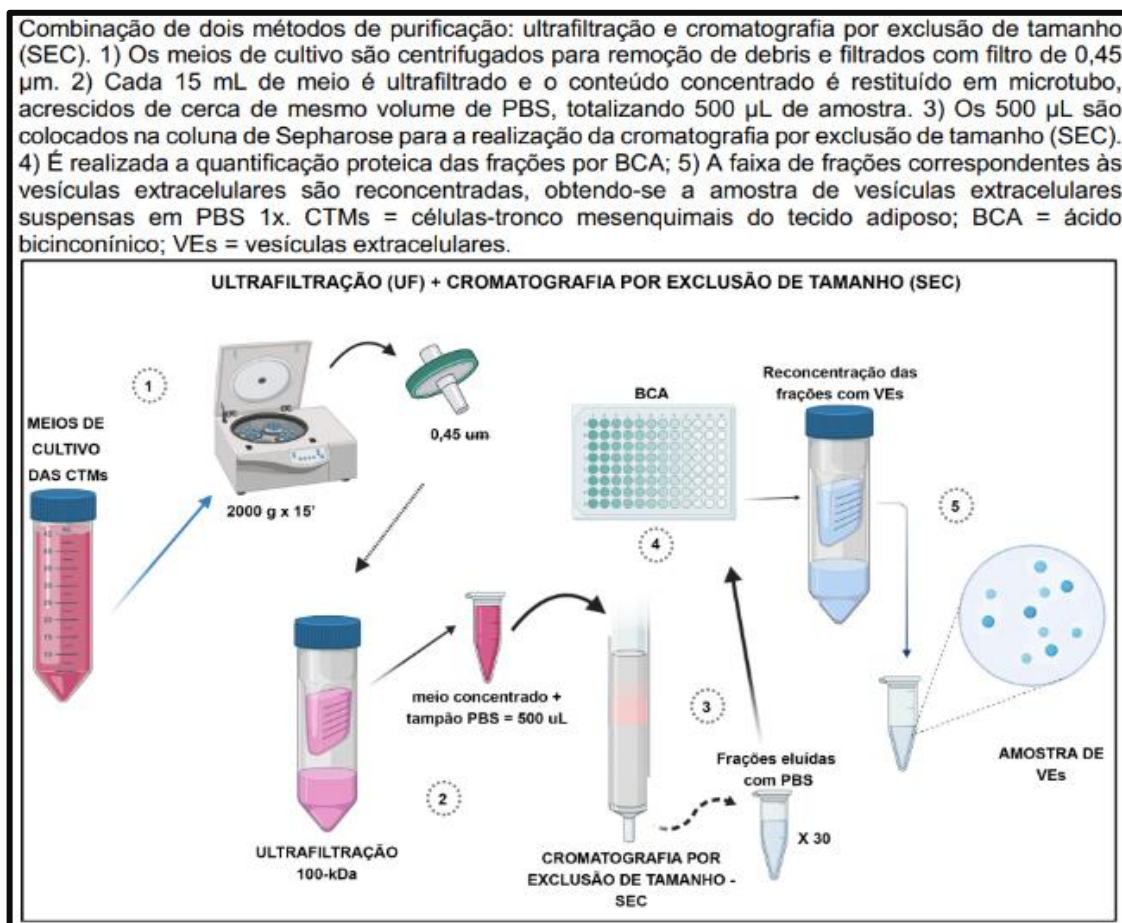
Foi realizado coleta de tecido adiposo em suíno de aproximadamente 5 meses, hípido, escolhido de forma aleatória, não sendo os animais do experimento. Devidamente sedados com uso de acepromazina 0,05 mg/kg, cloridrato de midazolam (0,2 mg/kg) e anestesiados com cetamina (10,0 mg/kg), a região de retirada de tecido foi bloqueada com o uso de anestésico local (lidocaína 2% com vasoconstritor). Em seguida realizou-se a tricotomia, antissepsia e incisão de

aproximadamente 4 cm de pele na região da base da cauda do suíno, dois fragmentos de aproximadamente 20g de tecido adiposo foram excisados, lavados em três soluções de Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco (DMPBS), onde permaneceram por 4 horas, na última solução de lavagem, sob refrigeração até serem transportados para o laboratório Bio Cell Terapia Celular, localizado em Brasília – DF, sendo o único laboratório do Brasil com registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizados a realizar o tratamento com CT em cães, gatos e equinos.

4.3- PROCESSAMENTO, ISOLAMENTO E CULTIVO DAS VEs

No laboratório, o tecido adiposo foi lavado em solução tampão de fosfato padrão (PBS) para retirada dos debris celulares e excesso de sangue. Em seguida, foi fragmentado em partículas pequenas e colocado em contato com a solução de colagenase e hialuronidase para digestão enzimática. Esta mistura foi centrifugada e o pellet celular, ressuspendido. Após a obtenção das células mononucleares, as mesmas foram colocadas em garrafas de cultivo contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), acondicionadas em estufas à temperatura de 37,5 °C e 5% de gás carbônico (CO²) para a obtenção de maior número de células. Esse meio de cultivo repleto de proteínas liberadas pelas células foi coletado e passado pelo processo de ultracentrifugação para isolamento das vesículas extracelulares, sendo a proteína presente nesse meio quantificada pelo método de Bradford. A partir daí, feito a definição das duas concentrações para tratamento dos animais (Fig. 2).

FIGURA 2. Etapas da purificação das vesículas extracelulares dos meios de cultivo das células-tronco mesenquimais.



FONTE: BRAVO et al. (2022).

4.4- ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

De forma aleatória foram utilizados 3 suínos machos, idade aproximada de três meses, raça Large White, hígdos, castrados, desverminados, com peso aproximado de 35kg. Os animais passaram por adaptação ambiental e alimentar antes do procedimento cirúrgico por dez dias e quarenta dias de pós cirúrgicos, durante o período de cicatrização das feridas. Alimentação servida em cocho, duas vezes ao dia, não ultrapassando o limite de 1,5% do peso vivo, sendo utilizada ração de manutenção com 25% de proteína, padronizada na quantidade adequada e recebendo água *ad libitum* em bebedouro tipo chupeta. Os suínos foram acondicionados individualmente em 3 baias de 9 m², devidamente identificadas (Fig.3).

FIGURA 3. Suíno experimental em sua baia individual, devidamente identificada.



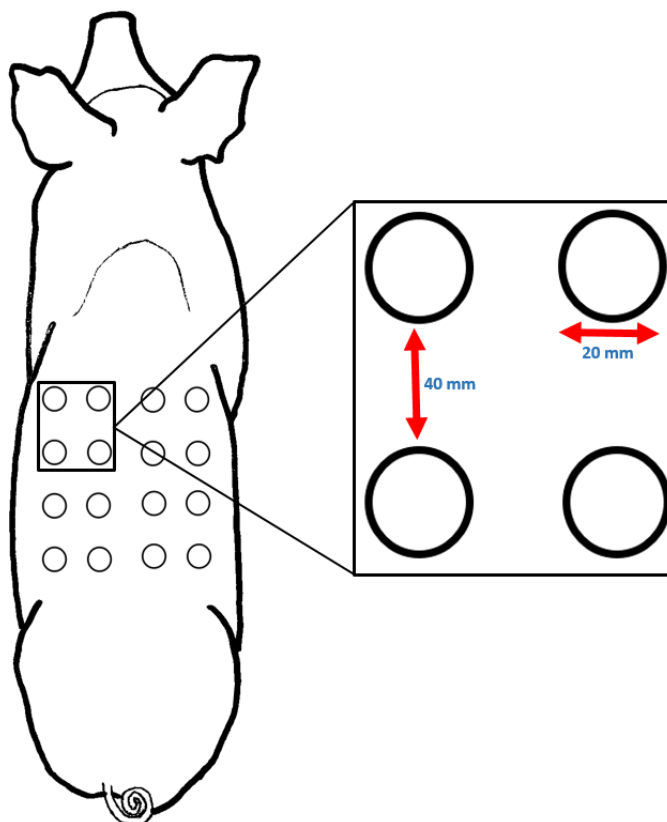
FONTE: O autor

4.5- PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após o período de adaptação, os animais foram submetidos a jejum de 8 horas antes do procedimento cirúrgico. No dia do procedimento cirúrgico, os animais foram pesados, realizado a coleta de sangue para dados de hematologia e bioquímica sérica, posteriormente foram canulados com cateter 22G, sedados com acepromazina (0,05 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) e cetamina (5 mg/kg), medicação pré-anestésica. A indução foi realizada com propofol (5 mg/kg) e manutenção com isoflurano. Os pacientes foram monitorados no trans cirúrgico por eletrocardiograma, oximetria de pulso, pressão arterial invasiva e capnografia. Seguindo o cronograma, os animais foram posicionados em decúbito ventral, sendo realizada tricotomia dos pelos com a máquina Oster® e lâmina de 50 mm. A antissepsia foi realizada em duas etapas de cinco minutos com Clorexidine Riohex® 2% e escova de degermação, finalizando com álcool 70%. Um gabarito de aço cirúrgico foi utilizado contendo 4 círculos de 20mm com espaçamento de 40mm entre eles (Fig. 4), para padronizar as feridas no dorso dos animais, com a demarcação dos círculos sendo realizadas com caneta cirúrgica (Fig. 5). As

incisões de espessura total dérmica (remoção da epiderme e derme expondo a fáscia muscular) foram realizadas com punch circular de biópsia de 20mm de diâmetro por 5 mm de profundidade total (Fig. 5), sendo produzidos com movimentos circulares até seccionar totalmente as três camadas de pele e com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 10, cabo de bisturi nº3 e uma pinça dente de rato (Fig. 5) a amostra foi retirada por divulsão com todo o cuidado para não afetar a musculatura. Para cada animal foram realizadas 16 feridas de espessura total. Sendo os procedimentos cirúrgicos realizados no mesmo dia, porém em momentos distintos, cada paciente recebendo atenção individual.

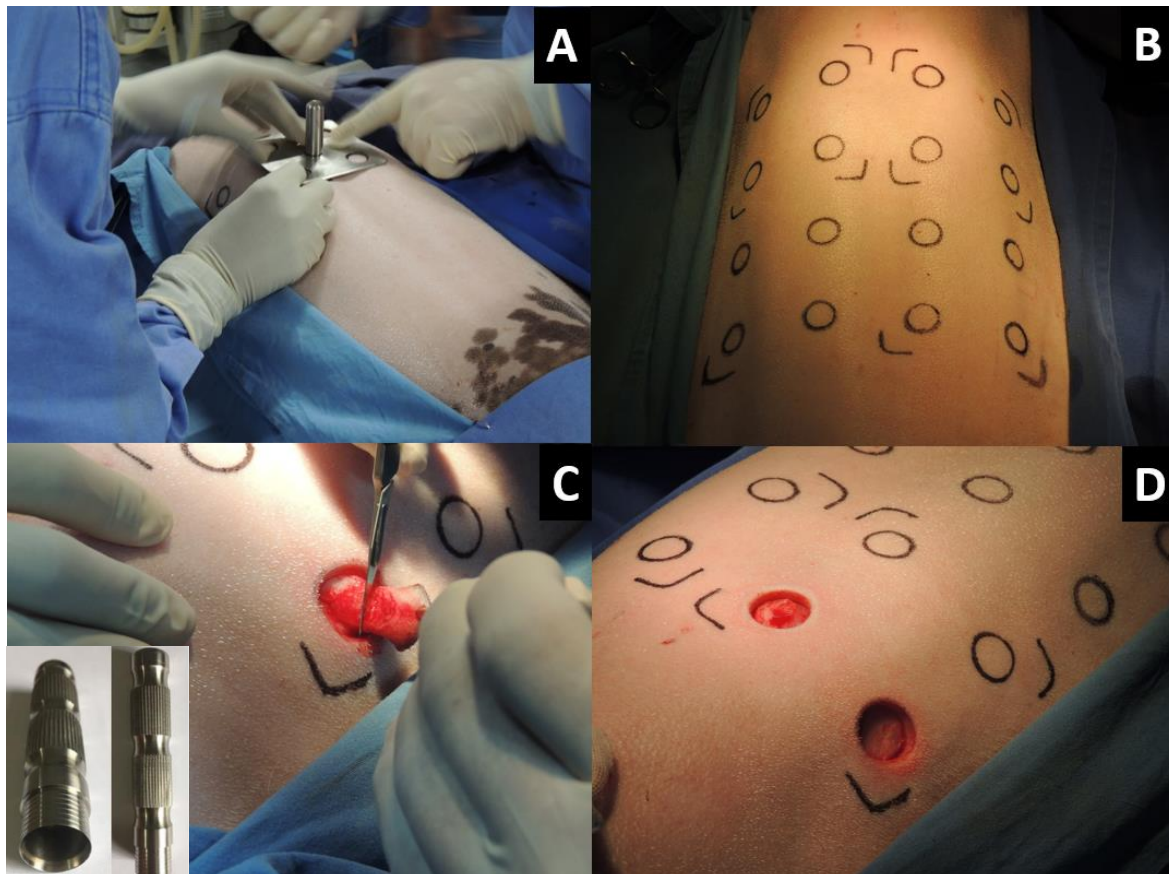
FIGURA 4. Medida do gabarito de aço cirúrgico para demarcação dos discos excisionais cutâneos, contendo 4 círculos de 20mm com espaçamento de 40mm.



FONTE: O autor

FIGURA 5. Procedimento cirúrgico de retirada de discos excisionais cutâneos de suíno.

(A) Delimitação com gabarito de aço cirúrgico, (B) demarcação dos círculos com caneta cirúrgica, (C) remoção da epiderme e derme expondo a fáscia muscular (disco cutâneo) (D) lesões cutâneas em formato circular, no dorso de suíno.

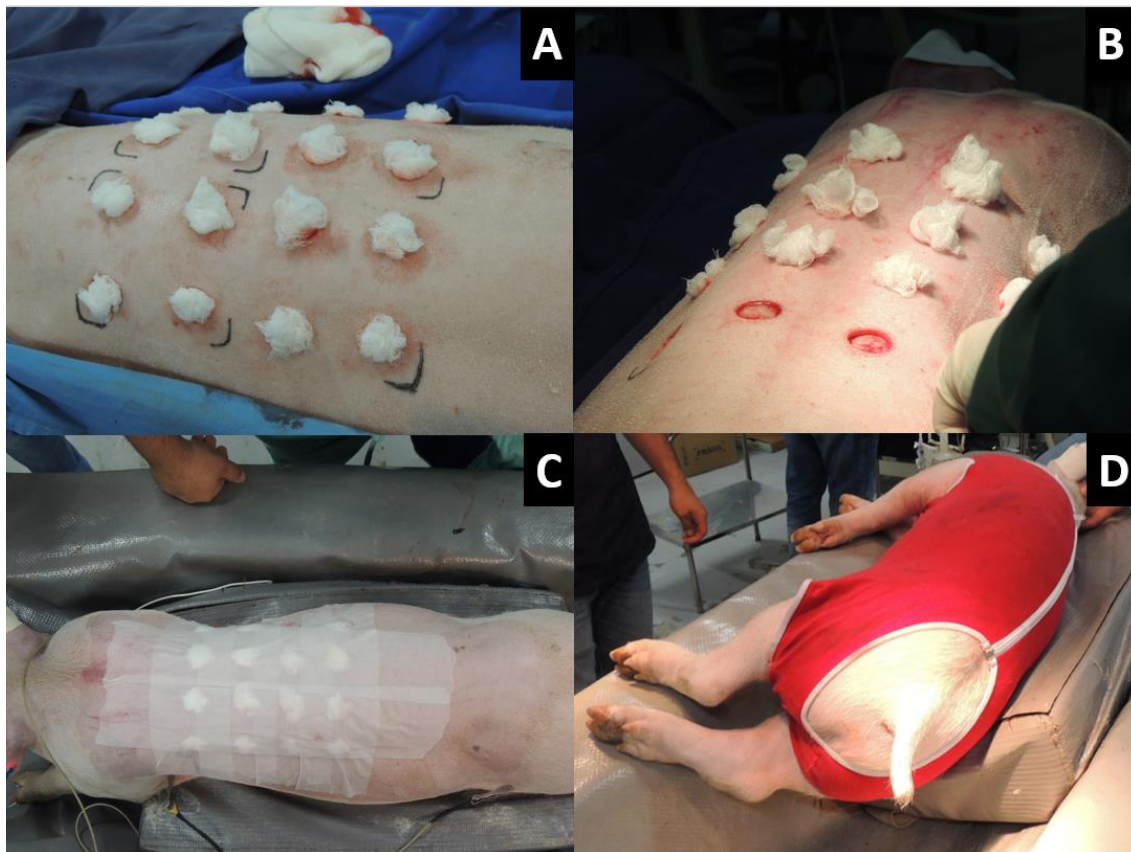


FONTE: O autor

Imediatamente após a retirada dos discos excisionais cutâneos, foi realizada a hemostasia em cada ferida (Fig. 6) e posteriormente feito o curativo oclusivo com gaze e fita microporosa (Fig. 6), finalizando com roupa cirúrgica para proteção das lesões (Fig. 6). Na recuperação anestésica os suínos foram posicionados em decúbito lateral e monitorados até a reabilitação completa. No pós-cirúrgico imediato foi estabelecido protocolo de controle de dor e inflamação com o uso de anti-inflamatório não esteroide, a base de flunixinina meglumina (1,1 mg/kg), a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos e analgésico a base de dipirona (25 mg/kg), a cada 12 horas, por 3 dias consecutivos, ambos por via intramuscular.

FIGURA 6. Hemostasia das feridas cirúrgicas e curativo final.

(A e B) hemostasia individual das feridas, utilizando gaze estéril, (C) feridas sendo protegidas com fita microporosa, (D) roupa cirúrgica para proteção das lesões dos suínos.



FONTE: O autor

4.6- DISTRIBUIÇÃO DOS TRATAMENTOS

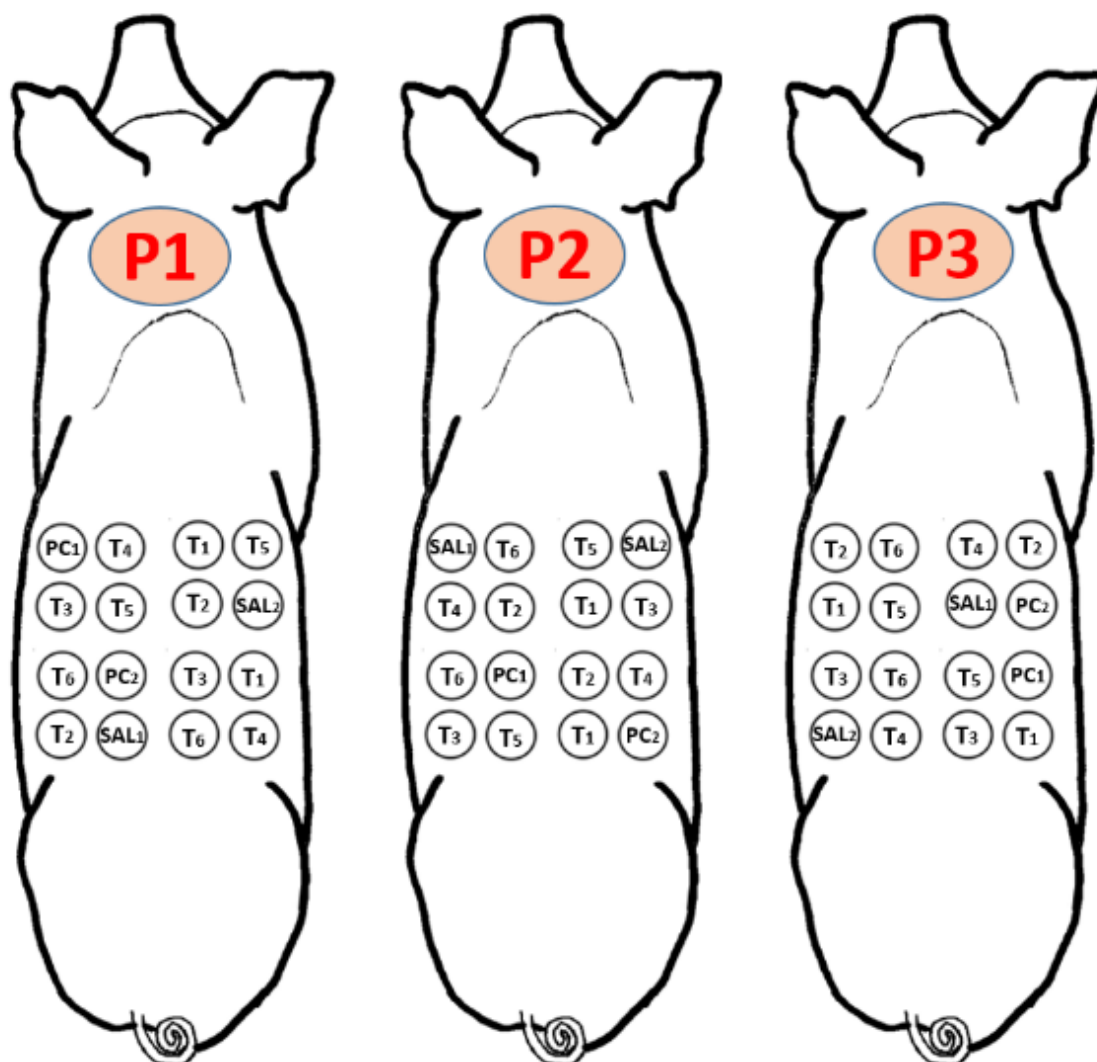
Após o procedimento cirúrgico para produção das 16 feridas cutâneas no dorso de cada suíno, os tratamentos foram identificados (Quadro 1) e distribuídos aleatoriamente em duplicata conforme demonstra a imagem esquematizada na figura 7. As vesículas extracelulares foram obtidas a partir do meio condicionado das células, sendo que cada frasco de tratamento continha vesículas extracelulares que foram concentradas a partir do meio condicionado de 1,5 milhões ou 750 milhões de células cultivadas e concentração proteica de 2,5 ou 5 microgramas, dependendo do tratamento escolhido. A composição da base cicatrizante utilizada foi Trealose, Hialuronato de sódio, Vitamina A e E. Esse material foi processado e fornecido pelo laboratório Bio Cell Terapia Celular, em frascos de vidro de

administração em spray, condicionados em caixa de isopor (Fig. 8), sendo mantidos sob refrigeração. Como controle positivo utilizamos pomada comercial a base de Cloreto de lauril dimetil benzil amônio a 35% - 1g e como controle negativo, soro fisiológico, Cloreto de sódio 0,9%.

QUADRO 1. Identificação e concentrações das vesículas, base cicatrizante e meio condicionado, pomada comercial e soro fisiológico.

IDENTIFICAÇÃO DOS TRATAMENTOS UTILIZADOS	
Tratamento 1 (T1)	Vesículas extracelulares (1,5 milhões)
Tratamento 1 (T1)	Vesículas extracelulares (1,5 milhões)
Tratamento 2 (T2)	Vesículas extracelulares (750 milhões)
Tratamento 2 (T2)	Vesículas extracelulares (750 milhões)
Tratamento 3 (T3)	Vesículas extracelulares (1,5 milhões)
Tratamento 3 (T3)	Vesículas extracelulares (1,5 milhões)
Tratamento 4 (T4)	Vesículas extracelulares (750 milhões)
Tratamento 4 (T4)	Vesículas extracelulares (750 milhões)
Tratamento 5 (T5)	Base cicatrizante
Tratamento 5 (T5)	Base cicatrizante
Tratamento 6 (T6)	Meio condicionado
Tratamento 6 (T6)	Meio condicionado
Tratamento 7 (PC1)	Controle positivo = Pomada comercial
Tratamento 7 (PC2)	Controle positivo = Pomada comercial
Tratamento 8 (SAL1)	Controle negativo = Soro fisiológico
Tratamento 8 (SAL2)	Controle negativo = Soro fisiológico

FIGURA 7. Suínos distribuídos aleatoriamente em duplicata dos tratamentos propostos no estudo. (P1) primeiro, (P2) segundo e (P3) terceiro.



FONTE: O autor

FIGURA 8. Material processado e armazenados em frascos de vidro para administração em spray, acondicionados em caixa de isopor.



FONTE: O autor

4.7- CURATIVO E MANEJO DAS FERIDAS

A realização do curativo iniciou-se 24 horas após a produção das feridas, sendo executados diariamente, por 28 dias ou até o fechamento total das feridas, sempre realizados no mesmo horário. Primeiro os animais eram devidamente sedados com uso de acepromazina (0,05 mg/kg), midazolam (0,5 mg/kg) e cetamina (7,0 mg/kg). Logo após o efeito sedativo, retirava-se a roupa cirúrgica e os animais eram posicionados em uma mesa de curativo, com quatro aberturas ventrais para introdução dos membros (Fig. 9). A primeira etapa do cronograma de curativo foi a retirada cuidadosa de todo o curativo do dia anterior, aferição de temperatura individual de cada ferida, com termômetro digital infravermelho, posteriormente era feita a limpeza delicada individual de cada ferida com soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%) e gaze estéril para retirada de debris celulares, secreções e resto de produtos do dia anterior. Em seguida era feita a administração dos tratamentos designados individualmente no leito de cada ferida, limpeza da pele com solução de éter alcoolizado, apenas ao redor das feridas, não havendo nenhum contato com as lesões, com o intuito de diminuir a oleosidade da pele e

melhorar a aderência do curativo. Então as feridas eram isoladas primeiramente com curativo filme transparente (Fig. 10), após oclusão, as feridas eram novamente protegidas, dessa vez com fita microporosa, finalizando com a roupa cirúrgica.

Nos dias de registro fotográfico das feridas, dia da cirurgia (D0), sétimo (D7), decimo quarto (D14), vigésimo primeiro (D21) e no vigésimo oitavo (D28) dias, usava-se o gabarito adesivo para análises de retração de ferida e as lesões eram fotografadas individualmente, logo após a limpeza das feridas, seguindo posteriormente o cronograma normal do curativo das feridas, com a administração dos tratamentos e demais etapas. Nos dias de biópsia que foram realizadas nos dias D14 e D21, coincidindo com os dias dos registros fotográficos, essas biópsias eram realizadas logo após registro fotográfico, seguindo posteriormente o cronograma normal do curativo das feridas com a administração dos tratamentos e demais etapas.

FIGURA 9. Mesa de curativo utilizada durante os 28 dias experimentais.



FONTE: O autor

FIGURA 10. Feridas cirúrgicas antes e depois do curativo e aplicação do curativo filme transparente.



FONTE: O autor

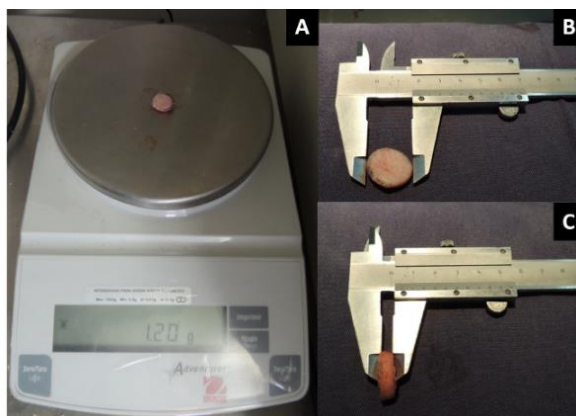
4.8- COLETA DE DADOS

4.8.1 DISCOS EXCISIONAIS CUTÂNEOS RETIRDOS DURANTE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No dia do procedimento cirúrgico foi feito a retirada dos discos excisionais cutâneos, e essas amostras foram pesadas, com o uso de balança de precisão (Fig. 11) e mensuradas com o uso de paquímetro mecânico universal (Fig. 11), na tentativa de padronizar a produção de cada ferida e de ter dados fidedignos para comparação da cicatrização individual das feridas, sendo exposto desvio-padrão, média e coeficiente de variação de todos os dados coletados (Quadro 2).

FIGURA 11. Pesagem e mensuração dos discos excisionais cutâneos.

(A) Pesagem, (B) diâmetro, e (C) espessura.



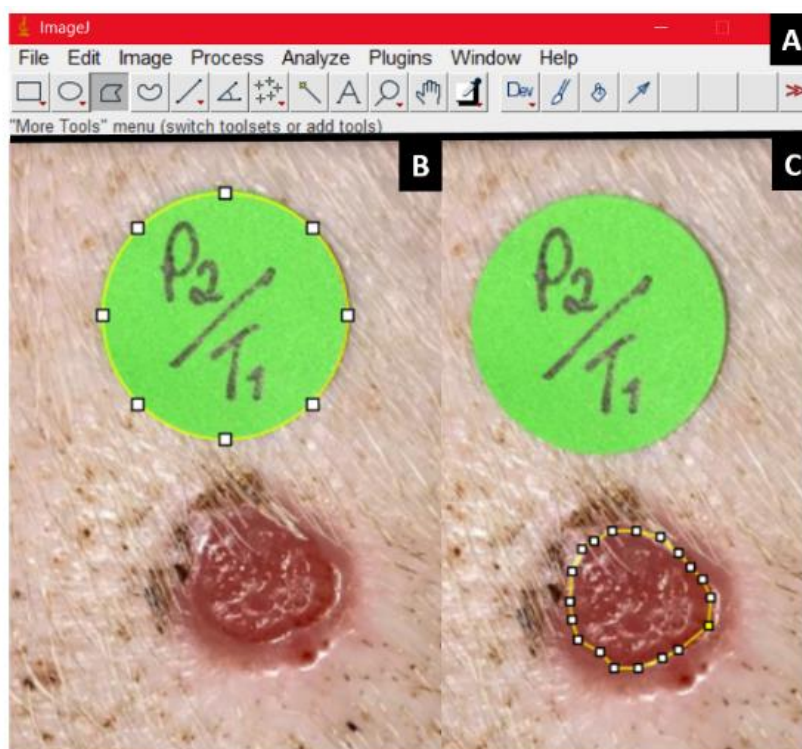
FONTE: O autor

4.8.2 IMAGENS FOTOGRÁFICAS

As feridas foram fotografadas nos dias D0, D7, D14, D21 e D28, utilizando um gabarito circular adesivo de área conhecida (Diâmetro = 20mm, Área = 314.16mm²). Esses adesivos eram colados na região periférica dorsal de cada ferida (Fig. 12) com a finalidade de mensurar a retração de bordas com auxílio do software Image J® (NIH – National Institute of Health – USA). No software as medidas do gabarito foram utilizadas para calibrar o programa, seguida da leitura da imagem, estabelecendo assim a planimetria digital da ferida por comparação (Fig. 12). As imagens coletadas no D0 indicaram a área inicial e os valores obtidos nas coletas de D7, D14, D21 e D28 foram subtraídas indicando a retração semanal.

FIGURA 12. Gabarito circular adesivo de cor verde durante mensuração de retração de ferida, delimitando o gabarito e a ferida.

(A) Painel de tarefas do programa ImageJ, (B) mensuração do gabarito, (C) mensuração da ferida.



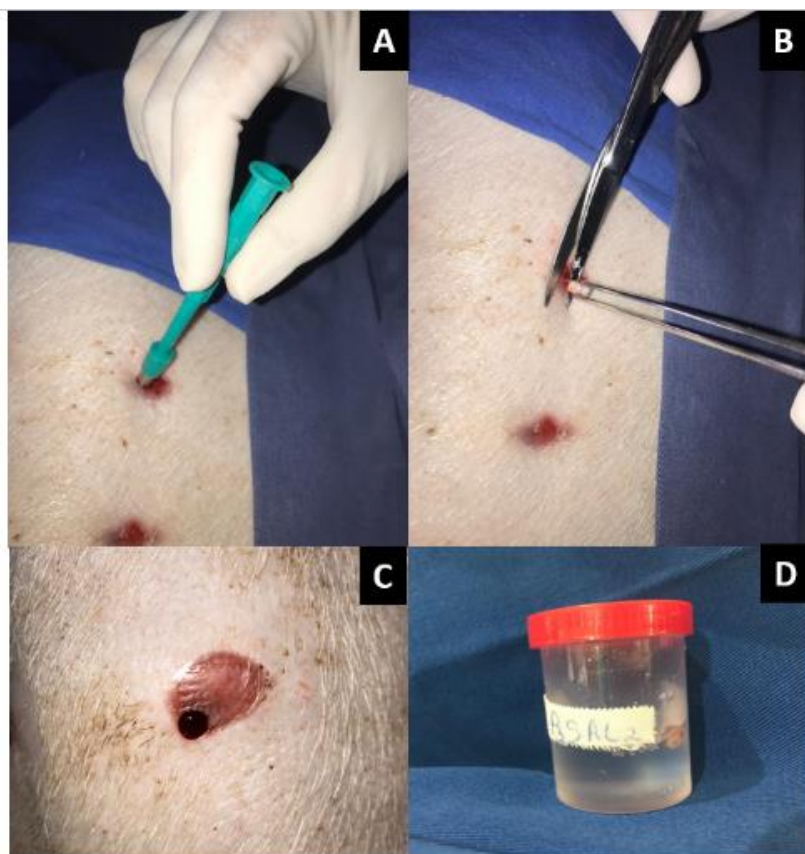
FONTE: O autor

4.8.3 BIÓPSIAS

As biópsias ocorreram no D14 e D21, sendo os animais devidamente sedados com uso de acepromazina (0,05 mg/kg), cloridrato de midazolam (0,2 mg/kg) e anestesiados com cetamina (10,0 mg/kg), sendo cada região biopsiada bloqueada com o uso de anestésico local (lidocaína 2% com vasoconstritor). Uma amostra de cada ferida, foi produzida com movimentos circulares, utilizando um punch circular de 5 mm na região limítrofe da área de cicatrização de cada região excisada (Fig. 13), logo após a extração, as amostras foram individualmente condicionadas em frascos contendo formalina tamponada a 10% (Fig. 13) e encaminhadas para análises histológicas junto ao Laboratório de Patologia Veterinária da FAV – UnB. Após a retirada da amostra os animais receberam analgesia a base de dipirona (25 mg/kg), a cada 12 horas, por 3 dias consecutivos, por via intramuscular.

FIGURA 13. Biópsia cutânea destinada a processamento histológico.

(A) Delimitação de área a ser biopsiada, (B) Retirada de material biológico, (C) Delimitação de campo biopsiado, (D) Material acondicionado em formalina tamponada a 10%.



FONTE: O autor

4.8.4 PROCESSO HISTOLÓGICO

Para o processamento das análises histopatológicas, as amostras de pele foram fixadas em formaldeído tamponado 10%. Já no processo de preparo das lâminas, inicialmente as amostras foram acondicionadas em cassetes histológicos identificados e então desidratadas em soluções de álcool com concentrações crescentes de 70%, 80%, 90% por 50 minutos e 3x de 100% por uma hora cada, em seguida foram diafanizados duas vezes, uma hora cada, em xilol, também em concentrações crescentes. Em seguida, impregnadas três vezes em parafina a 60°C. Posteriormente as mostras foram incluídas em parafina e seccionadas integralmente no micrótomo em secções de 5µm de espessura. As secções foram coletadas em lâminas de microscopia e identificadas de acordo com cada tratamento realizado na amostra e identificação do próprio laboratório. Para a coloração das amostras, foi produzida as etapas de coloração padrão com a desparafinização, hidratação, coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E), desidratação, clarificação e montagem das lâminas para leitura. A leitura das lâminas foi realizada de forma cega, sob microscopia de luz.

4.8.5 TEMPERATURA AMBIENTAL

A temperatura e umidade ambientais foram coletadas sempre no mesmo horário dos curativos, através do termo-higrômetro Tomate PD-003, com finalidade de controle desses parâmetros (Gráfico 1 e 2), sendo exposto desvio-padrão, média e coeficiente de variação de todos os dados coletados (tabela 1).

4.8.6 TEMPERATURA DOS SUÍNOS

Foram realizadas a aferição de temperatura dos animais, de forma sistêmica, (Quadro 3), através de termômetro retal digital G-tech®, além da temperatura local, no próprio dorso do animal, sendo realizada a coleta abaixo do ponto médio perpendicular das orelhas cinco centímetros e na zona lombar caudal cinco centímetros acima do início do rabo, ou seja, borda inferior e superior do plano de feridas, para mensurar a temperatura de perímetro (Quadro 3). E por último foram mensuradas as temperaturas individuais das feridas com termômetro digital infravermelho Dikang® à 4 cm de distância do centro da ferida, apresentando o

desvio-padrão, média e coeficiente de variação dos dados ANEXO II, com finalidade de avaliar e modular o processo inflamatório individual de cada ferida, sendo essas temperaturas coletadas logo após a sedação e retirada dos curativos do dia anterior.

4.8.7 PESAGEM

Os animais foram pesados semanalmente (Quadro 4) utilizando balança Filizola® digital de plataforma. Sendo realizado alterações nas doses das medicações que eram administradas diariamente e da ração de manutenção que os animais recebiam.

4.8.8 ANÁLISES CLÍNICAS

Foram coletadas amostras sanguíneas em tubo com e sem anticoagulante para análises hematológicas e de bioquímica sérica, dos três animais a cada sete dias, D0, D7, D14, D21 (Quadro 5). Tendo em vista que os animais precisaram ser sedados diariamente para se ter um manejo correto das feridas e dos dados coletados, uma vez que os suínos são animais muito estressados.

4.8.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos tratamentos em cada ferida foi realizada de forma aleatória, através de sorteio. Os dados são a média de duplicatas \pm desvio padrão. Diferença na área da ferida da linha de base entre os tratamentos foram testados com One Way Anova, ($P < 0,05$). E as diferenças na redução percentual do tamanho da ferida foram analisadas com One Way Anova, ($P < 0,05$) e Bonfferoni's Test (Quadro 6) após transformar os dados percentuais pelo seu valor arco sin.

5. RESULTADOS

5.1- PESAGEM E MENSURAÇÃO DOS DISCOS EXCISIONAIS CUTÂNEOS.

QUADRO 2. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) dos discos excisionais cutâneos, retirados no momento da cirurgia.

DESVIO-PADRÃO, MÉDIA E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO DAS MEDIDAS E PESO DOS DISCOS EXCISIONAIS CUTÂNEOS													
Identificação	Diametro	DP	Média	CV (%)	Espessura	DP	Média	CV (%)	Peso	DP	Média	CV (%)	
1	P1	1,45			0,3				1,85				
1	P2	1,48	0,025	1,477	1,704	0,28	0,047	0,263	17,946	1,77	0,178	1,710	10,396
1	P3	1,5			0,21				1,51				
2	P1	1,5			0,2				1,58				
2	P2	1,4	0,100	1,500	6,667	0,11	0,052	0,170	30,566	1,27	0,158	1,407	11,248
2	P3	1,6			0,2				1,37				
3	P1	1,6			0,27				1,7				
3	P2	1,54	0,035	1,580	2,192	0,1	0,085	0,190	44,968	1,2	0,254	1,477	17,217
3	P3	1,6			0,2				1,53				
4	P1	1,55			0,2				1,4				
4	P2	1,55	0,023	1,537	1,503	0,1	0,050	0,153	32,825	1,23	0,087	1,303	6,703
4	P3	1,51			0,16				1,28				
5	P1	1,6			0,2				1,49				
5	P2	1,6	0,023	1,587	1,456	0,05	0,078	0,137	56,835	1,06	0,221	1,303	16,920
5	P3	1,56			0,16				1,36				
6	P1	1,45			0,38				1,77				
6	P2	1,4	0,050	1,450	3,448	0,21	0,091	0,313	28,959	1,6	0,165	1,767	9,341
6	P3	1,5			0,35				1,93				
7	P1	1,52			0,2				1,4				
7	P2	1,58	0,042	1,567	2,657	0,04	0,081	0,113	71,320	1,15	0,132	1,250	10,583
7	P3	1,6			0,1				1,2				
8	P1	1,53			0,21				1,41				
8	P2	1,57	0,035	1,567	2,242	0,12	0,071	0,197	36,074	1,35	0,216	1,503	14,349
8	P3	1,6			0,26				1,75				
9	P1	1,51			0,19				1,34				
9	P2	1,49	0,010	1,500	0,667	0,05	0,072	0,130	55,470	1,1	0,142	1,263	11,204
9	P3	1,5			0,15				1,35				
10	P1	1,55			0,14				1,38				
10	P2	1,5	0,029	1,517	1,903	0,04	0,050	0,093	53,927	1,27	0,086	1,287	6,701
10	P3	1,5			0,1				1,21				
11	P1	1,5			0,2				1,77				
11	P2	1,46	0,023	1,487	1,553	0,03	0,085	0,110	77,673	0,93	0,442	1,270	34,824
11	P3	1,5			0,1				1,11				
12	P1	1,5			0,1				1,28				
12	P2	1,5	0,000	1,500	0,000	0,1	0,000	0,100	0,000	1,26	0,081	1,223	6,658
12	P3	1,5			0,1				1,13				
13	P1	1,55			0,1				1,33				
13	P2	1,55	0,000	1,550	0,000	0,06	0,023	0,087	26,647	1,04	0,145	1,183	12,256
13	P3	1,55			0,1				1,18				
14	P1	1,4			0,12				1,3				
14	P2	1,46	0,119	1,497	7,971	0,09	0,035	0,123	28,475	1,06	0,155	1,237	12,536
14	P3	1,63			0,16				1,35				
15	P1	1,6			0,15				1,44				
15	P2	1,5	0,100	1,600	6,250	0,1	0,029	0,117	24,744	1,27	0,119	1,307	9,130
15	P3	1,7			0,1				1,21				
16	P1	1,5			0,09				1,28				
16	P2	1,6	0,058	1,567	3,685	0,09	0,006	0,093	6,186	1,05	0,119	1,183	10,082
16	P3	1,6			0,1				1,22				

5.2 - TEMPERATURA E UMIDADE LOCAL

TABELA 1. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) da temperatura e umidade local, durante os 28 dias de experimento.

	Temperatura (°C)	Umidade (%)
DP	2,27	7,75
Média	27,82	20,06
CV (%)	8,15	38,64
Máximo	32,30	35,00
Mínimo	24,10	10,00

GRÁFICO 2. Temperatura local retirada diariamente durante 28 dias de experimento.

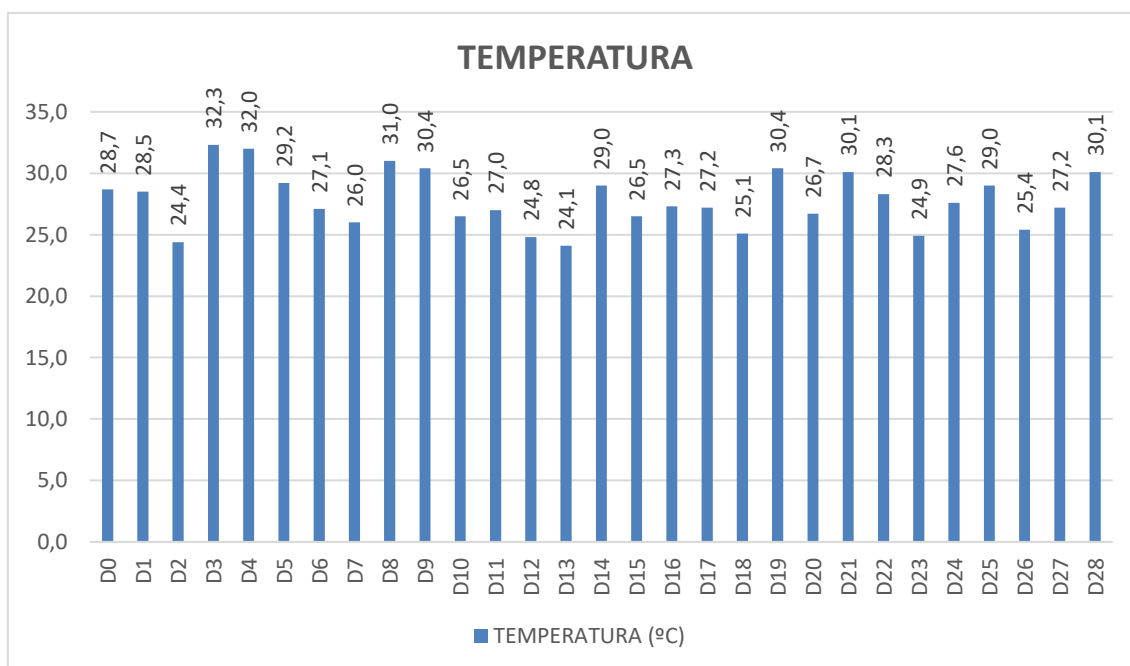
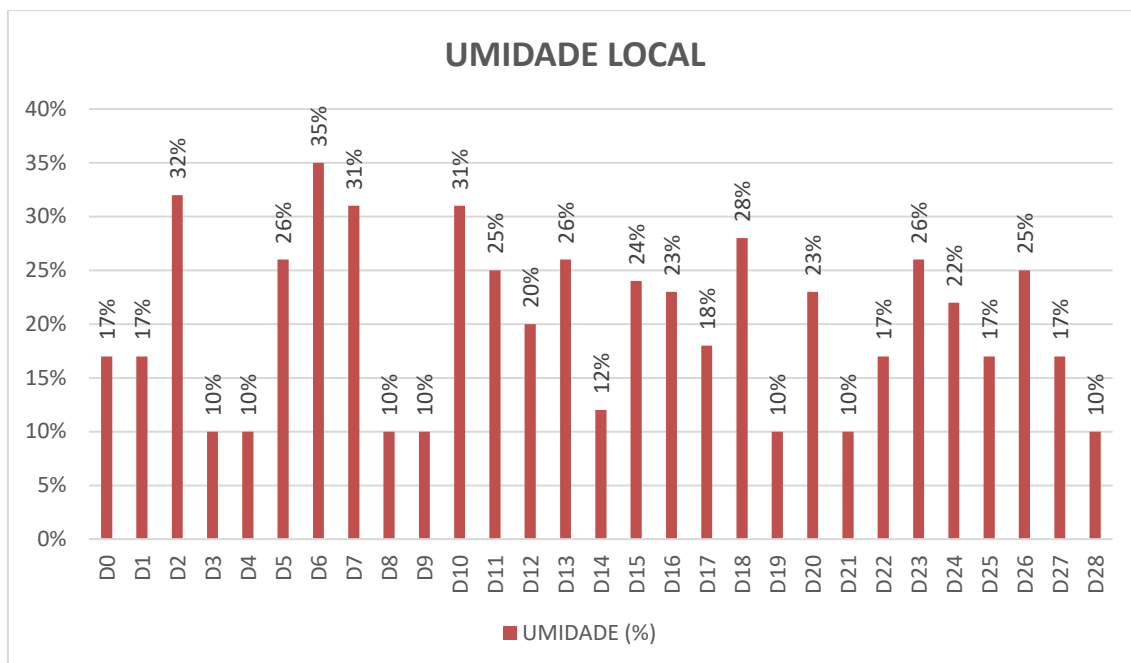


GRÁFICO 3. Umidade local retirada diariamente durante 28 dias de experimento.

5.3 - TEMPERATURA RETAL, LOMBO E DORSO DOS SUÍNOS EXPERIMENTAIS

QUADRO 3. Desvio-padrão (DP), média e coeficiente de variação (CV) das temperaturas, retal, região de dorso e lombo dos suínos experimentais.

TEMPERATURAS - SISTEMICA, DORSO E LOMBO E FERIDA INDIVIDUAL													
DATA	ID	RETAL	DP	Média	CV	LOMBO	DP	Média	CV	DORSO	DP	Média	CV
D1	P1	39				39,1				38			
	P2	38,6	0,208	38,767	0,537	38,1	0,721	38,900	1,854	38,1	0,608	38,400	1,584
	P3	38,7				39,5				39,1			
D2	P1	38,4				38,5				38,1			
	P2	39,1	0,513	38,967	1,317	38,5	0,462	38,767	1,191	38,7	0,321	38,333	0,839
	P3	39,4				39,3				38,2			
D3	P1	38				38,5				38,3			
	P2	38,7	0,351	38,367	0,915	38,2	0,351	38,167	0,920	38	0,300	38,000	0,789
	P3	38,4				37,8				37,7			
D4	P1	37,2				38,1				38			
	P2	37,5	0,569	37,667	1,510	38,2	0,436	37,900	1,150	38,3	0,458	37,900	1,209
	P3	38,3				37,4				37,4			
D5	P1	39,4				39,2				38,8			
	P2	38,8	0,300	39,100	0,767	39,4	0,115	39,333	0,294	39,7	0,624	39,000	1,601
	P3	39,1				39,4				38,5			
D6	P1	38,9				38,7				38,5			
	P2	38,7	0,252	38,667	0,651	38,8	0,058	38,733	0,149	38,4	0,100	38,500	0,260
	P3	38,4				38,7				38,6			
D7	P1	38,3				38,6				38,6			
	P2	38	0,208	38,233	0,544	38,2	0,351	38,233	0,919	38,2	0,503	38,133	1,320
	P3	38,4				37,9				37,6			
D8	P1	38,6				38,6				37,8			
	P2	38,6	0,115	38,533	0,300	38,9	0,850	38,267	2,223	38	0,643	37,533	1,713
	P3	38,4				37,3				36,8			
D9	P1	37,6				38,6				37,8			
	P2	38	0,208	37,767	0,551	38,3	1,136	37,800	3,005	38,6	0,850	37,767	2,252
	P3	37,7				36,5				36,9			
D10	P1	38,9				38,7				38,2			
	P2	38,7	0,252	38,933	0,646	38,8	0,208	38,633	0,539	38,6	0,451	38,167	1,181
	P3	39,2				38,4				37,7			
D11	P1	39,1				39,4				39			
	P2	39,5	0,265	39,200	0,675	40,4	0,551	39,767	1,385	40,8	0,987	39,667	2,487
	P3	39				39,5				39,2			
D12	P1	39				38				38,8			
	P2	38,7	0,208	38,933	0,535	38	0,751	38,433	1,953	39,1	0,404	38,733	1,043
	P3	39,1				39,3				38,3			
D13	P1	38,6				38,9				38,8			
	P2	39,1	0,265	38,900	0,680	39,3	0,611	38,767	1,576	38,8	0,173	38,700	0,448
	P3	39				38,1				38,5			
D14	P1	39,2				39,3				39,3			
	P2	38,3	0,451	38,767	1,163	39,5	0,153	39,467	0,387	39,1	0,200	39,100	0,512
	P3	38,8				39,6				38,9			
D15	P1	39,2				38,7				38,7			
	P2	39,1	0,265	39,300	0,673	38,2	0,321	38,333	0,839	38,3	0,231	38,433	0,601
	P3	39,6				38,1				38,3			

D16	P1	39,1	0,231	39,233	0,589	38,6	0,802	39,433	2,034	39,1	0,416	39,567	1,052
	P2	39,1				39,5				39,7			
	P3	39,5				40,2				39,9			
D17	P1	38,5	0,265	38,700	0,684	37,4	0,493	37,733	1,307	38,1	0,361	38,200	0,944
	P2	38,6				38,3				38,6			
	P3	39				37,5				37,9			
D18	P1	38,2	0,153	38,067	0,401	37,9	0,458	38,300	1,196	37,6	0,551	38,167	1,443
	P2	37,9				38,2				38,7			
	P3	38,1				38,8				38,2			
D19	P1	38,9	0,265	39,100	0,677	39	0,231	38,733	0,596	38,9	0,100	38,800	0,258
	P2	39				38,6				38,7			
	P3	39,4				38,6				38,8			
D20	P1	37,8	0,757	38,667	1,958	38,1	0,751	38,867	1,931	38,8	0,289	39,133	0,738
	P2	39,2				39,6				39,3			
	P3	39				38,9				39,3			
D21	P1	38,5	0,608	38,900	1,564	38,6	0,289	38,933	0,741	38,3	0,208	38,467	0,541
	P2	38,6				39,1				38,4			
	P3	39,6				39,1				38,7			
D22	P1	38,9	0,252	38,667	0,651	38,7	0,058	38,733	0,149	38,5	0,100	38,500	0,260
	P2	38,7				38,8				38,4			
	P3	38,4				38,7				38,6			
D23	P1	39,1	0,153	38,967	0,392	39,6	0,551	38,967	1,413	39,8	0,850	38,933	2,184
	P2	39				38,7				38,9			
	P3	38,8				38,6				38,1			
D24	P1	39,4	0,503	39,867	1,263	39,2	0,306	39,267	0,778	38,6	0,493	38,933	1,267
	P2	39,8				39				38,7			
	P3	40,4				39,6				39,5			
D25	P1	39,4	0,361	39,100	0,922	37,6	0,513	38,033	1,349	37,5	0,300	37,800	0,794
	P2	39,2				38,6				38,1			
	P3	38,7				37,9				37,8			
D26	P1	38,8	0,503	38,867	1,295	39,2	0,529	39,000	1,357	39,1	0,173	39,300	0,441
	P2	38,4				38,4				39,4			
	P3	39,4				39,4				39,4			
D27	P1	38,7	0,289	38,867	0,743	38,3	0,473	38,133	1,239	38,4	0,231	38,267	0,604
	P2	38,7				38,5				38,4			
	P3	39,2				37,6				38			
D28	P1	39	0,208	38,933	0,535	38,3	0,500	38,800	1,289	38,7	0,306	38,967	0,784
	P2	38,7				39,3				39,3			
	P3	39,1				38,8				38,9			

5.4- PESAGEM SEMANAL DOS SUÍNOS EXPERIMENTAIS

QUADRO 4. Peso semanal dos suínos experimentais.

PESO DOS ANIMAIS			
IDENTIFICAÇÃO	P1	P2	P3
D0	34.3 kg	32.0 kg	34.0 kg
D7	38.0 kg	35.3 kg	37.8 kg
D14	42.2 kg	38.6 kg	41.8 kg
D21	46.5 kg	43.0 kg	45.5 kg

5.5- ANÁLISES CLÍNICAS

QUADRO 5. Resultados de hematologia e bioquímica sérica dos animais de experimento.

RESULTADOS DE HEMATOLOGIA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE TRÊS SUÍNOS EXPERIMENTAIS

IDENTIFICAÇÃO e DATA	VG (%)	Leucócitos (x 10 ³ /μl)	PPT (g/dl)	Uréia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	AST (UI/L)	GGT (UI/L)	Proteína total (g/dl)	Albumina (g/dl)
P1 - D0	37	29,02	6,4	25	1,4	32	40	6,5	3,1
P2 - D0	30	31,7	6	20	1	38	45	6,3	3,2
P3 - D0	35	26,49	6,4	18	1,2	37	32	6,6	2,9
P1 - D7	32	20,15	6	22	1,4	34	36	5,2	3,5
P2 - D7	31	26,27	6	33	1,3	46	48	6	4,5
P3 - D7	35	22	6,8	19	1,5	44	39	6,4	3,4
P1 - D14	32	24,15	6	29	1,6	36	38	5,2	1,6
P2 - D14	35	21,9	6,4	24	1,9	89	68	5,7	2,51
P3 - D14	35	19,35	6,6	25	2	83	45	5,8	2
P1 - D21	33	27,55	6,2	49	1,8	20	38	5,2	1,92
P2 - D21	33	24,9	6	29	1,8	31	45	5,6	2,35
P3 - D21	33	19,3	6,2	29	2,1	36	30	6,1	2,08
REFERÊNCIAS	32 - 50	11,0 - 22,0	6,0 - 8,0	21,4 - 64,2	1,0 - 2,7	32 - 84	10 - 60.	7,90 - 8,90	1,80 - 3,30

5.6- ANÁLISE VISUAL

Para interpretação de análises visuais, foram utilizados parâmetros de forma padrão para todas as feridas, como hemorragia, eritema, secreção, granulação, crosta e edema. Vinte e quatro horas após a cirurgia de retirada dos discos excisionais cutâneos e hemostasia, todas as feridas se encontravam limpas, sem sinais de hemorragia, infecções, edema ou eritema (Fig. 14 a 21). Com 7 dias pós cirúrgicos, todas as feridas apresentaram no seu leito, secreção e crostas, sendo exibida pelas feridas do controle positivo, uma intensidade maior de crostas impregnadas além da presença de tecido desvitalizado (Fig. 20). Com 14 dias as feridas dos tratamentos T1 a T6 apresentaram boa retração de ferida, com presença de tecido de epitelização nas bordas da lesão, uma ferida de controle

negativo SAL apresentou uma crosta enegrecida de difícil remoção e todas as feridas de PC apresentaram do D7 até o D14 crostas enegrecidas de difícil remoção (Fig. 20 e 21). Com 21 dias de curativo algumas feridas já estavam quase totalmente cicatrizadas, de todos os tratamentos, porém observamos feridas, também em todos os tratamentos ainda com tecido de granulação e bordas de epitelização presentes (Fig. 14 a 21). No último dia do experimento, totalizando 28 dias pós-operatórios, obtivemos feridas que estavam totalmente fechadas e feridas que não tinham completado ainda o total fechamento, isso em todos os tratamentos. Sendo o fechamento total de todas as feridas com 33 dias.

5.7 - ÁREA DA FERIDA

Os dados expostos no trabalho mostraram que não houve diferença significativa (ANOVA One Way, $P > 0,05$) entre as áreas basais das lesões. Sendo expressado durante todo o tratamento, nos dias de registros fotográficos com o auxílio do gabarito, que não houve diferença significativa da área da lesão em qualquer um dos tratamentos em comparação com o SAL, como demonstra no (Quadro 6).

É observado no gráfico exposto, as médias da retração de todas as feridas durante os 28 dias de tratamento (Gráfico 4), sendo comparados com o controle positivo, representados pelas linhas tracejadas em vermelho, exibindo uma diferença significativa com uma média maior no controle positivo, no D14 em relação o SAL.

Também é evidenciado no gráfico o percentual (%) de cicatrização da área das feridas dos diferentes tratamentos e controle negativo ao longo do período dos 28 dias (Gráfico 5). Exibindo uma uniformidade na redução de área de ferida de todos os tratamentos e do controle negativo.

Junto com a imagem de cada ferida, expõe-se uma tabela apresentando a média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, da contração das feridas de todos os tratamentos individualmente (Tabela 2 a 9).

QUADRO 6. Teste de Bonfferoni's comparando o controle negativo com todos os outros tratamentos.

D0				
<i>POST-HOC</i>	<i>Bonfferoni's Test</i>			Alpha
Groups	P-value (T-Test)	Significant?	Test	Alpha
Sal v T1	0,137738858	NO	ANOVA	0,05
Sal v T2	0,637250948	NO	Post-Hoc Test Bonfferoni Correction	0,008333333
Sal v T3	0,720356097	NO		
Sal v T4	0,515197134	NO		
Sal v T5	0,659630702	NO		
Sal v T6	0,131821096	NO		
Sal V PC	0,817494961	NO		
D7				
<i>POST-HOC</i>	<i>Bonfferoni's Test</i>			Alpha
Groups	P-value (T-Test)	Significant?	Test	Alpha
Sal v T1	0,919930731	NO	ANOVA	0,05
Sal v T2	0,754356347	NO	Post-Hoc Test Bonfferoni Correction	0,008333333
Sal v T3	0,56004259	NO		
Sal v T4	0,986425442	NO		
Sal v T5	0,848325165	NO		
Sal v T6	0,932601591	NO		
Sal V PC	0,034072586	NO		
D14				
<i>POST-HOC</i>	<i>Bonfferoni's Test</i>			Alpha
Groups	P-value (T-Test)	Significant?	Test	Alpha
Sal v T1	0,746828829	NO	ANOVA	0,05
Sal v T2	0,563942964	NO	Post-Hoc Test Bonfferoni Correction	0,008333333
Sal v T3	0,841045555	NO		
Sal v T4	0,905540082	NO		
Sal v T5	0,49722277	NO		
Sal v T6	0,228307658	NO		
Sal V PC	0,279567922	NO		
D21				
<i>POST-HOC</i>	<i>Bonfferoni's Test</i>			Alpha
Groups	P-value (T-Test)	Significant?	Test	Alpha
Sal v T1	0,774537658	NO	ANOVA	0,05
Sal v T2	0,748323137	NO	Post-Hoc Test Bonfferoni Correction	0,008333333
Sal v T3	0,771465151	NO		
Sal v T4	0,323157452	NO		
Sal v T5	0,336923449	NO		
Sal v T6	0,625252064	NO		
Sal V PC	0,104269963	NO		
D28				
<i>POST-HOC</i>	<i>Bonfferoni's Test</i>			Alpha
Groups	P-value (T-Test)	Significant?	Test	Alpha
Sal v T1	0,268662235	NO	ANOVA	0,05
Sal v T2	0,40455371	NO	Post-Hoc Test Bonfferoni Correction	0,008333333
Sal v T3	0,386324343	NO		
Sal v T4	0,778037345	NO		
Sal v T5	0,159990652	NO		
Sal v T6	0,911688957	NO		
Sal V PC	0,492333998	NO		

GRÁFICO 4. Média das retrações de feridas excisionais em dorso de suínos em todos os tratamentos.

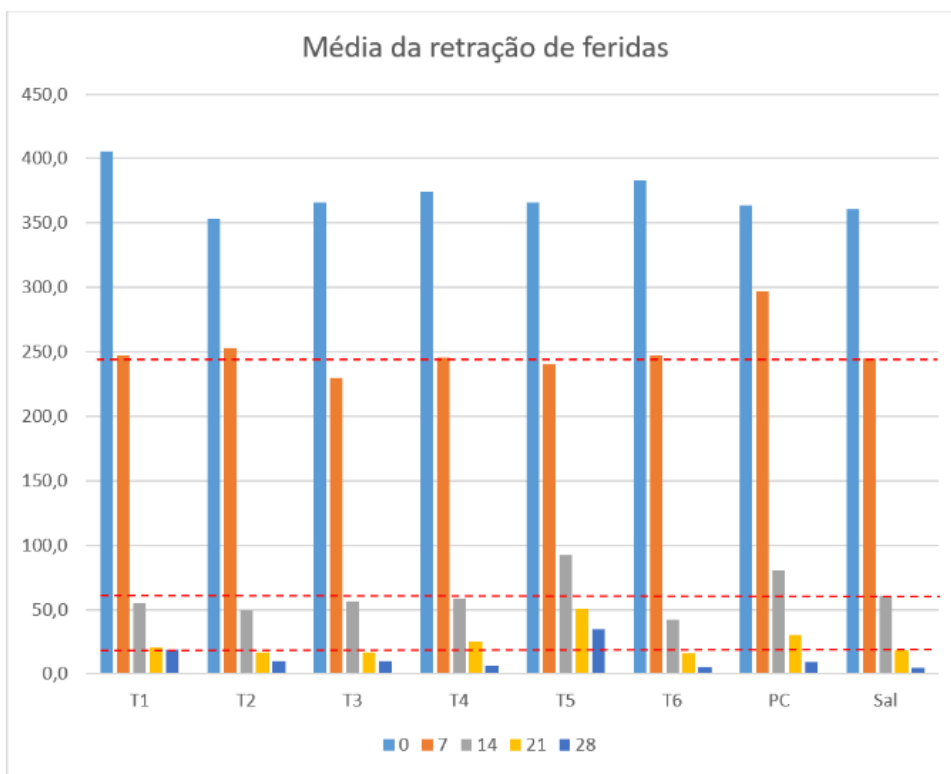


GRÁFICO 5. Porcentagem das retrações de feridas de todos os tratamentos de feridas excisionais em dorso de suíno hígado.

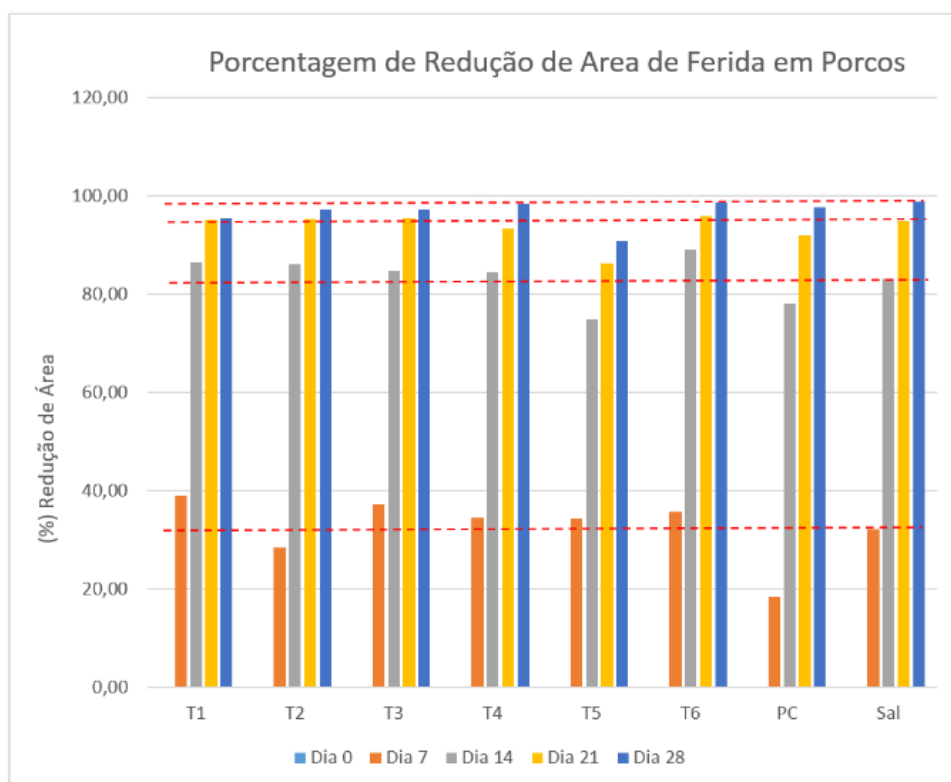


FIGURA 14. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T1. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.



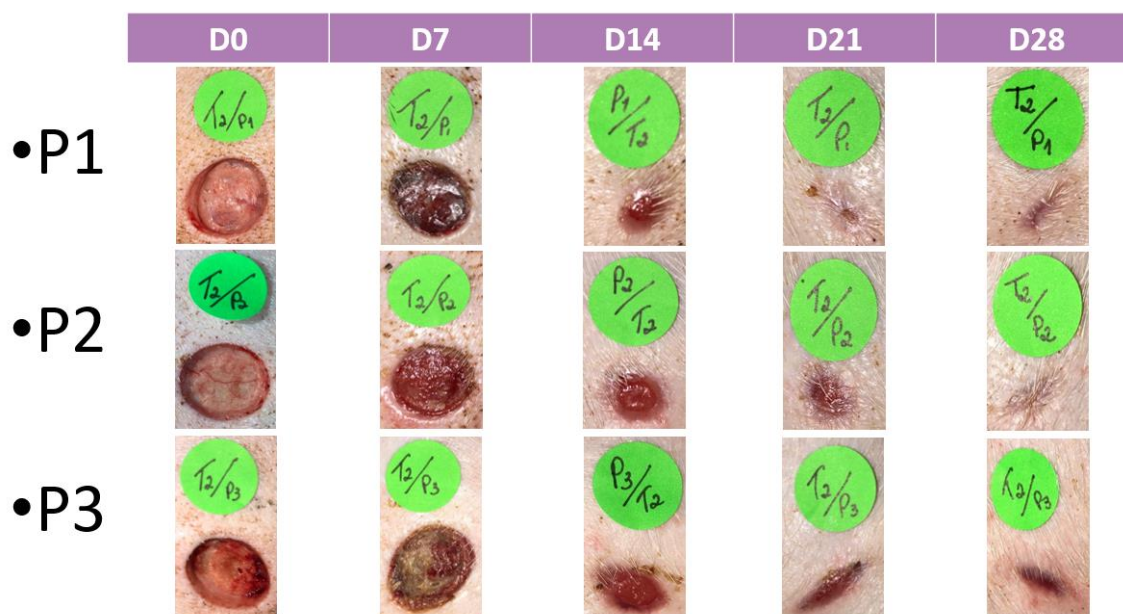
FONTE: O autor

TABELA 2. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T1.

T1	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	405,30	247,20	54,98	20,39	18,66
DESVIO PADRÃO	64,57	34,78	36,01	14,54	27,86
% REDUÇÃO	0%	39,0	86,4	95,0	95,4

FIGURA 15. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T2. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

TRATAMENTO 2



FONTE: O autor

TABELA 3. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T2.

T2	D0	D7	D14	D21	D28
MEDIA	353,36	252,89	49,64	16,83	10,16
DEVIO PADRÃO	29,06	43,07	38,42	11,28	12,93
% REDUÇÃO	0%	28,4	86,0	95,2	97,1

FIGURA 16. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T3. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

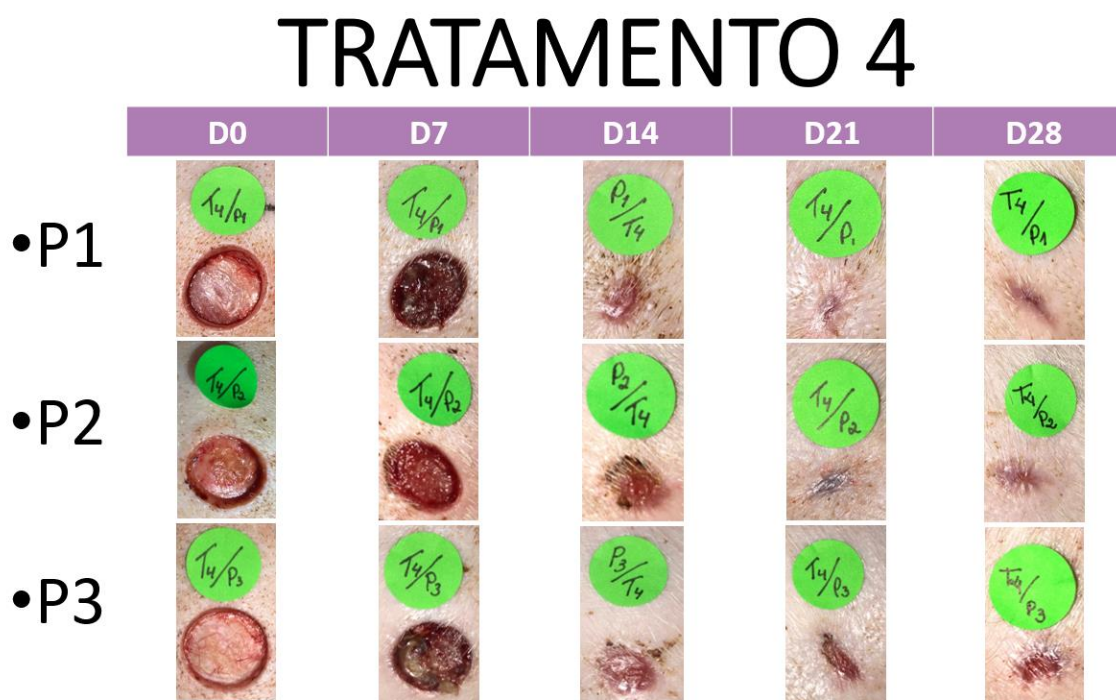


FONTE: O autor

TABELA 4. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T3.

T3	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	365,8	229,9	56,2	17,0	10,4
DESVIO PADRÃO	27,78	42,41	51,25	11,07	12,84
% REDUÇÃO	0%	37,1	84,6	95,3	97,2

FIGURA 17. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T4. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

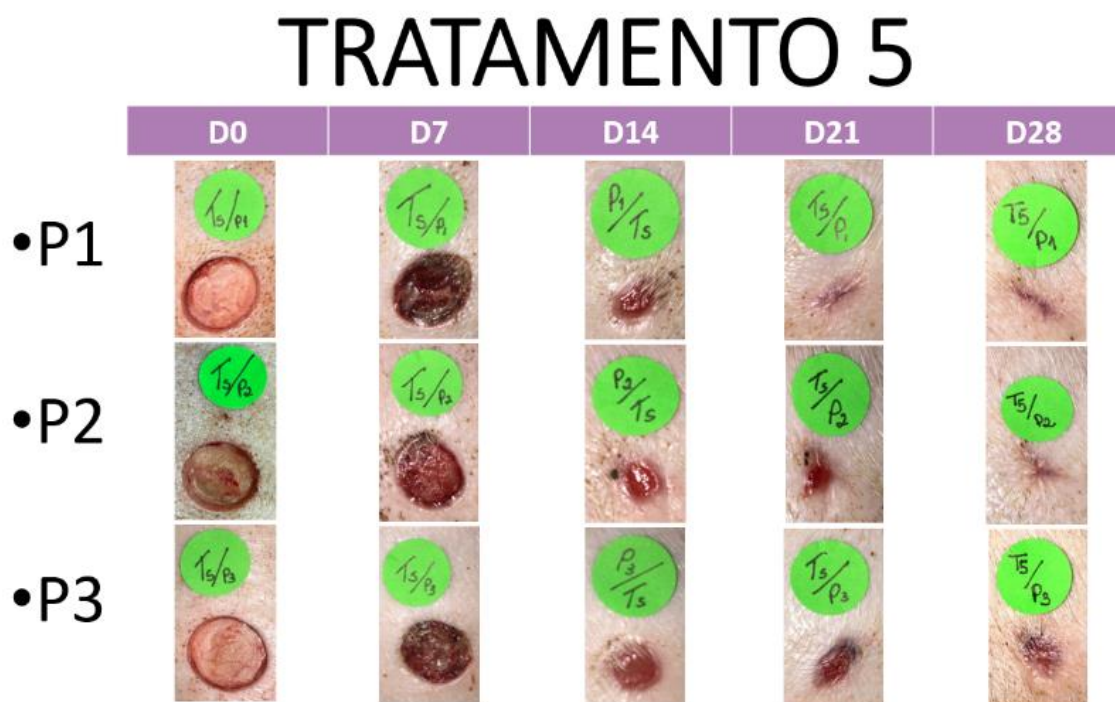


FONTE: O autor

TABELA 5. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T4.

T4	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	374,1	245,2	58,6	25,2	6,4
DESVIO PADRÃO	44,55	21,31	42,68	14,71	10,39
% REDUÇÃO	0%	34,5	84,3	93,3	98,3

FIGURA 18. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T5. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

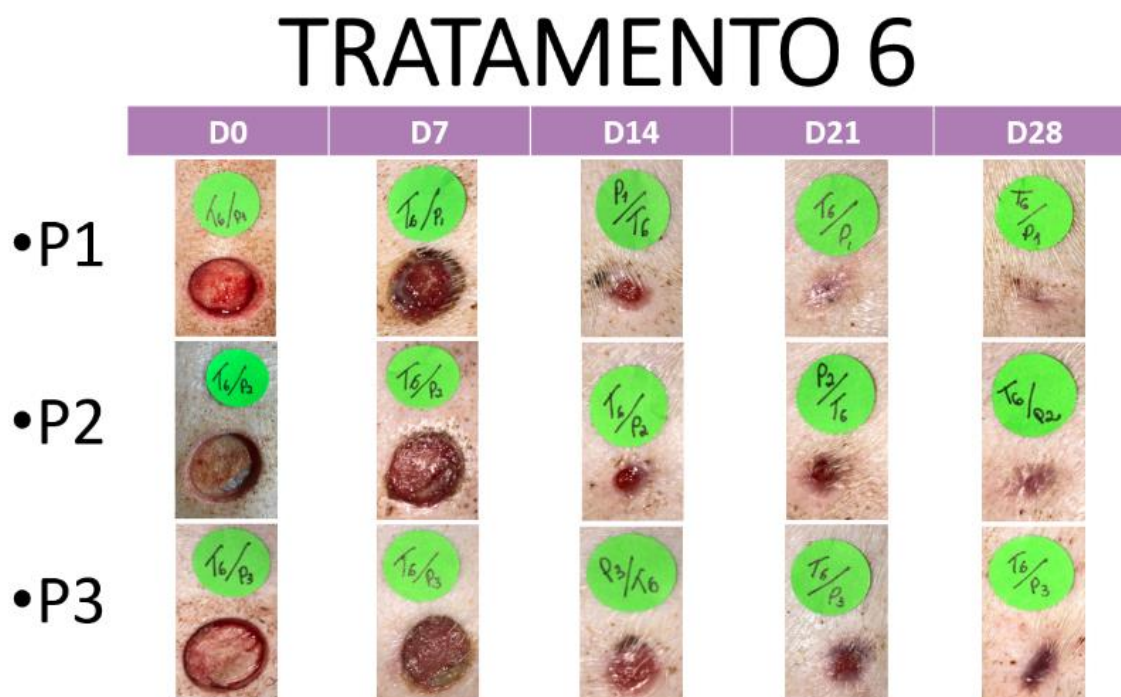


FONTE: O autor

TABELA 6. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T5.

T5	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	365,8	240,6	92,0	50,6	34,4
DESVIO PADRÃO	19,08	30,56	104,19	77,70	47,04
% REDUÇÃO	0%	34,2	74,8	86,2	90,6

FIGURA 19. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T6. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

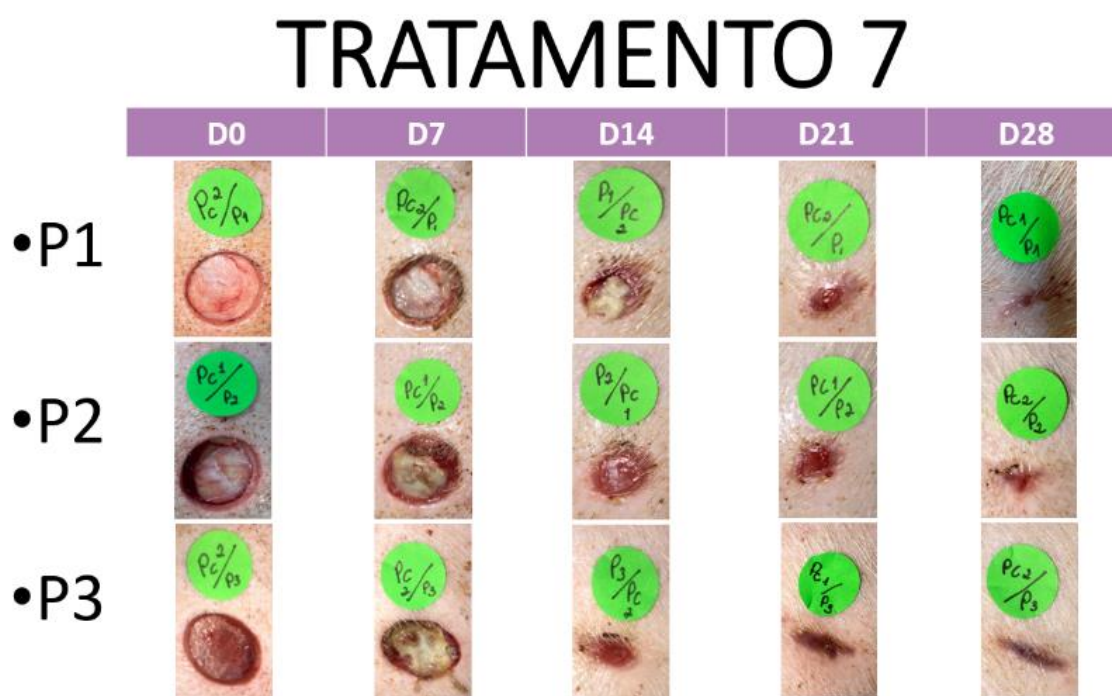


FONTE: O autor

TABELA 7. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T6.

T6	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	383,2	247,0	42,3	16,2	5,4
DESVIO PADRÃO	26,27	42,67	23,49	9,81	7,24
% REDUÇÃO	0%	35,5	88,9	95,8	98,6

FIGURA 20. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T7. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.



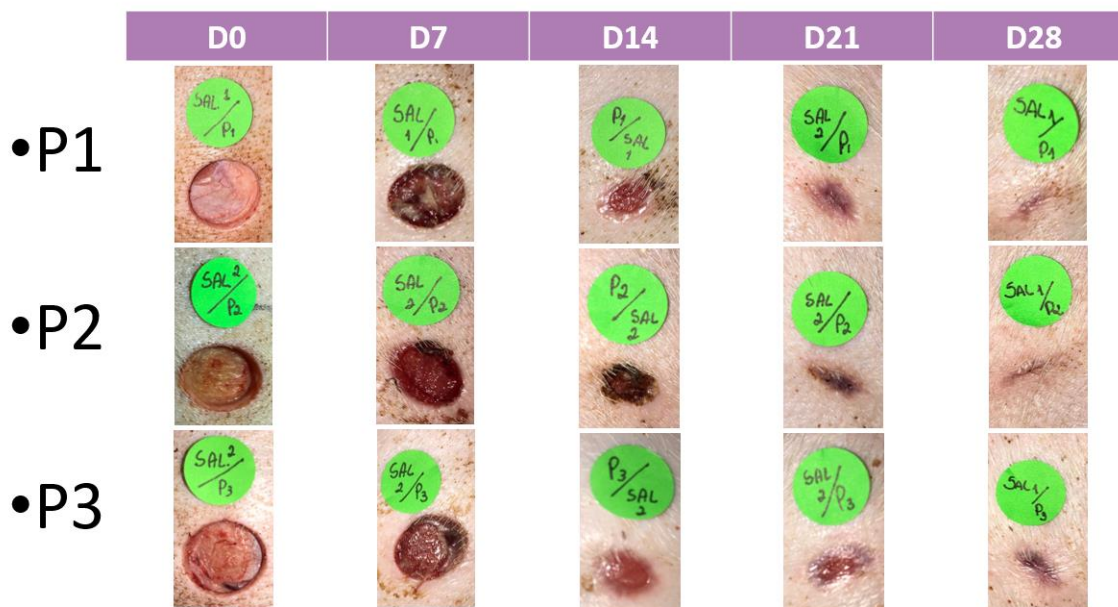
FONTE: O autor

TABELA 8. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T7.

T7	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	363,7	297,2	80,2	29,9	8,9
DESVIO PADRÃO	25,24	29,24	30,79	14,59	11,60
% REDUÇÃO	0%	18,3	78,0	91,8	97,6

FIGURA 21. Feridas excisionais em pele suína tratadas com T8. Avaliação macroscópica da evolução da ferida, mensurando tamanho de área e porcentagem de redução.

TRATAMENTO 8



FONTE: O autor

TABELA 9. Média, desvio padrão e porcentagem de redução, em relação à média, das feridas do T8.

T8	D0	D7	D14	D21	D28
MÉDIA	360,5	244,9	61,1	18,5	4,9
DESVIO PADRÃO	21,31	43,33	26,93	5,51	7,23
% REDUÇÃO	0%	32,1	83,1	94,9	98,6

5.8 - ANÁLISE HISTOLÓGICA

A histologia foi realizada nos dias D0 (primeira histologia) da pele integra (Fig. 22), D14 (segunda histologia) (Fig. 23 a 25) e D21 (terceira histologia) (Fig. 26 a 29), onde foi observado na primeira leitura, características histológicas da pele suína intacta, mostrando derme com tecido conjuntivo denso não modificado com feixes de fibras colágenas, ausência de infiltrado celular atípico e/ou inflamatório. Já na segunda leitura das lâminas, foi visto um padrão linear quanto ao processo de reparação da ferida entre os grupos, onde foram observados epiderme com acantose de discreta a moderada, úlcera focalmente extensa com infiltrado acentuado de neutrófilos, linfócitos e necrose. Derme com tecido de granulação composto por poucos capilares neoformados, discreta inflação, proliferação de tecido conjuntivo fibroso e infiltrado multifocal discreto de linfócitos, plasmócitos, macrófagos. Foi evidenciado crosta serocelular em uma das lâminas do tratamento de controle positivo, o que condiz com as observações macroscópicas vistas nas feridas desse tratamento.

A terceira análise histológica, também ocorreu uma padronização nos achados esperados de uma ferida em processo de cicatrização com 21 dias, apresentando epiderme com acantose de discreta a moderada, ausência de úlcera sendo substituída por um tecido de reepitelização (camada de hiperqueratose) e espessura já se assemelhando ao tecido normal, antes de ser lesionado. Derme com tecido de granulação composto por capilares que se alternaram de menos alongados a mais alongados e inflamação discreta.

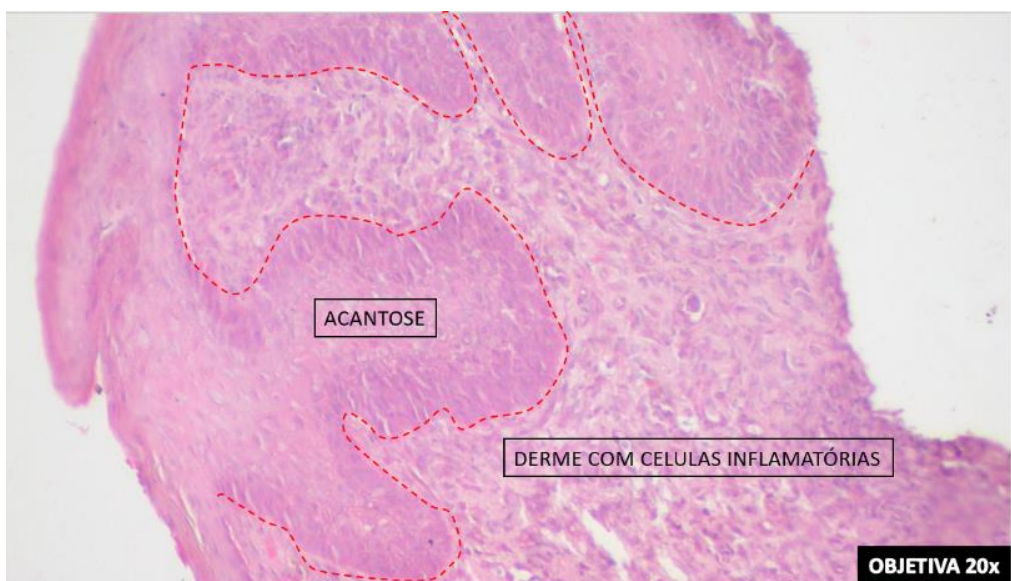
Na replicadas do T5, do P2 onde ocorreu um processo inflamatório intenso e distinto das demais feridas de todos os porcos, tendo essa replicata apresentado deposição de colágeno de forma acentuada unicamente na lâmina desse tratamento no P2 (fig. 30 e 31).

FIGURA 22. Pele hirsuta sem alterações histológicas, com epiderme normal e derme com tecido conjuntivo denso não modificado com feixes de fibras de colágeno maduro, ausência de infiltrado celular atípico e/ou inflamatório. HE, 4x.



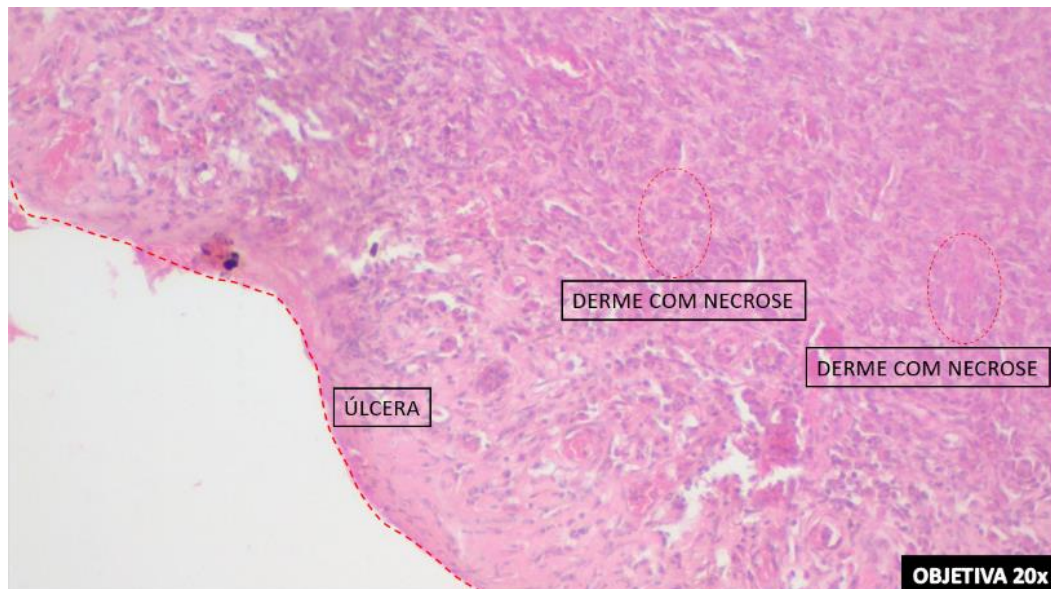
FONTE: O autor

FIGURA 23. Espessamento moderado da camada espinhosa da epiderme (acantose) e derme com infiltrado multifocal moderado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. HE, 20x.



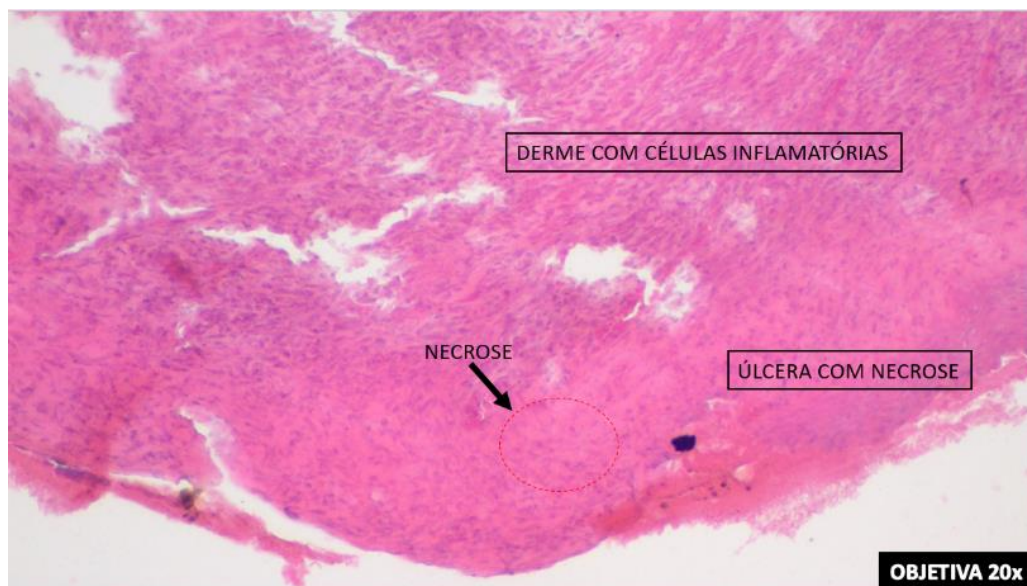
FONTE: O autor

FIGURA 24. Perda da epiderme (úlceras) com derme apresentando necrose e infiltrado multifocal acentuado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. HE, 20x.



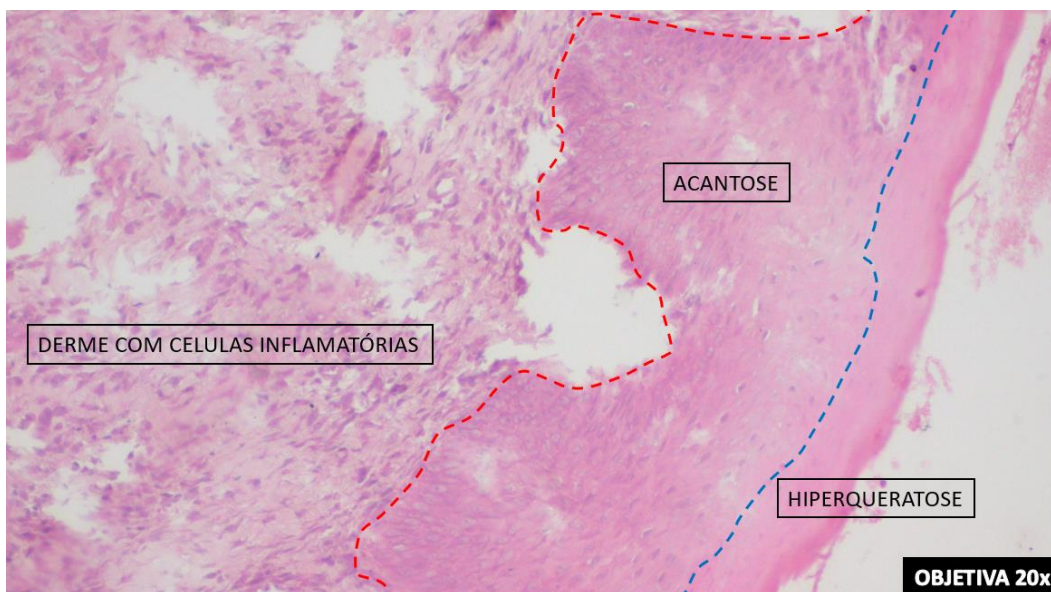
FONTE: O autor

FIGURA 25. Perda da epiderme (úlceras) com derme apresentando necrose e infiltrado multifocal acentuado de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. HE, 20x.



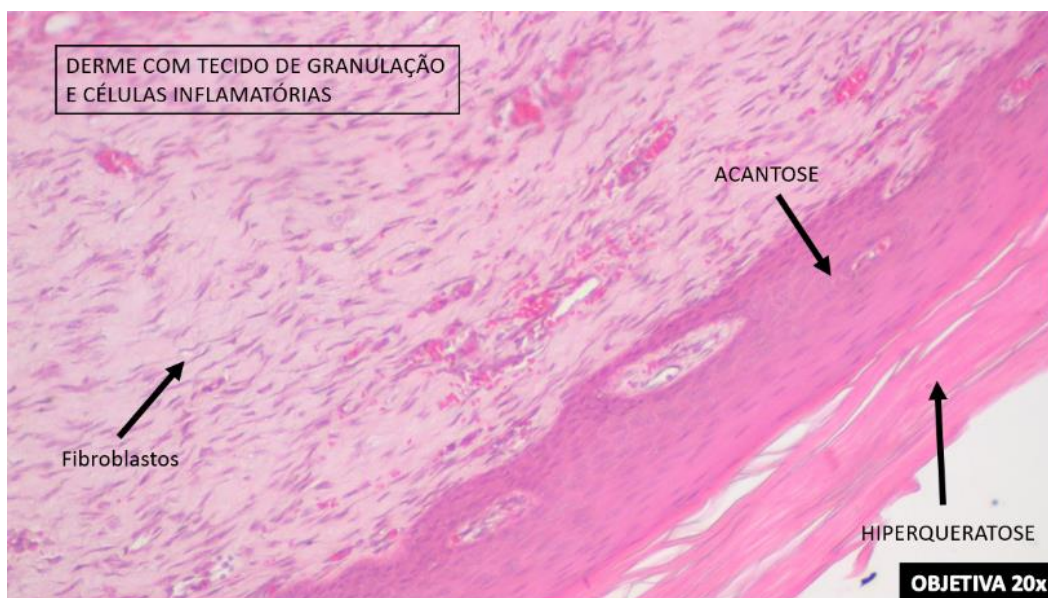
FONTE: O autor

FIGURA 26. Espessamento moderado da camada espinhosa (acantose) e córnea (hiperqueratose) da epiderme e derme com infiltrado multifocal discreto de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos. HE, 20x.



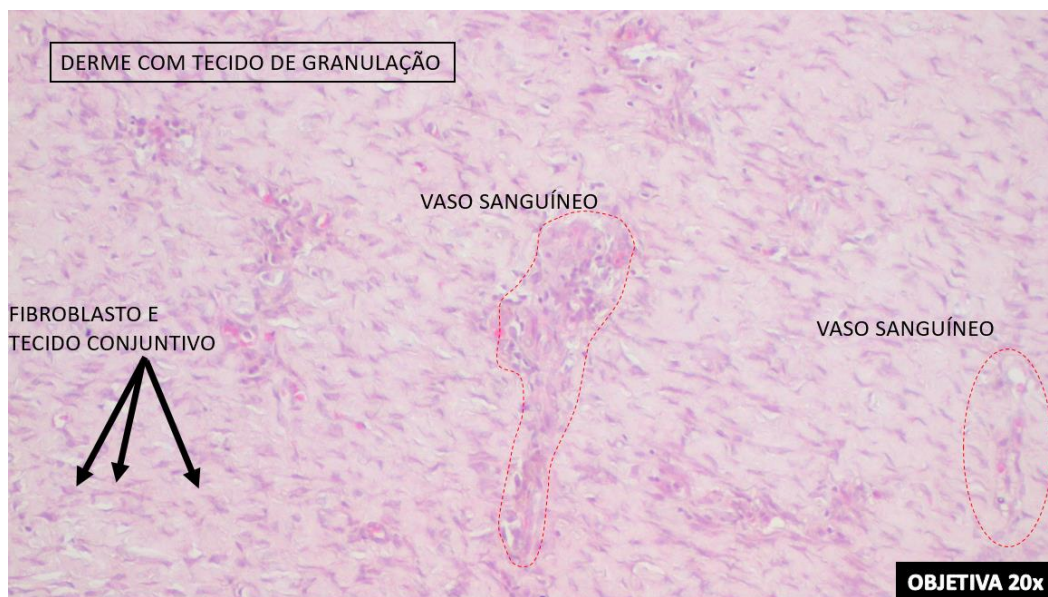
FONTE: O autor

FIGURA 27. Epiderme com presença de acantose, hiperqueratose e derme com tecido de granulação e células inflamatórias. HE, 20x.



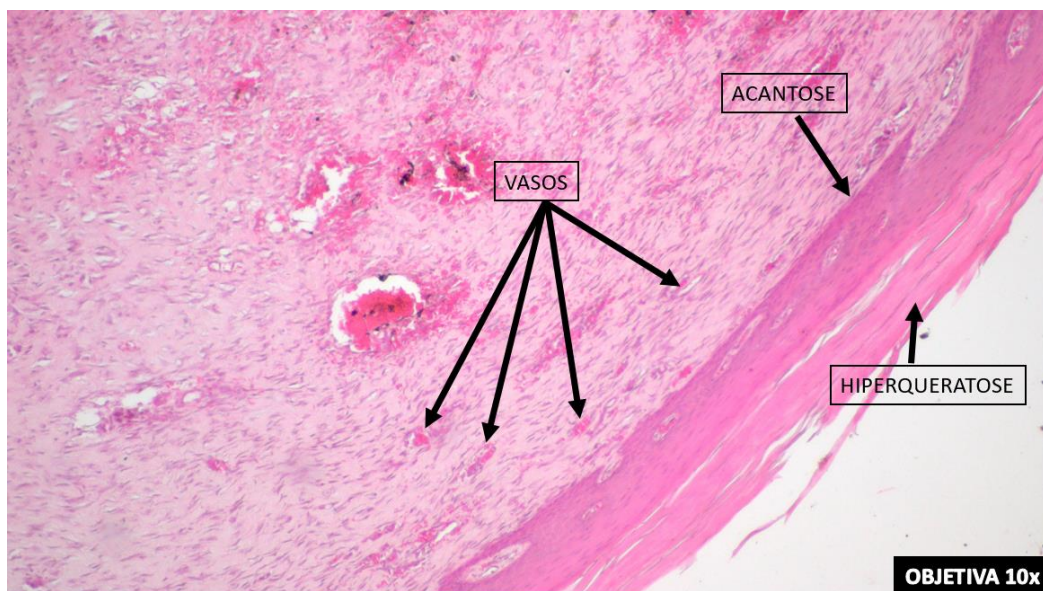
FONTE: O autor

FIGURA 28. Derme com tecido de granulação, caracterizado por proliferação de vasos sanguíneos, fibroblastos dispostos de forma perpendicular aos vasos, tecido conjuntivo fibroso e células inflamatórias. HE, 20x.



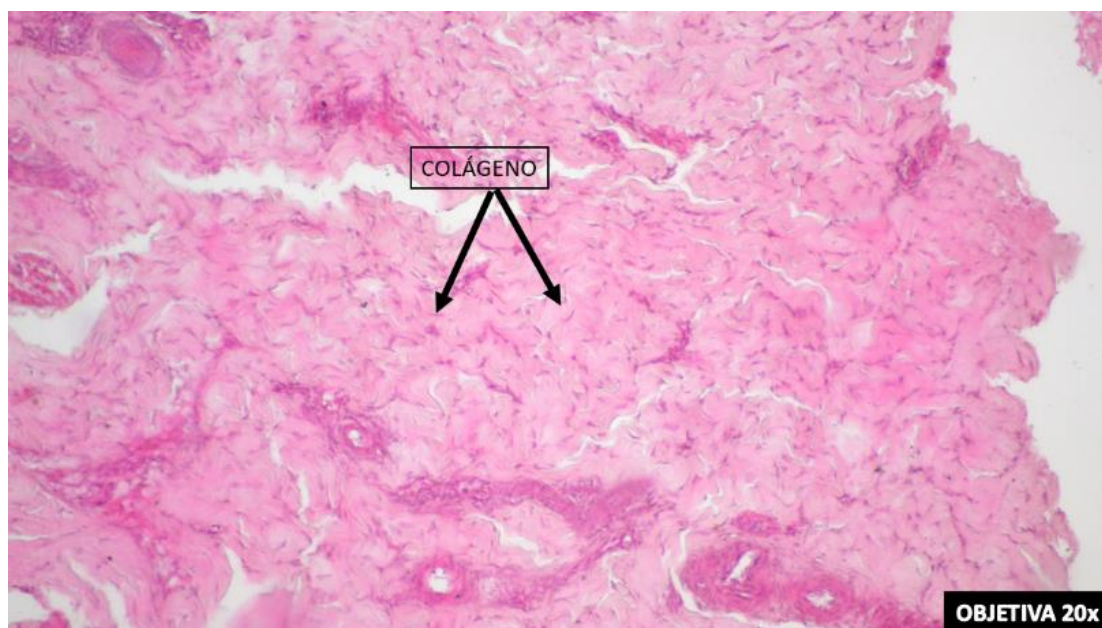
FONTE: O autor

FIGURA 29. Espessamento moderado da camada espinhosa (acantose) e córnea (hiperqueratose) da epiderme e derme com infiltrado multifocal moderado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e formação de novos vasos (angiogênese). HE, 10x.



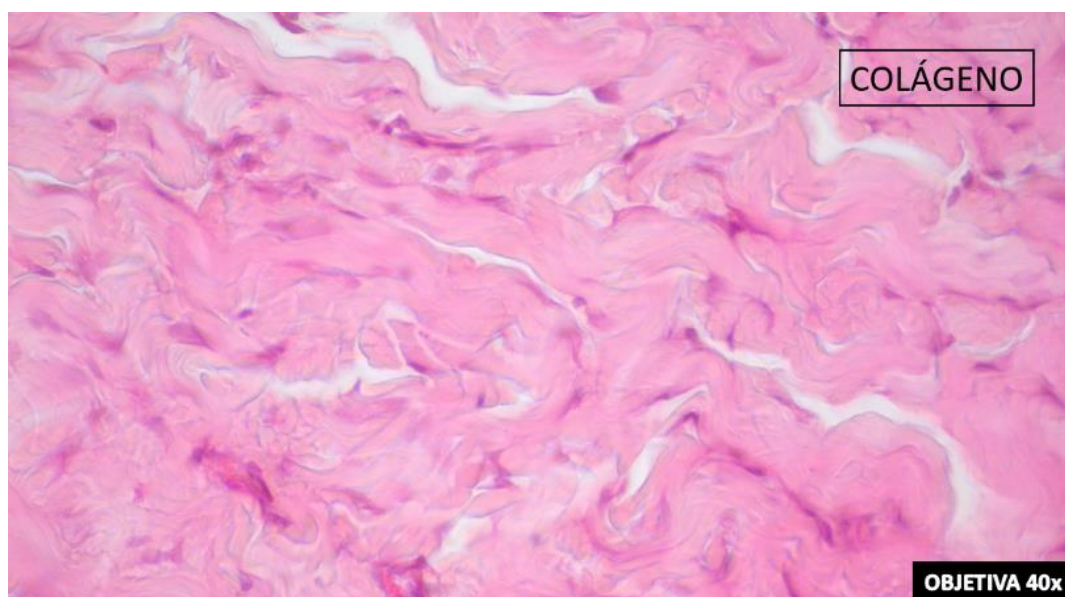
FONTE: O autor

FIGURA 30. Derme com presença de colágeno maduro. HE, 20x.



FONTE: O autor

FIGURA 31. Derme com presença de colágeno maduro. HE, 40x.



FONTE: O autor

6. DISCUSSÃO

Até o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que utiliza, de forma tópica, vesículas extracelulares, base cicatrizante e meio condicionado provenientes de CTMs de tecido adiposo de suíno, com o objetivo de auxiliar a resposta cicatricial de lesões cutâneas. MUSIAŁ-WYSOCKA et al. (2019) e VOGA et al. (2020) descrevem sobre a capacidade das CT de se proliferar, produzir células funcionais diferenciadas e se regenerar após uma lesão. Sendo as terapias com CT utilizadas para superar a incapacidade do corpo de regenerar tecidos danificados e processos metabólicos após injúria tecidual. Entre os diferentes tipos de CT, as CTMs representam atualmente as mais adequadas para fins terapêuticos, pelo fato de poderem ser isoladas de várias fontes, sua relativa facilidade de cultura *in vitro*, sua capacidade de se diferenciar em vários tipos de células diferentes e suas propriedades imunológicas especiais, tornando-as ferramenta promissora para terapia celular e regeneração tecidual.

Artigos como o de VOGA et al. (2020) discorre sobre a utilização de CT em medicina veterinária, representando uma possível opção terapêutica para muitas doenças animais, como doenças ortopédicas, orodentais e do trato digestivo, doenças hepáticas, renais, cardíacas, respiratórias, neuromusculares, dérmicas, olfativas e do sistema reprodutor. ALVES et al., (2019) observa através das pesquisas, a eficácia no tratamento de várias doenças utilizando CT, como infarto agudo do miocárdio, *diabetes mellitus*, cirrose hepática, ataxia cerebelar e mal de Parkinson.

A utilização de VEs demonstrou ser uma ferramenta promissora para a cicatrização de feridas e que os dias de análises histológicas foram importantes para avaliação de células inflamatórias, queratinócitos e fibroblastos. Feridas excisionais de espessura total e modelos de cicatrização de feridas com imobilização excisional são frequentemente usados para a verificação do fechamento da área da ferida cutânea após a administração de VEs de CT (FERREIRA & GOMES, 2018). FERREIRA et al., (2017) realizaram avaliação histológica nos dias 7, 14 e 21, revelando que a administração tópica de VEs acelerou o fechamento da ferida cutânea e que queratinócitos e fibroblastos expostos a VEs exibiram níveis mais elevados de proliferação e migração.

A utilização do suíno como modelo experimental fez com que fosse validado o uso seguro das vesículas extracelulares de CT processadas de tecido adiposo proveniente de suíno, para a cicatrização de feridas excisionais cutâneas utilizadas no nosso experimento. EIRIN et al., (2014) procuraram identificar os fatores que contribuísse para os efeitos terapêuticos das VEs derivadas de CTMs suínas, caracterizando sua carga proteica usando proteômica. As CTMs suínas foram cultivadas a partir de gordura abdominal e as VEs caracterizadas quanto à expressão de marcadores típicos de CTMs e VEs. Concluindo então que as VEs derivadas de CT de tecido adiposo suíno, têm uma carga proteica seletivamente enriquecida com uma assinatura biológica específica que as CTMs podem empregar para comunicação intercelular para facilitar o reparo tecidual.

Roedores e logomorfos, foram utilizados em vários estudos, como modelo de cicatrização, porém a cicatrização desses animais ocorre de forma diferenciada. A anatomia, fisiologia e histologia são diferentes, sendo que a retração da ferida se dá pela retração do panículo carnosus (ZUO et al., 2016). Por isso, no trabalho exposto, o modelo experimental utilizado foram os suínos, pelo fato de serem modelos de doenças muito eficientes na pesquisa biomédica, particularmente para interpretar as descobertas que posteriormente serão utilizadas para os seres humanos. O modelo suíno se assemelha em várias características da fisiologia humana, permitindo uma visão mais profunda dos mecanismos patogênicos clinicamente relevantes e obtendo avanço nas estratégias regenerativas para melhorar a progressão da doença (EIRIN et al., 2014). A utilização de animais com a mesma idade, sendo adquiridos de um mesmo lugar, teve como objetivo minimizar a variabilidade genética individual entre os animais reduzindo assim o efeito da genética na resposta individual. Além disso, pode se eliminar possíveis variações, pelo fato de que comparações de vários tratamentos possam ser realizadas no mesmo indivíduo utilizando o modelo suíno (THEUNISSEN et al., 2016).

A primeira histologia realizada no experimento (D14), relevou um padrão linear quanto ao processo de reparação da ferida entre os grupos, onde foram observados inflamação acentuada na epiderme com a presença de neutrófilos e linfócitos, seguindo assim, um padrão de cicatrização normal de feridas com a ativação da cascata de coagulação e as vias inflamatórias, além de várias células

imunes como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, neutrófilos, monócitos, macrófagos e linfócitos (SHEDOEVA et al., 2019; RAZIYEVA et al., 2021). Sendo também observado na segunda análise histológica, uma padronização nos achados esperados de uma ferida cicatrizada com 21 dias, com tecido de granulação composto por capilares menos alongados e inflamação bem discreta. Nessa fase de maturação ou remodelamento ocorre a regressão de muitos dos capilares recém-formados, a estrutura tecidual tende ao normal, além de ser observado todos os processos ativados nas fases anteriores diminuir, como a presença de células inflamatórias (LEAL & CARVALHO, 2014; TOTTOLI et al., 2020).

Na terceira análise histológica (D21), foi contatado na leitura da lâmina do T5, animal P2, um depósito acentuado de colágeno, observado apenas no T5 e somente em uma única lâmina. Durante os 28 dias de curativo das feridas cirúrgicas, um dos T5 do animal P2 obteve um processo inflamatório acentuado, se diferenciando das demais feridas no dorso do animal, essa ferida específica apresentou todas as fases de um processo inflamatório de uma forma acentuada, o que pode ter levado a presença de colágeno unicamente na lâmina histológica dessa ferida específica (Fig. 30 e 31), Tendo em vista que durante a reparação do tecido conjuntivo ocorre a formação do tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos. Os fibroblastos iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (OLIVEIRA & DIAS, 2012).

O peso semanal dos animais, tendo sido observado aumento gradativo em todos os suínos, foi um dado relevante durante os 28 dias de cicatrização das feridas, considerando que muitas falhas nas tentativas em adaptar-se ao ambiente de restrição de espaço implicam em redução do ganho de peso vivo, da taxa de ingestão e da eficiência alimentar, uma vez que ocorre a persistência dessa situação, afeta o grau de bem-estar animal (SILVA et al., 2018). Além de que a nutrição tem sido reconhecida como fator muito importante que também afeta a cicatrização de feridas, como por exemplo, carências de vitamina C resultam na cicatrização deficiente de feridas, tendo sido associada a uma diminuição da

síntese de colágeno e a proliferação de fibroblastos, além de diminuir a anfigênese e aumentar a fragilidade capilar (LEAL & CARVALHO, 2014).

A coleta de temperaturas, tanto do ambiente, quanto de forma sistêmica e individual das feridas foram dados importantes para a observação de um padrão de resultados entre os animais e entre as feridas excisionais, tendo em vista que feridas mais contaminadas são encontradas em situação de ambientes com temperatura e umidade alta (OLIVEIRA et al., 2012). Conseqüentemente, sendo os dados importantes para este estudo, uma vez que a inflamação é um dado significativo nesse processo de cicatrização.

7. CONCLUSÕES

Apesar do estudo não ter demonstrado diferença significativa no reparo tecidual, com as análises e resultados expostos, conclui-se que as vesículas extracelulares possuem efeito terapêutico na cicatrização de feridas excisionais cutâneas, apresentando intensa neovascularização e uma boa retração de ferida, sem causar retardo ou complicações na cicatrização das feridas. Sendo também observado na análise histológica, que todos os tratamentos mantiveram um processo de cicatrização esperado de uma ferida em processo de cicatrização aguda.

Conclui-se também a importância da utilização de suínos como modelo experimental na cicatrização de feridas cutâneas, além de uma padronização de espessura e diâmetro das feridas excisionadas. Sendo também demonstrado no estudo que animais sedados diariamente por 28 dias, não obtiveram alterações significativas em análises hematológicas e em bioquímica sérica.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos estudos devem ser realizados para identificar concentrações diferentes de VE, tendo em vista que o estudo não observou diferenças significativas na cicatrização das feridas excisionais cutâneas, com o uso de duas concentrações diferentes de VE. Até mesmo a utilização subdérmica dessas vesículas, se tornam importante para novos estudos, tendo em vista a influência do processo inflamatório local das feridas, como a atividades proteolíticas, possam ter interferido nas funções das VE. Sendo o tamanho dessas vesículas também fatores que podem influenciar na sua migração durante o processo de cicatrização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S., COTTAFAVA, S., FERRO, C. A., SANTOS, J. A., SANTOS, K. F., CIPRIANO, D. Z., FRASSON, F., DIAS, L. A. D. S. O uso terapêutico de células tronco. **Revista Saúde em Foco–Edição** nº 11, 2019.

BASSOLS, A., COSTA, C., ECKERSALL, P. D., OSADA, J., SABRIA, J., & TIBAU, J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. **Proteomics–Clinical Applications**, v. 8, n. 9-10, p. 715-731, 2014.

BERNARDO, A. F. C; SANTOS, K. D; SILVA, D, P. PELE: ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DO NASCIMENTO À MATURIDADE. **Revista Saúde em Foco–Edição** nº 11, V. 1, P. 1221-33, 2019.

BRASILEIRO, A. C. L., OLIVEIRA, D. C. D., SILVA, P. B. D., & ROCHA, J. K. S. D. L. Impact of topical nifedipine on wound healing in animal model (pig). **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 19, 2020.

BRAVO, M. D. O. Aplicação de bactérias extracelulares de células-tronco mesenquimais (VEs-CTMs) na produção *in vitro* de embriões bovinos. **(Tese doutorado)** Universidade Católica de Brasília. 2022.

BRUNO, S., GRANGE, C., DEREGIBUS, M. C., CALOGERO, R. A., SAVIOZZI, S., COLLINO, F., MORANDO, L., BUSCA, A., FALDA, M., BUSSOLATI, B., TETTA, C., CAMUSSI, G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 5, p. 1053-1067, 2009.

CAMPAGNOLI, C., ROBERTS, I. A., KUMAR, S., BENNETT, P.R., BELLANTUONO, I., FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.

CAMPOS, A. C. L., BORGES-BRANCO, A., & GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)**, v. 20, p. 51-58, 2007.

CHU, D. T., NGUYEN THI PHUONG, T., TIEN, N. L. B., TRAN, D. K., MINH, L. B., THANH, V. V., ANH, P. G., PHAM, V. H., T, V. Adipose tissue stem cells for therapy: an update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 7, 2019.

CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C.W., CORSELLI, M., PARK, T.S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 301-313, 2008.

DANESHMANDI, L., SHAH, S., JAFARI, T., BHATTACHARJEE, M., MOMAH, D., SAVEH-SHEMASHAKI, N., BAIXO, K. W. H., LAURENCIN, C. T. Emergence of the

stem cell secretome in regenerative engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1373-1384, 2020.

EIRIN, A., ZHU, XY, PURANIK, AS, WOOLLARD, J. R, TANG, H., DASARI, S., LERMAN. A., WIJNEN, A. J. V., LERMAN, L. O. MicroRNA and mRNA cargo of extracellular vesicles from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Gene**, v. 551, n. 1, p. 55-64, 2014.

FAN, N., LAI, L. Genetically modified pig models for human diseases. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 40, n. 2, p. 67-73, 2013.

FERREIRA, A. D. F., GOMES, D. A. Stem cell extracellular vesicles in skin repair. **Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. 4, 2018.

FERREIRA, A. D. F., CUNHA, P. D. S., CARREGAL, V. M., SILVA, P.D. C. D., MIRANDA, M. C. D., KUNRATH-LIMA, M., MELO, M. I. A., FARACO, C. C. F., BARBOSA, J. L., FREZARD, F., RESENDE, V., RODRIGUES, M. A., GOES, A. M., GOMES, D. A. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Accelerate Migration and Activate AKT Pathway in Human Keratinocytes and Fibroblasts Independently of miR-205 Activity. **Stem Cells International**, v. 2017, Article ID: 9841035.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATSINIK, N. V.; PANASYUK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *In Vitro* and Replantation *In Vivo*. **Transplantation**, v. 17, n.4, p.331-340, 1974.

FRYKBERG R. G. & BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances In Wound Care**, V. 4, n. 9, p. 560-582, 2015.

GORECKA, J., KOSTIUK, V., FERREYDOONI, A., GONZALEZ, L., LUO, J., DASH, B., ISAJI, T., ONO, S., LIU, S., LEE, S.R., XU, J., LIU, J., TANIGUCHI, R., YASTULA, B., HSIA, H.C., QYANG, Y., DARDIK, A. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2019.

GOWEN, A., SHAHJIN, F., CHAND, S., ODEGAARD, K. E., & YELAMANCHILI, S. V. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: challenges in clinical applications. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 8, p. 149, 2020.

GRADA, A., MERVIS, J., & FALANGA, V. Research techniques made simple: animal models of wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 10, p. 2095-2105. e1, 2018.

GUO, S. A., & DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal Of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

HAMILTON, D. W., WALKER, J. T., TINNEY, D., GRYNYSHYN, M., EL-WARRAK, A., TRUSCOTT, E., FLYNN, L. E. The pig as a model system for investigating the

recruitment and contribution of myofibroblasts in skin healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 30, n. 1, p. 45-63, 2022.

HARMAN, R. M., MARX, C., & VAN DE WALLE, G. R. Translational animal models provide insight into mesenchymal stromal cell (MSC) secretome therapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 654885, 2021.

HASSAN, W. U., GREISER, U., & WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 3, p. 313-325, 2014.

HONMOU, O., ONODERA, R., SASAKI, M., WAXMAN, S. G., KOCSIS, J. D. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 292-297, 2012.

JOHNSON, V., WEBB, T., NORMAN, A., COY, J., KURIHARA, J., REGAN, D., DOW, S. Activated mesenchymal stem cells interact with antibiotics and host innate immune responses to control chronic bacterial infections. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-18, 2017.

KABASHIMA, K., HONDA, T., GINHOUX, F., EGAWA, G. A. ANATOMIA IMUNOLÓGICA DA PELE. **Nature Reviews Immunology**, V. 19, n. 1, p. 19-30, 2019.

KARUSSIS D., KARAGEORGIU C., VAKNIN-DEMBINSKY A., GOWDA-KURKALLI B., GOMORI J.M., KASSIS I., BULTE J.W.M., PETROU P., BEM-HUR T., ABRAMSKY O., SLAVIN S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. **Archives of Neurology**. v. 67, n. 10, p. 1187-1194, 2010.

KATSUDA, T., KOSAKA, N., TAKESHITA, F., & OCHIYA, T. The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Proteomics**, v. 13, n. 10-11, p. 1637-1653, 2013.

KESHTKAR, S., AZARPIRA, N., & GHAREMANI, M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2018.

KOU, M., HUANG, L., YANG, J., CHIANG, Z., CHEN, S., LIU, J., GUO, L., ZHANG, X., ZHOU, X., XU, X., YAN, X., WANG, Y., ZHANG, J., XU, A., TSE, H., LIAN, Q. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool?. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 7, p. 1-16, 2022.

KUCHARZEWSKI, M., ROJCZYK, E., WILEMSKA-KUCHARZEWSKA, K., WILK, R., HUDECKI, J., & LOS, M.J. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. **European Journal Of Pharmacology**, v. 843, p. 307-315, 2019.

LALU M.M., MCINTYRE L., PUGLIESE C., FERGUSSON D., WINSTON B.W., MARSHALL J.C., GRANTON J., STEWART D.J. Safety of cell therapy with

mesenchymal stromal cells (safecell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Plos One**. v. 7, n. 10, p. e47559, 2012.

LAUREANO, A., & RODRIGUES, A. M. Cicatrização de feridas. **Revista da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia**, v. 69, n. 3, p. 355-355, 2011.

LEAL, E.C, & CARVALHO, E. Cicatrização de feridas: o fisiológico e o patológico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 9, n. 3, p. 133-143, 2014.

LI, P., GUO, X. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2018.

MARTINELLO, T., GOMIERO, C., PERAZZI, A., IACOPETTI, I., GEMIGNANI, F., DEBENEDICTIS, G. M., FERRO, S., ZUIN, M., MARTINES, E., BRUN, P., MACCATROZZO, L., CHIERS, K., SPAAS, J., PATRUNO, H. M. Allogeneic mesenchymal stem cells improve the wound healing process of sheep skin. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2018.

MAZINI, L., ROCHETTE, L., AMINE, M., MALKA, G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 2523, 2019.

MENDONÇA R. J, COUTINHO-NETTO J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiro de Dermatologia** 84(3):257-62. 2009.

MORAES, A. S., SILVA, A. L. B., ANDRADE, B. P., DOBELIN, C. C., MELO, E. R., SILVA, G. O., AGUIAR, L. C., MOREIRA, M. V. A., NASCIMENTO, M. M. P., CORRÊA, W. P. Perspectivas do uso de células-tronco na cirurgia plástica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 13, n. 4, p. e6756-e6756, 2021.

MUSIAŁ-WYSOCKA, A., KOT, M., & MAJKA, M. The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. **Cell Transplantation**, v. 28, n. 7, p. 801-812, 2019.

NAWAZ, M., FATIMA, F., VALLABHANENI, K. C., PENFORNIS, P., VALADI, H., EKSTRÖM, K., KHOLIA, S., WHITT, J. D., FERNANDES, J. D., POCHAMPALLY, R., SQUIRE, J. A., CAMUSSI, G. Extracellular vesicles: evolving factors in stem cell biology. **Stem Cells International**, Volume 2016, ID do artigo 1073140, 2015.

OLIVEIRA, A. C. D., ROCHA, D. D. M., BEZERRA, S. M. G., ANDRADE, E. M. L. R., SANTOS, A. M. R. D., & NOGUEIRA, L. T. Qualidade de vida de pessoas com feridas crônicas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 32, p. 194-201, 2019.

OLIVEIRA, L.V.P.M & DIAS, R.V.C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

PARK, K. S., BANDEIRA, E., SHELKE, G. V., LÄSSER, C., & LÖTVALL, J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2019.

PRATHEESH, M. D., DUBEY, P. K., GADE, N. E., NATH, A., SIVANARAYANAN, T. B., MADHU, D. N., SOMAL, A., BAIJU I., SREEKUMAR, T. R., GLEEJA, V. L., BHATT, I. A., VIKASHCHANDRA V., AMARPAL. SHARMA, B., SAIKUMAR, G., SHARMA, G. T. Comparative study on characterization and wound healing potential of goat (*Capra hircus*) mesenchymal stem cells derived from fetal origin amniotic fluid and adult bone marrow. **Research In Veterinary Science**, v. 112, p. 81-88, 2017.

QUEIROZ, C. M. D. Vesículas extracelulares e meio condicionado de células tronco mesenquimais e seu potencial imunomodulador em explantes endometriais bovinos. **(Tese Doutorado)** Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, 90 páginas, 2017.

RAZIYEVA, K., KIM, Y., ZHARKINBEKOV, Z., KASSYMBEK, K., JIMI, S., & SAPAROV, A. Immunology of acute and chronic wound healing. **Biomolecules**, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.

SALES, E.A. A eficácia dos nutricosméticos no tratamento da pele, durante o processo de envelhecimento cutâneo: uma revisão integrativa. Monografia Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia Da Faculdade Sete Lagoas – Facsete, 35 páginas, 2019.

SESWANDHANA, R., ANZHARI, S., GHOZALI, A., DACHLAN, I., WIROHADIDJOJO, Y. W., & ARYANDONO, T. A modified method to create a porcine deep dermal burn model. **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. 34, n. 2, p. 187, 2021.

SHEDOEVA, A., LEAVESLEY, D., UPTON, Z., & FAN, C. Cicatrização de feridas e uso de plantas medicinais. **Medicina Complementar e Alternativa Baseada em Evidências**, v. 2019, 2019.

SHEU, S. Y., WANG, W. L., FU, Y. T., LIN, S. C., LEI, Y. C., LIAO, J. H., TANG, N. Y., KUO, T.F., YAO, C. H. The pig as an experimental model for mid-dermal burns research. **Burns**, v. 40, n. 8, p. 1679-1688, 2014.

SI, Z., WANG, X., SUN, C., KANG, Y., XU, J., WANG, X., & HUI, Y. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 114, p. 108765, 2019.

SILVA BRAGA, J., MACITELLI, F., DE LIMA, V. A., & DIESEL, T. O modelo dos “Cinco Domínios” do bem-estar animal aplicado em sistemas intensivos de produção de bovinos, suínos e aves. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 19, n. 2, 2018.

SILVA, M. M. D. Efeito do secretoma de Células Tronco Mesenquimais da derme no crescimento do pelo de camundongos (*Mus musculus*). **Trabalho de Conclusão de Curso** – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SILVA, P. N., DE ALMEIDA, O. A. E., & ROCHA, I. C. Terapia tópica no tratamento de feridas crônicas. **Enfermería Global**, v. 13, n. 1, p. 33-58, 2014.

SIVIERI, K., DE CODES C., C., NOVAK, J., TOBARA, J. C., MARTINS, W. K. Microbiota da Pele: Novos Desafios. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, V. 50, N. 1, P. 93-112, 2021.

SOUTO, L.R.M. Modelo de Pele Humana (Derme+ Epiderme) Reconstruída *In Vitro*. **São Paulo Medicine Journal**, V. 124, N. 2, P. 71-76, 2005.

TEXTOR, J. A., CLARK, K. C., WALKER, N. J., ARISTIZOBAL, F. A., KOL, A., LEJEUNE, S. S., BLEDSOE, A., DAVIDYAN, A., GRAY, S. N., BOHANNON-WORSLEY, L. K., WOOLARD, K. D., BORJESSON, D. L. Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 98-108, 2018.

THEUNISSEN, D., SEYMOUR, B., FORDER, M., COX, S. G., & RODE, H. Measurements in wound healing with observations on the effects of topical agents on full thickness dermal incised wounds. **Burns**, v. 42, n. 3, p. 556-563, 2016.

TOTTOLI, E.M, DORATI, R., GENTA, I., CHIESA, E., PISANI, S., & CONTI, B. Processo de cicatrização de feridas cutâneas e novas tecnologias emergentes para tratamento e regeneração de feridas cutâneas. **Farmacêutica**, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

ULLAH, M., LIU, D. D., & THAKOR, A. S. Mesenchymal stromal cell homing: mechanisms and strategies for improvement. **Isience**, v. 15, p. 421-438, 2019.

VELANDER, P., THEOPOLD, C., HIRSCH, T., BLEIZIFFER, O., ZUHAILI, B., FOSSUM, M., HOELLER, D., GHEERARDYN, R., CHEN, M., VISOVATTI, S., SVENSSON, H., YAO, F., ERIKSSON, E. Impaired wound healing in an acute diabetic pig model and the effects of local hyperglycemia. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 2, p. 288-293, 2008.

VIEIRA, C. P. D. B, & ARAÚJO, T. M. E. D. Prevalência e fatores associados às feridas crônicas em idosos na atenção básica. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, 2018.

VOGA, M., ADAMIC, N., VENGUST, M., & MAJDIC, G. Stem cells in veterinary medicine—current state and treatment options. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 278, 2020.

WANG, H. S., HUNG, S.C., PENG, S.T., HUANG, C.C., WEI, H.M., GUO, Y.J., FU, Y.S., LAI, M.C., CHEN, C.C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1330-1337, 2004.

WANG, J. F., OLSON, M. E., RENO, C. R., WRIGHT, J. B., & HART, D. A. The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 4, p. 341-348, 2001.

YOUNG, H.E., STEELE, T.A., BRAY, R.A., HUDSON, J., FLOYD, J.A., HAWKINS, K., THOMAS, K., AUSTIN, T., EDWARDS, C., CUZZOURT, J., DUENZL, M., LUCAS, P.A., ASA C. BLACK JR. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

ZUK, P.A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D.A., HUANG, J.I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z.C., FRASER, J.K., BENHAIM, P., AND HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of The Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, 2002.

ZUO, Y., YU, X., LU, S. Dermal Fibroblasts from Different Layers of Pig Skin Exhibit Different Profibrotic and Morphological Characteristics. **Anatomical Record**, v. 299, n. 11, p. 1585–1599, 2016.

ANEXO I

Brasília, 26 de abril de 2022.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de ensino intitulado “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS DE PELE EM SUÍNOS**”, SEI n.º 23106.104828/2021-96, sob responsabilidade do Professor Fábio Henrique Bezerra Ximenes, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, na 172ª reunião ordinária, realizada em 26/4/2022. Este projeto foi aprovado para utilização de suínos - *Large White* (3 machos), provenientes do criatório comercial Granja Santo Antônio, PADDF/DF.

O presente certificado é válido pelo período de 27/4/2022 a 12/6/2022.



Carina Krewer

Dra. Carina da Costa Krewer

Coordenadora da CEUA – UnB



ANEXO II

TRATAMENTO IDENTIFICAÇÃO		TEMPERATURA INDIVIDUAL DAS FERIDAS																													
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22	D23	D24	D25	D26	D27	D28		
T1	DP	0,5	0,543	0,392	0,354	0,331	0,527	0,597	0,747	0,528	0,331	0,731	0,36	0,752	0,568	0,741	0,683	0,585	0,214	0,562	0,493	0,299	0,438	0,758	0,489	0,535	0,378	0,477	0,361		
	Média	36,92	36,93	36,28	36,02	36,02	37,12	35,9	36,47	36,33	37,28	37,38	37,68	37,52	37,13	37,12	36,05	37,82	37,68	38,3	38,45	37,78	37,6	37,53	38,77	37,67	38,55	37,5	38,47		
	CV	1,353	1,47	1,08	0,984	0,871	1,42	1,662	2,05	1,453	0,888	1,954	0,956	2,005	1,53	1,997	1,796	1,546	0,567	1,468	1,282	0,793	1,165	2,02	1,26	1,421	0,981	1,273	0,94		
	Máx	37,7	37,6	36,7	36,6	38,5	37,9	36,9	37,4	37,1	37,7	38,3	38,2	38,3	37,7	38,1	39,3	38,4	37,9	39,1	39,2	38,2	38,4	38,4	39,7	38,2	39	38,3	38,9		
	Mín	36,3	36	35,8	35,7	37,6	36,5	35,1	35,6	36,9	36,7	37,2	36,4	36,3	36	37,3	36,9	37,3	36,9	37,3	37,6	37,8	37,4	37,3	36,5	38,4	36,8	38	36,9	37,9	
T2	DP	0,333	0,441	0,442	0,456	0,571	0,755	0,197	1,046	0,725	0,367	0,755	0,596	0,726	0,771	0,649	0,906	0,378	0,531	0,121	0,407	0,354	0,417	0,556	0,306	0,333	0,361	0,299	0,509		
	Média	36,75	37,17	36,65	36,4	36,12	36,78	36,15	36,32	36,52	37,03	37,52	37,55	37,25	37,35	37,28	37,78	37,75	37,68	38,47	38,52	38,02	37,42	37,28	38,82	37,87	38,67	36,92	38,65		
	CV	0,907	1,187	1,205	1,253	1,497	2,052	0,546	2,88	1,985	0,991	2,012	1,587	1,949	2,065	1,742	2,399	1,002	1,408	0,315	1,057	0,932	1,114	1,493	0,788	0,879	0,935	0,811	1,317		
	Máx	37	37,7	37,2	37,3	38,9	37,9	36,3	37,1	37,9	37,5	38,5	38,3	38	38,5	37,7	39	38,3	38,3	38,3	38,6	38,9	38,6	38,2	38,3	39,2	38,3	39,1	37,3	39,2	
	Mín	36,1	36,6	36,2	36,1	37,5	35,9	34,5	36	36,4	36,7	36,8	36,3	36,4	36	36,7	37,2	37,1	37,1	38,3	37,8	37,7	37	36,8	38,3	37,4	38,1	36,5	37,9		
T3	DP	0,432	0,32	0,509	0,21	0,547	0,516	0,383	0,279	0,606	0,459	0,66	0,531	0,672	0,72	0,756	0,339	0,434	0,467	0,207	0,437	0,175	0,479	0,708	0,45	0,632	0,098	0,485	0,303		
	Média	36,85	37,03	36,37	36,1	38,03	36,83	36,07	36,38	36,37	37,37	37,3	37,72	37,55	37,57	37,3	37,77	37,8	37,68	38,55	38,45	37,77	37,62	37,62	37,42	38,37	37,6	38,28	36,65	38,4	
	CV	1,174	0,865	1,399	0,581	1,437	1,402	1,062	0,766	1,665	1,228	1,77	1,407	1,788	1,917	2,028	0,897	1,147	1,238	0,538	1,137	0,464	1,274	1,893	1,173	1,682	0,257	1,323	0,79		
	Máx	37,6	37,4	37	36,3	39	37,4	36,6	36,7	37,1	38	38,1	38,1	38,4	38,4	38,1	38,2	38,6	38,1	38,8	39,1	38	38	38	38,2	39	38,2	38,4	37,4	38,8	
	Mín	36,4	36,6	35,5	35,8	37,5	36	35,7	36	35,7	36,8	36,4	36,7	36,9	36,3	36,1	37,3	37,3	36,8	38,2	38,1	37,5	36,7	36,7	36,3	37,6	36,7	38,2	36,1	38	
T4	DP	0,513	0,319	0,471	0,689	0,398	0,509	0,525	0,371	0,671	0,464	0,578	0,398	0,746	0,818	0,418	0,333	0,152	0,463	0,393	0,542	0,463	0,493	0,717	0,534	0,731	0,875	0,356	0,403		
	Média	36,83	36,98	36,38	36,03	37,03	36,2	36,32	36,62	37,15	37,82	37,43	37,3	37,68	37,65	38,15	38,07	38,15	38,07	38,47	38,48	37,93	37,97	37,97	38,68	37,77	38,48	37,03	38,67		
	CV	1,391	0,862	1,294	1,912	1,047	1,373	1,451	1,022	1,831	1,248	1,527	1,064	1,999	2,172	1,111	0,872	0,398	1,217	1,022	1,408	1,221	1,297	1,906	1,382	1,936	2,274	0,961	1,043		
	Máx	37,7	37,4	37,2	37	38,5	37,6	37	36,9	37,6	38,4	38,4	38,4	38,2	38,8	38,4	38,6	38,3	38,8	38,8	39,3	38,5	38,4	38,7	39,5	38,8	39,3	37,6	39,1		
	Mín	36,2	36,6	35,8	34,9	37,3	36,3	35,7	35,8	35,9	36,7	37	36,9	36,3	36,4	37,2	37,8	37,9	37,6	37,9	37,6	37,9	38	37,2	37,2	36,7	38,2	36,9	37,1	36,5	38,3
T5	DP	0,608	0,24	0,383	0,4	0,243	0,903	0,407	0,665	0,422	0,789	1,029	0,611	0,707	1,108	0,74	0,947	1,151	0,597	1,189	0,778	0,677	0,909	1,093	1,058	0,585	0,788	0,403	0,596		
	Média	36,88	36,92	36,55	36,2	38,55	37,03	36,22	36,62	36,32	37,03	37,03	37,32	37,3	37,2	37,35	37,8	37,8	37,6	38,18	38,12	37,52	37,43	36,87	38,73	37,63	38,38	37,13	38,47		
	CV	1,648	0,65	1,049	1,105	0,63	2,437	1,124	1,815	1,161	2,131	2,778	1,638	1,896	2,979	1,98	2,504	3,044	1,587	3,114	2,042	1,803	2,429	2,965	2,731	1,555	2,054	1,086	1,548		
	Máx	37,5	37,3	37,3	37,3	36,9	38,8	37,9	36,8	37,6	36,9	37,6	38,4	37,9	38,2	38,4	38,3	38,7	39,7	38	39,5	38,8	38	38,4	38,1	39,8	38,3	38,9	37,8	38,9	
	Mín	35,9	36,7	36,2	35,8	38,1	35,9	35,6	35,8	35,9	35,5	35,4	36,2	36,3	35,5	36,8	36,5	36,5	36,4	36,1	36,7	36,7	36,2	35,9	35,3	36,7	36,8	36,8	36,6	37,3	
T6	DP	0,339	0,395	0,331	0,207	0,293	0,756	0,361	0,356	0,489	0,366	0,631	0,248	0,591	0,472	0,812	0,316	0,413	0,327	0,5	0,585	0,849	0,493	0,844	0,719	0,51	0,539	0,484	0,56		
	Média	36,93	37,4	36,62	36,15	38,28	36,8	36,13	36,53	36,53	37,48	37,22	37,88	37,42	37,73	37,43	38	37,97	37,65	38,62	38,37	37,7	37,75	37,4	38,92	37,7	38,65	37,03	38,62		
	CV	0,917	1,056	0,904	0,574	0,765	2,055	1	0,974	1,337	0,975	1,694	0,656	1,58	1,251	2,168	0,832	1,088	0,869	1,294	1,526	2,251	1,306	2,256	1,849	1,353	1,396	1,308	1,45		
	Máx	37,4	38	37,2	36,5	38,7	38	36,7	36,9	37,1	37,9	38,1	38,2	38	38,2	38,7	38,5	38,3	38,2	39,5	39	38,6	38,3	38,2	39,8	38,1	39,6	37,5	39,5		
	Mín	36,5	37	36,2	35,9	38	35,8	35,7	36	36	37	36,4	37,6	36,5	37,1	36,4	37,8	37,3	37,3	38,1	37,5	36,2	37	36,1	38	37	38,1	36,3	37,9		
PC	DP	0,264	0,637	0,601	0,628	0,854	0,531	0,734	0,625	0,591	0,685	0,95	0,492	0,905	0,69	0,907	0,922	0,559	0,749	0,566	0,535	0,424	0,151	0,731	0,52	0,446	0,79	0,512	0,103		
	Média	36,98	37,52	36,52	36,47	36,38	37,22	36,57	36,83	36,28	36,98	36,78	37,58	37,17	37,3	37,37	38,35	38,2	37,78	38,3	38,37	38	38,23	37,37	38,77	37,77	38,3	37,62	38,83		
	CV	0,714	1,698	1,647	1,723	2,225	1,426	2,007	1,697	1,63	1,853	2,581	1,308	2,434	1,85	2,427	2,405	1,462	1,984	1,477	1,396	1,116	1,394	1,957	1,342	1,18	2,062	1,36	2,266		
	Máx	37,4	38,8	37,3	37,5	39,3	37,9	37,4	37,4	38,1	38,5	38,3	38,5	38,5	38,7	39,9	38,8	38,7	39,9	38,8	38,7	39,1	39,1	38,6	38,4	38,2	39,4	38,3	39,1	38,2	39
	Mín	36,7	37,1	35,6	35,6	37	36,6	35,5	35,7	36,4	35,8	37	36,1	36,6	36,3	37,3	37,2	36,9	37,4	36,9	37,4	37,8	37,6	38	36,1	38,1	37,2	37	36,9	38,7	
SAL	DP	0,264	0,408	0,253	0,591	0,373	0,813	0,29	0,711	0,605	0,548	0,596	0,516	0,988	0,662	0,788	1,038	0,587	0,464	0,32	0,631	0,436	0,501	1,1	0,35	0,777	0,366	0,339	0,52		
	Média	36,72	37,07	36,3	35,92	38,05	37,08	35,8	36,68	36,28	37,3	37,33	37,47	37,63	37,67	37,48	38,22	37,6	37,55	38,57	38,32	38,08	37,77	37,68	38,57	38,52	37,75	38,52	37,03	38,57	
	CV	0,719	1,101	0,697	1,646	0,98	2,194	0,81	1,938	1,667	1,468	1,595	1,378	2,547	1,758	2,103	2,716	1,56	1,235	0,831	1,646	1,144	1,326	2,919	0,908	2,057	0,949	0,914	1,349		
	Máx	37,1	37,7	36,7	36,5	38,5	37,9	36,2	37,9	37,3	37,9	38,3	38,2	38,8	38,6	38,6	39,3	38,1	38,2	38,9	39,1	38,9	38,4	39,1	38,9	38,6	39,1	37,4	39,1		
	Mín	36,3	36,5	36	34,9	37,4	35,8	35,4	35,7	35,6	36,6	36,5	36,9	36,4	37	36,7	36,8	36,7	37	38	37,5	37,7	37,2	36,1	38	36,5	38,1	36,5	38		