

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**ANGÉLICA MARIA SCHETTINO**

**CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS RADIOINDUZIDAS  
TRATADAS COM CÚRATIVO DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
COM E SEM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO  
ADIPOSO: Análise Experimental**

RIO DE JANEIRO

2023

Angélica Maria Schettino

CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS RADIOINDUZIDAS  
TRATADAS COM CÜRATIVO DE MEMBRANA AMNIÓTICA  
COM E SEM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO  
ADIPOSO: Análise Experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Franco Vieira de Oliveira

Coorientadores: Prof. Dra. Daniela Franco Bueno

Prof. Dra. Maria Alice Fusco de Souza

Rio de Janeiro

2023

S327

Schettino, Angélica Maria.

Cicatrização de feridas radioinduzidas tratadas com curativo de membrana amniótica com e sem células-tronco derivadas de tecido adiposo: análise experimental/ Angélica Maria Schettino. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas, 2023.

115 f.; 31 cm.

**Orientador: Diogo Franco Vieira de Oliveira**

**Coorientadores: Daniela Franco Bueno e Maria Alice Fusco de Souza.**

Tese (Doutorado em Ciências Cirúrgicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas, 2023.

Referências bibliográficas: f. 92-102.

1. Células-tronco. 2. Tecido adiposo. 3. Adipócitos. 4. Âmnio. 5. Cicatrização. 6. Radiodermite. 7. Radioterapia. I. Oliveira, Diogo Vieira de. II. Bueno, Daniela Franco. III. Souza, Maria Alice Fusco de. IV. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Ciências Cirúrgicas. V. Título.

Angélica Maria Schettino

CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS RADIOINDUZIDAS TRATADAS COM  
CURATIVO DE MEMBRANA AMNIÓTICA COM E SEM CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO: Análise Experimental

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Cirúrgicas.

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Diogo Franco Vieira de Oliveira – UFRJ  
Presidente

---

Prof. Dra. Talita Romero Franco – UFRJ

---

Prof. Dra. Mariane Tami Amano - Hospital Sírio Libanês

---

Prof. Dra. Ana Cláudia Weck Roxo – UERJ

---

Prof. Dr. Cesar Silveira Cláudio da Silva - UFRJ

Ao Enzo, que segue me ensinando o amor pelo amor...

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Talita Franco, da UFRJ, que desde os tempos de faculdade foi exemplo na profissão e me mostrou a Cirurgia Plástica, além de ter confiado em mim no início da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Diogo Franco, meu orientador, pela confiança e liberdade que me deu na escolha do tema desta tese.

À Prof. Maria Alice Fusco, do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital Naval Marcílio Dias, pela amizade, parceria e paciência, por colocar a “mão na massa” em todas as etapas do experimento e por ter me ensinado o amor aos animais e, mais ainda, por ter me permitido conhecê-lo, através da Catarina.

À Prof. Daniela Bueno, do Hospital Sírio Libanês, por me abrir as portas de SP e nos receber com carinho, auxiliando sempre nas fases mais difíceis deste trabalho.

À Prof. Mariane Amano, do Hospital Sírio Libanês, que, sem nem me conhecer, “comprou a ideia” da pesquisa e me ajudou nos testes multiplex.

À Thais Kimmemgs, do Hospital Sírio Libanês, que com toda a sua simpatia, nos recebeu com muito carinho e auxiliou muito a fase de extração de proteínas das amostras.

À Prof. Maria Isabel Doria Rossi, do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular da UFRJ, que me iniciou nas citometrias de fluxo e me apresentou à Rhayra.

À Rhayra Braga, do Instituto de Traumatologia-Ortopedia (INTO) do Rio de Janeiro, por toda a ajuda nas citometrias de fluxo e suas interpretações.

À Carla Pinheiro, do Centro de Tecnologia Celular do Hospital Sírio Libanês, pela generosidade, paciência e cuidado, todas as vezes que estive em SP, em compartilhar seus conhecimentos no mundo da cultura celular.

Ao 3SG(EF) Lucas Sant ‘Anna, do Instituto de Pesquisas Biomédicas, pela parceria e ensinamentos sobre as células e o que se pode fazer em um laboratório de células, pelo cuidado em todas as etapas do meu aprendizado e das nossas culturas.

À CMG(Md) Lisa Tiemi Ogawa, chefe por muitos anos do Serviço de Radioterapia do HNMD, por ter confiado em mim e no projeto e por ter aberto a possibilidade de irradiarmos os animais nos finais de semana.

E ao seu fiel escudeiro, SO(EF) Jose Francisco da Silveira, pelos inúmeros finais de semana, irradiando os ratos da nossa pesquisa, com paciência e amor aos animais, intercalados de bolos e cafês.

Ao CF(Md) Cesar Bastos, médico patologista da Marinha do Brasil, pela ajuda e presteza com a interpretação dos achados histológicos das feridas.

Ao Daniel Oliveira Martins, do Hospital Sírio Libanês, que com toda paciência nos explicou e ajudou a fazer as análises multiplex, traduzindo os resultados no final.

A Prof Lycia Gitirana, do Laboratório de Histologia do CCS/ UFRJ, pela paciência e ajuda com as lâminas de histologia.

Ao Jefferson Cipriano, da UNIMICRO, que preparou todas as amostras para a MEV e aceitou os nossos desafios.

Ao Prof. Cesar Silveira Claudio da Silva, chefe do Serviço de Cirurgia Plástica do HUCFF, pelo apoio e confiança.

Aos meus companheiros de jornada e especialidade do Serviço de Cirurgia Plástica do HUCFF-UFRJ, pela amizade e carinho.

Ao meu amigo e braço direito CC(Md) Elisson Calvano Barros, da Clínica de Cirurgia Plástica do HNMD, por toda ajuda nas coletas – a melhor gordura de todas!! - e nos vídeos do trabalho.

Aos meus companheiros de especialidade da Clínica de Cirurgia Plástica do HNMD, pela parceria diária.

Aos meus queridos residentes, todos, do HUCFF e do HNMD, pelo desafio diário do aprendizado e ensino da Cirurgia Plástica e por toda a oportunidade de troca de conhecimento.

Aos companheiros do IPB, por toda paciência que tiveram comigo desde o início e por terem me auxiliado no cuidado para com os animais, na compra e manejo de reagentes, microscópios e tudo que faz parte da pesquisa de “bancada”.

À Heloisa Colucci, Verônica Stein, Marli Paiva, 3SG(EF) Vitor Hugo e SO(EF) Chaparro, anjos de guarda diários no HUCFF e no HNMD, que se tornaram amigos e muitas vezes cúmplices e que tornam nossa vida muito mais fácil, todos os dias.

À minha primeira e sempre chefe, CMG(RM1- Md) Denise Sotto Mayor Ribeiro, do HNMD, por ter tido paciência me ensinando a arte da simetria e do detalhe, lá no início de tudo, e sempre confiando no “ovo de dragão”.

Ao meu eterno mestre CMG(RM1- Md) Soto, meu pai na especialidade, que me escolheu para transmitir seus conhecimentos e filosofias. Espero ter correspondido.

Aos meus pais, por terem plantado em mim a semente da curiosidade, do estudo e do trabalho e por terem me dado as condições necessárias para que eu crescesse.

À Patricia, minha irmã e amiga, que me deu o maior presente de todos!

Ao Enzo e à Catarina, meus filhos postíços, que me inspiram e me tornam melhor.

À Angela, pelo apoio incondicional e pelo companheirismo de anos.

Graças à Deus.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.” — Albert Einstein

“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”  
John Dewey



## RESUMO

SCHETTINO, Angélica Maria. **Cicatrização de Feridas Radioinduzidas Tratadas com Curativo de Membrana Amniótica com e sem Células-Tronco Derivadas de Tecido Adiposo**: Análise Experimental, Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

As feridas cutâneas induzidas por radiação ionizante, sejam produzidas após exposição acidental ou tratamento médico, são de especial interesse por se tratarem de lesões de difícil resolução e cicatrização, caracterizadas por episódios recorrentes de ulceração necrótica e dor intensa. Assim, torna-se imperiosa a busca por métodos de tratamento eficazes às lesões radioinduzidas. A membrana amniótica humana vem sendo utilizada como curativo biológico devido à presença de uma membrana basal que permite a migração das células epiteliais do paciente, processo de suma importância na fase de reepitelização da cicatrização. Além disso, possui efeito bacteriostático, analgésico, anti-inflamatório e anti-adesivo. Também de grande interesse são as células-tronco mesenquimais, cuja característica mais marcante é o seu potencial de diferenciação celular e presentes no tecido adiposo. O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um curativo com células-tronco derivadas do tecido adiposo, cujo arcabouço foi a membrana amniótica humana e comparar sua eficácia no tratamento de radiodermite em ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*). Utilizou-se 49 animais no total do estudo, com tratamento efetivo de 23 ratos, distribuídos em três grupos, conforme o tipo de tratamento: grupo neomicina, grupo membrana amniótica e grupo membrana amniótica com células-tronco. A indução da radiodermite foi realizada por meio de bomba de acelerador de elétrons, com um total de 86Gy, em dose única, fracionada, obtendo-se uma radiodermite grau IV após 30 dias, momento este do tratamento. A eutanásia dos animais foi realizada no D35, com coleta de material para Histologia e teste multiplex. Observou-se que as feridas tratadas após 30 dias da radiação com membrana amniótica enriquecida com células-tronco tiveram a melhor cicatrização, em comparação com os demais grupos. Além disso, a análise das citocinas específicas da cicatrização por meio de teste multiplex evidenciou aumento do IFN- $\gamma$  e da fractalquina no grupo tratado apenas com membrana amniótica. A análise histológica não mostrou diferença estatística entre os grupos. Como conclusão, observou-se que o grupo com melhor cicatrização foi aquele tratado com a membrana amniótica semeada com células-tronco derivada de tecido adiposo e que o grupo com piores índices de cicatrização foi também o grupo cuja concentração de IFN- $\gamma$  foi maior- grupo membrana amniótica.

Palavras chave: células-tronco; tecido adiposo; adipócitos; âmnio; cicatrização; Radiodermite; Radioterapia

## ABSTRACT

SCHETTINO, Angélica Maria. **Healing of Radioinduced Wounds Treated with Amniotic Membrane Dressing with and without Stem Cells Derived from Adipose Tissue: Experimental Analysis.** Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

Skin wounds induced by ionizing radiation, whether produced after accidental exposure or medical treatment, are of special interest because they are injuries that are difficult to resolve and heal, characterized by recurrent episodes of necrotic ulceration and intense pain. Therefore, it is imperative to search for effective treatment methods for radio-induced injuries. The human amniotic membrane has been used as a biological dressing due to the presence of a basement membrane that allows the migration of the patient's epithelial cells, a process of utmost importance in the re-epithelialization phase of healing. Furthermore, it has bacteriostatic, analgesic, anti-inflammatory and anti-adhesive effects. Also of great interest are mesenchymal stem cells, whose most striking characteristic is their potential for cellular differentiation and present in adipose tissue. The objective of this research was to develop a dressing with stem cells derived from adipose tissue, whose scaffold was the human amniotic membrane, and to compare its effectiveness in treating radiodermatitis in *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*). A total of 49 animals were used in the study, with effective treatment of 23 rats, distributed into three groups, depending on the type of treatment: neomycin group, amniotic membrane group and amniotic membrane with stem cells group. Radiodermatitis was induced with an electron accelerator pump, with a total of 86 Gy, in a single, fractionated dose, resulting in grade IV radiodermatitis after 30 days, the same moment when they were treated. The euthanasia of the animals was carried out on D35, with material extraction for Histology and multiplex tests. It was observed that wounds treated with amniotic membrane enriched with stem cells healed more than the other groups. Furthermore, in a search for specific healing cytokines using a multiplex test, IFN- $\gamma$  and fractalkine were the cytokines found in greater quantities in the group treated only with amniotic membrane. Histological analysis was also performed, without finding any statistically significant values. It was then concluded that the group with the best healing rates was the one treated with amniotic membrane seeded with stem cells derived from adipose tissue and that the group with the worst healing rates was also the group whose concentration of IFN- $\gamma$  was higher - amniotic membrane group .

Keywords: stem cells; adipose tissue; adipocytes; amnion; wound healing; radiodermatitis; radiotherapy

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: Lesão de DNA pela Radiação .....	26
Fig. 2: Estrutura da membrana amniótica .....	34
Fig. 3: Coleta do Lipoaspirado .....	40
Fig. 4: Processamento do Lipoaspirado .....	41
Fig. 5: Secção do disco placentário .....	45
Fig. 6: Separação mecânica da membrana amniótica .....	45
Fig. 7: Animal acondicionado em molde de isopor .....	48
Fig. 8: Animal acondicionado em molde de isopor, com a placa de chumbo .....	48
Fig. 9: Aspecto do curativo final .....	49
Fig. 10: Ensaio de imunofenotipagem das amostras de células .....	57
Fig. 11: Diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos .....	57
Fig. 12A: Fragmento de MAH, ainda com a camada epitelial de células cubóides.....	57
Fig. 12B: MAH descelularizada, com <i>print</i> ainda das células retiradas.....	57
Fig. 13A: CTMDA aderidas em MAH, em microscopia eletrônica de varredura .....	58
Fig. 13B: Em aumento maior .....	58
Fig. 14A: MAH sem células semeadas .....	58
Fig. 14B: CTMDA aderidas em MAH coradas com hematoxilina.....	58
Fig. 15: CTMDA aderidas em MAH, em imunofluorescência .....	58
Fig. 16A: Ferida no D16 .....	60
Fig. 16B: Ferida no D30 .....	60
Fig. 17A: Ferida no D30 antes do desbridamento .....	61
Fig. 17B: Após o desbridamento cirúrgico .....	61
Fig. 18: Prancha comparativa de feridas entre os grupos, em D30 e D35 .....	63
Fig. 19: Prancha comparativa de fotomicrografias das feridas de cada grupo. MO, Coloração HE, aumento 10x .....	66
Fig. 20: Retração da ferida e de todo o membro, após a radiação .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tab.1: Progressão e definição do protocolo de radiodermite em ratos.....	47
Tab.2: Escore da avaliação qualitativa, realizada por médico patologista.....	53
Tab.3: Distribuição dos animais por grupo de estudo.....	60
Tab.4: Medidas (cm <sup>2</sup> ) das feridas do grupo 1 (GN) no D30 e D35.....	62
Tab.5: Medidas (cm <sup>2</sup> ) das feridas do grupo 2 (GMAH) no D30 e D35.....	62
Tab.6: Medidas (cm <sup>2</sup> ) das feridas do grupo 3 (GCTMDA) no D30 e D35.....	62
Tab.7: Estatística descritiva das áreas das feridas, conforme grupos e momento da ferida.....	63
Tab.8: Estatística descritiva da análise de proliferação vascular.....	64
Tab.9: Estatística descritiva da análise da presença de células mononucleares.....	64
Tab.10: Estatística descritiva da análise da presença de células polimorfonucleares.....	65
Tab.11: Estatística descritiva da análise da proliferação fibroblástica.....	65
Tab.12: Estatística descritiva da análise de colagenização.....	65
Tab.13: Estatística descritiva da análise de reepitelização.....	66
Tab.14: Estatística descritiva das citocinas pró-inflamatórias.....	70
Tab.15: Estatística descritiva das citocinas anti-inflamatórias e dos fatores de crescimento....	71
Tab.16: Análise descritiva do IFN- $\gamma$ .....	71
Tab.17: Análise descritiva da Fractalquina.....	71
Tab.18: Coeficientes de correlação de Spearman entre citocinas e as áreas das feridas.....	72
Tab.19: Valores brutos das citocinas em um animal GCTMDA e um GN.....	73

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico <i>boxplot</i> das concentrações de IFN- $\gamma$ .....	71
Gráfico 2: Gráfico <i>boxplot</i> das concentrações de Fractalquina.....	71

## SIGLAS

FVE	Fração Vascular Estromal
CTMDA	Célula-tronco Mesenquimal Derivada de Tecido Adiposo
ADSC	Adipose Derived Stem Cell
MAH	Membrana Amniótica Humana
GHz	Giga Hertz
MeV	Mega Elétron Volt
Gy	Gray
Si	Sievert
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
SOD	Speróxido Dismutase
BH4	Tetra hidro biopterina
TNF- $\beta$	Tumor Necrosis Factor- $\beta$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
EGF	Epidermal Growth Factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
FGF	Fibroblastic Growth Factor
MMP	Matrix Metallo Proteinase
TIMP	Tissue Inhibitor of Metallo Proteinase
NK	Natural Killer
IP-10	Interferon Inducible Protein-10
SMAD	
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
CCL5	RANTES
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1
Mig-9	Monocyte Induced by IFN- $\gamma$
MDC	Macrophage Derived Chemokine

CTGF	Connective Tissue Growth Factor
COX-2	Ciclo Oxigenase-2
HGF	Hepatic Growth Factor
IFATS	International Federation for Adipose Therapeutics and Sciences
ISCT	International Society of Cellular Therapy
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
HNMD	Hospital Naval Marcílio Dias
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
HSL	Hospital Sírio Libanes
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
DFS	Distância Fonte Sujeito
ASA	American College of Anesthesiology
IMC	Índice de Massa Corporal
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM F-12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
UNIMICRO	Unidade de Microscopia Multiusuário
DAPI	4'-6 Diamino-2-Phenilindole
GFP	Green Fluorescent Protein
HE	Hematoxicilina & Eosina
EDTA	Ethylenediamine tetracetic Acid
NaOH	Hidróxido de Sódio
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
STATS	Signal Transducer and Activator of Transcription

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 PRINCIPAL.....	21
2.2. SECUNDÁRIOS.....	21
<b>3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	22
3.1. A RADIAÇÃO E A RADIOTERAPIA.....	22
3.2. RADIODERMITE E OS EFEITOS BIOMOLECULARES DA RADIAÇÃO.....	24
3.2.1 Ação da Radiação no DNA e a ação oxidativa.....	25
3.2.2 Cicatrização e Citocinas.....	28
3.3. MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (MAH).....	32
3.4. CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO (CTMDA).....	34
<b>4. MÉTODOS</b> .....	38
<b>FASE I – <i>IN VITRO</i></b> .....	38
4.1 COLETA DO LIPOASPIRADO HUMANO.....	39
4.2 PROCESSAMENTO DO LIPOASPIRADO.....	39
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMDA.....	40
<b>DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA</b> .....	42
<b>DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA</b> .....	42
<b>DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA</b> .....	43
4.4 PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (MAH).....	43
4.5 SEMEADURA E PRODUÇÃO DO COMPLEXO MAH+CTMDA.....	45
<b>FASE II – <i>IN VIVO</i></b> .....	46
4.6 DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO.....	46
4.7 DEFINIÇÃO DO INÍCIO DO TRATAMENTO DAS LESÕES.....	47



4.8 IRRADIAÇÃO DOS ANIMAIS.....	47
4.9 GRUPOS DE ANIMAIS, TRATAMENTO E EUTANÁSIA.....	48
4.10. ANÁLISES DA HISTOLOGIA E TESTE MULTIPLEX.....	51
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
<b>FASE I – <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>55</b>
5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DO LIPOASPIRADO.....	55
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMDAs.....	55
5.3 PROCESSAMENTO DA MAH E PRODUÇÃO DO COMPLEXO MAH+CTMDA.....	56
<b>FASE II – <i>IN VIVO</i>.....</b>	<b>59</b>
5.4 INDUÇÃO DA RADIODERMITE, ALOCAÇÃO E TRATAMENTO.....	59
5.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS FERIDAS.....	60
5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS FERIDAS.....	64
5.7 ANÁLISE MULTIPLEX DAS AMOSTRAS.....	66
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>103</b>
APÊNDICE 1: TCLE: Doação tecido adiposo.....	104
APÊNDICE 2: TCLE: Doação de Placenta.....	107
APÊNDICE 3: Tabela de Coeficientes de Correlação de Spearman entre as Citocinas e as áreas das feridas.....	110
APÊNDICE 4: Tabela de dados do grupo controle.....	111
<b>ANEXOS.....</b>	<b>112</b>
ANEXO A: Certificado apresentação Poster. Congresso IFATS, Dezembro/ 2018.....	113
ANEXO B: Certificado apresentação Poster. Congresso da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica – ASPS, Outubro/ 2022.....	114
ANEXO C: Certificado 1º Lugar Categoria Poster. Jornada Científica do Hospital Naval Marcilio Dias, Agosto/ 2023.....	115

## 1. INTRODUÇÃO

A história da humanidade é envolta por catástrofes e guerras, marcos que definem eras, séculos e a própria história. Com a radiação, não é diferente. O primeiro uso da energia nuclear ocorreu, de forma trágica, durante a Segunda Guerra Mundial, quando as cidades de Hiroshima e Nagasaki foram bombardeadas por bombas atômicas. Iniciava-se ali o conhecimento, na prática e da pior forma, do potencial de dano e morte das radiações, deixando à mostra a gama de possibilidades de lesões cutâneas induzidas pela radiação e seu poder de cronificação.

Outros eventos se sucederam às explosões nas cidades japonesas, como acidentes em usinas nucleares –Chernobil em 1986, e Fukushima, em 2011- e, nacionalmente, o evento trágico de Goiânia, onde uma fonte radioativa de Césio foi descartada de modo errôneo. Todos estes incidentes descortinaram inúmeros sintomas da síndrome da radiação aguda e das lesões térmicas, causadas pela exposição inadvertida à radiação e, da mesma forma, expuseram as dificuldades do tratamento destas lesões, cuja evolução é lenta, dolorosa e mutilante.

Apesar das maiores exposições acidentais à radiação terem ocorrido por conta das guerras, o início de tudo ocorreu em 1865, quando Roëntgen descobriu a presença de raios do tipo X e, posteriormente, em 1904, quando Madame Marie Curie observou que uma lesão na mão de seu marido, Pierre Curie, ocorrida após exposição à radiação, não cicatrizava. E foi justamente esta dificuldade de cicatrização e de cronificação de lesões que instigou e fez surgir esta pesquisa.

A cicatrização de feridas é bastante conhecida, em suas fases, elementos facilitadores e ação de diversas vitaminas como cofatores. Igualmente, os fatores que retardam e dificultam a evolução da cicatrização podem ser hoje manejados, de modo a propiciar auxílio a toda esta cascata de eventos. Exceção deve ser feita àquelas lesões ocorridas após exposição às radiações, conforme descrito, no século passado, por Madame Curie. As lesões radioinduzidas, sejam decorrentes de tratamentos oncológicos ou acidentes com fontes radioativas, são de difícil tratamento, com tendência à cronicidade, formação de tecido de granulação, fibrose e necrose, além de serem bastante dolorosas.

Do mesmo modo que o homem foi capaz de aprimorar o uso de fontes radioativas ao longo dos tempos, as pesquisas que visam novas possibilidades de curativos e terapêuticas também avançaram. E uma das mais inovadoras e promissoras possibilidades está atrelada às

células-tronco mesenquimais, já utilizadas em pesquisas experimentais no tratamento de diversas doenças e, mais recentemente, associadas à regeneração tecidual, seja de modo isolado como opção terapêutica, seja associada ao uso de retalhos e enxertos, como na Cirurgia Plástica.

Independente de sua origem –derivada da medula óssea, do cordão umbilical ou do tecido adiposo – essas células possuem características fascinantes, como o elevado potencial de diferenciação celular e a imunomodulação, características, indubitavelmente, mais interessantes e responsáveis por gerar um grande número de pesquisas.

Em se tratando da origem, é recente o conhecimento do tecido adiposo como grande reservatório de células-tronco mesenquimais. Tradicionalmente, a manipulação do tecido adiposo é amplamente realizada por cirurgiões plásticos, com objetivo estético de reduzir o próprio tecido adiposo, seja para enxertos no tratamento de assimetrias diversas, seja como volumizador ou preenchedor. Pode-se dizer então que a auto enxertia e o manejo de material lipoaspirado é, na verdade, um enxerto de um aglomerado de células, entre elas, de células-tronco mesenquimais, com potencial de diferenciação, imunomodulação e carregada de fatores de crescimento<sup>1-6</sup> e outras substâncias capazes de, em última análise, auxiliar na cicatrização e regeneração de tecidos.

Eticamente, ao se considerar a presença de células mesenquimais em um lipoaspirado, deve-se observar que é impossível garantir a pureza e a presença exclusiva dessas células, fato este possível apenas com a expansão celular em laboratório.

Em se tratando de cultura de células-tronco, ela se inicia a partir de um aglomerado heterogêneo de células isoladas do lipoaspirado, por meio de dissociação enzimática. Esse aglomerado celular heterogêneo é chamado de fração vascular estromal (FVE), sendo esta fração expandida em laboratório, até que se obtenha uma cultura de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMDA), em inglês *Adipose Derived Stem Cell* (ADSC). Deste modo, a cultura de células-tronco é repleta de fatores de crescimento e propriedades que podem auxiliar, por exemplo, no tratamento de feridas complexas, deformidades congênitas, cirurgias de reconstrução em geral, queimaduras e, sobretudo, em lesões derivadas de agentes ionizantes e radiodermite.

Se há, portanto, um procedimento consagrado na Cirurgia Plástica, como a lipoaspiração, o conhecimento das propriedades regenerativas das células-tronco e a necessidade de novas terapêuticas em lesões radioinduzidas/ radiodermite, é quase mandatório vislumbrar esta união.

Alguns estudos já demonstraram o uso de células-tronco em tratamento de feridas radioinduzidas com sucesso<sup>7</sup>, porém com as células coletadas por meio de mielograma, ou seja, usando como base células hematopoiéticas e injetando-as nas feridas. Essa injeção, realizada nas bordas da lesão com as células-tronco derivadas da medula óssea, gera desconforto do próprio procedimento de coleta, além de não garantir que as células permaneçam muito tempo no local da ferida, atuando de modo limitado e fugaz na cicatrização destas feridas, uma vez que a tendência é de que essas células migrem do local da injeção.<sup>8</sup> Adicionalmente, não se pode esquecer do ganho indireto na coleta de células-tronco no lipoaspirado à coleta de material na medula óssea, com componente estético que deve ser considerado.

Pensando-se em uma solução para o consumo das células tronco e sua saída do sítio da lesão, uma possibilidade seria utilizar um material que servisse de leito para as células, de modo a mantê-las mais tempo na ferida, uma espécie de curativo “*cell delivery*”. A solução veio sob a forma de membrana amniótica humana (MAH), conhecida por suas propriedades cicatrizantes desde 1910 e popularizada entre os cirurgiões plásticos na década de 80 como curativo biológico em queimaduras, sendo seu uso interrompido após a descoberta das doenças virais, como HIV e hepatites.<sup>9</sup>

A MAH é um material biológico, retirado a partir da placenta humana e que possui propriedades também angiogênica e imunomoduladora. Considerando-se todo este potencial<sup>10</sup>, a ideia de torná-la um curativo biológico ativo, enriquecido com células-tronco, veio ao encontro da necessidade de um veículo para que as CTMDA se fixassem à região afetada, sem perda do material e por período maior do que aquele obtido com a inoculação por meio de injeção de células.

Surge assim, a presente pesquisa, aliando conceitos bastante novos - como as células-tronco, e outros não tão novos - como a membrana amniótica e as lesões radioinduzidas – como uma forma de auxiliar o difícil tratamento e cicatrização destas feridas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 PRINCIPAL

Analisar a ação das células-tronco derivadas de tecido adiposo, semeadas em membrana amniótica humana, na cicatrização de feridas radioinduzidas em animais e observar se este tratamento promove uma cicatrização de melhor qualidade, quando comparada ao tratamento com pomada de neomicina/ bacitracina e MAH.

### 2.2 SECUNDÁRIOS

1. Avaliar o sucesso da adição e aderência das células-tronco derivadas do tecido adiposo à membrana amniótica descelularizada;
2. Analisar, macroscopicamente, a evolução das feridas dos animais, comparando-as em seu tamanho;
3. Observar e analisar seis parâmetros histológicos da cicatrização nas feridas dos animais;
4. Quantificar e analisar a presença de fatores de crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias nas feridas dos três grupos.

### 3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

#### 3.1. A RADIAÇÃO E A RADIOTERAPIA

É impensável, atualmente, a medicina sem exames de imagem, sem o uso de radiação, radioisótopos, elétrons, mas todas estas possibilidades de diagnóstico e tratamento se iniciaram apenas no século XIX, mais precisamente em 1895, quando a radiografia foi descoberta pelo alemão Wilhelm Konrad Roëntgen. Mesmo com a tecnologia rudimentar, a radiografia se espalhou e, um mês após a sua descoberta, podia ser encontrada em toda Europa e Estados Unidos, sendo inclusive utilizada em soldados baleados na Primeira Guerra Mundial.

Nesta mesma onda de avanços e descobertas, o físico francês Antoine Henri Becquerel, em seus estudos com urânio, descobriu que este mineral possuía potencial radioativo. Em momento semelhante, Marie Curie, juntamente com seu marido e pesquisador Pierre Curie, descobriu outros dois minerais com potencial radioativo: o polônio e o rádio, ambos com poder radioativo maior do que o urânio. Foi deste modo que o prêmio Nobel de 1903 foi dividido entre os Curie e Becquerel.

Por alguns anos, acreditou-se que a radiação poderia ter efeitos benéficos e foi usada com fins estéticos, cosméticos e no tratamento de doenças hoje sabidas como autoimunes. Não se imaginava à época, que feixes de luz e minerais poderiam causar outros efeitos que não os benéficos. Novamente, foram os Curie que observaram que a exposição à alguns centigramas de rádio eram capazes de causar hiperemia e até abrir feridas de difícil cicatrização, após cerca de 15 dias. Foi assim que Pierre Curie entrou para a história como o primeiro caso de radiodermite.<sup>11</sup>

A radiação é definida como uma energia que se propaga de um ponto ao outro no vácuo, no espaço ou em um material, ou seja, está em tudo. Pode ser ionizante, se tiver capacidade de liberar elétrons dos átomos ou moléculas de substâncias como água, ar e tecido vivo, ou não ionizante, no caso de passar um elétron de um nível fundamental para outro mais energético, sem liberar elétrons dos átomos e moléculas.<sup>12</sup> São exemplos os raios eletromagnéticos, como os raios ultravioletas e aqueles relacionados aos aparelhos de micro-ondas.

Várias outras descobertas ligadas ao campo da radiação ionizante se seguiram, como a primeira bomba de Cobalto 60 em 1951 e o acelerador linear de elétrons, em 1953. No Brasil, o primeiro acelerador linear chegou somente em 1971.

Hoje, os aceleradores lineares são muito usados em teleterapia, um ramo da Radioterapia, por emitirem irradiações à distância e externamente, diferentemente da braquiterapia, que utiliza fontes radioativas, como o Iridio ( $I^{192}$  ou  $I^{125}$ ) e que atua diretamente, em contato íntimo ou o mais próximo possível da lesão.<sup>13</sup>

Estes aceleradores usam micro-ondas com frequências de até 3GHz para acelerar elétrons até que estes atinjam elevados níveis de energia cinética, que podem variar entre 4MeV e 25MeV, em um tubo linear. Os elétrons formam feixes de alta energia para tratamento de tumores superficiais ou podem ser freados ao atingirem um alvo e gerar feixe de fótons para tratamento de tumores profundos. Assim, podem produzir elétrons e fótons, e alguns ainda, raio do tipo X, com variada tensão elétrica. Um feixe de fótons consegue penetrar, biologicamente falando, com mais profundidade, sem causar maiores danos na pele. Já os elétrons são elementos que produzem uma lesão mais superficial, por serem menos penetrantes que os fótons. Considera-se, portanto, que o tratamento com elétrons atua de modo mais específico e superficial, por atingirem lesões menos profundas ou restritas à pele.<sup>14</sup> De modo prático, costuma-se usar o acelerador linear em modo de emissão de fótons para tratamento de câncer de próstata e de mama, variando-se a dose. Entretanto, em pacientes que já foram submetidas à mastectomia e que, por isso, não tenham um coxim adiposo/ mamário, usa-se o feixe de elétrons, mais superficial, a fim de irradiar somente o tecido de mama residual e não outros órgãos, como pulmão, mais próximos normalmente ao sítio da lesão. Assim, a terapia com radiação ionizante, muito usada no tratamento oncológico, deve atingir apenas o tecido tumoral, poupando os tecidos adjacentes e impedindo seus efeitos deletérios para além do tecido doente.

Um benefício do acelerador linear é o potencial de definição do campo exato a ser irradiado e a homogeneidade do feixe de elétrons ou fótons, por meio, principalmente, do uso de colimadores primários e secundários. O colimador primário define o maior tamanho disponível da seção circular do feixe, enquanto o secundário pode fornecer feixes com áreas de seção retangulares ou quadradas no isocentro do acelerador, formando um feixe com seção de até 40 x 40 cm.<sup>15</sup>

A radiação é medida internacionalmente em unidades de Gray (Gy), definida por sua vez como joule/kg de massa. Há ainda o Sievert (Si), unidade usada para dose equivalente, como um modo de se padronizar a energia da radiação liberada por fontes diversas e com resultados igualmente diversos, segundo o tecido alvo. Acredita-se, por exemplo, que uma pessoa esteja exposta a uma média de 2,4mSi por ano, considerando-se raios ultravioletas e outras fontes naturais.<sup>16</sup>

Conhecendo-se a radiação, depreende-se que a radiodermite é resultado da exposição da pele à radiação ionizante, forma de energia que atua removendo elétrons de átomos ou moléculas de materiais, incluindo tecidos vivos. A radiodermite pode ocorrer como resultado de um ataque em uma guerra, do bioterrorismo ou desastre nuclear, mas sem dúvida, a radiação possui sua mais louvável atuação como coadjuvante no tratamento de tumores. Mesmo nestes casos, também se podem observar radiodermite em tecidos saudáveis de pacientes expostos ao tratamento do câncer pela radioterapia.

### 3.2. RADIODERMITE E OS EFEITOS BIOMOLECULARES DA RADIAÇÃO

A atenção acerca de lesões radioinduzidas tem crescido bastante nos últimos tempos, muito pela notícia de acidentes nucleares, exposição de pessoas a fontes radioativas e nucleares, uso de fontes na indústria naval e o aumento no número de países que detém um potente poderio bélico, com armas nucleares. Associa-se a isto, os avanços no campo da radioterapia, com novas técnicas de braquiterapia e aceleradores lineares.

Seja em decorrência de guerras, ataques ou de tratamentos oncológicos, as lesões e suas evoluções se assemelham, muito embora a cinética seja diferente. Nota-se, por exemplo, que 100% dos pacientes submetidos à radioterapia evoluem com algum grau de radiodermite e que pacientes submetidos à irradiação de corpo inteiro (*total body irradiation*) para tratamento oncológico também podem evoluir com síndrome da radiação aguda.<sup>17</sup> Esta síndrome ocorre em casos de exposição de corpo inteiro ou de sua grande maioria a altas dose de radiação e em um curto período. Muito por conta da possibilidade de grandes lesões ou de irradiações extensas, a radioterapia para pacientes oncológicos preconiza a exposição de doses menores, de modo repetido, sendo muitas das vezes diária.<sup>18</sup>

As lesões radioinduzidas podem se apresentar desde lesões cutâneas superficiais, passando pelas mais profundas, podendo acometer mucosas, músculo, ossos e tecidos hematopoiético e linfóide, cada uma com complicações e tratamentos mais específicos. Fato é que, em se tratando de queimaduras e lesões decorrentes de radiação, as feridas costumam demorar mais para cicatrizar, geralmente cronificando-se e requerendo maiores esforços no sentido de auxiliar e favorecer a formação de tecido de granulação e cicatrização dos pacientes. Casos de radiodermite e até radionecrose são vistos na prática de cirurgiões plásticos, oncologistas e mastologistas.



Para a análise e tratamento da radiodermite, vários aspectos devem ser levados em consideração, como aqueles relacionados à fonte ionizante (tipo de fonte, dose, volume e heterogenicidade) e àqueles ligados ao paciente (tipo de tecido afetado, espessura dos tecidos, ativação da cicatrização, *status* imunológico e nutricional prévios, tabagismo, idade e reação anti- inflamatória).<sup>17</sup> Não se pode esquecer ainda da possibilidade de lesões agudas se tornarem crônicas e recidivantes e do local da irradiação, principalmente após radioterapia, sofrer um processo de malignização, por conta de mutações no *deoxyribonucleic acid* (DNA), associado à instabilidade cromossomial, o chamado “campo de malignização”, sofrido pela área adjacente ao tumor tratado.<sup>19</sup>

Macroscopicamente, as lesões da fase aguda da radiodermite podem se apresentar na pele como uma simples hiperemia ou eritema, que surge algumas horas até vários dias após a exposição, progredindo com flictemas, descamação, ulceração, atrofia e necrose, que variam em extensão e profundidade, de acordo com a fonte de radiação e a dose.<sup>19,20</sup> A pele irradiada se apresenta com lesão de células endoteliais e endarterite progressiva, que contribui para a necrose tecidual, atrofia e fibrose. As alterações da fase aguda podem ocorrer até 90 dias após a exposição, sendo então consideradas crônicas, e tendo a atrofia e a fibrose como as principais características. Apesar de haver várias classificações destas lesões, a mais usada clinicamente é a escala da *Radiation Therapy Oncology Group*, que classifica de 1 a 5 as radiodermites, a saber<sup>19</sup>:

Grau 1: descamação seca, com eritema, prurido, epilação e diminuição da sudorese local – doses até 20Gy

Grau 2: eritema brilhoso, edema moderado, descamação úmida - início em doses de 30 – 40Gy

Grau 3: descamação úmida em outras áreas além das áreas de sulco e dobras, exsudato, edema com cacofo;

Grau 4: ulceração, hemorragia e necrose;

Grau 5: morte;

### 3.2.1. AÇÃO DA RADIAÇÃO NO DNA E A AÇÃO OXIDATIVA

Em termos biomoleculares, a radiodermite ocorre após haver interação da radiação com o tecido humano, liberando elétrons que ionizam o meio e geram quebra do DNA, hidrólise de água, liberação de radicais livres e combinações químicas entre eles. O dano gerado ao DNA

pode ocorrer com a quebra da dupla hélice, de apenas uma delas ou com o *crossing linking*. Seja qual for o tipo de lesão que ocorra, culmina com a apoptose celular. A radiação é capaz de atuar nas fases G2 e M do ciclo celular, gerando uma redução celular global. Além disso, gera uma expressão mais exacerbada das proteínas p53 e Bax, que causam a apoptose e a necrose tecidual e afetam o processo de neovascularização, contração da ferida e reepitelização.<sup>21</sup>

O reparo do DNA é feito por um conjunto de enzimas, que podem consertar este erro ou fixá-lo, determinando o aparecimento de mutações, dificuldades em divisão celular e até carcinogênese mais tardiamente.<sup>21</sup> Além disso, este reparo produz vários radicais livres e peróxidos que são tóxicos às células, membranas e proteínas. Assim, a célula é mais sensível à radiação quanto maior for sua quantidade de DNA. A Fig. 1 explicita as possibilidades de danos ao DNA e suas correções.

Além do dano direto da radiação ao DNA e apesar de ainda restarem dúvidas sobre o mecanismo de ação da radiação na célula, pode-se dizer que há duas outras vias acontecendo nos tecidos irradiados: a via do estresse oxidativo e a via inflamatória.<sup>22</sup> Cabe lembrar então que vários eventos ocorrem simultaneamente no tecido irradiado.

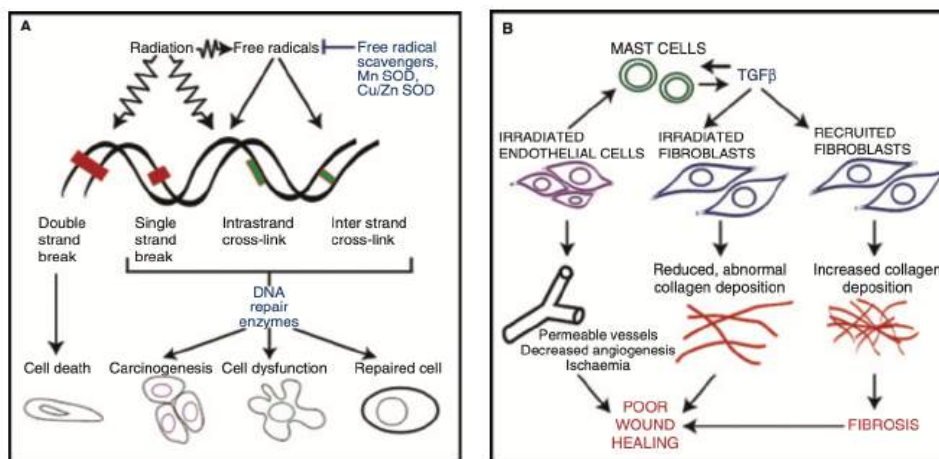


Fig. 1: Lesão de DNA pela Radiação. Extraído de Dormand E-L, Banwell PE, Goodacre TEE. Radiotherapy and wound healing. Int Wound J 2005;2:112-27.<sup>21</sup>

Assim, a radiação ionizante pode causar dano direto ao DNA e indiretamente, por meio de uma grande concentração de *reactive oxygen species* (ROS), produzidos após a radiólise da água. Os produtos de ROS e do *reactive nitrogen species* (RNS) aumentam o dano oxidativo intracelular.<sup>23</sup>

Uma vez que a célula possui cerca de 80% de água em sua composição, a sua lise produz elétrons hidratados, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e de hidrogênio, entre outros. Estes radicais podem se tornar altamente reativos na presença de ferro e cobre, por exemplo. Deste modo, os ROS vão interagir com lipídios da membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos, podendo gerar alteração na permeabilidade da membrana, degradação proteolítica, danos no DNA e instabilidade genômica.<sup>23</sup>

Há também genes que são relacionados às vias de estresse oxidativo e que, de acordo com estudos recentes, podem atuar nas células por meio de algumas principais vias, como a via ferroptótica, apoptótica, via de senescência celular, autofagia, via Fox O (*forkhead box protein O*) e Erb-b (receptor de tirosina quinase). Dependendo da dose de radiação, qualidade ou tipo da fonte ionizante e exposição, essas vias de proteção podem atuar juntas e com efeitos finais pró- oxidantes ou antioxidantes.<sup>23</sup> Esses mecanismos ocorrem também em pacientes submetidos à radioterapia e seu conhecimento é importante no tratamento dos vários tipos de câncer.<sup>23</sup>

Por outro lado, existem enzimas com papel de protetoras celulares e que agem limpando as células dos ROS, como superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GPX), NADPH, tioredoxina redutase (TrxR) e outras catalases antioxidantes, que usualmente, necessitam de magnésio ou ferro como cofatores em suas reações.<sup>23</sup> Por exemplo, em sua degradação, o óxido nítrico é convertido em em oxigênio por meio do auxílio da NADPH, L- arginina e óxido nítrico sintase, tendo como cofator crucial nessa reação a 5,6,7,8 tetrahidrobiopterina (BH4).<sup>24</sup> Assim, os ROS podem diminuir a quantidade de BH4, uma vez que o oxidam em BH2, o que altera a ação do óxido nítrico sintase e elevam os níveis de radicais superóxidos. Assim, de modo geral, a radiação reduz os níveis de BH4 na pele e aumentam a produção de ROS.<sup>25</sup>

Nota-se que a ação da radiação ionizante é bastante complexa e ainda pouco conhecida e seus efeitos devem levar em consideração o balanço entre as vias antioxidativas e a produção de ROS e RNS, da via do estresse oxidativo. Cabe lembrar ainda que essa via oxidativa ocorre concomitante com todo o processo de cicatrização, com suas fases e a participação de diferentes citocinas e quimiocinas.

### 3.2.2. CICATRIZAÇÃO E CITOCINAS

Uma das primeiras ocorrências na cicatrização é a ativação da cascata de coagulação de modo rápido, proporcionado pela inativação de fatores anticoagulantes pelos radicais livres. As células endoteliais entram em apoptose, como várias outras, e isso aumenta a permeabilidade capilar, expõe a camada íntima do endotélio vascular e pode gerar trombose, vistos na prática clínica sob a forma de exsudação, hemorragia e necrose tecidual.<sup>21</sup>

Os neutrófilos são o primeiro tipo celular recrutado após o dano tecidual. Já os macrófagos são os responsáveis por fagocitar debris e restos celulares e secretar fatores de crescimento fundamentais para a cicatrização.<sup>24</sup>

Neste momento, a cicatrização já foi ativada, seguindo as fases que são, de modo conciso, a fase inflamatória -fase 1 (que dura do dia zero ao dia quatro, considerando-se o zero como o dia da exposição à radiação), fase proliferativa – fase 2 (dia três a 3°. semana da exposição) e fase de maturação – fase 3 (da 3°. semana até 2 anos).<sup>24</sup> Cabe ressaltar, que essa divisão é meramente didática, uma vez que várias destas ativações e produção de substâncias ocorrem simultaneamente.

A síntese de citocinas pró inflamatórias, como interleucinas 1 (IL1), IL3, IL5, IL6 e IL8, TNF- $\beta$  (*transforming growth factor - $\beta$* ), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor-  $\alpha$* ) e IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) está aumentada na fase 1, alterando o depósito de matriz, que se desorganiza, e causa fibrose.

Outras substâncias também serão afetadas nas fases seguintes de cicatrização, como EGF (*endothelial growth factor*), TGF- $\beta$  (*transforming growth fator -  $\beta$* ), PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*), MMP (*matrix metalloproteinases*) – 1, 2, 12 e 13- e TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*). Esta duas últimas são enzimas que regulam a síntese de matriz extracelular e, por isso, responsáveis pelo depósito de colágeno de modo desorganizado e a fibrose que ocorrem nas radiodermites.

A resposta inflamatória local é, portanto, aumentada pela produção de várias citocinas pró- inflamatórias, que determinam o recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, produzindo uma reação inflamatória recorrente e dano tecidual. E os fibroblastos são os principais envolvidos na resposta tardia à exposição à radiação.

O papel do TGF-  $\beta$  tem importância em todo o processo inflamatório, principalmente no tecido conjuntivo, por se tratar de uma proteína reguladora do processo de cicatrização, proliferação, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular, aumentando o depósito desta

matriz e o de colágeno. Tudo isso, por meio de sua ação sobre mastócitos, fibroblastos, monócitos e macrófagos.<sup>21</sup> Nos tecidos irradiados, o TGF- $\beta$  e seu receptor são mais expressados e podem contribuir para a fibrose, seja por meio do aumento da síntese de matriz extracelular, seja pela inibição de colagenase e do crescimento de células epiteliais, pela degradação da matriz ou ainda por sua ação sobre os fibroblastos. Corroborando, em experimentos com ratos sem SMAD3<sup>1</sup> expostos à radiação, ocorreu um menor dano tecidual e com menos fibrose após irradiação e com uma cicatrização mais acelerada.<sup>26</sup>

Na fase mais tardia da cicatrização, as MMP possuem ação importante, uma vez que são elas as responsáveis pelo reparo tecidual e todo o processo de remodelagem. Cabe salientar que o TGF- $\beta$  estabiliza o depósito de matriz extracelular por inibir as MMP.<sup>27</sup>

Ainda sobre citocinas pró- inflamatórias, o IFN-  $\gamma$  é produzido pelas células do tipo *Natural Killers* (NK) e pelos linfócitos T CD4, agindo sobre os macrófagos, nas próprias NK e nos linfócitos, ativando o sistema imune, por meio do processamento de anticorpos, aumentando a produção de ROS e NOS – discutido anteriormente - e aumentando a produção de citocinas pró- inflamatórias.<sup>28</sup>

Estudos *in vitro* mostram que o interferon modula negativamente a cicatrização, visto que a ausência dessa citocina está relacionada ao aumento da angiogênese em feridas cutâneas. Essas ações ocorrem pelo fato de o interferon induzir a produção de *Interferon inducible protein 10* (IP-10), um potente agente antitrombogênico; além disso, na ausência do IFN-  $\gamma$ , há um aumento de VEGF. O IFN-  $\gamma$  ainda atua, pela sua regulação negativa, na via de TGF-  $\beta$ . Há também evidências de que o IFN-  $\gamma$  altera as moléculas de SMAD; a ausência do SMAD 3, por exemplo, pode acelerar a cicatrização, concordando com as pesquisas descritas anteriormente.<sup>26</sup>,<sup>29</sup> Ishida ainda cita, entre seus resultados, que o IFN-  $\gamma$  inibe a expressão do VEGF, efeito contrário do TGF-  $\beta$ . Pode-se então assumir que o um dos efeitos do IFN-  $\gamma$  é a modulação negativa do processo de cicatrização, por meio da supressão na produção e ação do TGF-  $\beta$ .<sup>29</sup> Schwarz complementa, dizendo que a presença de altas concentrações de IFN- $\gamma$ , produzidos por fibroblastos em uma ferida pode ser usado como um preditor de que a cicatrização poderá não ocorrer de modo normal ou esperado, uma vez que reduz a contração da ferida e a síntese de colágeno.<sup>30</sup>

---

<sup>1</sup>SMAD: Proteína expressa por gen de mesmo nome, que age como mediador nas vias ativadas pelo TGF- $\beta$ , na proliferação, diferenciação e morte celular.

Também as quimiocinas têm função no processo de cicatrização, juntamente com as citocinas e os fatores de crescimento. As quimiocinas podem ser, de acordo com a sua ligação em cada tipo de receptor, do tipo CXC, CC ou C. Entre os mais citados na cicatrização, estão o MCP-1 (*macrophage chemo-attractante protein*) ou CCL2, o IP-10 (ou CXCL10), a IL-8 (ou CXCL8) e a GRO- $\alpha$  (ou CXCL1).<sup>31</sup>

Cabe lembrar outra quimiocina importante na inflamação, a Fractalquina. Ela é uma quimiocina transmembrana do tipo CX3CL1, que se liga à superfície de células endoteliais inflamadas, células epiteliais, macrófagos e células musculares lisas vasculares. Seus receptores estão presentes em grandes quantidades em feridas, o que faz com que ela medie a cicatrização de feridas, por meio da ação de fibroblastos e macrófagos.<sup>32</sup> Não se deve esquecer, entretanto, que, para a cicatrização, há a necessidade de outros fatores de crescimento, como TGF- $\beta$ .

Estudos mostram que a concentração de fractalquina está elevada em pacientes com sepse, estando também ligada intimamente à elevação de leucócitos, de outras citocinas inflamatórias, como IL 6, IL 1 $\beta$ , IL 17A, IL6 e o IFN-  $\gamma$  e à redução do *clearance* bacteriano, naquele estado inflamatório.<sup>33</sup>

Ainda na fase inflamatória da cicatrização, os neutrófilos começam a desaparecer por apoptose, facilitada pela ação dos macrófagos. É neste momento que são encontradas concentrações elevadas de quimiocinas que atraem macrófagos e monócitos, entre elas o RANTES (CCL5), o MIP-1 ou CCL4 (*macrophage inflammatory protein*) e os MCP-1 e MCP-3. Estas quimiocinas são encontradas somente na primeira semana após o dano, fase esta em que os queratinócitos começam também a expressar o MCP-1 e ajudam a aumentar a concentração desta quimiocina nas bordas da ferida.<sup>27</sup> Há estudos comparativos com fibroblastos de feridas que cicatrizaram de modo esperado e outros de feridas crônicas que mostram que o MCP-1 estaria super- expresso nas lesões crônicas, o que poderia configurar como desvantagem no processo cicatricial.<sup>30</sup>

O MCP-1 também volta a aparecer quando a população de linfócitos aumenta na ferida, último tipo celular a migrar para a área lesionada. Com os linfócitos, aumenta a secreção de quimiocinas como o MCP-1, citado acima, o IP-10 (CXCL-10), o Mig-9 ou CXCL9 (*monokine induced by IFN-  $\gamma$* ) e o MDC ou CXCL22 (*macrophage derived chemokine*).<sup>27</sup>

Em experimentos *in vivo* com animais, a ausência de MCP-1 parece retardar a cicatrização, às custas do retardo da reepitelização, angiogênese e síntese de colágeno.<sup>31</sup>

Deste modo, paradoxalmente, há indícios de que o MCP-1 possui efeitos favoráveis na fase aguda da cicatrização, porém tem efeito deletérios nas fases mais adiantadas, já que

perpetuaria a fase aguda inflamatória, por meio da atração quimiotática sobre macrófagos e monócitos, causando degradação da matriz extracelular pelo aumento na produção de metaloproteinase.<sup>27</sup>

Já a presença da IL-8 está relacionada com um aumento na migração e proliferação de queratinócitos, situação compatível com altos níveis dessa citocina em feridas agudas. Estudos mostram ação semelhante do GRO- $\alpha$ , também por acelerar a proliferação de queratinócitos em lesões agudas.<sup>31</sup>

Sobre o IP-10, citado acima como sendo um agente antitrombogênico, essa citocina tem impacto negativo na cicatrização, uma vez que altas concentrações desta quimiocina aumentam a resposta inflamatória, com intenso recrutamento de linfócitos para o sítio da ferida.<sup>31</sup>

Na radiação, além das substâncias analisadas, o CTGF (*connective tissue growth factor*) atua no processo de cicatrização e a resistência da pele irradiada é aumentada pela inibição da COX-2 (ciclooxigenase 2) e da MCP-1.<sup>22</sup>

A cicatrização, nos momentos de angiogênese e neovascularização, depende também de outros fatores de crescimento, como o VEGF e FGF- $\beta$ . Em alguns estudos onde foi administrado o VEGF, a cicatrização ocorreu com menos tecido fibroso e com maior angiogênese tecidual.<sup>34</sup> O VEGF, sobretudo o VEGF-A, é o responsável por promover a proliferação e migração de células endoteliais; do mesmo modo que os macrófagos liberam o VEGF no sítio da ferida, o faz com o TNF- $\alpha$ , que vai induzir a expressão do VEGF-A por queratinócitos e fibroblastos.<sup>31</sup> Outras citocinas e fatores de crescimento com efeito parácrino e que aumentam a expressão de VEGF são TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ , KGF, EGF, bFGF, PDGF e IL1- $\beta$ .<sup>31</sup> Há ainda estudos que mostram que o VEGF-A age favorecendo também a linfoangiogênese, durante o processo de cicatrização.<sup>31</sup>

Diz-se então que após a radiação, a cicatrização não é capaz de resolver o dano tecidual, por haver uma produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, alterações nas comunicações célula-célula e célula-matriz, o que gera um acúmulo maior de matriz e, por fim, a fibrose.

Na prática clínica diária, o manejo destas lesões, sejam elas agudas ou crônicas, passa pelo controle da dor, intensa na maioria dos casos, e pela oferta de condições ao tecido para sua regeneração, que pode ir desde a escolha de um curativo capaz de diminuir a dor, melhorar as condições locais para auxiliar a cicatrização, cuidados com as recidivas dessas lesões e até os

cuidados cirúrgicos, que normalmente são necessários, com desbridamentos constantes, uma vez que estas lesões evoluem em tamanho e tem a recorrência como fator importante, quando se trata de fontes radioativas.

E neste contexto de curativos que possam, ao mesmo tempo reduzir a dor e favorecer a cicatrização de algum modo, está a MAH que, historicamente, já foi muito utilizada em grandes queimados até a década de 80. Hoje, ela ressurgiu como possibilidade de curativo, esterilizável, e com apostas de enriquecimento com vários tipos celulares, como a célula mesenquimal.

### 3.3. MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA

Considera-se que toda quebra de barreira de um tecido vivo é uma ferida. Tratar uma ferida, especialmente as crônicas e mais complexas, pode ser um desafio no dia a dia e começa com a escolha entre os diversos tipos e opções de curativos disponíveis no mercado. A busca pela cicatrização perfeita (ou regeneração) e acelerada é também um dos focos da Bioengenharia, que tenta criar materiais, biológicos ou sintéticos, que sirvam de suporte (*scaffold*) para a migração de novas células do paciente e assim, a reepitelização acontecer de forma mais rápida.<sup>35</sup>

A membrana amniótica humana (MAH) é um excelente exemplo. Usada pela primeira vez em 1910 por Davis em um transplante de pele<sup>9</sup>, a Cirurgia Plástica utilizou a MAH como opção de curativo biológico temporário em pacientes grandes queimados, como uma forma de reduzir a dor e diminuir as perdas de líquidos e de calor, até que se conseguisse efetivamente enxertar esses pacientes ou simplesmente até sua epitelização.<sup>36</sup>

Este momento histórico foi abandonado, temporariamente, pela descoberta, nos anos oitenta, de doenças infecciosas como a hepatite B e C e o HIV, ressurgindo, alguns anos depois, em reconstruções de vagina, laringe e no tratamento de lesões oculares e de córnea, com novas técnicas de preparo e esterilização, combinando suas particularidades com biossegurança.<sup>37,38</sup>

A MAH possui propriedades ímpares, além de seu custo ser baixo e sua obtenção fácil, por se tratar de material de descarte após parto cesariana. É biocompatível, de baixa imunogenicidade, possui propriedades físicas como aderência, maleabilidade, elasticidade e permeabilidade, que são de grande valia ao se pensar em um curativo biocompatível e que sirva de arcabouço para o crescimento de outros tipos celulares. Acrescenta-se aqui, que sua utilização em curativos de pacientes queimados, por exemplo, serve como uma barreira



mecânica capaz de evitar perdas sensíveis, perda térmica e de transudatos, conferindo também um alívio da dor local.

Tais características fazem com que a MAH também tenha propriedades anti-inflamatórias, antiaderentes, antimutagênicas, antifibróticas e sejam fonte de fatores de crescimento, citocinas e que delas possam ser extraídas ainda células-tronco mesenquimais.<sup>39</sup> Muitas destas qualidades são decorrentes do fato da MAH possuir, em sua matriz extracelular, componentes como laminina, fibronectina, ácido hialurônico, colágeno e proteoglicanas.<sup>39</sup>

As placentas, de onde são retiradas as MAH, tem a função de proteger o feto durante toda a vida intrauterina, como uma barreira física e biológica, e possuem duas membranas: a coriônica, mais externa, que fica adjacente ao endométrio, e a amniótica, mais interna, que fica em contato com o líquido amniótico e o feto. A MAH é fina, semitransparente, resistente, com espessura entre 20 a 500  $\mu\text{m}$ , e é composta por três camadas, sendo a que a camada de células epiteliais simples, do tipo cubóide ou colunar, é banhada pelo líquido amniótico e se apoia à membrana basal por meio de hemidesmossomos.<sup>40</sup> A membrana basal, por sua vez, é a responsável pela grande quantidade de colágeno do tipo I, III e IV e possui ainda laminina e fibronectina<sup>41</sup>, que lhe garante a capacidade de resistir à tração.<sup>42</sup> Abaixo da membrana basal, está a camada estromal, que é rica em colágeno e possui outras três camadas: uma camada compacta e densa, normalmente acelular, com grandes quantidades de colágeno I, III e fibronectina; uma segunda camada fibroblástica, onde estão as células mesenquimais da membrana amniótica e raros macrófagos; e a terceira camada, mais esponjosa, rica em glicoproteínas e proteoglicanas. (Fig. 2)<sup>39</sup>

Biologicamente, a MAH é um tecido imunologicamente privilegiado, pois possui baixa ou nenhuma expressão de moléculas do complexo antígeno leucocitário humano (HLA) tipo I e nenhuma expressão do HLA II, associado ao fato de possuir fatores imunorregulatórios. Produz ainda fatores de crescimento, como EGF, KGF, fator de crescimento hepático (HGF), VEGF, PDGF, b-FGF e o M-CSF.<sup>39</sup>

Sobre seus efeitos anti-inflamatórios, os mesmos decorrem pela expressão de receptores antagonistas de IL-1, expressão de inibidores de metaloproteinases (TIMP) do tipo 1, 2, 3 e 4, e IL-10, sem contar com o TGF- $\beta$ , o que auxilia na sua função anti-fibrótica.<sup>39</sup>

Deve-se salientar, porém que para sua utilização, a MAH deve preferencialmente ter a sua camada epitelial retirada, de modo que não haja perda da integridade mecânica da membrana basal, matriz extracelular e estroma remanescentes e que sua atividade biológica e composição sejam mantidos.<sup>43</sup> Assim, a descelularização elimina as células epiteliais, o que

diminui as possibilidades de uma reação imunomediada indesejável no hospedeiro. Além disso, possibilita sua utilização como arcabouço para a semeadura e proliferação de outros tipos celulares, lembrando que a MAH possui propriedades adesivas e que favorecem a proliferação celular. Deste modo, poderia ser possível a obtenção de uma estrutura semelhante a um curativo biológico, com o diferencial de ser biocompatível e bioativo, acrescida de células sobre ela semeadas, de acordo com o sítio a ser usado o curativo.

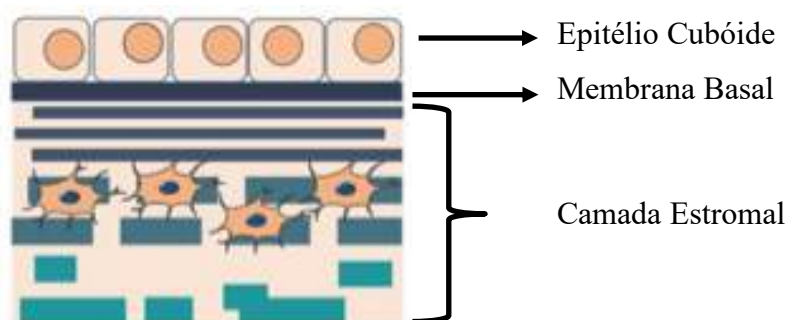


Fig. 2: Estrutura da membrana amniótica. Modificado de Fénélon M, Catros S, Meyer C, Fricain JC, Obert L et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. Membranes. 2021;11:387. Acesso online em 23/06/2023 <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>.

### 3.4. CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO (CTMDA)

As células-tronco mesenquimais são células adultas, de origem mesodérmica, inicialmente observadas como sendo derivadas da medula óssea e com poder de serem autorrenovadas e multipotentes. Estudos com as células tronco se iniciaram na década de 50-60, com Dr Friedenstein, que cunhou o nome de células tronco mesenquimais.<sup>44,45</sup>

Antes de 1960, acreditava-se que todas as células se dividiam e auxiliavam no crescimento e *turn over* de células. Em 1961, pesquisadores<sup>46</sup> conseguiram isolar da medula óssea uma célula que conseguia se renovar e a injetaram em ratos irradiados com doses letais. A célula injetada migrou para o baço e lá formou núcleos de células hematopoiéticas. Iniciava-se ali o conhecimento de células com poder de renovação e diferenciação, o que revolucionou os estudos em Medicina Regenerativa.

Hoje, sabe-se que as células-tronco mesenquimais podem ser isoladas a partir de outros tecidos, como sangue periférico, sangue de cordão umbilical, tecido adiposo, medula óssea, derme, polpa dentária e órgãos sólidos.<sup>45</sup> Não apenas sua origem pode ser diferente, como

também as características biológicas e seus marcadores de superfície, mesmo se originadas de um único doador.<sup>44</sup>

As células mesenquimais adultas possuem um potencial enorme, sobretudo por sua ação angiogênica e seus efeitos anti-inflamatórios e sua capacidade de se renovar e se diferenciar em outras células. Além disso, já podem ser usadas em estudos clínicos controlados, diferentemente das células de cordão umbilical, das células embrionárias e das chamadas iPCs (*induced pluripotent stem cell*).<sup>47</sup>

Apesar de várias décadas terem se passado, somente em 2001 as células-tronco mesenquimais foram isoladas a partir de tecido adiposo.<sup>48,49</sup> Zuk estabeleceu um protocolo de obtenção de células-tronco mesenquimais a partir da gordura, isolando-se a fração vascular estromal (FVE), obtida com o lipoaspirado.<sup>48,49</sup> Assim, observou-se que a FVE possui em sua composição, uma gama de tipos celulares que podem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, desde que sob condições especiais de cultivo. Desta forma, a FVE, derivada do tecido adiposo, possui células endoteliais, CTMDA, fibroblastos, macrófagos, pericitos e progenitores vasculares. Trata-se de uma fração bastante heterogênea em relação à sua população de células e pode ser obtida sem necessidade de cultivo celular, utilizando-se apenas dissociação enzimática e filtração.<sup>48</sup>

O lipoaspirado, após coletado, é levado ao laboratório para o seu processamento. De acordo com o protocolo utilizado, que pode ser variado em número de centrifugações e uso ou não de enzimas, obtém-se a FVE e semeia-se o *pellet*, retirado do fundo do tubo *falcon*, com uma heterogeneidade de células diversas, incluindo as CTMDA, em garrafas de cultivo com meio específico para o crescimento e confluência das CTMDA.

As células-tronco possuem algumas propriedades que auxiliam e favorecem a angiogênese, vasculogênese e diminuem a inflamação, podendo-se inferir efeitos benéficos ao processo de cicatrização e regeneração celular e tecidual. Estes efeitos ocorrem pela sua ação secretória e imunomoduladora, liberando interleucinas, prostaglandinas e fatores do crescimento diversos, como o VEGF, TGF- $\beta$  e o FGF.<sup>47</sup>

As CTMDA são de origem mesodérmica, muito embora possam se diferenciar em outras células de ectodérmicas ou endodérmicas, como células de Schwann, células endoteliais vasculares e até neurônios.<sup>47</sup>

Para que as células cultivadas sejam realmente as CTMDA, o meio de cultura é específico e são feitos testes para a identificação das células, a partir de seus marcadores de superfície. Da mesma forma, quando se deseja cultivar osteoblastos ou condrócitos a partir do lipoaspirado e da FVE, o meio de cultura e seus substratos são os responsáveis pela seleção do tipo celular.

Hoje, já se sabe que as CTMDA são células com aspecto semelhante à de fibroblasto, possuem tropismo e capacidade de adesão à superfícies plásticas e tem marcadores de superfície celular, como as demais células mesenquimais. Elas expressam CD105, CD29, CD44, CD90, CD73 e CD166 e não expressam em sua superfície outros marcadores hematopoiéticos e endoteliais, como CD3, CD4, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD56, CD62p, CD 104 e CD144. Este conhecimento é importante para se confirmar se as células cultivadas são de fato CTMDA.<sup>50</sup>

A Federação Internacional para Terapia e Ciência com Tecido Adiposo (IFATS) e a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) determinaram três critérios mínimos para se caracterizar as CTMDA, que são: i) capacidade de aderência ao plástico, ii) expressão de moléculas de superfície celular positivas para CD73, CD90 e CD105 e negativas para CD11b, CD14, CD19, CD 34, CD45 e HLA-DR; e iii) potencial de diferenciação em três linhagens, adipócitos, condrócitos e osteoblastos.<sup>50,51</sup>

Da mesma forma que se tem conhecimento sobre seus marcadores, outros estudos foram realizados, buscando-se respostas sobre possíveis sítios doadores de tecido adiposo e se há influência do método de coleta da gordura na proliferação celular *in vitro*. Pesquisadores analisaram a proliferação celular das CTMDA coletadas em sítios diferentes, em pacientes de idades, gênero e IMC diversos e ainda o papel da centrifugação do lipoaspirado.<sup>52,53</sup> Assim, sabe-se que a região com maior quantidade de células-tronco é o abdome, quando comparado com regiões como joelho, flancos e coxas/ culotes.<sup>53</sup> Da mesma forma, a proliferação das células *in vitro* não é diferente entre pacientes masculino ou feminino e tão pouco sofre influência do IMC.<sup>53</sup>

A utilização de centrifugação, preconizada por Coleman para o uso do lipoaspirado em auto-enxertias, parece não influenciar também a coleta e proliferação de CTMDA.<sup>52</sup> Nem mesmo o uso de lipoaspirador ultrassônico parece interferir na obtenção de CTMDA.<sup>54</sup> Deste modo, a utilização de seringas ou aparelhos de lipoaspiração não alteram a quantidade e proliferação de células-tronco, igualmente o sítio de coleta. Isso confere maior liberdade ao cirurgião plástico, por exemplo, ao se prever, em um futuro bem próximo, o tratamento de

doenças crônicas, como radiodermites, úlceras venosas e feridas complexas, de modo autólogo, com CTMDA coletadas durante procedimentos cirúrgicos. Esta é, aliás, uma realidade, basta se observar vários estudos experimentais que vêm sendo realizados no campo da medicina regenerativa.<sup>55, 56, 57</sup>

#### 4. MÉTODOS

Esta pesquisa foi realizada no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF-UFRJ), em parceria com o Hospital Sírio Libanês (HSL). Foi aprovada pelo CEP-HNMD e cadastrada na Plataforma Brasil, sob o número 65264717.9.0000.5256, com dois Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovados: um referente à doação de material de lipoaspirado humano e outro referente à doação de placenta (APÊNDICES 1 e 2). Quanto ao uso ético dos animais utilizados na fase *in vivo*, a pesquisa está inscrita e aprovada pela Comissão de Ética em Uso de Animais do HNMD (CEUA), sob o número 07/2015.

As membranas amnióticas humanas, base do curativo, foram obtidas a partir das placentas humanas, doadas por pacientes gestantes, à época do parto cesariana, operadas pela Clínica de Obstetrícia do HNMD. As membranas foram processadas, conforme protocolo já estabelecido pelo IPB, descrito adiante no texto. Do mesmo modo, o lipoaspirado humano foi coletado no HNMD, pela Clínica de Cirurgia Plástica, quando do momento da cirurgia de abdominoplastia.

Optou-se, de modo didático, por apresentar os métodos desta pesquisa em duas fases: uma fase onde foram estabelecidos protocolos e preparados os materiais para o tratamento experimental, com estudos *in vitro*, e uma fase de tratamento propriamente dita, *in vivo*, a partir dos métodos estabelecidos e estudados na primeira fase.

##### **FASE I – *IN VITRO***

Nesta etapa da pesquisa, iniciou-se o processo de coleta do material humano sob a forma de lipoaspirado e a reprodução do protocolo de cultivo celular, conforme método aprendido no Hospital Sírio Libanês.

Em paralelo, iniciou-se o manejo da MAH, preparação e descélularização, já se utilizando as primeiras células isoladas em testes de quantificação e caracterização celular e semeadura nas MAH processadas.

Ainda, outra vertente da pesquisa foi iniciada, com a tentativa de se obter um protocolo de irradiação de animais com acelerador linear de elétrons, uma vez que há poucos relatos na literatura a respeito do uso desse tipo de fonte.

Definiram-se, assim, os métodos de acordo com cada etapa desta fase, descritas abaixo:

#### 4.1. COLETA DE LIPOASPIRADO HUMANO

A base celular desta pesquisa é o lipoaspirado humano<sup>8</sup>, coletado de pacientes submetidos à abdominoplastia reparadora pela Clínica de Cirurgia Plástica do HNMD. O retalho inferior abdominal, que é desprezado neste tipo de cirurgia, é lipoaspirado antes de sua retirada e a gordura resultante é separada para a pesquisa. Os pacientes doadores de lipoaspirado foram atendidos e operados, após pré-operatório completo, conforme indicação e técnica usadas na Clínica de Cirurgia Plástica do HNMD. Todo o processamento celular e do lipoaspirado foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do IPB.

Foram selecionados, como doadores de lipoaspirado humano, 40 pacientes hígidos, conforme os critérios de inclusão descritos, a saber: pacientes do sexo feminino, com idade entre 18 e 50 anos, com exames laboratoriais pré-operatórios normais, risco cirúrgico, pela classificação da *American Society of Anesthesiology* (ASA), do tipo I ou II e com Índice de Massa Corporal (IMC) entre 24 e 27kg/m<sup>2</sup>. Excluíram-se do estudo pacientes submetidos previamente à cirurgia bariátrica e pacientes com história de emagrecimento (sem cirurgia, com reeducação alimentar, por exemplo) superior à 10 (dez) kg. Todos os participantes assinaram o TCLE, permitindo a doação e utilização desse material para pesquisa experimental (APÊNDICE 1)

O lipoaspirado humano foi coletado em centro cirúrgico, de acordo com as normas de assepsia e antissepsia, com o paciente doador sob anestesia, geral ou peridural, à critério do anesthesiologista, durante procedimento cirúrgico de abdominoplastia. Utilizou-se a técnica úmida de lipoaspiração, com seringas de 60 ml e infiltração de solução de 1:500.000 de soro fisiológico 0,9% e adrenalina. As cânulas utilizadas foram as de calibre 2,5mm e 3,0mm (Rhosse Instrumentos e Materiais Cirúrgicos Ltda<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). O material, após decantação simples, foi conduzido ao laboratório de Biologia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), em caixa de transporte própria para substâncias biológicas. (Fig. 3) O material foi mantido em geladeira no laboratório, nos casos em que o processamento foi feito no dia seguinte à coleta.

#### 4.2. PROCESSAMENTO DO LIPOASPIRADO

Iniciou-se, após a coleta, em um prazo máximo de 24h, o processamento do material obtido, por meio de dissociação celular, a fim de se isolar a fração vascular estromal, de acordo

com a técnica de Zuk et al.<sup>48,49</sup> Assim, o lipoaspirado foi distribuído em tubos cônicos (Falcon) e lavado três vezes com solução-tampão fosfato (PBS-*Phosphate Buffered Saline*), na proporção de 1:1. Em seguida, realizou-se a digestão enzimática com adição de colagenase à 0,075%, seguida de agitação intensa do material e aposição em banho-maria à 37°C, sempre se tendo o cuidado de agitar a mistura, periodicamente, neste tempo.



Fig. 3: Lipoaspirado coletado

Após 30 minutos, os tubos foram levados à centrifuga, por cinco minutos, com força de 1.200G. Retirou-se o *pellet* obtido, adicionou-se 10 ml de meio basal *Dulbecco's Modified Eagle Medium* F-12 (DMEM F-12, Gibco, *Thermo Fisher Scientific*<sup>®</sup>, EUA) e retornou-se à centrifuga por mais cinco minutos, desta vez com força de 300G. O *pellet*, que já recebe o nome de fração vascular estromal, foi ressuspensionado em meio DMEM F12 e semeado em frascos específicos para cultura. Os frascos com as células foram encubadas em estufas de CO<sub>2</sub>, de modo a se obter adesão e proliferação celular. (Fig. 4)

As garrafas de culturas foram acompanhadas diariamente, com reposição e troca de meio DMEM F12 ou tripsinização para a expansão celular em frascos maiores (passagem celular). Assim, cada transferência de recipiente é considerada uma passagem celular. Quando este procedimento é feito próximo ao momento da semeadura da MAH, mantem-se as células em expansão até a quarta passagem.

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMDA

Para a caracterização da população celular CTMDA, procedeu-se o estudo de três amostras, que foram obtidas após o isolamento celular e expansão até a passagem quatro, como descritos anteriormente nos itens 4.1 e 4.2.





Fig. 4. Processamento do Lipoaspirado

A caracterização imunofenotípica das CTMDA foi realizada no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), por meio da análise de marcadores de superfície, por citometria de fluxo, pesquisando-se: i) marcadores para células mesenquimais: CD44, CD73, CD90 e CD105; ii) e para células de linhagem hematopoiética: CD34, CD 45 e CD11b.

Para a análise, reservou-se, para cada marcador, um total de  $10^6$  células que foram incubadas, por tubo de análise, com 0,4ug dos seguintes anticorpos primários conjugados à fluorocromos: anti-CD44 PE-Cy<sup>TM</sup>7, anti-CD105 FITC, anti-CD90 PE-Cy<sup>TM</sup>7, anti-CD73 BV421, anti-CD45 FITC, anti-CD34 FITC e anti-CD11b PE-Cy<sup>TM</sup>7 (BD Biosciences, Califórnia, EUA). As marcações foram realizadas separadamente e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz. Após lavagem com PBS, o bloqueio de ligações inespecíficas foi feito com PBS suplementado com 3% de SFB. A imunorreatividade para cada marcador foi avaliada usando o citômetro de fluxo BD FACS CANTO II (BD Biosciences) e para cada amostra, ao menos 20.000 eventos foram adquiridos. As análises foram realizadas com o software FlowJo<sup>®</sup> (BD Biosciences, Califórnia, EUA).

Para analisar a caracterização multipotente das CTMDA, foram usadas duas amostras de células de pacientes, com a indução *in vitro* para diferenciação celular nas três diferentes linhagens de células - adipócitos, osteócitos e condrócitos. Esta etapa foi realizada no Centro de Tecnologia Celular do Hospital Sírio-Libanês, conforme protocolo publicado previamente.<sup>58,59</sup>

## DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Na diferenciação osteogênica, as culturas primárias de CTMDA foram induzidas na via osteogênica e se diferenciaram em osteócitos imaturos e maduros. Com o cultivo e indução permanente por 21 dias, obteve-se a formação de matriz óssea (áreas com calcio-hydroxapatita positiva).

Em uma placa de 12 poços (Corning® Costar®, EUA), as células foram plaqueadas com a mesma concentração em triplicata ( $5 \times 10^3$  células). Após as 24 horas com o meio de cultura basal, esse foi trocado por meio de cultura específico com fatores de crescimento, StemPro® Diferenciação Osteogênica (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA).

Após 21 dias em cultura específica para a diferenciação osteogênica, as células em placas foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com etanol 70% por 30 minutos. Após a fixação, as células foram coradas com solução de Vermelho de Alizarina S a 0,2% (pH:4,2; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 30 minutos. Para a lavagem final, foi utilizado PBS por três vezes. Em seguida, procedeu-se à observação das células com o auxílio de microscópio invertido para a avaliação da formação de matriz extracelular óssea mineralizada no aumento de 10x.

## DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Na diferenciação adipogênica, as culturas primárias de CTMDA foram induzidas a se diferenciarem em adipócito por 18 dias, em indução permanente. Após esse período, foram observadas mudanças morfológicas e, com isso, a formação de vesículas intracelulares de gordura.

Em uma placa de 12 poços, as células foram plaqueadas com a mesma concentração em triplicata ( $5 \times 10^3$  células), então após as 24 horas com o meio de cultura basal, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura específico com fatores de crescimento, StemPro® Diferenciação Adipogênica (StemPro® Adipogenic Differentiation Kit; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA).

Para a avaliação, realizou-se a coloração das células com *Oil Red* (OIL RED - Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para isso, o meio indutor foi retirado das culturas celulares, que foram lavadas com PBS (Phosphate- Buffered Saline; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) duas vezes e fixadas com isopropanol 60% (Sigma aldrich, St. Louis, MO, EUA) por cinco minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram coradas com óleo

Vermelho (0,5mg/ml), por 15 minutos ao abrigo de luz, em temperatura ambiente. Para a lavagem final foi utilizada isopropanol 60%, uma vez e com água destilada por duas vezes. Realizada a observação das estruturas celulares e coloração das vesículas de gordura em microscopia no aumento de 10x.

#### DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

Na diferenciação condrogênica, as culturas primárias de CTMDA foram induzidas na via de sinalização condrogênica, através de fatores de crescimento, para se diferenciarem em condrócitos, após 21 dias em indução permanente.

Em uma placa de 12 poços, as células foram plaqueadas com a mesma concentração em triplicata ( $5 \times 10^3$  células), após as 24 horas com o meio de cultura basal o meio de cultura foi trocado por meio de cultura específico com fatores de crescimento, StemPro® Diferenciação Condrogênica (StemPro® Chondrogenic Differentiation Kit; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA).

Para a avaliação, realizou-se a coloração com *Alcian Blue*. Após 21 dias em condição de diferenciação, esse corante é usado para identificar as proteoglicanas (matriz extracelular), liberadas pelos condrócitos.

O meio indutor foi retirado das culturas celulares, que foram lavadas com PBS (Phosphate- Buffered Saline; Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) duas vezes e fixadas com formaldeído 4% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 20 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação as células foram coradas com 1mg/ml *Alcian Blue* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por duas horas ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Para a lavagem final foi utilizada ácido clorídrico (0,1M), uma vez e com PBS por 2 vezes.

Durante todo o processo de manipulação e tripsinização das células, a viabilidade celular foi observada, bem como sua quantificação.

#### 4.4. PROCESSAMENTO DA MEMBRANA AMNIÓTICA HUMANA (MAH)

Os protocolos de isolamento e descelularização da membrana amniótica já estão bem estabelecidos por pesquisadores do IPB. Deste modo, a fase experimental do processamento se inicia com a reprodução do preparo da MAH e a semeadura de células da FVE e consequente adição nas membranas, de modo que sejam utilizadas como curativo nas feridas radioinduzidas.

A coleta das membranas ocorreu no Centro Obstétrico do HNMD, após assinatura do TCLE (CAAE 01028512.7.0000.5256), autorizando a doação das placentas para fins de pesquisa, realizada no próprio hospital. Deste modo, as pacientes submetidas à cirurgia do tipo cesariana e com sorologia negativa para HIV-1 e -2, HTLV-1 e -2, Hepatite B e C, CMV e Sífilis foram consideradas aptas para a participação no estudo. Sob condições de assepsia e antisepsia, a placenta foi lavada em solução tampão fosfato-salino (PBS; pH 7,4) várias vezes para retirada de debris, sangue e coágulos. Em seguida, a membrana foi seccionada à dois centímetros do disco placentário (Fig. 5), por se tratar de área com maior concentração de fatores de crescimento. Seguiu-se a separação manual da membrana amniótica e do córion. (Fig. 6) A MAH foi colocada em solução de DMEM e glicerol, contendo 25mg de penicilina, 25mg de estreptomicina e 62,5 mg de anfotericina B e armazenada por tempo mínimo de 24 horas até sua utilização. Este processo, por si só, já inativa as células da MAH, que só serão efetivamente retiradas com a descclularização. O restante do processo foi realizado quando as células-tronco já se encontravam na passagem estipulada para a adição na MAH.

Assim, no momento de sua utilização, a MAH foi fragmentada em quadrados de 2x2cm e lavada por trinta segundos em solução de hidróxido de sódio 0,5M (NaOH)<sup>60</sup> para a descclularização. Ato contínuo, realizou-se a raspagem suave com o lado cego de uma lâmina de bisturi no. 15, procedendo-se assim, a remoção mecânica das células. Uma nova retirada mecânica foi realizada, desta vez com o auxílio de hastes flexíveis de algodão para a remoção completa das células epiteliais da MAH e a consequente exposição da membrana basal. Para a visualização do sucesso do processo de descclularização, um fragmento da MAH foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) da UFRJ, com o microscópio Fei Quanta FEG 250 (Oregon, EUA).

O preparo prévio das amostras para a visualização em microscopia de varredura foi o realizado na Unidade de Microscopia Multiusuário Padrón- Lins (UniMicro), da UFRJ. A fixação do material foi feita com glutaraldeído 2,5% e tampão de cacodilato de sódio 0,1M, seguida de desidratação com etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e secagem com hexametildisilazano 100%, pelo ponto crítico. Após, foram montados em suporte metálico e recobertos em ouro coloidal, para serem então analisados no MEV.



Fig. 5. Secção do disco placentário



Fig. 6. Separação mecânica da membrana amniótica

#### 4.5. SEMEADURA E PRODUÇÃO DO COMPLEXO MAH+CTMDA

As MAH, após serem descélularizadas e lavadas com PBS, foram dispostas em placas de Petri com 2ml soro fetal bovino (SFB) a 10%, puro, por trinta minutos. Em seguida, o excesso de SFB foi retirado e as CTMDA foram semeadas no lado epitelial da MAH. Nesta superfície com membrana basal<sup>61</sup>, as células na quarta passagem foram depositadas na quantidade de  $10^6$  células por MAH. À placa contendo MAH+ CTMDA, foi acrescentado DMEM F12 e, em seguida, levada a estufa de CO<sub>2</sub>, à 37<sup>0</sup>C, onde permaneceram por sete dias. Após este período, a MAH, contendo CTMDA, encontrava-se pronta para o uso como curativo biológico.

A observação da adesão das células à MAH foi feita no MEV, utilizando-se o protocolo descrito previamente, porém, fazendo-se a leitura desta vez no Laboratório de Imagem, do Inmetro, com microscópio de feixe duplo, por efeito de campo e feixe de íons focalizados – FEI SEM/ FIB NovaLab 600. (Eurofins NanoLab Technology, França)

Adicionalmente à leitura das amostras em MEV, para a visualização qualitativa da adesão das CTMDA à MAH, foi realizada a coloração de hematoxilina para a visualização em microscópio invertido Primo Vert 99C (Zeiss®, Jena, Alemanha)

Também foi realizada a imunofluorescência. Para isso, o conjunto MAH+ CTMDA foi fixado com paraformaldeído 10%. No dia seguinte, foram adicionados na amostra os marcadores DAPI (4'6 Diamino -2-fenil-indol) e anticorpo anti- CD90 conjugado à FITC. Utilizou-se o protocolo já estabelecido de imunofluorescência preconizado pelo Instituto, com captação de imagens em microscópio confocal Leica TCS-SPE do Laboratório Multiuso do Bloco B do CCS/ UFRJ e software LAS X.

## FASE II- *IN VIVO*

Devido à escassez na literatura de protocolos para indução de lesões por meio de acelerador de elétrons em ratos *Wistar*, projetos-piloto foram realizados a fim de se obter uma ferida cutânea compatível com uma radiodermite/ radionecrose em humanos, com área crostosa e debris.

### 4.6. DEFINIÇÃO DO PROTOCOLO DE IRRADIAÇÃO

Quatorze ratos *Wistar*, machos, com peso entre 300g e 500g de peso foram utilizados para a definição do protocolo de irradiação. Com os animais anestesiados (protocolo anestésico descrito a seguir), as primeiras irradiações se iniciaram com dose de 45 Gy, em três ratos, a uma distância fonte sujeito (DFS) de 100cm, *bolus* de um centímetro e energia de 5MeV. O tempo de irradiação foi de 14 minutos. Nestes três animais, não houve lesão aparente cutânea até o dia 30 pós radiação, contrariando os protocolos da literatura.<sup>62,63</sup>

Procedeu-se, então, o início de nova irradiação, após revisão e análise junto ao físico responsável pelo acelerador de elétrons, com 85 Gy, com a mesma energia e distância, em oito ratos. Apenas em um animal houve o desenvolvimento da lesão cutânea após os mesmos 30 dias, igualmente de modo diverso ao descrito na literatura.

Nova reavaliação foi feita, alterando-se então a energia e a intensidade da irradiação, passando-se para 8MeV e 86 Gy, com distância (DFS) também reduzida para 57 cm, o que diminuiu o tempo em que o animal permaneceu anestesiado no aparelho para 9 minutos. Neste grupo de três animais, todos desenvolveram lesão cutânea no 16º dia de irradiação, o que permitiu determinar os parâmetros para a irradiação de ratos com acelerador linear de elétrons para este estudo. Os dados da fase inicial do estabelecimento do protocolo estão explícitos na Tab. 1.

A partir dessas medidas de energia, intensidade de dose e distância, todos os outros animais da pesquisa foram irradiados, obtendo-se a partir de então, a ferida no 16º. dia pós irradiação.

#### 4.7. DEFINIÇÃO DO INÍCIO DO TRATAMENTO DAS LESÕES

A fase de experimentação e desenvolvimento do protocolo de irradiação serviu também para definir o tempo, após a irradiação, de obtenção de uma ferida propícia ao desbridamento e, conseqüentemente, ao tratamento. Era necessário observar uma ferida profunda o bastante para que fosse aplicada a MAH, com bordas adequadas para a sutura da mesma ao leito da ferida.

Número de Animais	Dose (Gy)	DFS (cm)	Energia (MeV)	Dia de Ferida (animais)	Tempo de Irradiação (min)
3	45	100	5	Não houve	14
8	85	100	5	30 (1)	14
3	86	57	8	16 (3)	9

Tab. 1: Progressão e Definição do Protocolo de Radiodermite em ratos

Nos três animais irradiados com dose de 86Gy durante a fase de definição do protocolo de radiação, obteve-se uma lesão inicialmente úmida e superficial no 16º dia, que progrediu até sua resolução completa, com cicatrização da área no 43º dia após a exposição à fonte.

Nesta observação da evolução completa da ferida, desde seu surgimento até a resolução, observou-se que, no 30º dia de irradiação, os animais evoluíam com uma ferida mais profunda, com crosta, bordas elevadas e passível de desbridamento cirúrgico, aplicação de MAH e sutura dessa às bordas da ferida, caracterizada como uma radiodermite grau IV. Com a ausência de maiores dados na literatura, optou-se por definir o dia 30 dias pós-irradiação como o momento em que se procederia o tratamento dos animais do estudo.

#### 4.8. IRRADIAÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram irradiados no Serviço de Radioterapia do HNMD, mesmo local onde foram feitos os estudos até a definição do protocolo de radiação usado nesta pesquisa, considerando-se este dia o D0 (dia zero) do tratamento. Para a indução da lesão, utilizou-se a câmara de acelerador linear de elétrons da marca Siemens Primus® (Munique, Alemanha), com a dose total de 86 Gy, fracionada em quatro tomadas, no mesmo dia, com intervalo suficiente apenas para a reprogramação da máquina, com energia de 8MeV e unidade motora de 2857, durante nove minutos e trinta segundos, em aplicação única. A área irradiada é de 2cm X 2cm,

na área do membro posterior esquerdo de cada animal. Utiliza-se uma placa de chumbo, com recorte central com esta dimensão, de modo que a lesão fique restrita à área desejada.

Como medicação pré-anestésica, foi realizada a injeção intraperitoneal nos animais com maleato de midazolam (Dormonid<sup>®</sup>, Roche<sup>®</sup>, Suíça), na dose de 5mg/kg, o que permite o transporte com menos ansiedade dos animais até o Setor de Radioterapia e a depilação e preparo para a radiação. Lá, aplicou-se uma dose de quetamina (Ketamin<sup>®</sup>, Biochimico<sup>®</sup>, Brasil - 10mg/kg), também calculada para cada animal, levando-se em conta seu peso, acomodando-se em seguida o rato no aparelho. Para acondicionar o animal, de modo a manter a posição durante os nove minutos de radiação, foi confeccionado um berço de isopor para a melhor acomodação do animal e mantê-lo no correto posicionamento para receber a radiação. Também com esse leito, foi possível acomodar o *bolus* e a placa de chumbo com recorte do tamanho da ferida desejada. (Fig. 7 e 8)

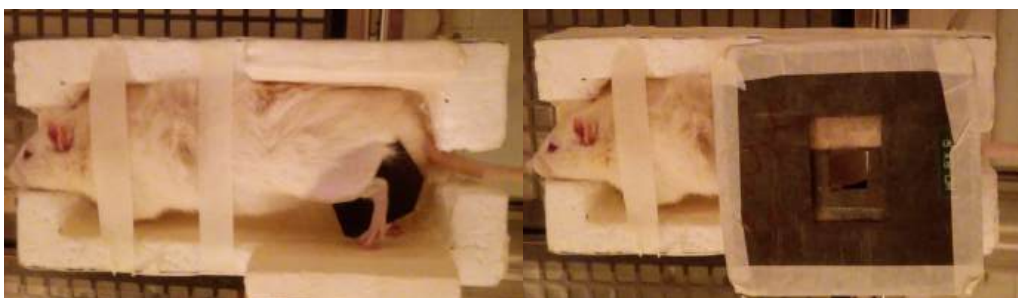


Fig. 7 e 8: Animal acondicionado em molde de isopor; com a placa de chumbo

#### 4.9. GRUPOS DE ANIMAIS, TRATAMENTO E EUTANÁSIA

Os animais experimentais foram distribuídos em grupos, de modo aleatório. O tratamento se iniciou no D30, ou seja, trinta dias após a radiação, momento em que todos os animais do estudo possuíam uma radiodermite grau IV. Entre o dia da irradiação (D0) e o D30, os animais foram observados diariamente e a partir do D16, momento em que era possível observar o início da formação da ferida, receberam, como tratamento analgésico, tramadol subcutâneo (5mg/kg) e morfina (5mg/kg), diariamente, além do fornecimento, *ad libitum* no bebedouro, de 3ml de paracetamol 100mg/ml, diluído em 300ml de água.

No dia trinta após a radiação, os animais foram separados, em grupos, a saber:

- Grupo 1 - Neomicina (GN): animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e pomada de neomicina com bacitracina;



- Grupo 2 - Membrana Amniótica Humana (GMAH): animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e membrana amniótica descelularizada;

- Grupo 3 - Grupo CTMDA (GCTMDA): animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e complexo MAH+ CTMDA;

Antes do tratamento propriamente dito, as feridas de todos os animais foram desbridadas cirurgicamente, deixando área cruenta para o tratamento.

No grupo 1 (GN), aplicou-se à ferida uma camada fina de pomada de neomicina e bacitracina.

No grupo 2 (GMAH), a MAH foi suturada com fio do tipo Mononylon 5.0, da marca Ethicon® (Johnson & Johnson®, EUA) na área da ferida.

No grupo 3 (GCTMDA), o complexo MAH + CTMDA foi suturado na ferida com o mesmo fio usado no grupo GMAH (Mononylon 5.0, da marca Ethicon®).

Após os tratamentos, as feridas de todos os grupos tratados foram cobertas com curativo feito com protetor ocular da marca Nexcare® (3M®, Brasil), para cada perna, seguido de curativo de filme transparente do tipo Curatec®, com o cuidado de se envolver toda a perna do animal. (Fig.9)



Fig. 9: Aspecto do curativo final

Neste dia, antes de se efetivar o tratamento da ferida e após a mesma ter sido desbridada, desenhou-se em plástico, o tamanho da ferida de cada animal, colocando-se o plástico sobre as feridas, no dia da cirurgia (D30)- tamanho da ferida no D30.

Os procedimentos de desbridamento, tratamento e curativo de cada animal foi realizado no Setor de Cirurgia Experimental do IPB. Para isso, os animais receberam como medicação pré-anestésica, midazolam (5mg/kg, Cristália<sup>®</sup>, SP, Brasil) e morfina (5mg/kg, Cristália<sup>®</sup>, SP, Brasil), intraperitoneal. Para a anestesia inalatória, foi usado sevoflurano (Cristália<sup>®</sup>, Brasil) e oxigênio à 100%, em aparelho de anestesia da marca Conquest<sup>®</sup> (Baumer<sup>®</sup>, SP, Brasil). Durante todo o procedimento, o animal foi mantido em ventilação com o auxílio de máscara facial, confeccionada com uma seringa de 20 ml sem êmbolo.

Os animais foram observados diariamente, até o surgimento da ferida e, após o tratamento. No dia do tratamento, foram feitas todas as documentações fotográficas, bem como no momento da eutanásia, a fim de que as fotos fossem comparadas entre os grupos.

Novamente no D35, antes da eutanásia, as feridas foram desenhadas em plástico, a fim de que fossem analisados posteriormente. Todos os desenhos foram analisados, utilizando-se a contagem do papel centimetrado de modo simples e obtendo-se o tamanho em centímetros das feridas nos dias D30 e D35.<sup>64</sup> Os resultados foram analisados em um segundo momento, estatisticamente, de modo a se observar e mensurar mais fielmente a evolução das feridas, além das fotografias. A escolha pela eutanásia neste momento se baseou na cicatrização e contração de feridas em ratos, uma vez que, no início da pesquisa, se observou que a cicatrização completa desta radiodermite ocorria em torno do 43º dia.

Os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose de tiopental intraperitoneal após cinco dias de tratamento (D35) e, em seguida, as feridas foram retiradas cirurgicamente e divididas em duas partes iguais, a saber: uma parte para análises histopatológicas – Hematoxilina & Eosina (HE) e Picrosírius -e a outra foi congelada para a realização de análises quantitativas de fatores de crescimento e interleucinas pelo método multiplex.

Todos os procedimentos com os animais foram acompanhados por médica veterinária especializada em Ciências de Animais de Laboratório, parte do corpo clínico do IPB/HNMD. A finalização humanitária foi necessária, em alguns casos, e os animais excluídos da pesquisa.

#### 4.10 ANÁLISES DE HISTOLOGIA E TESTE MULTIPLEX

As amostras biológicas retiradas de todos os animais dos três grupos foram avaliadas histologicamente quanto ao grau de processo inflamatório, a disposição e concentração celulares e de fibras colágenas. Outra parte das mesmas amostras foi avaliada quanto ao padrão de expressão de citocinas e quimiocinas no momento D35 de tratamento, por análise multiplex.

Foram coletados também um fragmento de pele de outros quatro animais, que não foram submetidos a nenhuma abordagem, nem irradiação, para avaliação do padrão de citocinas e quimiocinas. Os valores obtidos dessas amostras serviram apenas para guiar a análise estatística do teste multiplex. Pontua-se que estes animais permaneceram 35 dias no mesmo biotério dos demais ratos que sofreram intervenção e sob os mesmos cuidados, com alimentação e água *ad libitum*, porém sem administração de analgésicos ou outras medicações.

O preparo do material para histologia foi realizada no Laboratório de Histologia da Prof. Lycia Gitirana, no Centro de Ciências da Saúde (CCS), da UFRJ. As peças retiradas dos animais foram colocadas em formol a 10%, desidratadas e emblocadas em parafina. Procedeu-se à confecção de lâminas histológicas, contendo cortes histológicos de 5µm de espessura, que receberam coloração HE ou picrossírius.

Em seguida, os cortes histológicos foram analisados por um médico patologista, sem conhecimento prévio de a quais grupos os cortes histológicos pertenciam. A análise foi qualitativa, considerando-se a intensidade em que foram achados os dados, seguindo critério já definido em literatura.<sup>65</sup> Assim, foram observados e analisados cinco cortes histológicos de cada grupo, escolhidos aleatoriamente.

Foram feitas as seguintes análises:

1. Proliferação Vascular (PV): ausente, quando sem vaso sanguíneo no corte; discreta, quando possui poucos vasos; moderada, quando estavam mais frequentes e dispersos em campo óptico; e acentuada, quando vistos em grande frequência.

2. Presença de células mononucleares (MN): ausente, quando não se evidenciou estas células no campo óptico; discreta, quando as células estavam presentes de modo isolado, com áreas livres de infiltrado; moderada, quando as células estavam presentes em maior quantidade, formando pequenos aglomerados, mas ainda com áreas livres; e acentuada, quando estavam as

células presentes em grande quantidade, formando aglomerados densos e justapostos, sem áreas livres.

3. Presença de células polimorfonucleares (PMN): ausente, quando não foram evidenciadas; discreta, quando foram visualizadas de modo esparso, de modo isolado; moderada, quando as células formavam aglomerados, porém com áreas adjacentes livres; e acentuada, quando foi possível visualizar as células em quantidade grande, formando aglomerados densos e sem áreas livres de infiltrados.

4. Proliferação Fibroblástica (PF): ausente, quando não se observou proliferação fibroblástica; discreta, quando havia esparsos fibroblastos em meio ao tecido conjuntivo frouxo; moderada, quando havia moderada quantidade de fibroblastos proliferados, constituindo pequenos feixes celulares multi direcionalmente; e acentuada, quando havia grande quantidade de fibroblastos proliferados, com formação de agregados compactos de células dispostas multi direcionalmente.

5. Colagenização (COL): ausente, quando não se observou fibras colágenas; discreta, quando o depósito de fibras colágenas ocorreu em pequena quantidade, caracterizada por fibras dispostas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada, quando o depósito de colágeno formava feixes de fibras eosinofílicas espessas, intermeada por tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e acentuada, quando havia grandes depósitos de fibras colágenas, formando espessos feixes de fibras eosinofílicas, organizadas de modo compacto em meio a fibroblastos proliferados e com pouco tecido conjuntivo frouxo.

6. Reepitelização (REP): ausente, quando não havia epitélio no campo óptico; parcial, quando a reepitelização aparecia de modo parcial ou incompleto; e completa, quando se visualizou a reepitelização total ou completa.

A partir destas análises, foi feito um escore, atribuindo-se uma nota de zero a três, em que zero (0) referia-se à ausência do quesito analisado, um (1) referia-se ao quesito com presença “discreta”, dois (2) os “moderados” e três (3) os classificados como “acentuados”. Exceção feita na observação da reepitelização, onde se classificou como ausente, conferindo-se valor de um, parcial com pontuação de dois, e completa com pontuação de três. (Tab. 2)

Os resultados do escore do avaliador foram compilados e analisados, comparando-se aos achados da literatura e com análise estatística.

	Ausente	Discreta	Moderada	Acentuada
<b>Proliferação Vascular (PV)</b>	0	1	2	3
<b>Presença de Cél. Mononucleares (MN)</b>	0	1	2	3
<b>Presença de Cél. Polimorfonucleares (PMN)</b>	0	1	2	3
<b>Proliferação Fibroblástica (PF)</b>	0	1	2	3
<b>Colagenização (COL)</b>	0	1	2	3
<b>Reepitelização (REP)</b>	1	2	2	3

Tab. 2: Escore da avaliação qualitativa, realizada por médico patologista

A análise multiplex foi realizada no Instituto de Ciências Biomédicas IV, na Universidade de São Paulo (USP) e no HSL.

Para essa análise, realizou-se previamente a extração das proteínas dos materiais biopsiados. O macerador de tecido utilizado foi um Precellys 24<sup>®</sup> (Bertin Technologies, França), que se baseia na tecnologia “beadbeating” para homogeneizar e macerar as amostras antes das análises de DNA, RNA e proteína. Na segunda etapa, o equipamento Luminex MAGPIX<sup>®</sup> Multiplex System (Dia Sorin Corporation, EUA) foi utilizado para as leituras simultâneas (análise multiplex).

No HSL, o material coletado foi cortado, colocado em tubos de criogenia com tampa de rosca e volume 2,0mL e acrescentados entre 0,350g a 0,400g de *beads* de Zircônio de 1,4mm, (Loccus<sup>®</sup>, Saluggia, Itália) em cada tubo de 2,0mL. Adicionou-se inibidor de protease e levou-se o material ao aparelho. Após a ciclagem no Precellys 24<sup>®</sup>, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000g/4°C e mantidos no gelo, enquanto os sobrenadantes eram coletados.

As soluções contendo as proteínas extraídas foram mantidas em freezer a -80°C e descongeladas antes da quantificação. Esta fase tem por objetivo quantificá-las, antes de proceder a leitura no multiplex. As amostras foram centrifugadas a 13000rpm/4°C para garantir que não houvesse resíduo tecidual ou genético para a quantificação de proteínas. Nesta etapa, usou-se o equipamento Infinite 200 PRO<sup>®</sup> (Tecan Trading AG, Suíça) - leitora de microplacas multifuncional para trabalhos em absorvância, fluorescência e luminescência para obtenção dos valores de absorvância utilizados na quantificação das amostras.

Após, seguiu-se com a leitura no multiplex, utilizando-se o kit MILLIPLEX® Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay RECYTMAG-65K/RECYMAG65K27PMX/ RECYMAG65PMX27BK e todas as etapas foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante. A primeira parte do protocolo foi realizada com a reconstituição dos reagentes que acompanham o kit e, em seguida, a leitura de cada substância, em um total de 27 metabolitos, a saber: EGF, Eotaxina, Fractalquina, G-CSF, GM-CSF, GRO/KC/CINC-1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, IP-10, Leptina, LIX, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, RANTES, TNF- $\alpha$  e VEGF.

#### 4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística utilizou testes variados, de acordo com o objetivo da análise. Para dados numéricos, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney, que desobriga uma distribuição normal, com a correção de Buonferroni.

Outros testes usados foram o de Kruskall Wallis, não paramétrico também, e o teste de Spearman.

A análise foi realizada com o auxílio do software IBM SPSS versão 24 (Armonk, NY, EUA) e o p-valor considerado como estatisticamente significativo foi o de menor que 0,10.

## 5. RESULTADOS

### FASE I – *IN VITRO*

#### 5.1. COLETA E PROCESSAMENTO DO LIPOASPIRADO

Coletou-se o lipoaspirado de 40 pacientes, conforme os critérios de inclusão e exclusão descritos, de pacientes submetidos à abdominoplastia.

O volume médio de lipoaspirado coletado de região hipogástrica do abdome foi de 30ml, que foi totalmente usado para a pesquisa. As pacientes possuíam o IMC médio de 22,3 Kg/m<sup>2</sup> e idade média de 39,2 anos – variação esta que ocorreu entre os 23 e 50 anos, idade limite para a inclusão na pesquisa de paciente como doadora de lipoaspirado.

As amostras de todas as pacientes foram processadas segundo o protocolo descrito e quantificadas em relação ao número de células obtidas, no momento imediatamente anterior de aplicação delas, estivessem elas congeladas em nitrogênio ou saindo da cultura para o uso efetivo na MAH.

Assim, a média da quantidade de células produzidas, a partir do lipoaspirado coletado pela técnica úmida, variou de  $3,1 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  células, por paciente.

Os primeiros cinco lipoaspirados foram usados para caracterização das células por citometria de fluxo e para a diferenciação celular em outras linhagens, a fim de se caracterizar a célula-tronco, ambos os processos descritos mais adiante. Outra parte foi usada para os testes de integração e composição do complexo MAH + CTMDA propriamente dito.

As demais amostras de lipoaspirado processado foram usadas para a produção efetiva do complexo MAH+ CTMDA e o tratamento das feridas nos animais.

#### 5.2. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMDAs

A caracterização das células foi realizada, baseadas nos critérios descritos anteriormente, como a adesão ao plástico, morfologia celular alongada do tipo fibroblastoide, perfil de marcadores de superfície e a capacidade de diferenciação em três linhagens mesenquimais diferentes.

A análise por citometria de fluxo revelou que as células expressavam CD73, CD90, CD105 e CD44, com uma expressão superior a 90%. Quanto aos marcadores CD11b, CD34 e CD45, observamos expressão inferior a 4%. Por tanto, por meio da análise de marcadores de superfície, por citometria de fluxo, foi demonstrado que as amostras eram positivas para os marcadores das células mesenquimais, como descrito anteriormente por Dominici.<sup>66</sup> (Fig. 10)

Ainda na caracterização das células cultivadas a partir da FVE, a diferenciação em três linhagens foi realizada no HSL, em duas amostras, demonstrando a plasticidade celular onde cada amostra de CTMDA inicial foi capaz de se diferenciar nas três linhagens, após indução *in vitro*, como demonstrado na Fig.11.

Nesta mesma figura, observam-se as estruturas celulares que evidenciam a diferenciação em células osteogênicas, como deposição de cálcio; nas células condrogênicas, é possível observar, em azul, as proteínas da matriz extracelular, formada por proteoglicanas; e nas células adipogênicas, as vesículas lipídicas intracelulares.

### 5.3. PROCESSAMENTO DA MAH E PRODUÇÃO DO COMPLEXO MAH+ CTMDA

Foram utilizadas cinco placentas para a produção de MAH, que serviram para a experimentação e confirmação dos procedimentos de separação, descelularização e processamento da MAH, além da confecção do complexo MAH+ CTMDA.

A descelularização foi realizada com êxito, confirmada também pela análise, com microscopia eletrônica de varredura (MEV), de duas amostras de MAH processadas com NaOH, observando-se a descelularização completa das mesmas. (Fig. 12A e 12B)

A produção do complexo MAH+ CTMDA foi confirmada por meio de análise qualitativa das células aderidas à MAH, observadas na MEV e na coloração com hematoxilina. (Fig. 13 a 15)



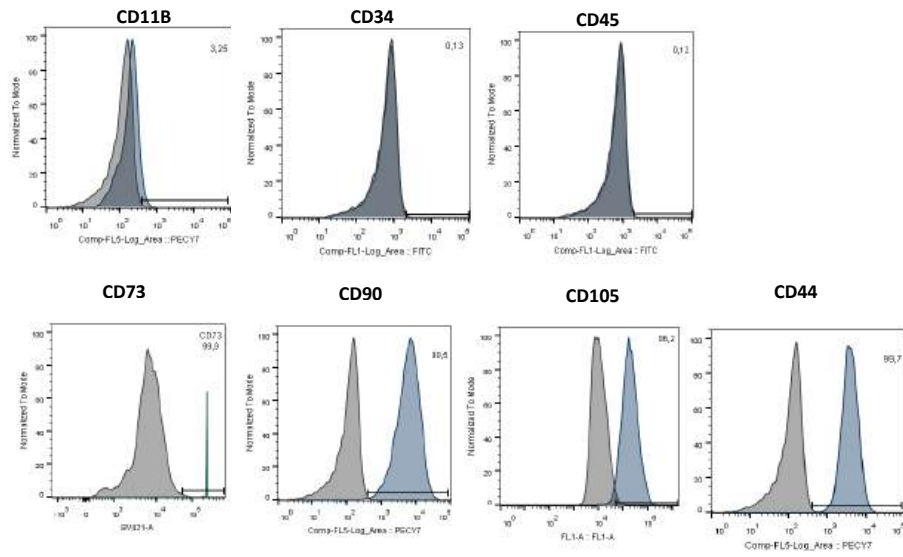


Fig.10: Ensaio de imunofenotipagem das amostras de células



Fig. 11: Diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos

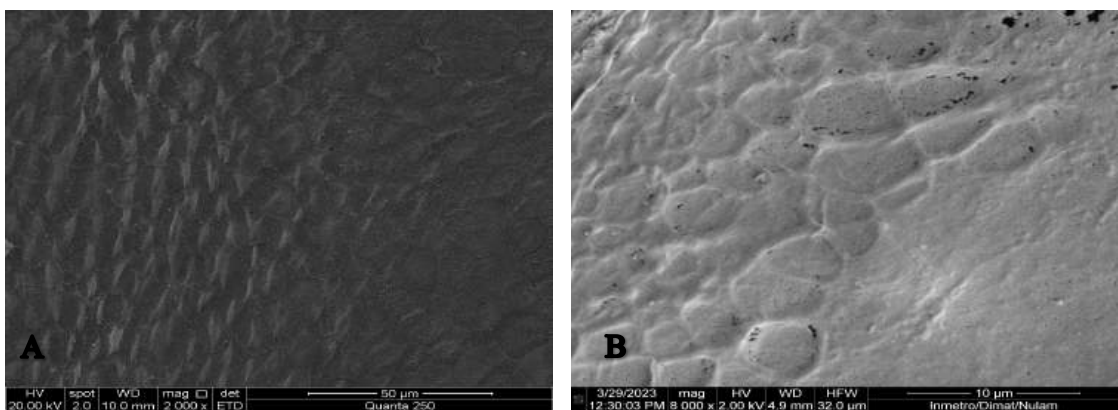


Fig. 12A: Fragmento de MAH, ainda com a camada epitelial de células cubóides. B: MAH descelularizada, com *print* ainda das células retiradas.

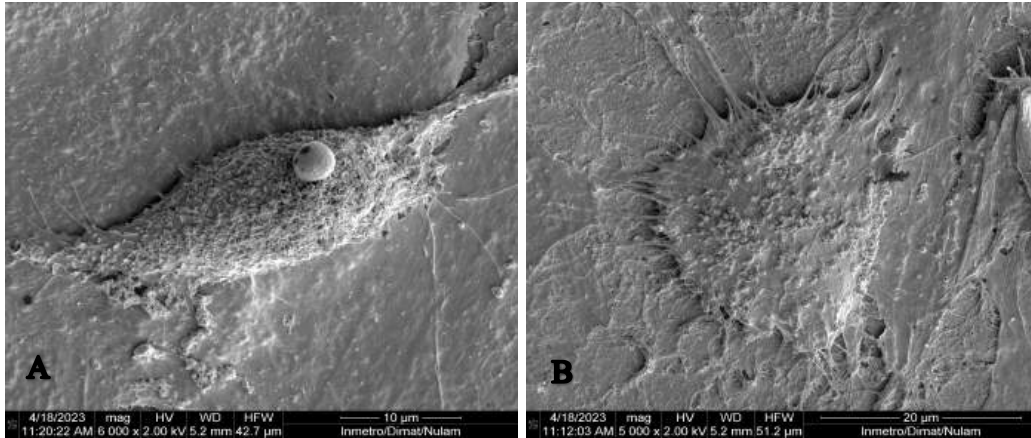


Fig. 13A: CTMDA aderidas em MAH, em microscopia eletrônica de varredura; B: Em aumento maior

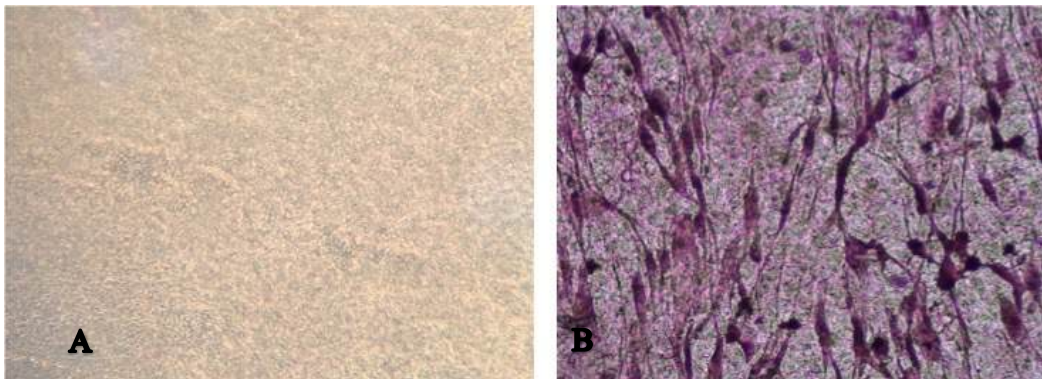


Fig. 14A: MAH sem células semeadas; B: CTMDA aderidas em MAH coradas com hematoxilina

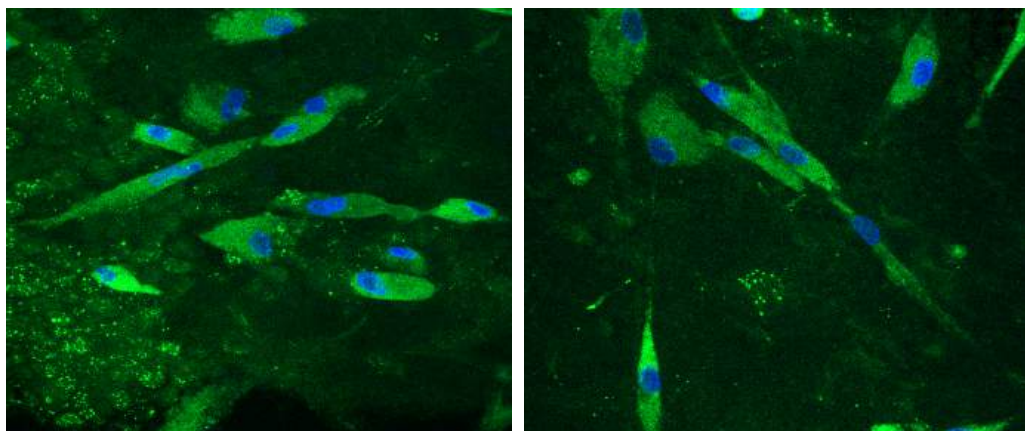


Fig. 15: CTMDA aderidas em MAH, em imunofluorescência

## FASE II – *IN VIVO*

### 5.4. INDUÇÃO DE RADIODERMITE, ALOCAÇÃO E TRATAMENTO

Utilizou-se um total de 49 animais. Desses, 14 animais foram utilizados na fase experimental de definição de protocolo de irradiação e definição da ferida a ser tratada; oito animais que foram a óbito durante os procedimentos—tanto irradiação, como anestesia e tratamento—; e 23 ratos participaram do tratamento efetivo das lesões de radiodermite, de modo aleatório. Acrescenta-se aqui os quatro animais que serviram apenas como doadores de fragmento de pele, para a utilização na análise multiplex. Assim, anota-se um total de 49 ratos neste estudo.

Deste modo, a alocação ocorreu da seguinte maneira, descrita também conforme a tabela 3:

- Grupo 1 - Neomicina (GN): sete animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e pomada de neomicina com bacitracina;
- Grupo 2 - Membrana Amniótica Humana (GMAH): nove animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e membrana amniótica descelularizada;
- Grupo 3 - Grupo CTMDA (GCTMDA): sete animais com lesão radioinduzida, tratada com desbridamento cirúrgico da ferida e complexo MAH+ CTMDA;

Todos os 23 animais utilizados como grupo de estudo foram irradiados com dose de 86Gy, energia de 8MeV, durante nove minutos, de acordo com a definição prévia de um protocolo de irradiação, utilizando-se o acelerador de elétrons.

Em todos os animais, as lesões se iniciaram no 16º dia (D16), após a irradiação e, neste momento de identificação da ferida, o tratamento com substâncias analgésicas foi iniciado, conforme descrito. (Fig. 16A)

O tratamento foi realizado no D30 após a irradiação e contou com um desbridamento cirúrgico prévio, com retirada de *debris* e tecidos desvitalizados. (Fig. 16B) Somente depois disto, os tipos de tratamentos foram realizados, conforme a alocação dos grupos. (Fig. 17A e B)

	Quantidade	Dose (Gy)	Energia (MeV)
<b>Grupo 1 (GN)</b>	7	86	8
<b>Grupo 2 (GMAH)</b>	9	86	8
<b>Grupo 3 (GCTMDA)</b>	7	86	8

Tab. 3: Distribuição dos animais por grupo de tratamento

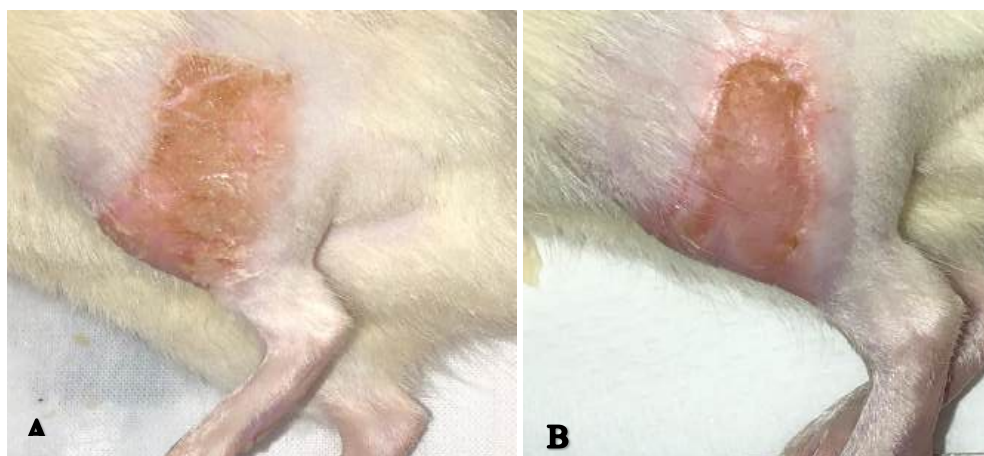


Fig.16: A: Ferida no D16; B: ferida no D30

### 5.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

A análise das feridas levou em consideração o tamanho da ferida no dia da cirurgia (D30 de irradiação) e no 5º dia pós-tratamento cirúrgico (D35 de irradiação) e foi feita com auxílio de plástico e papel centimetrado, como explicitado anteriormente. Assim, após as medidas terem sido quantificadas (tabelas 4, 5 e 6), foram analisadas estatisticamente, utilizando-se os testes de Wilcoxon, Kruskal Wallis e o recurso estatístico, que sugere uma força de associação entre eventos, que é o *Effect Size*.

No momento da análise, observou-se que havia cinco medidas completas, com os tamanhos do D30 e do D35 no grupo 1 (GN), nove no grupo 2 (GMAH) e sete no grupo 3 (GCTMDA).



Fig. 17: A: Ferida no D30 antes do desbridamento; B: após o desbridamento cirúrgico. Nota-se a retração da pata do animal.

Conforme a tabela 7 explicita, pode-se observar uma relevância estatística, com  $p < 0,05$ , pelo teste de Wilcoxon em cada grupo, de modo isolado, o que reflete que houve redução significativa da ferida, comparando-se o D30 e D35 (p-valor de GN= 0,043; GMAH= 0,011 e GCTMDA= 0,018). Porém, não foi possível inferir que esta redução do tamanho das feridas foi mais importante em um grupo específico, uma vez que o p-valor pelo teste de Kruskal Wallis, comparando os grupos entre si, não mostrou relevância, mesmo considerando  $p < 0,10$ .

Cabe, porém, a análise do *Effect Size*, que, como já referido, se trata de um coeficiente que indica força de correlação. Para que a relação seja forte, ou seja, para que possa ser afirmado que há relação entre a redução do tamanho da ferida com o tipo de tratamento proposto, o valor deve ser o mais próximo a 1. Assim, o grupo 3 (GCTMDA) foi o que obteve o maior valor de *Effect Size*, chegando o mais próximo de 1, com valor de -0,91, o que sugere ter havido aqui o maior fechamento da ferida e, portanto, a maior cicatrização.

A redução da ferida em cada grupo é visível quando se analisa, em conjunto, a prancha com a evolução das feridas nos dias D30 e D35, como mostra a figura 18.

Estes resultados, ainda à época de modo preliminar, foram apresentados, sob o formato de poster, no congresso da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica. (ANEXO 1 e 2)

<b>Animal no.</b>	<b>D30 (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>D35 (cm<sup>2</sup>)</b>
24	4,5	3,0
26	1,5	1,0
33	10,5	5,0
39	10,5	5,5
40	6,5	2,5

Tab. 4: Medidas (cm<sup>2</sup>) das feridas do grupo 1 (GN) no D30 e D35

<b>Animal no.</b>	<b>D30 (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>D35 (cm<sup>2</sup>)</b>
6	3,0	0,5
10	1,5	0,5
12	2,5	1,0
28	3,5	2,0
29	3,5	1,5
30	2,0	1,0
31	5,0	1,0
34	10,0	10,0
35	8,5	7,0

Tab.5: Medidas (cm<sup>2</sup>) das feridas do grupo 2 (GMAH) no D30 e D35

<b>Animal no.</b>	<b>D30 (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>D35 (cm<sup>2</sup>)</b>
8	5	1,5
14	2	1
27	3,5	1
32	4	1,5
36	8	4
37	4	2
38	13	5

Tab.6: Medidas (cm<sup>2</sup>) das feridas do grupo 3 (GCTMDA) no D30 e D35

Estatísticas descritivas das áreas das feridas, em cm <sup>2</sup> , segundo os grupos e os momentos das intervenções em ratos experimentais										
Momento	Estatísticas das áreas das feridas, em cm <sup>2</sup> , segundo os grupos									P-valor do teste Kruskal-Wallis
	G1: Neomicina (n=5)			G2: MAH (n=9)			G3: CTMDA (n=7)			
	Média	Desvio-padrão	Mediana	Média	Desvio-padrão	Mediana	Média	Desvio-padrão	Mediana	
D30	6,7	3,9	6,5	4,4	3,0	3,5	5,6	3,7	4,0	0,378
D35	3,4	1,9	3,0	2,7	3,4	1,0	2,3	1,6	1,5	0,345
Diferença ( $\Delta$ )	-3,3	2,2	-4,0	-1,7	1,1	-1,5	-3,4	2,3	-2,5	0,154
Effect size*	-0,85			-0,56			-0,91			
P-valor pelo teste de Wilcoxon	0,043			0,011			0,018			
*Definido pela razão entre a média da diferença e o desvio-padrão em D0										

Tab. 7: Estatística descritiva das áreas das feridas, conforme grupos e momento da medida.

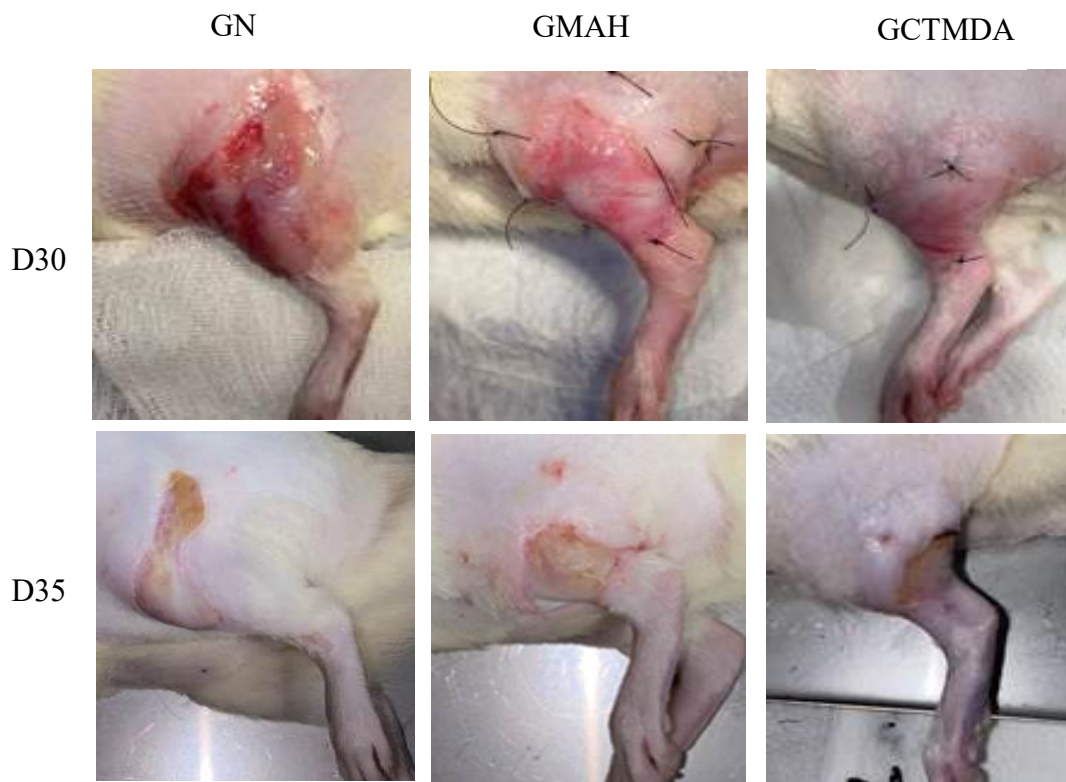


Fig. 18: Prancha comparativa de feridas entre os grupos, em D30 e D35

## 5.6. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS FERIDAS

Os resultados das análises das amostras foram analisadas estatisticamente, a partir da avaliação com o escore já citado, pelo médico patologista. Nesta análise, os seis itens selecionados e relacionados à cicatrização foram avaliados, obtendo-se as tabelas a seguir. (Tab. 8 a 13) Foram analisadas as pontuações dos cinco cortes, de cada grupo, por meio do teste de Kruskal- Wallis e nenhum item apresentou relevância estatística que permitisse afirmar que em um tipo de tratamento foi mais efetivo que os demais.

<b>Estatísticas descritivas do escore de Proliferação Vascular (PV), segundo as intervenções em 5 cortes histológicos, nos grupos de estudo</b>			
<b>Cortes</b>	<b>Escore de PV, segundo os grupos</b>		
	<b>G1: Neomicina</b>	<b>G2: MAH</b>	<b>G3: CTMDA</b>
1	2 = Moderada	3 = Acentuada	1 = Discreta
2	1 = Discreta	2 = Moderada	1 = Discreta
3	2 = Moderada	2 = Moderada	3 = Acentuada
4	3 = Acentuada	1 = Discreta	3 = Acentuada
5	3 = Acentuada	3 = Acentuada	3 = Acentuada
Escore médio	2,2	2,2	2,2
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	1,000		

Tab. 8: Estatística descritiva da análise da proliferação vascular

<b>Estatísticas descritivas do escore de Presença de Células Mononucleares (MN), segundo as intervenções em 5 cortes histológicos, nos grupos de estudo</b>			
<b>Cortes</b>	<b>Escore de MN, segundo os grupos</b>		
	<b>G1: Neomicina</b>	<b>G2: MAH</b>	<b>G3: CTMDA</b>
1	1 = Discreta	2 = Moderada	1 = Discreta
2	1 = Discreta	3 = Acentuada	1 = Discreta
3	2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada
4	3 = Acentuada	1 = Discreta	2 = Moderada
5	2 = Moderada	1 = Discreta	3 = Acentuada
Escore médio	1,8	1,8	1,8
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	1,000		

Tab. 9: Estatística descritiva da análise da presença de células mononucleares



Estatísticas descritivas do escore de Presença de Células Polimorfonucleares (PMN), segundo as intervenções em 5 cortes histológicos, nos grupos de estudo			
Cortes	Escore de PMN, segundo os grupos		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
1	0 = Ausente	2 = Moderada	1 = Discreta
2	0 = Ausente	3 = Acentuada	0 = Ausente
3	1 = Discreta	3 = Acentuada	2 = Moderada
4	3 = Acentuada	1 = Discreta	2 = Moderada
5	2 = Moderada	1 = Discreta	3 = Acentuada
Escore médio	1,2	2,0	1,6
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,578		

Tab. 10: Estatística descritiva da análise da presença de células polimorfonucleares

Estatísticas descritivas do escore de Proliferação Fibroblástica (PF), segundo as intervenções em 5 cortes histológicos, nos grupos de estudo			
Cortes	Escore de PF, segundo os grupos		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
1	2 = Moderada	3 = Acentuada	2 = Moderada
2	2 = Moderada	2 = Moderada	1 = Discreta
3	3 = Acentuada	2 = Moderada	3 = Acentuada
4	3 = Acentuada	1 = Discreta	3 = Acentuada
5	2 = Moderada	3 = Acentuada	3 = Acentuada
Escore médio	2,4	2,2	2,4
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,981		

Tab. 11: Estatística descritiva da análise da proliferação fibroblástica

Estatísticas descritivas do escore de Colagenização (COL), segundo as intervenções nos cortes histológicos, nos grupos de estudo			
Cortes	Escore de COL, segundo os grupos		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
1	2 = Moderada	1 = Discreta	3 = Acentuada
2	2 = Moderada	1 = Discreta	1 = Discreta
3	2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada
4	2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada
5	2 = Moderada	2 = Moderada	2 = Moderada
Escore médio	2,0	1,6	2,0
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,561		

Tab. 12: Estatística descritiva da análise da colagenização

Estatísticas descritivas do escore de Reepitelização (REP), segundo as intervenções nos 5 cortes histológicos, nos grupo de estudo			
Cortes	Escore de REP, segundo os grupos		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
1	2 = Discreta/moderada	1 = Ausente	3 = Acentuada
2	1 = Ausente	1 = Ausente	3 = Acentuada
3	2 = Discreta/moderada	1 = Ausente	1 = Ausente
4	1 = Ausente	3 = Acentuada	2 = Discreta/moderada
5	2 = Discreta/moderada	2 = Discreta/moderada	2 = Discreta/moderada
Escore médio	1,6	1,6	2,2
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,523		

Tab. 13: Estatística descritiva da análise da reepitelização

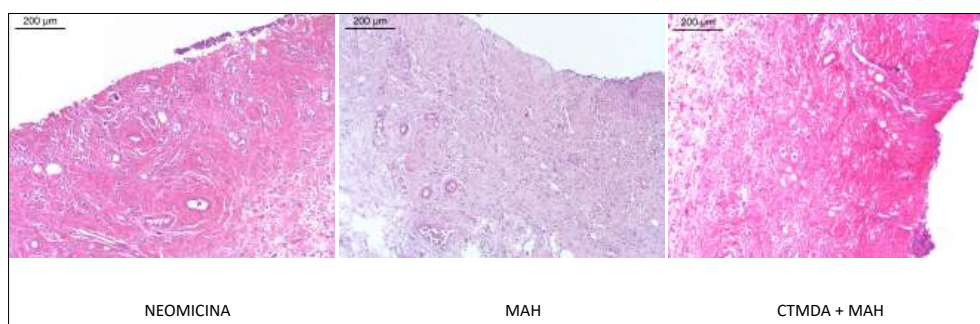


Fig. 19: Prancha comparativa de fotomicrografias das feridas de cada grupo. MO, Coloração HE, aumento 10x.

## 5.7. ANÁLISE MULTIPLEX DAS AMOSTRAS

O resultado da análise multiplex gerou uma grande tabela dos valores dos 27 analitos pesquisados (EGF, Eotaxina, Fractalquina, G-CSF, GM-CSF, GRO/KC/CINC-1, IFN $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, IL-18, IP-10, Leptina, LIX, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, RANTES, TNF- $\alpha$  e VEGF).

Para fins didáticos, os analitos foram classificados em pró-inflamatórios, anti-inflamatórios e em fatores de crescimento. Deste modo, tem-se as tabelas 14 e 15, com as estatísticas descritivas de todos os valores obtidos.

Nota-se, ao se analisar e considerar o p-valor de 0,10 como estatisticamente significativo, que na tabela com as descrições de valores das citocinas inflamatórias (Tab. 14), obteve-se relevância estatística somente no IFN $\gamma$ , com maior concentração foi no grupo 2 (GMAH), seguida do grupo 3 (GCTMDA), e na Fractalquina, que também apresentou maiores valores de concentração no grupo 2 (GMAH), porém seguido do grupo 1 (GN).

Entre as citocinas anti-inflamatórias e os fatores de crescimento, não houve relevância estatística em nenhum analito avaliado. (Tab. 15)

Em relação aos analitos com valores estatisticamente significantes, pode-se estabelecer algumas correlações. No caso da IFN- $\gamma$ , o GMAH tem maiores concentrações, com significância estatística (p-valor de 0,044) e o GN com menores valores. Na análise entre os grupos 2x2, utilizando-se o teste de Mann-Whitney e a correção de Bonferroni, há relevância estatística apenas entre os grupos GMAH e GCTMDA, com p-valor de 0,093. Ou seja, o grupo MAH possui uma concentração maior de IFN- $\gamma$ , com significância estatística sobre o GCTMDA. (Tabela 16 e gráfico 1)

Da mesma forma, fez-se a análise detalhada da Fractalquina, que possui, de modo estatisticamente importante, as concentrações maiores também no GMAH e menores no GCTMDA, o que contrasta com a IFN- $\gamma$ , que possui menores valores no GN. Ou seja, enquanto o GMAH possui maiores concentrações de Fractalquina, o GCTMDA possui os menores valores.

Ao se usar os testes para análises entre os grupos, combinando-os 2x2, com a correção de Bonferroni, novamente há significância na diferença entre os grupos GMAH e GCTMDA (p-valor de 0,093). (Tabela 17 e gráfico 2)

Uma análise extra foi realizada, no intuito de relacionar o tamanho das feridas nos dias D30 e D35 e as concentrações das citocinas, com os coeficientes de correlação de Spearman ( $r^2$ ), de acordo com cada grupo de intervenção. O questionamento a ser respondido é se as concentrações de citocinas variavam ou não naquelas feridas com melhor cicatrização, dada pela diferença do tamanho da ferida nos dias D30 e D35.

O teste de Correlação de Spearman serve para avaliar se há correlação entre os fatos a serem estudados, sendo consideradas correlações perfeitas quando o valor de  $r^2$  for igual a 1— correlação perfeita positiva, ou seja, quando um aumenta, o outro que se busca relação também

aumenta- ou menos 1–correlação perfeita negativa, ou seja, que ocorre quando um aumenta, o outro diminui. Nos casos em que  $r^2$  se aproximar de zero, não há nenhuma correlação.

Assim, surgiram dados novos, observados apenas na diferença de D35-30, ou seja, no quanto houve de cicatrização, muito embora, ao se complementar a correlação de Spearman com a análise de p-valor, não tenha havido significância estatística. (Tabela 18)

O MCP-1 surgiu com correlação forte negativa no grupo GN, com um valor de  $r^2$  de -0,800, sem relevância estatística (p-valor de 0,104).

Em análise, o LIX obteve uma correlação positiva forte, de  $r^2$  de 0,900 e, desta vez, com p-valor com significância (p= 0,037), no grupo GN, o que sugere uma relação positiva em relação a ferida e a concentração de LIX (quanto maior a cicatrização da ferida, maior a concentração de LIX), apenas neste grupo. Foi o único nestas análises que teve um p-valor estatisticamente significativo.

A MIP -2 e a IL 4 apresentaram um  $r^2$  sugestivo de correlação positiva no grupo neomicina ( $r^2=0,70$ ), porém com p- valor de 0,188. Ambos tiveram os mesmos valores.

Por último, o VEGF apresentou um valor de  $r^2= - 0,036$ , mostrando uma correlação negativa no grupo GCTMDA, com p= 0,939. O mesmo valor, desta vez positivo, foi encontrado no grupo GMAH ( $r^2=0,036$ ), porém sem p- valor significativo (p= 0,932).

A tabela 18 apresenta os valores mais detalhadamente. Cabe ressaltar que, embora a tabela esteja contemplando os coeficientes do D30, de cada grupo, neste momento da ferida não foram coletadas amostras para as análises por teste multiplex, das citocinas, o que invalida estes resultados positivos no D30 de cada grupo.

A tabela completa com todos os valores foi adicionada como APÊNDICE 3.

Durante a análise multiplex, foram incluídos, mais como curiosidade científica e sem a intenção de estabelecer qualquer relação estatística, fragmentos de tecido de dois animais, um pertencente ao GCTMDA e outro ao grupo neomicina (GN), buscando-se valores das citocinas da área da ferida propriamente, mas também de uma área cicatrizada da mesma ferida. No animal do GCTMDA, acrescentou-se ainda um fragmento da pata contralateral, não irradiada. Obteve-se, com os dados, a tabela 19.

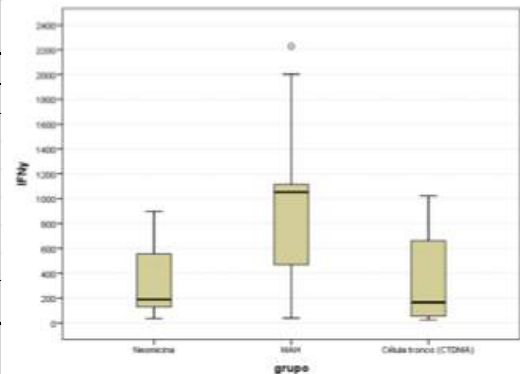
Estatísticas descritivas das citocinas inflamatórias, em µg/g, segundo as intervenções em grupos de ratos experimentais (G1: Neomicina, n=7; G2: MAH, n=9; G3: Célula tronco, n=7)							
Citocinas inflamatórias	Grupo	Estatísticas descritivas					P-valor do teste Kruskal-Wallis
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	
GM-CSF	G1: Neomicina	3,63E+07	4,49E+07	1,50E+03	2,29E+07	1,00E+08	0,536
	G2: MAH	3,05E+07	4,60E+07	8,03E+02	5,13E+05	1,00E+08	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	3,16E+07	4,70E+07	1,16E+03	3,41E+06	1,00E+08	
EOTAXINA	G1: Neomicina	5,7	4,5	3,1	3,8	15,5	0,153
	G2: MAH	11,6	8,1	3,5	9,0	27,6	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	10,6	7,3	2,6	6,3	21,3	
IL 1α	G1: Neomicina	6,18E+03	5,07E+03	1,40E+03	5,55E+03	1,65E+04	0,121
	G2: MAH	1,27E+04	7,56E+03	5,61E+03	1,10E+04	2,73E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	1,35E+04	1,47E+04	1,74E+03	1,22E+04	4,49E+04	
LEPTINA	G1: Neomicina	2,83E+03	3,72E+03	1,77E+02	1,16E+03	1,06E+04	0,980
	G2: MAH	2,21E+03	2,29E+03	3,77E+02	1,05E+03	7,18E+03	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	1,32E+03	6,57E+02	3,77E+02	1,51E+03	2,09E+03	
MIP 1α	G1: Neomicina	8.727,9	9.509,1	598,5	4.469,0	28.953,0	0,419
	G2: MAH	9.542,8	7.258,8	235,9	7.183,0	20.194,0	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	4.846,9	3.559,4	241,0	6.288,0	9.526,0	
IL 1β	G1: Neomicina	2,27E+03	1,61E+03	7,27E+02	1,55E+03	4,94E+03	0,611
	G2: MAH	3,97E+03	3,88E+03	1,23E+02	3,00E+03	1,26E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	2,99E+03	2,22E+03	1,90E+02	1,93E+03	6,58E+03	
IL 2	G1: Neomicina	10,0	6,6	4,0	7,4	19,4	0,110
	G2: MAH	21,4	17,8	4,6	20,3	63,3	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	23,6	14,2	5,9	20,3	40,7	
IL 6	G1: Neomicina	4,18E+04	4,53E+04	7,88E+03	2,89E+04	1,36E+05	0,925
	G2: MAH	5,90E+04	6,47E+04	1,66E+03	1,96E+04	1,89E+05	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	4,42E+04	4,01E+04	1,24E+04	3,15E+04	1,27E+05	
IL 12p70	G1: Neomicina	12,1	6,5	6,7	10,5	23,5	0,641
	G2: MAH	13,8	6,5	5,8	11,3	25,3	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	17,0	10,7	7,4	15,1	36,9	
IFN γ	G1: Neomicina	356,50	374,84	36,38	188,88	897,75	0,044
	G2: MAH	1000,94	730,11	39,08	1053,00	2230,00	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	378,25	421,53	24,78	166,06	1022,00	
IL 18	G1: Neomicina	1,09E+04	6,63E+03	5,03E+03	9,64E+03	2,47E+04	0,245
	G2: MAH	1,53E+04	9,79E+03	4,23E+03	1,50E+04	3,59E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	8,04E+03	2,75E+03	4,82E+03	8,11E+03	1,15E+04	
TNF α	G1: Neomicina	48,6	74,5	9,0	21,4	216,3	0,294
	G2: MAH	70,4	76,0	19,6	33,6	225,9	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	36,4	34,3	3,7	30,8	108,2	
IL 5	G1: Neomicina	47,1	19,7	27,6	51,7	81,6	0,601
	G2: MAH	69,5	48,1	25,3	67,1	174,1	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	53,9	19,4	30,7	57,7	79,0	
IL 17A	G1: Neomicina	9,82E+02	1,11E+03	1,81E+02	5,46E+02	3,37E+03	0,269
	G2: MAH	2,83E+03	3,72E+03	2,21E+01	1,49E+03	1,12E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	3,70E+03	5,36E+03	3,17E+02	1,54E+03	1,56E+04	
MCP-1	G1: Neomicina	3,34E+03	3,63E+03	9,17E+02	2,43E+03	1,14E+04	0,524
	G2: MAH	3,22E+03	2,83E+03	3,31E+02	3,22E+03	9,31E+03	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	1,83E+03	6,73E+02	8,69E+02	1,76E+03	2,77E+03	
IP-10	G1: Neomicina	1,31E+03	1,19E+03	5,26E+02	8,84E+02	3,84E+03	0,525
	G2: MAH	1,24E+03	6,32E+02	6,12E+02	1,01E+03	2,20E+03	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	8,61E+02	3,38E+02	4,47E+02	8,65E+02	1,36E+03	
GRO/KC/CINC1	G1: Neomicina	5,17E+03	5,76E+03	5,22E+02	2,83E+03	1,60E+04	0,832
	G2: MAH	9,13E+03	1,25E+04	0,00E+00	4,66E+03	3,60E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	3,13E+03	3,09E+03	9,04E+01	2,77E+03	7,83E+03	
FRACTALKINE	G1: Neomicina	266,04	85,45	181,88	274,46	423,23	0,069
	G2: MAH	288,32	80,38	158,00	296,07	396,61	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	183,65	96,28	81,62	149,68	348,28	
LIX	G1: Neomicina	1,10E+04	9,11E+03	5,03E+03	5,86E+03	2,56E+04	0,527
	G2: MAH	2,14E+04	2,30E+04	3,74E+02	7,76E+03	6,58E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	9,84E+03	1,36E+04	1,94E+03	5,14E+03	4,04E+04	
MIP-2	G1: Neomicina	5,76E+04	3,40E+04	2,73E+04	3,84E+04	1,11E+05	0,680
	G2: MAH	6,90E+04	3,39E+04	4,33E+03	7,49E+04	1,22E+05	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	6,65E+04	2,94E+04	2,10E+04	7,64E+04	1,00E+05	
RANTES	G1: Neomicina	2,69E+03	2,59E+03	5,49E+02	8,46E+02	6,61E+03	0,393
	G2: MAH	3,52E+03	3,25E+03	5,99E+02	2,50E+03	1,01E+04	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	5,04E+03	4,29E+03	7,76E+02	4,59E+03	9,40E+03	

Tab. 14: Estatística descritiva das citocinas pró-inflamatórias

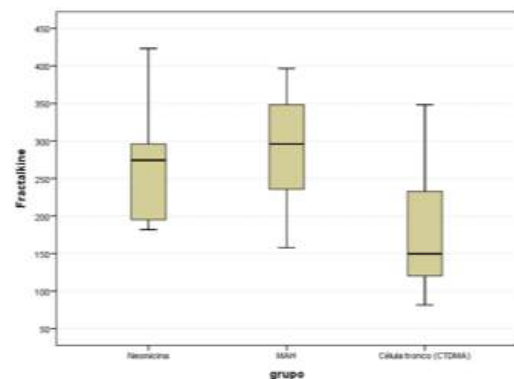
Estatísticas descritivas das citocinas anti-inflamatórias e dos fatores de crescimento, em $\mu\text{g/g}$ , segundo as intervenções em grupos de ratos experimentais (G1: Neomicina, n=7; G2: MAH, n=9; G3: Célula tronco, n=7)							
Citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento	Grupo	Estatísticas descritivas					P-valor do teste Kruskal-Wallis
		Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	
G-CSF	G1: Neomicina	1,67	0,66	1,09	1,32	2,90	0,792
	G2: MAH	1,94	0,99	1,04	1,83	3,99	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	2,03	0,82	0,88	1,97	3,61	
IL 4	G1: Neomicina	42,8	37,2	0,0	40,7	92,9	0,725
	G2: MAH	63,4	45,8	0,0	54,0	152,9	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	57,7	27,5	28,8	60,2	92,9	
IL 13	G1: Neomicina	0,02	0,05	0,00	0,00	0,14	0,189
	G2: MAH	12,71	14,44	0,00	4,90	32,80	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	14,70	19,24	0,00	0,00	44,44	
IL 10	G1: Neomicina	289,7	191,7	58,6	331,5	634,9	0,777
	G2: MAH	991,5	1.503,7	22,1	338,8	4.270,0	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	575,0	974,5	69,7	234,4	2.769,0	
EGF	G1: Neomicina	533,3	287,9	247,3	494,0	1.131,0	0,238
	G2: MAH	483,2	302,1	79,3	469,9	898,6	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	303,6	166,4	79,3	267,2	600,2	
VEGF	G1: Neomicina	3.370,7	4.374,0	216,2	1.552,0	12.003,0	0,504
	G2: MAH	5.602,2	6.624,8	268,5	2.195,0	20.099,0	
	G3: Célula tronco (CTMDA)	2.729,8	2.629,8	363,7	1.363,0	6.614,0	

Tab. 15: Estatística descritiva das citocinas anti-inflamatórias e dos fatores de crescimento

Estatísticas descritivas da citocina inflamatória IFN $\gamma$ , em $\mu\text{g/g}$ , segundo as intervenções em grupos de ratos experimentais			
Estatísticas descritivas da citocina IFN $\gamma$	Grupo		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
n	7	9	7
Média	356,5	1.000,9	378,3
Desvio-padrão	374,8	730,1	421,5
Mínimo	36,4	39,1	24,8
Mediana	188,9	1.053,0	166,1
Máximo	897,8	2.230,0	1.022,0
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,044		
Nota: Valores de p pelo teste de Mann-Whitney sem correção para comparações múltiplas: G1xG2 = 0,042; G1xG3 = 0,805; G2xG3 = 0,031 (A correção de Bonferroni implicaria em multiplicar por 3 esses valores de p observados)			

Tab. 16 e gráfico 1: Análise descritiva da IFN- $\gamma$  e gráfico *boxplot* das concentrações de IFN- $\gamma$ 

Estatísticas descritivas da citocina inflamatória FRACTALKINE, em $\mu\text{g/g}$ , segundo as intervenções em grupos de ratos experimentais			
Estatísticas descritivas da citocina FRACTALKINE	Grupo		
	G1: Neomicina	G2: MAH	G3: CTMDA
n	7	9	7
Média	266,0	288,3	183,7
Desvio-padrão	85,5	80,4	96,3
Mínimo	181,9	158,0	81,6
Mediana	274,5	296,1	149,7
Máximo	423,2	396,6	348,3
P-valor pelo teste de Kruskal-Wallis	0,069		
Nota: Valores de p pelo teste de Mann-Whitney sem correção para comparações múltiplas: G1xG2 = 0,536; G1xG3 = 0,097; G2xG3 = 0,031 (A correção de Bonferroni implicaria em multiplicar por 3 esses valores de p observados)			

Tab. 17 e gráfico 2: Análise descritiva da Fractalquina e gráfico *boxplot* das concentrações de Fractalquina

Coeficientes de correlação de Spearman ( $r_s$ ) entre as citocinas e as áreas das feridas em ratos experimentais, segundo os grupos e os momentos das										
Citocinas		Correlações de Spearman ( $r_s$ ) com as áreas das feridas								
		G1: Neomicina (n=5)			G2: MAH (n=8)			G3: CTMDA (n=7)		
		D30	D35	D30-D35	D30	D35	D30-D35	D30	D35	D30-D35
EOTAXINA	$r_s$	-0,616	-0,900	0,500	-0,216	0,012	0,321	-0,126	-0,291	0,018
	p-valor	0,269	0,037	0,391	0,608	0,977	0,438	0,788	0,527	0,969
MIP 1 $\alpha$	$r_s$	-0,368	-0,667	0,359	-0,120	0,173	0,085	-0,631	-0,400	0,577
	p-valor	0,542	0,219	0,553	0,778	0,682	0,842	0,129	0,374	0,175
IFN $\gamma$	$r_s$	-0,526	-0,872	0,410	-0,252	0,037	0,345	-0,216	-0,218	0,054
	p-valor	0,362	0,054	0,493	0,548	0,931	0,402	0,641	0,638	0,908
MCP-1	$r_s$	0,872	0,700	-0,800	0,214	0,356	0,410	-0,108	0,036	0,270
	p-valor	0,054	0,188	0,104	0,610	0,387	0,313	0,818	0,938	0,558
IP-10	$r_s$	-0,872	-1,000	0,800	0,310	0,405	0,566	0,396	0,291	-0,342
	p-valor	0,054	< 0,01	0,104	0,456	0,319	0,143	0,379	0,527	0,452
FRACTALKIN	$r_s$	-0,205	-0,300	0,300	0,048	0,233	0,253	0,613	0,837	-0,396
	p-valor	0,741	0,624	0,624	0,911	0,578	0,545	0,144	0,019	0,379
LIX	$r_s$	-0,872	-0,900	0,900	0,381	0,577	0,289	-0,234	0,127	0,450
	p-valor	0,054	0,037	0,037	0,352	0,134	0,487	0,613	0,786	0,310
MIP-2	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,190	0,000	-0,036	-0,414	-0,218	0,360
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,651	1,000	0,932	0,355	0,638	0,427
IL 4	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,619	-0,454	-0,193	-0,252	-0,364	0,306
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,102	0,258	0,647	0,585	0,423	0,504
IL 13	$r_s$	-0,725	-0,707	0,707	-0,026	0,237	0,355	0,219	0,140	-0,219
	p-valor	0,165	0,182	0,182	0,952	0,572	0,388	0,638	0,764	0,638
EGF	$r_s$	-0,462	-0,400	0,600	-0,024	0,098	0,229	-0,306	-0,164	0,198
	p-valor	0,434	0,505	0,285	0,955	0,817	0,586	0,504	0,726	0,670
VEGF	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,762	-0,442	0,036	-0,180	-0,200	-0,036
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,028	0,273	0,932	0,699	0,667	0,939

Tab. 18: Coeficientes de Correlação de Spearman entre citocinas e as áreas das feridas

Curiosamente, as duas citocinas para as quais se observa relevância estatística em testes anteriores, o IFN- $\gamma$  e a Fractalquina, possuem valores bem próximos, sem grandes diferenças entre as áreas da ferida e a área cicatrizada ou da pata contralateral. Em contrapartida, a GRO/KC/CINC1 e a MIP 2 mostraram-se com valores bastante discrepantes, sobretudo a primeira, onde os valores na área da ferida, ainda não cicatrizada, foram maiores do que os da cicatrizada.

O VEGF também chama atenção, por possuir valores maiores em ambas as áreas da ferida.

Em relação aos animais que foram doadores de pele, sem nenhuma intervenção ou tratamento, obteve-se também uma tabela com os valores das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, listada como APÊNDICE 4. Ela, porém não foi usada como critério comparativo.

Valores brutos das citocinas, em µg/g, em dois ratos experimentais, um no grupo CTMDA e outro no Neomicina, segundo a condição da ferida						
Citocinas	Ratos experimentais					
	38 (Grupo CTMDA)			40 (Grupo Neomicina)		
	Área ferida	Área controle	Cicatrizada	Área ferida	Cicatrizada	
Pró-inflamatórias	GM-CSF	3.405.519	1.556.976	73.167.088	28.727.024	1.066.850
	EOTAXINA	15,5	11,5	4,6	6,3	16,6
	IL 1α	44.929	16.134	1.667	6.816	21.243
	LEPTINA	1.795	25.491	6.878	4.460	3.153
	MIP 1α	6.288,0	21,1	174,2	9.526,0	134,3
	IL 1β	3.840	203	326	727	174
	IL 2	35,1	5,2	8,2	8,2	8,6
	IL 6	55.381	2.565	7.883	28.916	829
	IL 12p70	36,9	13,2	7,4	10,5	18,5
	IFNγ	898	630	900	898	354
	IL 18	11.463	2.071	1.779	11.970	2.628
	TNF α	108,2	4,1	5,6	38,7	14,5
	IL 5	79,0	36,6	51,7	81,6	52,9
	IL 17A	15.575,0	12,2	684,9	707,5	50,4
	MCP-1	1.646	206	1.270	2.432	582
	IP-10	503,3	8,2	9,0	1.768,0	243,6
	GRO/KC/CINC1	6.878,0	0,0	0,9	6.307,0	0,0
	FRACTALKINE	348	186	184	293	174
	LIX	5.143	19.351	2.210	22.925	214
MIP-2	89.857	1.058	1.343	74.887	8.464	
RANTES	923	13	36	4.204	682	
Anti-inflamatórias	G-CSF	2,0	1,8	1,3	2,0	2,6
	IL 4	28,8	47,4	24,2	87,0	55,2
	IL 13	44,4	0,0	0,0	0,0	0,3
	IL 10	385,8	2,5	20,0	353,8	12,2
Fatores de crescimento	EGF	267,2	98,5	72,7	494,0	49,2
	VEGF	5.725	190	333	6.614	299

Tab.19: Valores brutos das citocinas em um animal GCTMDA e um GN



## DISCUSSÃO

Após a participação em um tratamento experimental a um paciente exposto à gamagrafia industrial com Iridium<sup>192</sup>, em associação com a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), surgiu esta pesquisa, visando oferecer mais uma possibilidade no difícil tratamento das radiodermites, independente de sua etiologia. Àquela época, o tratamento se baseou em células-tronco mesenquimais coletadas por meio de mielograma e suscitou uma série de perguntas: haveria um modo mais fácil de coletar e usar células-tronco? Como as células-tronco agem nas feridas? E se fosse utilizado um curativo enriquecido com células-tronco? As células injetadas nas bordas das feridas permanecem por quanto tempo?

A descoberta por Zuk em 2001 de que o tecido adiposo possui células-tronco expandiu o horizonte em relação ao estudo e pesquisa e de novos tratamentos, embora ainda experimentais, para desordens graves e de difícil resolução, como a radiodermite. As células-tronco estão presentes como uma das grandes linhas de pesquisa e atividades em laboratório e um desafio que vem sendo vencido, paulatinamente.

A facilidade de coleta de tecido adiposo, aliado às possibilidades de dissociação mecânica já descritas na literatura<sup>67</sup> e associadas às propriedades que as células-tronco possuem, sobrepujam a dificuldade de tratamento das radiodermites e levanta a hipótese de que sua ação traria benefícios na cicatrização de feridas desencadeadas pela exposição à radiação.

Sabe-se que as CTMDA podem ser coletadas por meio da lipoaspiração, da mesma forma que células-tronco hematopoiéticas podem ser coletadas por meio de punção aspirativa de medula óssea. Obviamente, a lipoaspiração é mais bem tolerada e menos invasiva e, considerando que há tecido adiposo em qualquer parte do corpo humano, a disponibilidade de sítios de coleta é maior. Sabe-se, porém, que o melhor sítio de coleta de gordura é no abdome inferior, por haver maior concentração das CTMDA.<sup>52</sup> Estudos comparativos realizados, observando-se a taxa de proliferação das CTMDA, mostraram que as células coletadas da região abdominal possuíram uma taxa 65% maior de proliferação do que de outros sítios, como joelhos, coxas e culotes.<sup>53</sup> Além disso, os autores não observaram alteração significativa na taxa de proliferação celular, *in vitro*, ao se comparar indivíduos mais velhos ou com IMC elevado e também não havia diferença entre os sexos, masculino ou feminino.<sup>53</sup>

Na presente pesquisa, a opção de coleta de lipoaspirado foi a do abdome inferior, uma vez que já se possuía a informação de ser o melhor sítio. Entretanto, a inclusão de pacientes com IMC dentro da normalidade foi baseada na rotina da Clínica de Cirurgia Plástica, em que

somente pacientes com IMC até 25kg/cm<sup>2</sup> são submetidos a procedimentos. A inclusão apenas de mulheres também foi baseado na experiência clínica, uma vez que este gênero é o que mais procura os consultórios médicos e a seleção/ inclusão de pacientes seria facilitada.

Já a seleção da idade de pacientes submetidos à coleta de lipoaspirado foi baseada na hipótese de que os adultos jovens teriam uma maior concentração de CTMDA do que idosos<sup>64</sup>. Entretanto, tal fato é contrariado por outros autores.<sup>53</sup> Apesar disso, a restrição de pacientes pela faixa etária não interferiu nos resultados das quantidades de células-tronco obtidas, após ao isolamento do FVE e a cultura de células.

O método de coleta de lipoaspirado utilizou seringa e cânulas rombas, conforme preconizado por Coleman, em 1987, que, à ocasião, contraindicou o uso de aparelhos de pressão negativa, nos casos em que a gordura fosse usada para auto-enxertia.<sup>69</sup> O material foi apenas decantado e não centrifugado, contrário à Coleman, que usou a centrífuga com o intuito de proceder a lipo-enxertia. Segundo Ivyanki, a associação da técnica de Coleman com a centrifugação não aumentou, de modo estatisticamente significativo, a quantidade de células-tronco finais obtidas, embora a quantidade de FVE tenha sido maior.<sup>52</sup>

A média de células obtidas neste estudo variou entre 3,1x10<sup>5</sup> e 2x10<sup>6</sup> células por paciente, ou seja, em cerca de 30ml de lipoaspirado coletado. Estudos mostram que se pode obter até 6 milhões de células na FVE/ ml de lipoaspirado – lembrando que, em se tratando de FVE, estas células podem ser de qualquer tipo.<sup>45</sup> Sobre a quantidade de células-tronco, estima-se que os valores estejam entre 3,5x 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células por grama de lipoaspirado.<sup>45</sup> Outros trabalhos com análise de estudos recentes mostram uma quantidade bastante variável de células, podendo chegar até 8x10<sup>7</sup> células.<sup>70</sup> Deve-se lembrar que a variabilidade na quantidade de células pode estar relacionada aos aspectos individuais de cada paciente, além da heterogeneidade e miscigenação da população brasileira, mesmo quando se tenta manter critérios de inclusão rígidos nas pesquisas.

Embora a média de células obtidas neste trabalho esteja dentro da média relatada por vários autores, a contagem de células foi realizada apenas no momento da tripsinização, na quarta passagem, antes da semeadura nas MAH. Não foi feita a contagem celular imediatamente após se isolar a FVE, por se tratar de um *pool* de células bastante heterogêneo.<sup>48,49</sup>

Uma das formas de se caracterizar as CTMDA é a avaliação de seus marcadores de superfície, com o concurso da citometria de fluxo. Uma vez que as CTMDA constituem uma população heterogênea, já se tem ideia de que sua superfície possui inúmeros marcadores, mas ainda não se conhece um marcador que seja único. As CTMDA expressam marcadores típicos de células mesenquimais, como o CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90 e o CD105 e não expressam, ou seja, são negativos para outros marcadores de células hematopoiéticas, como o CD14, CD31, CD45 e CD144.<sup>45</sup>

Apesar disso, a expressão desses marcadores varia ao longo das passagens das culturas. Um exemplo, é o CD34, presente na primeira passagem da cultura e que parece diminuir sua expressão e até ser ausente, ao longo das várias passagens.<sup>45</sup> Da mesma forma, outros marcadores de superfície característicos de células hematopoiéticas, como o CD11, CD14, CD34 e CD45, estarão ausentes, conforme são feitas as passagens. Por outro lado, marcadores como o CD29, CD73, CD90 e CD166 estão presentes em maiores quantidades na FVE. Acredita-se assim, que as passagens da cultura servem para purificar ou selecionar as células, tornando as culturas mais homogêneas, conforme são tripsinizadas e recultivadas em outros frascos e com o meio de cultura específico.<sup>45, 71</sup>

Outro exemplo que demonstra a complexidade e as nuances das CTMDA é o fato de Traktuev ter demonstrado que estas estão associadas à parede de estruturas vasculares da porção estromal dos adipócitos e raramente dispostos entre eles. Ele observou ainda uma subpopulação de CTMDA que expressam CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup> em áreas perivasculares.<sup>72</sup>

Com o conhecimento de tantos marcadores e possibilidades, a caracterização das células-tronco, conforme preconizado por Dominici<sup>66</sup> em publicação pela ISCT, é feita por algumas características, como a aderência ao plástico, vista nos frascos de cultura, a expressão de marcadores de superfície com critérios mínimos de positividade para CD 73, CD 90 e CD105 e negatividade para CD 45, CD 34, CD 14 ou CD 11b, ou CD79 $\alpha$  ou CD 19 e HLA-DR.<sup>66</sup> Além disso, as células devem se diferenciar *in vitro* nas linhagens óssea, adiposa e cartilaginosa, ou seja, sob condições específicas de meio e suplementação, devem se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. A publicação data de 2006 e ainda é aceita atualmente na comunidade científica para confirmar que realmente se trata de CTMDA.

Seguindo estas diretrizes, no presente estudo, foram obtidos os pré-requisitos para se considerar que as células estudadas são de fato, células-tronco mesenquimais isoladas a partir

do lipoaspirado humano. Como resultado da caracterização celular, obteve-se, por meio da citometria de fluxo, amostras de células positivas para marcadores de superfície do tipo CD44, CD73, CD90 e CD105 e negativas para marcadores CD34, CD45 e CD11b.

Em uma outra etapa, as amostras de células foram submetidas à diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, corroborando a caracterização. O último requisito, a aderência em plástico, foi observada durante todo o cultivo celular, uma vez que as células aderiam à superfície do frasco de cultura, sendo necessária a tripsinação, sempre que se pretendia seguir com a expansão celular.

Alguns autores descreveram o uso das CTMDA como adjuvantes em diversos tratamentos, entre eles o tratamento de feridas complexas.<sup>2,7,8,57</sup> Há quem preconize sua infiltração no sítio da ferida ou em sua borda,<sup>7</sup> mas há também quem considere que, uma vez injetada, as células permaneceriam apenas algumas horas no local, antes de migrarem para a corrente sanguínea e serem destruídas, sem, no entanto, agirem como desejado.<sup>8</sup> Na Cirurgia Plástica, já se fala em enriquecer os enxertos de gordura<sup>2</sup> com a fração vascular estromal que, sabidamente, possui células-tronco, como forma de se obter resultados mais duradouros nos enxertos, com uma integração de maior quantidade de lipoaspirado. Outras propostas de tratamento são apresentadas à população em geral, com o uso simples do lipoaspirado como uma fonte de CTMDA e atribuindo a elas os resultados favoráveis.<sup>55,57</sup>

Seguindo a linha de raciocínio dos enxertos enriquecidos com FVE ou com as células tronco, a opção usada nesta pesquisa foi a de se enriquecer um curativo, cuja base ou arcabouço seria a MAH.

Sabidamente, a MAH possui propriedades intrínsecas, determinadas por seus vários fatores de crescimento, hoje já isolados, e que foi inicialmente usada como curativo biológico em pacientes queimados, nos idos de 1980. Hoje, há uma gama de estudos onde a membrana é usada em cirurgias oftalmológicas como substituto epidérmico, sendo uma opção de curativo temporário em pacientes queimados, feridas complexas, cirurgias cardíacas, urológicas e ginecológicas.<sup>37,38,73,74,75</sup> Além disso, a MAH já se encontra disponível nos Estados Unidos e Europa, liofilizada e esterilizada, prontas para o uso.<sup>74</sup>

Embora a descelularização possa adelgaçar a MAH, pela desidratação ocorrida no processo, muito de suas propriedades biológicas, como a ação anti-inflamatória, os fatores de crescimento e o ácido hialurônico são preservadas em quantidades variáveis na MAH, de acordo com o método de processamento.<sup>76</sup> A descelularização tem o potencial de diminuir a imunogenicidade, uma vez que retira da membrana restos celulares, preservando, porém, as proteínas estruturais extracelulares. Existem vários métodos de descelularização, por meio de ácido etilenodiamino acético (EDTA), tripsina, ureia e Triton X100.<sup>76</sup> Estudos prévios de Saghizadeh<sup>77</sup> mostraram que o NaOH, além de descelularizar eficazmente a MAH, preserva sua membrana basal, a morfologia do estroma e o colágeno. Neste mesmo estudo, o autor ainda procedeu a semeadura de iPSC (células-tronco de pluripotência induzida) derivadas de fibroblastos cutâneos, com êxito, o que mais do que justifica a escolha deste método neste trabalho.<sup>77</sup> Salah também ressalta que o processo de descelularização com NaOH é mais rápido e mais eficiente.<sup>78</sup> Assim sendo, no presente estudo, o método adotado se baseou no uso de NaOH, conforme experiência prévia do grupo desta pesquisa, que já fez análises comparativas entre os tipos de descelularizações<sup>60</sup> com as respectivas concentrações de citocinas.

Deste modo, com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), obteve-se a comprovação da eficácia do processo de descelularização com NaOH, antes da produção dos complexos CTMDA+ MAH. Aliás, foi também confirmada com a MEV que as CTMDA estavam integradas à MAH, após a semeadura destas e a manutenção do complexo em estufa de CO<sub>2</sub> por sete dias. Em paralelo, a observação em imunofluorescência das células e sua coloração com hematoxilina também garantiram que as células estavam fixadas à MAH.

Um questionamento que surgiu nesta etapa foi sobre o tempo de incubação das células, quando da formação do complexo CTMDA+ MAH. Kurzyk mostrou que existe uma proliferação das células semeadas em arcabouço sintético muito maior após a incubação por 21 dias, quando comparado aos períodos de 7 e 14 dias.<sup>79</sup> No presente estudo, entretanto, a escolha de manter a incubação apenas por sete dias se baseou na evolução da ferida dos animais, na tentativa de não postergar, desnecessariamente, as feridas nos ratos, e na observação de que em sete dias, havia célula-tronco aderida e viáveis para o tratamento.

Outras questões discutidas por Kurzyk foram a densidade ideal para a semeadura celular no arcabouço, bem como o volume da suspensão celular e ainda sobre a necessidade de uma etapa a mais para se aumentar a eficiência da semeadura. Observou-se que a densidade de  $0,9 \times 10^6$  células é a ideal<sup>79</sup>, embora haja também relatos na literatura, mostrando que uma maior

concentração celular poderia compensar a apoptose das células, que se inicia após três horas da semeadura.<sup>80</sup> Kurzyk observou que esta quantidade de células seria a melhor para o *scaffold* utilizado, que era de 6mm de diâmetro e 4mm de espessura.<sup>79</sup> Já Liu preconizou a semeadura de apenas 200.000 células em *scaffold* tridimensionais.<sup>80</sup> O fato é que esta quantidade de célula é bastante variável na literatura.<sup>79,80,81,82</sup> Aghayan, em estudo com membrana amniótica semeada também com células-tronco, utilizou  $10^6$  células, porém não foi explícito em dizer o tamanho da MAH usada. Sua ferida possuía apenas 10mm, feita com o auxílio de um punch.<sup>83</sup>

A opção neste estudo foi usar  $10^6$  células por MAH, mesmo que o tamanho do *scaffold* fosse maior do que os demais trabalhos. A semeadura se deu na área central da MAH, contando com a proliferação celular durante o período de incubação de sete dias em estufa. Embora se tenha utilizado um número de células dentro do preconizado na literatura, deve-se ressaltar que a grande maioria dos trabalhos atualmente se refere a *scaffolds* tridimensionais, com estruturas em 3D, porosa, com o intuito de bioengenharia, não sendo esse o propósito do presente estudo. Esta pesquisa teve por intuito a construção de um curativo com células na membrana amniótica, uma espécie de “*cell delivery*”, aos moldes de várias tecnologias do tipo “*drug delivery*”, contando que as células-tronco pudessem aderir à ferida e que seus fatores de crescimento e citocinas fossem capazes de atuar, favorecendo a cicatrização. Contrariamente, nos casos de arcabouços tridimensionais sim, a quantidade de células é importante e variável, mas principalmente o modo de realização da semeadura.<sup>81,82</sup>

Outra questão frequentemente abordada refere-se ao número de passagens considerado ideal para que as células-tronco pudessem ser semeadas na MAH. Estudos mostraram que quanto menor é a passagem celular, maior é o seu potencial de diferenciação e que suas características inatas também diminuem, conforme o número de passagens aumentam.<sup>84</sup> Além disso, parece que o momento de maior proliferação celular se dá em torno da quinta passagem e que seu potencial de proliferação vai decaindo gradativamente. Na décima passagem, a célula já é considerada senescente e a proliferação só segue, normalmente, até a 16ª passagem.<sup>79,84</sup> Deste modo, em se tratando de terapia celular, quanto menor for o número de passagens, melhores seriam os resultados. Alinhado a este raciocínio e vislumbrando-se a translação do estudo para humanos, utilizou-se células-tronco que se encontravam na quarta passagem para a formação do complexo CTMDA+MAH. Ao se produzir o curativo de MAH com células-tronco nessa passagem, as células estariam no momento de maior proliferação celular.<sup>79</sup>

Como o objetivo deste trabalho foi a aplicação do complexo CTMDA+ MAH nas radiodermites, foi necessário estabelecer um protocolo de radiação, uma vez que a literatura é bastante escassa quanto à indução de lesão com aceleradores de elétrons (equipamento disponível na instituição da pesquisa). Grande parte dos trabalhos citava modelos com radioisótopos, como o Césio- 137 e a bomba de Cobalto -60, com doses muito variáveis.<sup>85,86</sup> O que chama a atenção é que com esses elementos como indutores de radiodermite, as doses foram menores do que a dose atingida neste estudo.

Meirelles sugeriu um modelo de radiação em coelhos, utilizando Cobalto -60, nas doses de 10Gy, 20Gy, 30Gy e 45Gy, conseguindo uma área de epilação mantida por até 90 dias e uma lesão ulcerada na dose de 30Gy. Relatou ainda o óbito de um animal, com necrose cutânea e visceral na dose de 45Gy.<sup>63</sup> Na revisão de literatura realizada por Bernhardt, em apenas um único trabalho foi utilizado o acelerador linear de elétrons, como fonte de indução de radiação.<sup>85</sup> Além de fazer um compilado, propôs também um modelo de irradiação com Césio- 137, em doses fracionadas, diariamente. Inicialmente, foram usadas doses variando entre 25Gy e 40Gy, sem o efeito desejado – radiodermite, sendo a dose extrapolada até 80Gy. No grupo submetido a essa dose, foi possível observar a ulceração no animal, com o acometimento de todas as camadas da pele, entretanto ferida epitelizava completamente após 15 dias do término da radiação.<sup>85</sup> Por fim, a cicatrização da ferida completa se dava em torno de 45 dias após a radiação.

Utilizando camundongos como modelo animal, Fares et al propuseram o uso do acelerador linear de elétrons para a indução de radiodermite.<sup>86</sup> A irradiação foi feita com uma dose total de 30Gy, fracionadas em tomadas de 5Gy e 6MeV, obtendo uma dermatite classificada como grau IV, com ulceração e edema. Além dele, outros autores defenderam um protocolo de radiação com acelerador de elétrons, usando doses menores. Entretanto, os textos publicados carecem da descrição de detalhes primordiais em se tratando de reprodutibilidade dos protocolos, como distância fonte-sujeito, energia, espessura do *bolus* usado e tempo de radiação.<sup>86,87,88</sup> Deste modo, a carência de detalhamento dos artigos científicos refletiu-se na quantidade de tentativas aqui realizadas para se encontrar a dose ideal que fosse capaz de causar uma lesão compatível a uma radiodermite grau IV em ratos. Somente após algumas revisões das medidas e dose usadas, em um trabalho conjunto com radioterapeutas e físicos da Instituição, conseguiu-se chegar a uma ferida, inicialmente eritematosa, descamativa, mas que evoluiu para uma úlcera passível de desbridamento, no 30º dia (grau IV). Cabe destacar que a radiodermite, com necrose

e crosta, evolui frequentemente com retração da pata, conforme observado na imagem de um dos animais da pesquisa, determinando um grau de impotência funcional associada, fato que se observou em vários animais desta pesquisa. (Fig. 20)

As feridas produzidas foram analisadas, conforme a progressão do tamanho, nos dias D30 e D35, de acordo com o tratamento a que foi submetido. Considerando-se que todas elas foram classificadas como uma lesão grau IV de radiodermite, a abordagem de se utilizar o papel centimetrado para quantificar em  $\text{cm}^2$  as áreas das lesões, descrita como uma opção à *softwares*, no dia do tratamento (D30) e cinco dias após (D35) se mostrou bastante simples e eficaz.<sup>64,65</sup>



Fig. 20: Retração da ferida e de todo o membro, após radiação

Os achados sobre a evolução do tamanho da ferida mostraram que a maior redução do tamanho da ferida ocorreu no grupo GMAH, com o menor p-valor, seguido do grupo GCTMDA. Embora este resultado não tenha sido comprovado ao se analisar os grupos entre si, 2x2, o *Effect Size*, que simboliza a força de associação, sugeriu que o GCTMDA foi o que melhor cicatrizou, pois atingiu valores mais próximos a 1.

Desta forma, as melhores taxas de cicatrização foram observadas nos grupos MAH e CTMDA, com a sugestão de melhor cicatrização no grupo célula (GCTMDA). A literatura facilmente justifica tal achado, por conta de todas as propriedades das células tronco.<sup>45,47,55,68,89</sup> Ao se considerar que este curativo possuía as células, seu potencial cicatrizante estaria



relacionado ao maior recrutamento de macrófagos, maior depósito de colágeno e favorecimento da angiogênese, principalmente.<sup>89</sup> Deste modo, os achados encontrados nesta pesquisa corroboram a literatura.

Cabe ressaltar que os efeitos do tratamento observados no grupo CTMDA podem ser resultantes não apenas da célula-tronco, mas de uma associação das células e do arcabouço, que neste caso, não era um material inerte. A MAH possui igualmente propriedades que favorecem a cicatrização, além de também ser fonte de células-tronco. Haveria então, um efeito aditivo, potencializado, considerando-se as células e a MAH. Por isso também, que, mesmo o GMAH, sem células, teve um p-valor superior ao do GN (p-valor de 0,011 do GMAH, contra o p-valor do GN de 0,043).<sup>37,38,39,40,60,61</sup>

Após a avaliação macroscópica das feridas, um fragmento dessas seguiram para o preparo histológico e para a análise por Patologista. Pela dificuldade de se obter um serviço de Patologia e/ ou Histologia que auxiliasse com a produção das lâminas de HE e picrosírius, foram selecionadas, aleatoriamente, apenas cinco blocos de parafina de cada grupo, para que fossem preparadas as lâminas histológicas. Assim, embora houvesse uma quantidade maior de material, a análise realizada pelo Patologista contemplou apenas 15 cortes histológicos, cinco de cada grupo, que foram coradas em HE, para a observação de elementos celulares, e picrosírius, para avaliação da colagenização.

Com esta amostra reduzida, após a análise estatística das pontuações dadas a cada item, não houve relevância estatística em nenhuma das avaliações. (Tab. 8 a 13) Associando-se os achados supracitados das cicatrizações das feridas, com a sugestão de ter havido uma cicatrização melhor no GCTMDA, com p-valor significativo, esperavam-se alguns achados na avaliação histológica, sobretudo na avaliação de colagenização e reepitelização.

As primeiras três variáveis - proliferação vascular, contagem de células mononucleares e polimorfonucleares - são indicadores da reação inflamatória aguda. Uma das primeiras reações, no intuito de cicatrizar uma ferida é a inflamação. Há aumento da permeabilidade capilar, com recrutamento de diversos tipos celulares.<sup>21,24,65</sup> Conforme o processo de cicatrização continua, a fase proliferativa se inicia, seguida da fase da maturação. Neste

momento, a análise das demais variáveis - proliferação fibroblástica, colagenização e reepitelização - predizem um processo de cicatrização mais avançado.<sup>21, 24, 31, 34, 65</sup>

Observando-se as tabelas, em cujos resultados estão explícitas as variáveis analisadas, nota-se que as pontuações foram muito próximas, em alguns casos iguais (como na proliferação vascular e na presença de mononucleares) entre os grupos. Alguns fatores poderiam justificar a ausência de um resultado satisfatório nestas análises, como a amostra reduzida, apesar de o cálculo do tamanho amostral ter sido realizado previamente ao início da pesquisa, utilizando-se a Equação de Recursos, como preconizado pelo CONCEA/MCTI (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

Além disso, deve-se considerar que a grande maioria dos trabalhos se utiliza de pelo menos dois momentos de análise histológica, com intervalos de dias, que seriam importantes marcos no processo de cicatrização. Garros et al, por exemplo, produziram uma ferida e procederam o tratamento com *Passiflora edulis*, realizando a coleta de material nos dias 7, 14 e 21 após a ferida e tratamento.<sup>65</sup> Com este intervalo de tempo, é possível se ter diferenças estatísticas entre os grupos e entre os tempos de tratamento.<sup>65</sup>

Deve-se considerar ainda que a ferida aqui proposta se inicia após 16 dias, em média, da radiação e é tratada no trigésimo dia, quando se tem uma ferida crostosa, ulcerada e profunda. Antes deste momento, no entanto, eles passaram por toda a progressão da doença, com eritema e descamação úmida até atingirem a lesão crostosa, grau IV. Ao se pensar que, segundo os critérios clínicos na Medicina, em humanos, uma ferida torna-se crônica após 30 dias sem reparo, é plausível aventar-se a hipótese de que a ausência de células características da fase aguda (leucócitos, polimorfonucleares e mononucleares, por exemplo) nesta pesquisa é justificável, por se tratar de feridas “crônicas”, lembrando-se que o material das feridas foi coletado no D35.

Esta hipótese justifica a ausência de achados nos três primeiros itens avaliados na Histologia, porém não explica a ausência de dados importantes na fase mais tardia, da colagenização e da reepitelização.

Uma análise importante neste trabalho foi a utilização do multiplex para a avaliação de 27 metabólitos. O teste Multiplex revelou um padrão de citocinas presentes nas feridas dos

animais, de acordo com o grupo de tratamento correspondente. O modelo de ferida deste estudo foi o de radiodermite grau IV, que por si só, já é capaz de gerar uma série de alterações em termos de citocinas e outras substâncias no sítio da lesão. Acrescido a isso, utilizou-se um sistema de “*cell delivery*”, por meio da MAH, que igualmente possui seus fatores e citocinas, ainda enriquecido com os fatores e citocinas das próprias células. Por isso, cabe uma pequena análise isolada de cada momento citado, antes da análise completa das alterações encontradas nas concentrações de IFN- $\gamma$  e fractalquina.

A radiação *per se* induz à apoptose e morte celular, gerando ainda uma resposta sistêmica inflamatória, com alterações importantes na estrutura e padrão da microvasculatura da área atingida. Além de haver liberação de ROS e a ativação de vários tipos de células do sistema imune, as células endoteliais desencadeiam também um estado pró inflamatório, com liberação de uma série de citocinas, como IL 1-  $\beta$ , IL 1-  $\alpha$ , IL 4, IL 6, IL 8, IL 13 e TNF- $\alpha$ .<sup>90,91</sup> Tais citocinas estariam relacionadas à produção de ROS e NOS, ativação da diferenciação de células T em células T *helper*, indução da expressão de proto-oncogenes e promoção da transcrição de fatores pró inflamatórios, entre outras ações.<sup>90</sup>

Além disso, as células endoteliais também desencadeiam a liberação de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  após a radiação. A ação do interferon está ligado à ativação de STATS (*signal transducer and activator of transcription*) que promovem a fosforilação de IL1- $\beta$  e produção de IL 6, com ação também inflamatória. Além disso, a ativação dos STATS também inibe a divisão celular e ativa os leucócitos.<sup>90,92</sup> Outras citocinas envolvidas no processo da radiação são o G-CSF, GM-CSF e o TGF- $\beta$ .<sup>90</sup>

Em relação à MAH, esse tecido é rico em fatores de crescimento, onde destaca-se o VEGF e o EGF, além de colágeno e fibronectina.<sup>39</sup>

Quanto às células-tronco mesenquimais, uma de suas características é a capacidade de induzir a produção de fatores de crescimento, como VEGF, FGF e TGF- $\beta$ .<sup>47</sup>

Dado os fatos acima relatados, esperava-se, por exemplo, que as concentrações dos fatores de crescimento VEGF e EGF na ferida estivessem elevados, uma vez que estão relacionados à MAH e às células-tronco. Ao contrário do esperado, as concentrações daqueles fatores não apresentaram relevância estatística.

Recapitulando a ação do IFN-  $\gamma$ , esta citocina age modulando de forma negativa a cicatrização. Este fenômeno está relacionado à inibição que o IFN- $\gamma$  causa na produção e expressão do VEGF, ou seja, altas concentrações de IFN- $\gamma$  podem ser um fator preditivo desfavorável à cicatrização, com uma contração menor da ferida e menor produção de colágeno.<sup>28,29,30</sup>

Na análise do teste multiplex, optou-se por agrupar as citocinas em pró e anti-inflamatórias, didaticamente. No grupo das citocinas pró-inflamatórias, observou-se que o IFN- $\gamma$  foi encontrado em maior concentração, com relevância estatística no grupo GMAH ( $p=0,044$ ). Na comparação entre os grupos, usando-se o teste de Mann-Whitney e a correção de Bonferroni, houve significância apenas entre os grupos GMAH e GCTMDA, ou seja, as concentrações de IFN- $\gamma$  encontravam-se de fato mais elevadas no grupo da membrana amniótica ( $p=0,093$ ). Este grupo obteve o pior grau de cicatrização comparativamente ao grupo GCTMDA, após a análise do *Effect Size*, demonstrado na tabela 7.

O fato das concentrações de VEGF terem se mostrado baixas nos grupos MAH e CTMDA pode ser justificada também pela concentração elevada de IFN-  $\gamma$ , sobretudo no GMAH, uma vez que ele inibe a expressão e produção do VEGF. Uma possibilidade de não ter se encontrado alguma relevância nos valores de VEGF entre os grupos estudados está relacionada aos números de animais usados na pesquisa, apesar do número de animais ter sido avaliado antecipadamente no início da pesquisa.

Uma citocina que poderia confirmar tais achados seria o TGF- $\beta$ , que é modulado pelo IFN- $\gamma$ . O interferon suprime a produção e a ação do TGF-  $\beta$ , importante na redução de fibrose após radiações. Entretanto, o kit multiplex não contemplava este metabólito, portanto, o TGF- $\beta$  não foi dosado na pesquisa.

Outra substância que auxiliaria na análise do IFN-  $\gamma$  seria o IP-10, uma vez que se atribui ao interferon a indução da expressão desse metabólito de efeito antiangiogênico.<sup>28</sup> Entretanto, mesmo tendo sido dosadas as concentrações do IP-10, não houve relevância estatística na comparação entre os grupos ( $p=0,525$ ), apesar de se observarem valores maiores de IP-10 no grupo neomicina, seguido do GMAH e, por último, GCTMDA.

O outro achado relevante, estatisticamente, foi a concentração de fractalquina, com valores elevados no grupo GMAH ( $p=0,069$ ) e menores no GCTMDA, com significância também na análise pareada entre estes dois grupos, pela correção de Bonferroni ( $p=0,093$ ).

Considerando-se que a fractalquina é uma quimiocina pró-inflamatória, ela parece regular uma série de eventos fisiológicos e patológicos, como a imunidade, angiogênese, insuficiência cardíaca, doenças inflamatórias, como artrites, glomerulonefrite, e a dor.<sup>93,94</sup> Além disso, é expressa por vários órgãos, inclusive a pele.<sup>94</sup> Friston et al mostraram que a Fractalquina está relacionada com o estado inflamatório da queimadura, em seu trabalho também experimental com ratos e utilizando uma análise multiplex semelhante à usada neste estudo, com 27 analitos. Friston relatou também uma diferença estatística apenas nas concentrações de fractalquina e leptina.<sup>93</sup>

A fractalquina estimula a angiogênese de modo direto, mas também indiretamente durante o processo de cicatrização.<sup>94</sup> Ishida também creditou à fractalquina, a migração de células endoteliais em feridas e a angiogênese. Ele observou que em camundongos que não tinham receptor de fractalquina possuíam menores concentrações de VEGF.<sup>94</sup> Assim, embora a fractalquina esteja intimamente relacionada a efeitos favoráveis à cicatrização de feridas, como a angiogênese, a cicatrização não ocorre apenas em função da presença da fractalquina.<sup>94</sup> Como descrito por Chen, a microvasculatura local depende também de várias outras citocinas e fatores de crescimento, como a IL 6, IL 1 $\beta$ , IL 17A, IL6 e o IFN-  $\gamma$ <sup>33</sup> e ainda o VEGF e o TGF-  $\beta$ <sup>94</sup>, o que remete aos achados discutidos anteriormente.

O grupo MAH foi, de novo, o que apresentou maiores concentrações de fractalquina, com relevância ao compará-la apenas ao grupo CTMDA, mesmo resultado encontrado com o IFN-  $\gamma$ . O GMAH também foi o grupo com pior taxa de cicatrização, comparado ao GCTMDA, conforme o *Effect Size*.

Em análise completa, o p-valor da fractalquina ( $p=0,069$ ) foi maior do que o p-valor do IFN-  $\gamma$  ( $p=0,044$ ), o que sugere um poder estatístico das quantidades destes dois analitos, entre os grupos de estudo, maior no IFN-  $\gamma$ . Assim, depreende-se que o fato de a cicatrização ter sido menos efetiva no GMAH pode estar relacionada às concentrações do IFN- $\gamma$ , que foram maiores e mais discrepantes neste grupo, do que nos demais, comparado aos valores da fractalquina. Desta forma, muito embora a fractalquina estivesse em concentrações maiores no grupo GMAH, as maiores concentrações de IFN- $\gamma$  agiram contrariamente, dificultando a cicatrização,

lembrando que este é um processo complexo e dependente de várias outras substâncias, além da fractalquina. Coloca-se então que os papéis da fractalquina e do IFN-  $\gamma$  seriam antagônicos e, neste caso, os dados sugerem uma preponderância da ação do IFN-  $\gamma$  sobre a ação da Fractalquina, quando se observa o processo de cicatrização.

Cabe lembrar que a angiogênese é dependente também da presença de VEGF e TGF-  $\beta$ , sendo esse capaz de fazer uma regulação positiva na expressão do VEGF. Uma vez que as concentrações de VEGF foram baixas neste estudo, às custas das dosagens do IFN- $\gamma$ , pode este ser mais um fator que contribua para a hipótese de que a ação do IFN-  $\gamma$  seja mais preponderante do que a da fractalquina. Mais uma vez aqui, a dosagem de TGF-  $\beta$  poderia auxiliar nessa teoria.

Hipóteses que poderiam justificar a ausência de outra citocina ter cursado com valor estatisticamente significativo podem estar relacionadas ao tempo de análise da amostra, ou seja, se a análise da amostra fosse realizada em dois momentos, por exemplo, no D35 e no D40.

Analisando-se os resultados da citocinas anti-inflamatórias, não houve nenhum resultado estatisticamente relevante.

Sobre os achados da tabela 18, o que chama especial atenção é o p-valor estatisticamente significativo para o LIX, no grupo neomicina. Na análise da cicatrização do GN, com a correlação de Spearmann, observou-se valor com relevância estatística apenas na citocina LIX, única em que foi possível estabelecer uma correlação positiva forte ( $r^2=0,9$ ), ou seja, nos casos em que houve uma diferença maior do tamanho da ferida entre os dias D30 e D35, houve também uma maior concentração de LIX. Se for considerada que a diferença do tamanho da ferida entre os dias de tratamento se traduz como uma cicatrização maior da ferida, no grupo neomicina houve uma maior concentração de LIX.

A quimiocina LIX, também conhecida como CXCL5, é secretada por diferentes tipos celulares, como macrófagos, fibroblastos, células-tronco do tecido adiposo, e possui efeitos quimiotáticos para células endoteliais e outras inflamatórias.<sup>95,96</sup> É considerada uma adipocina, por ser produzida também por macrófagos do tecido adiposo, e possui características inflamatórias, estando muito presente em situações como obesidade, diabetes e infecção.<sup>97</sup> Outros estudos mostraram altas concentrações de LIX, principalmente na túnica adventícia e

íntima de vasos sanguíneos do tecido adiposo.<sup>98</sup> E Zhang ainda sugeriu que poderia haver uma correlação entre a insuficiência insulínica e altas doses de LIX, em estudos com macrófagos do tecido adiposo.<sup>98</sup>

Um fato importante observado é a correlação existente entre a diferença do tamanho da ferida, nos D30 e D35, e as concentrações de LIX no grupo tratado com neomicina. Relembra-se aqui que a comparação não é das cicatrizações entre os grupos, já analisada, anteriormente, mas do porquê deste grupo ter mostrado uma relação forte com a concentração da CXCL5 (LIX).

Uma das chaves desta questão pode estar no fato do LIX estar presente em altas concentrações em estados inflamatórios, doenças inflamatórias e metabólicas, muito por ser uma citocina inflamatória e bastante secretada nesses momentos.<sup>97,99</sup> Embora sua concentração inicial não tenha mostrado valor significativo nas primeiras análises (Tab. 14) quando comparadas às dosagens dos outros grupos, houve correlação quando comparada à cicatrização da ferida, momento em que o organismo está comprometido em ativar o sistema de reparo, com secreção e proliferação de células, substâncias, citocinas, fatores de crescimento e etc.

Adiciona-se ainda o fato de que a radiodermite é uma lesão que gera uma resposta intensa inflamatória e que, neste grupo, não houve um tratamento mais contundente ou agressivo, além do desbridamento e do curativo tópico com pomada. Desta feita, pode-se facilmente associar uma dosagem alta de citocina inflamatória ao tipo de tratamento, pouco eficaz. Tal associação traz à tona também a ideia de que a MAH e o curativo MAH+ CTMDA possuem efeitos anti-inflamatórios, por todos os fatores intrínsecos inerentes a cada um dos elementos, muito embora não tenha sido possível associar o grau de cicatrização dos outros grupos de tratamento aos metabólitos analisados.

Em última análise, a tabela 19 revela um momento de curiosidade científica, onde, aproveitando-se que foram coletados fragmentos da área da ferida cicatrizada (reepitelizada), uma do grupo GN e outra do GCTMDA, conferiu-se as dosagens de todos os metabólitos. A tabela foi fruto da comparação, embora sem relevância estatística, das áreas da ferida cruenta e da mesma ferida que se apresentava parcialmente cicatrizada, no mesmo animal, gerando alguns resultados interessantes, até mesmo se forem considerados novas pesquisas na área.

Os valores das dosagens de IFN- $\gamma$  e Fractalquina foram bastante semelhantes nos dois animais, tanto na área da ferida ainda ativa quanto na ferida cicatrizada. Opostamente, no metabólito GRO/KC/CINC1 e no MIP-2, os valores foram bastante elevados na ferida ativa e reduziram, sobremaneira, na área cicatrizada, com resultados próximos a zero.

O CXCL1, quimiocina anteriormente conhecida como GRO/KC, e está envolvida nos processos de angiogênese, inflamação, cicatrização e em alguns casos de tumor. Sua expressão está relacionada com a infiltração e migração de neutrófilos na fase inflamatória da cicatrização, o que significa dizer que está envolvida em várias condições adversas associadas à inflamação.<sup>100</sup>

Tanto o CXCL1 (GRO/KC), como o *Macrophage Inflammatory Protein-2* (MIP-2) também conhecido como CXCL2 são quimiocinas expressas por diferentes tipos celulares, em momentos diversos após uma lesão. Fibroblastos da derme e as células endoteliais são as primeiras responsáveis por produzirem o CXCL1 na pele, cerca de 6h após um trauma, enquanto a produção de MIP-2 parece ocorrer apenas pelos neutrófilos e monócitos, como uma resposta mais tardia.<sup>101</sup> Ambas estão relacionadas à magnitude do processo inflamatório, seja aguda ou cronicamente, porém mais agudamente, a CXCL1 pode ser secretado até vinte vezes mais do que o CXCL2, que começa a elevar suas concentrações cerca de 16-24h após um trauma.<sup>101</sup>

Baseado nesta informação, o que se pode observar dos resultados desta pesquisa - sem nenhuma ousadia de se caracterizar como resultados relevantes, mas curiosos - são as concentrações de GRO/KC/CINC1 maiores na ferida cruenta (valores em torno de 6.000) quando comparadas aos da área já cicatrizada (em torno de 0,0- 0,9), porém muito discrepantes daqueles achados no MIP-2. Na ferida cruenta, valores de MIP-2 variaram entre 74.000 e 89.000, com uma queda igualmente vertiginosa, na ferida já cicatrizada (1.300 – 8.400, conforme Tab.19).

Independente de não haver diferença entre os valores no animal do grupo GN e do GCTMDA, até mesmo porque a amostra foi de apenas dois animais e sem varrer os três grupos, ambos seguiram o mesmo padrão. O interessante foi o MIP-2, que é produzido um pouco mais tardiamente, ter valores muito maiores do que o GRO/KC/CINC1, cuja liberação ocorre poucas horas após o trauma, corroborando o fato de se tratar de uma ferida em um estágio mais crônico, uma vez que o tratamento ocorreu após 30 dias da radiação. Espera-se, usualmente, que estas



quimiocinas comecem a ser produzidas em momentos distintos, mas se igualem após alguns dias.<sup>101</sup>

Esta pergunta permanece, então, para as próximas pesquisas. Uma vez estabelecidos os padrões de radiação em ratos *Wistar* e um método de produção de um curativo de MAH enriquecido com células-tronco, em um sistema de “*cell delivery*”, será necessária a avaliação de outras citocinas importantes na cicatrização, como TGF- $\beta$ , e de momentos distintos do processo de cicatrização, a fim de que os resultados encontrados, sejam corroborados e somados à outros. Assim, caminha-se para o total esclarecimento da gênese e do tratamento da radiodermite.

## CONCLUSÃO

Conclui-se assim, que o complexo CTMDA+ MAH favoreceu a cicatrização de feridas radioinduzidas, traduzido pela maior redução da ferida nesse grupo.

Ademais, no trabalho apresentado:

1. Conseguiu-se produzir um complexo MAH+ CTMDA e comprovar que as CTMDA estavam aderidas na MAH, por meio da MEV e da coloração com Hematoxilina;
2. Todos os grupos de tratamento apresentaram uma cicatrização importante, com valor estatístico positivo, porém na comparação entre os grupos com o *Effect Size*, apenas o grupo CTMDA apresentou a melhor cicatrização, o que foi também observado, macroscopicamente, pela documentação fotográfica;
3. A análise Histológica não foi capaz de mostrar diferença estatística entre os grupos;
4. O tratamento com a MAH, ao se comparar com o grupo CTMDA, possuiu os maiores níveis de IFN- $\gamma$  e de fractalquina e os piores níveis de cicatrização.

Além disso, pode-se ainda produzir um modelo eficaz de indução da radiodermite em ratos irradiados com acelerador linear de elétrons, o que vem de encontro com a escassez destes modelos na literatura específica.

## REFERÊNCIAS

1. Kapur SK, Vilaboa DAS, Llull R, Katz A. Adipose Tissue and Stem Cell/ Progenitor Cells: Discovery and Development. *Clinics in Plastic Surgery*. 2015;april:155-167.
2. Tanikawa DYS, Aguena M, Bueno DF, Passos-Bueno MR, Alonso N. Fat Grafts Supplemented with Adipose-Derived Stroma Cells in the Rehabilitation of Patients with Craniofacial Microsomia. *PlastReconst. Surg*. 2013;132(1):141-52.
3. Aguena M, Fanganiello RD, Tissiani LA, et al. Optimization of Parameters for more eficiente use of adipose-derived stem cells in regenerative medicine therapies. *Stem Cells Int*. 2012;2012:303610.
4. Mazini L, Ezzoubi M, Malka G. Overview of current adipose-derived stem cell (ADSCs) processing involved in therapeutic advancements: flow chart and regulation updates before and after COVID-19. *Stem Cell Resaerch and Therapy*. 2021;12(1): 1-17. Acesso online em 25/07/2023. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02006-w>
- REVA5. Lu F, Mizuno H, Uysal CA et al. Improved Viability of Random Pattern Skin Flaps though the Use of Adipose Derived Stem Cells. *PlastReconst Surg*. 2008;121(1):50-8.
6. Minter DM, Marra KG, Rubin JP. Adipose Stem Cells: Biology, Safety, Regulation and Regenerative Potential. In: *Clinics in Plastic Surgery*. April, 2015. Pag. 169-179.
7. Bey E, Prat M, Duhamel P et al. Emerging therapy for improving wound repair of severeradiation burns using local bone marrow-derived stem celladministrations. *Wound Rep Reg* 2010;18:50–8.
8. Menezes K, Nascimento MA, Gonçalves JP, Borojevic R, Rossi MID et al. Human Mesenchymal Cells from Adipose Tissue Deposit Laminin and Promote Regeneration of Injured Spinal Cord in Rats. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e96020. doi:10.1371/journal.pone.00960.
9. Litwiniuk M, Grzela T. Amniotic membrane: new concepts for an old dressing. *Wound Repair Regen*. 2014;22(4):451-6.

10. Herndon DN, Branski LK. Contemporary Methods Allowing for Safe and Convenient Use of Amniotic Membrane as a Biological Wound Dressing for Burns. *Ann Plast Surg.* 2017;78(1):S9-10.
11. Reed, AB. The History of Radiation Use in Medicine. *J Vasc Surg.* 2011; 53: 3S-5S.
12. The Electromagnetic Spectrum: Ionizing Radiation. Site: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov). Acessado em 29/12/21.
13. Portela, Caio Fernando Teixeira. Avaliações de altas doses em pequenos campos utilizando filmes radiocrômicos. Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. 2020. Online, acesso em 05/01/2022. [www.Repositorio.ufmg.br](http://www.Repositorio.ufmg.br)
14. MOURÃO, A. P.; OLIVEIRA, F. A. Fundamentos de radiologia e imagem. 1 ed. São Caetano do Sul,SP: Difusão, 2009. 343 a 365 p.
15. Guimarães, Nilmara Almeida; Monteiro, Elisabeth Costa; Ponciano, Cássia Ribeiro. Avaliação Metrológica do Tamanho de Campo Irradiado por Aceleradores Lineares. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação PUC-RJ
16. Reisz JA, Bansal N, Qian J, Zhao W, Furdui CM. Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(2):260-292. Acesso online em 18/01/2022. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
17. Williams JP, McBride WH. After the bomb drops: a new look at radiation-induced multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Int J Radiat Biol.* 2011 Aug;87(8):851-68. doi: 10.3109/09553002.2011.560996.
18. Leventhal J, Young MR. Radiation Dermatitis: Recognition, Prevention and Management. *Oncology (Williston Park).* 2017 Dec 15;31(12):885-7, 894-9.
19. Singh M, Alavi A, Wong R, Akita S. Radiodermatitis: A Review of our Current Understanding. *Am J Clin Dermatol.* 2016. Doi: 10.1007/s40257-016-0186-4.

20. Borrelli MR, Shen AH, Lee GK, Momeni A, Longaker MT, Wan DC. Radiation-Induced Skin Fibrosis: Pathogenesis, Current Treatment Options and Emerging Therapeutics. *Ann Plast Surg*. 2019; october 83(4): S59–S64. doi:10.1097/SAP.0000000000002098.
21. Dormand EL, Banwell PE, Goodacre TEE. Radiotherapy and wound Healing. *Int Wound J* 2005;2:112-27.
22. Wei J, Meng L, Hou X, Qu C, Wang B, Xin Y, Jiang X. Radiation-induced skin reactions: mechanism and treatment. *Cancer Management and Research* 2019;11:167–177.
23. Rui L, Yan B, Lin L, LianHang L, Xiaodong L, Shumei MA. Molecular pathways associated with oxidative stress and their potential applications in radiotherapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2022; 49(65):1-11.
24. Yang X, Ren H, Guo X, Hu C, Fu J. Radiation-induced skin injury: pathogenesis, treatment, and management. *Aging* 2020; 12: 22. Acesso online em 20/07/2022, <http://www.aging-us.com>.
25. Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: Review of the literature. *Radiation Oncology* 2012;7:162-70. Acesso online em 17/06/2022, <http://www.ro-journal.com/content/7/1/162>.
26. Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH et al Makiko. Interference with Transforming Growth Factor- $\beta$ / Smad3 Signaling Results in Accelerated Healing of Wounds in Previously Irradiated Skin. *American Journal of Pathology*. 2003;63(6):2247-57.
27. Satish L. Chemokines as Therapeutic Targets to Improve Healing Efficiency of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*. 2015; 4(11): 651-9.
28. Ishida Y, Kondo T, Takayasu T, Iwakura Y Mukaida N. The Essential Involvement of Cross Talk Between IFN- $\gamma$  and TGF-  $\beta$  in Skin Wound Healing Process. *The Journal of Immunology*. 2004;172(3):1848-55.
29. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon -gamma (IFN-  $\gamma$ ): Exploring its Implications in Infectious Diseases. *Biomol Concepts*. 2018;9:64-79.

30. Schwartz F, Jennewein M, Bubel M, Holstein JH, Pohleman T et al. Soft Tissue Fibroblasts From Well Healing And Chronic Human Wounds Show Different Rates Of Myofibroblasts In Vitro. *Mol Bio Rep.* 2013; 40:1721-33.
31. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H. Growth Factors and Cytokines in Wound Healing. *Wound Repair and Regeneration.* 2008;16: 585-601.
32. Badr G, Badr BM, Mahmoud MH, Mohany M, Rabah DM et al. Treatment of Diabetic Mice with Undenatured Whey Protein Accelerates the Wound Healing Process by Enhancing the Expression of MIP- 1 $\alpha$ , MIP-2, KC, CX3CL1 and TGF- $\beta$  in Wounded Tissue. *BMC Immunology.* 2012;13(32):1-9.
33. Chen X, Wein Q, Hu Y, Wang C. Role of Fractalkine in Promoting Inflammation in Sepsis- Induced Multiple Organ Dysfunction. *Infection, Genetics and Evolution.* 2020;85: 104569. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104569>. Acessado online em 12/08/2023.
34. Soler R, Vianello A, Fülhase C, Wang Z, Atala A et al. Vascular Therapy for Radiation Cystitis. *Neurology and Urodynamics* 2011;30:428-34.
35. Vunjak-Novakovic et al. Dynamic Cell Seeding of Polymer Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *BiotechnolProg.* 1998; 14:193-202.
36. Davis J. *John Hopkins Hosp. Rep.* 1910;15:307.
37. Smiell JM, Treadwell T, Hahn HD, Hermans MH. Real World Experience with a Decellularized Dehydrated Human Amniotic Membrane Allograft. *Wounds.* 2015;27(6):158-69.
38. Malhotra C, Jain AK. Human Amniotic Membrane Transplantation: Different Modalities of its Use in Ophtalmology. *World J Transplant.* 2014; 24(2):111-21.
39. Fénelon M, Catros S, Meyer C, Fricain JC, Obert L et al. Applications of Human Amniotic Membrane for Tissue Engineering. *Membranes.* 2021;11:387. Acesso online em 23/06/2023 <https://doi.org/10.3390/membranes11060387>.
40. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham, E. Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. *Tissue Engineering.* 2006;12(8):2117-29.

41. Van Herendael B, Oberti C, Brosens I. Micronanatomy of the Human Amniotic Membranes. A Light Microscopic, Transmission and Scanning Electron Microscopy Study. *Am J ObstetGynaecol.* 1978;131:872-80.
42. Mohamed H. *Sci Basis Tissue Transplant.* 2001;5:139.
43. Gilber TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006; Jul;27(19):3675-83.
44. Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro. *World J Stem Cells* 2014 July 26; 6(3): 256-265.
45. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells* 2014; 6(3): 312-321 DOI: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.312>
46. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiationsensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14: 213- 22.
47. Naderi N, Combella EJ, Griffin M, Sedaghati T, Javede M et al. The Regenerative Role of Adipose Derived Stem Cell (ADSC) in Plastic and Reconstructive Surgery. *International Wound Journal.* 2017; 14(1):112-24.
48. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
49. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-95.
50. Palumbo P, Lombardi F, Siragusa G, Cifone MG, Cinque B et al. Methods of Isolation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Stem Cells (ASCs): An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:1897-1910.
51. Gouvea PQ. Avaliação de Infusão de Vesículas Extracelulares e Celulas Tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo em Modelo Experimental de Fibrose Peritoneal. *Dissertação de Mestrado. USP.* 2018.

52. Iyyanki T, Hubenak J, Liu J, Chang EI, Beahm EK et als. Haversting Technique Affects Adipose Derived Stem Cell Yiled. *Aesthetic Surgery Journal*. 2015; 2-10. Acesso online em 15JUL23. [www.aestheticsurgeryjournal.com](http://www.aestheticsurgeryjournal.com). DOI: 10.1093/asj/sju055.

53. Reumann MK, Linnemann C, Aspera-Werz RH, Arnold S, Held M et als. Donor Site Location Is Critical for Proliferation, Stem Cell Capacity, and Osteogenic Differentiation of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Implications for Bone Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2018; 19:1868-1883. Acessado online em 15JUL23. [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms). doi:10.3390/ijms19071868

54. Panetta NJ, Gupta DM, Kwan MD, et al. Tissue harvest by means of suction-assisted or third-generation ultrasound-assisted lipoaspiration has no effect on osteogenic potential of human adipose-derived stromal cells. *PlastReconstr Surg*. 2009;124(1):65–73.

55. Marco AP. Induced Auto- Regenerationwith Adipose Tissue in Humans- Beyond Frontiers of Healing. *JOJ Dermatol & Cosmet*. 2020; 3(4): 46-53. DOI: 10.19080/JOJDC.2020.03.555617.

56. Souza GMC, Amorim CCB, Vallejo CEA, Sternick MB, Costa SM et als. Fat Grafting Associated with Negative Pressure Wound Therapy. *Acta Cir Bras*. 2019;34(9):e201900907. Acessado online em 18/07/2023.

57. Piccolo NS, Piccolo MS, Piccolo MTS. Fat Grafting for Treatment of Burns, Burn Scars and Other Difficult Wounds. *Clin Plast Surg*. 2015;42:263-83.

58. Pinheiro CCG, Leyendecker Junior A, Tanikawa DYS, Ferreira JRM, Jarrahy R, Bueno DF. Is There a Noninvasive Source of MSCs Isolated with GMP Methods with Better Osteogenic Potential? *Stem Cells Int*. 2019;6:7951696. doi: 10.1155/2019/7951696. Acesso online em 10/08/2023. [www.hindawi.com](http://www.hindawi.com).

59. Junior AL, Pinheiro CCG, Tanikawa DYS, Ferreira JRM, Amano MT, Bueno DF. Mesenchymal Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth and the Orbicularis Oris Muscle: How Do They Behave When Exposed to a Proinflammatory Stimulus? *Stem Cells Int*. 2020;25:3670412. doi: 10.1155/2020/3670412. Acesso online em 10/08/2023.

60. Aguiar CC, Fusco MA. Avaliação Histológica de Diferentes Métodos de Descelularização da Membrana Amniótica Humana para Uso na Engenharia Tecidual. *TTC. IBMR – Laureate International Universities*. 2016.



61. Duarte, IGL. Membrana Amniótica como Curativo Biológico na Cicatrização de Feridas Cutâneas com Perdas de Substância: Estudo Experimental em Ratos. Tese de Doutorado - UFMG. 2014.

62. Yutong C, Chenchen L, Yang L, Yaqin Z, Xihua Y et al. Establishment of an Acute Radioactive Skin Injury Model in Wistar rats. Chinese Journal of Tissue Engineering Research. 2021; 25(2): 237-41.

63. Meirelles RPC. Modelo Experimental de Radiodermite em Coelhos. 2015. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2015.

64. Nichols E. Wound Assessment Part 1: How to Measure a Wound. Wound Essentials. 2015;10(2):51- 5.

65. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA et al. Extrato de *Passiflora edulis* na Cicatrização de Feridas Cutâneas Abertas em Ratos: Estudo Morfológico e Histológico. Acta Cirurgica Brasileira. 2006; 21(3):55-65.

66. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Keating A, Prockop DJ et als. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy. 2006; 8(4):315-17. Acessado online em 24/07/2023, [www.isct-cytotherapy.org](http://www.isct-cytotherapy.org).

67. Baptista LC, Amaral RJ, Carias RB, Aniceto M, Cláudio-da Silva C, Borojevic R. An Alternative Method for Isolation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Lipoaspirate Samples. Cytotherapy. 2009;11:706-15.

68. Yarak S, Okamoto OK. Células Tronco Derivadas de Tecido Adiposo Humano: Desafios Atuais e Perspectivas. An Bras Dermatol. 2010;85(5):647-56.

69. Coleman S R. Structural Fat Grafting. Aesthetic Surgery Journal. 1998;18(5):386-88.

70. Yin I, Li J, Wang H, Wang P, Zheng H, Li Q, Jin P. Current State of ADSC Enriched Fat Graft in Plastic Surgery. Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery. 2020; 2(4): 263-73.

71. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE et als. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24:376-85.

72. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W et als. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res* 2008; 102:77-85.

73. Carvalho MJ. Amniotic Membrane in Gynaecology. *Amniotic Membrane*. Dordrecht: Springer Netherlands;2015:165-75. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9975-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9975-1_10).

74. Marsh KM, Ferng AS, Pilikian T, Desai AA, Avery R et al. Anti-Inflammatory Properties of Amniotic Membrane Patch Following Pericardiectomy for Constrictive Pericarditis. *J Cardiothorac Surg*. 2017;12(1):6. <https://doi.org/10.1186/s13019-017-0567-7>.

75. Adamowicz J, Van Breda S, Tyloch D, Pokrywczynska M, Drewa T. Application of Amniotic Membrane in Reconstructive Urology: The Promising Biomaterial Worth Further Investigation. *Expert Opin Biol Ther*.2019;19(1):9-24.

76. Leal-Marin S, Thomas K, Nicola H, Olena P, Carsten F et al. Human Amniotic Membrane: A Review on Tissue Engineering, Application and Storage. *J Biomed Mater Res*. 2020;1-18. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34782>.

77. Saghizadeh M, Winkler MA, Kramerov AA, Hemmati DM, Ghiam CA et al. A Simple Alkaline Method for Decellularizing Human Amniotic Membrane for Cell Culture. *PLoS ONE*. 2013; 8(11): e79632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079632>.

78. Salah RA, Mohamed IK, El-Badri N. Development of Decellularized Amniotic Membrane as a Bioscaffold for Bone Marrow -Derived Mesenchymal Stem Cells: Ultrastructural Study. *J Mol Histol*. 2018;49:289-301.

79. Kurzyk A, Ostrowska B, Swieszkowski W, Podja Z. Characterization and Optimization of the Seeding Process of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffolds. *Stem Cells International*. 2019; 1-16. Article ID 1201927, <https://doi.org/10.1155/2019/1201927>. Acessado online em 03/08/2023.

80. Thevenot P, Nair A, Dey J, Yang J, Tang L. Method to analyze three-dimensional cell distribution and infiltration in degradable scaffolds. *Tissue Engineering. Part C, Methods*. 2008; 14(4):,319–31.

81. Liu Z, Tamaddon M, Gu Y, Yu J, Xu N et al. Cell Seeding Process Experiment and Simulation on Three-Dimensional Polyhedron and Cross-Link Design Scaffolds. *Bioeng Biotechnol. Sec Regenerative Medicine*. 2020;8.<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00104>. Acesso online em 03/08/2023.

82. Matsuno K, Saotome T. Effect of cell seeding methods on the distribution of cells into the gelatin hydrogel nonwoven fabric. *Regen Ther*. 2020;14(6):160-4.

83. Aghayan HR, Hosseini MS, Gholami M, Mohamad-Jahani F, Tayanloo-Beik A et al. Mesenchymal Stem Cells Seeded Amniotic Membrane as a Tissue Engineered Dressing for Wound Healing. *Drug Delivery and Translational Research*. 2022. <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00952-3>. Acessado online em 10/08/2023.

84. Hong SH, Lee MH, Koo AM, Seon GM, Park YJ et al. Stem Cell Passage Affects Directional Migration of Stem Cell in Electrotaxis. *Stem cell Research*. 2019; 38:101475. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101475>. Acesso online em 03/08/2023.

85. Bernhardt T, Kriesen S, Manda K, Schlie C, Panzer R et al. Induction of Radiodermatitis in Nude Mouse Model Using Gamma Irradiator IBL 637. *Skin Pharmacol Physiol*. 2022;35(4):224-34.

86. Fares F, Fares B, Azzam N, Nashashibi M, Nevelsky A et al. An Innovative Complexo of Benzene- Poly-Carboxylic Acid and Molybdenum for Prevention and Treatment of Radiation Dermatitis. *Med Chem*. 2015;5:447-51.

87. Zu G, Dou Y, Tian Q, Wang H, Zhao W et al. Role and Mechanism of Radiological Protection Cream in Treating Radiation Radiodermatitis in Rats. *J Tradit Chin Med*.2014;34(3):329-37.

88. Sultan SM, Stern CS, Allen Jr RJ, Thanik VD, Chang CC et al. Human Fat Grafting Alleviates Radiation Skin Damage in a Murine Model. *Plast Reconstr Surg*. 2011;128:363-72.

89. Isakson M, Blacam C, Whelam D, McArdle A, Clover AJP. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound healing: Current Evidence and Future Potencial. *Stem Cells International*. 2015; ID 831095. Acessado em 10/08/2023. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/831095>

90. Wijerathne H, Langston JC, Yang Q, Sun S, Miyamoto C et al. Mechanisms of Radiation- Induced Endothelium Damage: Emerging Models and Technologies. *Radiotherapy and Oncology*. 2021;158:21-32.

91. Müller K, Meineke V. Radiation Induced Alterations in Cytokines Production by Skin Cells. *Experimental Hematology*. 2007;35:96-104.

92. Muñoz- Carrillo JI, Contreras- Cordero JF, Gutierrez-Coronado O, Villalobos-Gutierrez PT, Ramos- Garcia RM et al. Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens in Immune Response Activation and Immunomodulation. *In: Tyagi RK, Bisen PS. Immune Response Activation and Modulation*. Reino Unido: IntechOpen, 2019.p.9-38.

93. Friston D, Junttila S, Lemes JBP, Laycock H, Torres-Perez JV et al. Leptin and Fractalkine: Novel Subcutaneous Cytokines in Burn Injury. *Disease Models & Mechanism*. 2020;13: dmm042713.doi:10.1242/dmm.042713.

94. Ishida Y, Gao JL, Murphy PM. Chemokine Receptor CX3CR1 Mediates Skin Wound Healing by Promoting Macrophage and Fibroblast Accumulation and Function. *J Immunol*. 2008;180:569-79.

95. Chung E, Ahn W, Son Y. CXCL5 Abundant in Wound Fluid at the Late Phase of Wound Healing Possibly Promoting Migration of Mesenchymal Stem Cells and vascular Tube Formation. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014;11(4):317-22.

96. Chen C, Lin LY, Chen JW, Chang TT. CXCL5 Supression Recovers Neovascularization and Accelerates Wound Healing in Diabetes Mellitus. *Cardiovascular Diabetology*. 2023;22(1):172. <https://doi.org/10.1186/s12933-023-01900w>. Acessado online em 14/08/2023.

97. Lee D, Kim DW, Yoon S, Nam AR, Lee KH et al. CXCL5 Secreted by Macrophages During Cold Exposure Mediates with White Adipose Tissue Browning. *J Lipid Res.* 2021;62; 100117. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2021.100117>. Acessado em 14/08/2023.
98. Zhang H, Ning H, Banie L, Wang G, Lin G et al. Adipose- Tissue Derived Stem Cell Secrete CXCL5 Cytokine with Chemoattractant and Angiogenic Properties. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2010; 402: 560-4.
99. Lee D, Lee KH, Kim DW, Yoon S, Cho JY. CXCL5 Inhibits Excessive Oxidative Stress by Regulating White Adipocyte Differentiation. *Redox Biology.* 2022; 54:102359. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102359>. Acessado em 15/08/2023.
100. Korbecki J, Maruszewska A, Bosiacki M, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. The Potential Importance of CXCL1 in the Physiologicla State and in Noncancer Diseases of the Cardiovascular System, Respiratory System and Skin. *Int J Mol Sci.* 2023;24(205). <https://doi.org/10.3390/ijms24010205>.
101. Armstrong DA, Major JA, Chudyk A, Hamilton TA. Neutrophil Chemoattractant Genes KC and MIP-2 are Expressed in Different Cell Populations at Sites of Surgical Injury. *J Lekoc Biol.* 2004;75:641-8.



## APÊNDICE 1: TCLE da coleta de Lipoaspirado



MARINHA DO BRASIL  
HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS  
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Paciente,

A Sra. está sendo convidada a participar de um estudo clínico denominado: **“Análise Comparativa do Uso de Células da Fração Vásculo-Estromal (FVE) e de Células Tronco Mesenquimais Culturadas (Derivadas de Adipócitos) em lesões Radio induzidas: Efeitos na Cicatrização de Feridas”**. A Sra. foi selecionada por ser candidata a cirurgia de abdominoplastia reparadora, pela Clínica de Cirurgia Plástica. Sua participação não é obrigatória e não implicará em nenhum custo adicional. A qualquer momento a Sra. poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo para o seu tratamento. Após receber todas as informações abaixo relacionadas pelo seu médico, ele lhe perguntará se a Sra. deseja participar deste estudo, doando, para a pesquisa, o tecido adiposo (gordura) que será retirado de seu abdome durante a cirurgia reparadora. Caso aceite participar, a Sra. deverá fornecer o seu consentimento por escrito.

#### **O estudo e seus objetivos**

A gordura humana é, conhecidamente, uma fonte de células tronco e podem auxiliar na cicatrização de feridas difíceis de tratamento, como úlceras crônicas e queimaduras relacionadas à radiação, como aquela após uma sessão de radioterapia. Assim, o objetivo deste estudo é analisar se realmente a gordura humana possui estas células e como elas se comportam quando estão associadas à curativos em feridas crônicas, decorrentes de radiação. Sua gordura será tratada e as células serão isoladas para, então, serem usadas em feridas após radiação, em ratos de laboratório. Dessa forma, será possível concluir o papel das células tronco da gordura humana na cicatrização de feridas, mesmo que ainda em caráter experimental.

#### **Descrição dos Procedimentos do Estudo**

A gordura será retirada da região do abdome que será operado, através de cânulas de lipoaspiração, utilizando-se apenas a aspiração do local a ser retirado na cirurgia de abdominoplastia. Ou seja, a parte do abdome, que será retirado e desprezado, será aspirada para a coleta da gordura e somente esta parte.

Por este Termo de Consentimento, a Sra. doará para o estudo a quantidade de gordura aspirada que é retirada durante a abdominoplastia, sem, com isso, aumentar a região operada e sem aumentar as cicatrizes inerentes à cirurgia. Este procedimento para a doação de gordura será realizado durante a cirurgia, estando a Sra. anestesiada, conforme a técnica escolhida pelo seu anestesista (anestesia geral, raquidiana ou peridural), não havendo, portanto, interferência no seu procedimento.

Após a coleta da sua gordura, o cirurgião continuará normalmente sua cirurgia e sua gordura será encaminhada ao Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias, onde se iniciarão as pesquisas com as células.

### **Benefícios**

Os benefícios da sua participação neste estudo estão relacionados ao maior entendimento sobre o potencial de cicatrização das células tronco derivadas da gordura, trazendo informações que podem auxiliar em futuros tratamentos de feridas crônicas.

### **Riscos**

Os riscos relacionados com a sua participação neste estudo são apenas os inerentes à cirurgia proposta de abdominoplastia, conforme detalhado em termo de consentimento livre e esclarecido, fornecido pela Clínica de Cirurgia Plástica, no momento da marcação de sua cirurgia. Sua participação não determina nenhum risco adicional ou dano à sua saúde e é isenta de remuneração ou ônus, sendo o maior risco do estudo, a perda de confidencialidade. Como forma de proteção, todas suas informações serão mantidas em confidencialidade e sigilo.

### **Despesas**

O estudo não acarretará nenhuma despesa extra para o participante da pesquisa, uma vez que se trata de doação de material a ser retirado durante o procedimento cirúrgico proposto e indicado pela Clínica de Cirurgia Plástica. As despesas decorrentes do procedimento – cirurgia de abdome- serão cobradas normalmente, conforme normas da Indenização Médico Hospitalar (IMH) do Hospital e da MB.

Além disso, sua participação é isenta de remuneração ou ônus, pois o material e os dados necessários ao estudo serão coletados durante sua internação.

### **Aspectos éticos do estudo**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital, em consonância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Se a Sra. decidir participar, deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando o seu acordo em participar espontaneamente e confirmando que leu e entendeu todas as informações contidas neste termo. Este termo é composto por três páginas e será assinado em duas vias.

É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que desejar sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

A Sra. terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa e terá o direito de fazer qualquer pergunta ao médico sobre o estudo. Ele responderá de forma compreensível para que a Sra. não tenha nenhuma dúvida e lhe informará, imediatamente, caso surja informações novas que possam afetar a sua decisão sobre a participação do estudo.

A médica principal deste estudo é a Dra. Angélica Maria Schettino, que poderá ser encontrada na Clínica de Cirurgia Plástica do Hospital Naval Marcílio Dias situado a Rua Cesar Zama 185 – Lins de Vasconcelos – Rio de Janeiro – RJ – Telefone (21) 2599-5442 – e-mail: angelicaschettinot@yahoo.com.br

Se a Sra. tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias situado a Rua Cesar Zama 185 – Lins de Vasconcelos – Rio de Janeiro – RJ – Telefone (21) 2599-5599 – e-mail: cep@hnmd.mar.mil.br

### **Direito de Confidencialidade**



Todos os registros identificando a Sra. serão mantidos em sigilo e sua identidade será conhecida apenas pelo seu médico e as pessoas envolvidas neste estudo. As informações obtidas sobre a Sra. serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente, mesmo em publicação dos resultados. A Sra. será tratada anonimamente, através de uma sequência numérica, durante toda a condução do estudo e os resultados desta pesquisa serão revelados também de forma anônima. A Sra tem o direito de recusar participar do estudo e a sua decisão não influenciará em nada o seu atendimento neste Hospital.

O material e os dados coletados poderão ser utilizados em outros estudos, caso haja interesse de outros pesquisadores, permitindo a utilização de informações cadastrais, assim como dos dados obtidos neste estudo, em pesquisas futuras, observando-se as mesmas garantias descritas neste Termo.

Os dados coletados serão armazenados de acordo com os requerimentos legais e considerando-se as regulamentações brasileiras para a proteção de dados.

Ao assinar este Termo de Consentimento, a Sra. autoriza o Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital e pesquisadores deste estudo a examinar seus registros médicos no local da pesquisa para monitorização dos dados.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou foram lidas para mim sobre o estudo “**Análise Comparativa do Uso de Células da Fração Vásculo-Estromal (FVE) e de Células Tronco Mesenquimais Culturadas (Derivadas de Adipócitos) em lesões Radio induzidas: Efeitos na Cicatrização de Feridas**” e que recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Eu tratei pessoalmente com a Dra. Angélica Maria Schettino sobre minha decisão em participar deste estudo. Está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é isenta de despesas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste estudo.

Paciente/Representante Legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Investigador:  
Angélica Maria Schettino

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

## APÊNDICE 2: TCLE da coleta de Placenta



MARINHA DO BRASIL  
HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS  
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezada Paciente,

A Sra. está sendo convidada a participar de um estudo clínico denominado: **“Análise Comparativa do Uso de Células da Fração Vásculo-Estromal (FVE) e de Células Tronco Mesenquimais Culturas (Derivadas de Adipócitos) em lesões Radio induzidas: Efeitos na Cicatrização de Feridas”**. A Sra. foi selecionada para participar deste projeto pela possibilidade de ser submetida à cirurgia de cesareana. Sua participação não é obrigatória e não implicará em nenhum custo adicional, bem como em nenhum risco à Sra. ou ao seu bebê. A qualquer momento, a Sra. poderá desistir de participar e retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo para o seu tratamento. Após receber todas as informações abaixo relacionadas pelo seu médico, ele lhe perguntará se a Sra. deseja participar deste estudo, doando a placenta. Caso aceite participar, a Sra. deverá fornecer o seu consentimento por escrito.

#### O estudo e seus objetivos

A membrana amniótica humana, parte componente da placenta, é conhecidamente um material biológico bastante utilizado como curativo, por auxiliar na cicatrização de feridas difíceis de tratamento, como úlceras crônicas e queimaduras relacionadas à radiação, como aquela após uma sessão de radioterapia, por exemplo. Assim, o objetivo deste estudo é analisar a membrana amniótica humana como curativo, inicialmente de modo experimental, em ratos de laboratório.

#### Descrição dos Procedimentos do Estudo

Por este Termo de Consentimento, a Sra. doará para o estudo a placenta, que é retirada e descartada na cirurgia cesareana. Assim, o procedimento para doação da placenta será realizado durante a sua cirurgia, normalmente, não havendo, portanto, interferência no seu procedimento.

Após a retirada da placenta, o cirurgião continuará normalmente sua cirurgia e a placenta será encaminhada ao Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do Hospital Naval Marcílio Dias, onde se iniciarão as pesquisas.

#### Benefícios

Os benefícios da sua participação neste estudo estão relacionados ao maior entendimento sobre o potencial de cicatrização da membrana amniótica humana, em feridas de difícil tratamento, trazendo informações que podem auxiliar na melhoria do tratamento destas feridas em um futuro próximo.

#### Riscos

Os riscos relacionados com a sua participação neste estudo são os inerentes à cirurgia cesariana, conforme detalhado e explicado pelos médicos da Clínica de Obstetrícia, durante consulta/atendimento pré natal. Portanto, este estudo não oferece qualquer risco adicional àquele relacionado à cirurgia, nem a Sra., nem ao bebê, uma vez que será doado o material (placenta) que é retirado durante o parto. Assim, sua participação não determina nenhum risco adicional ou dano à sua saúde e é isenta de remuneração ou ônus, sendo o maior risco do estudo, a perda de confidencialidade. Como forma de proteção, todas suas informações serão mantidas em confidencialidade e sigilo.

### **Despesas**

O estudo não acarretará nenhuma despesa extra para o participante da pesquisa, uma vez que se trata de doação de material a ser retirado durante parto. As despesas decorrentes do procedimento – parto- serão cobradas normalmente, conforme normas da Indenização Médico Hospitalar (IMH) do Hospital e da MB.

Além disso, sua participação é isenta de remuneração ou ônus, pois o material e os dados necessários ao estudo serão coletados durante sua internação.

### **Aspectos éticos do estudo**

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital em consonância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Se a Sra. decidir participar, deverá primeiramente assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando o seu acordo em participar espontaneamente e confirmando que leu e entendeu todas as informações contidas neste termo. Este termo é composto por três páginas e será assinado em duas vias.

É garantida a sua liberdade de se retirar deste estudo a qualquer hora que desejar sem causar nenhum prejuízo à continuidade do seu tratamento nesta instituição.

A Sra. terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa e terá o direito de fazer qualquer pergunta ao médico sobre o estudo. Ele responderá de forma compreensível para que a Sra. não tenha nenhuma dúvida e lhe informará, imediatamente, caso surjam informações novas que possam afetar a sua decisão sobre a participação do estudo.

A médica principal deste estudo é a Dra. Angélica Maria Schettino, que poderá ser encontrada na Clínica de Cirurgia Plástica do Hospital Naval Marcílio Dias, situado à Rua Cesar Zama, 185 – Lins de Vasconcelos – Rio de Janeiro – RJ – Telefone (21) 2599-5442 – e-mail: angelicaschettinot@yahoo.com.br

Se a Sra. tiver alguma dúvida ou consideração sobre a ética desta pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Naval Marcílio Dias situado a Rua Cesar Zama 185 – Lins de Vasconcelos – Rio de Janeiro – RJ – Telefone (21) 2599-5599 – e-mail: cep@hnmd.mar.mil.br

### **Direito de Confidencialidade**

Todos os registros, identificando a Sra., serão mantidos em sigilo e sua identidade será conhecida apenas pelo seu médico e pelas pessoas envolvidas neste estudo. As informações obtidas sobre a Sra. serão analisadas em conjunto com as de outras pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente, mesmo em publicação dos resultados. A Sra. será tratada anonimamente, através de uma sequência numérica, durante toda a condução do estudo e os resultados desta pesquisa serão revelados também de forma anônima. A Sra tem o direito de recusar participar do estudo e a sua decisão não influenciará em nada o seu atendimento neste Hospital.

O material e os dados coletados poderão ser utilizados em outros estudos, caso haja interesse de outros pesquisadores, permitindo a utilização de informações cadastrais, assim como dos dados obtidos neste estudo, em pesquisas futuras, observando-se as mesmas garantias descritas neste Termo.

Os dados coletados serão armazenados de acordo com os requerimentos legais e considerando-se as regulamentações brasileiras para a proteção de dados.

Ao assinar este Termo de Consentimento, a Sra. autoriza o Comitê de Ética em Pesquisas deste hospital e pesquisadores deste estudo a examinar seus registros médicos no local da pesquisa para monitorização dos dados.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou foram lidas para mim sobre o estudo “**Análise Comparativa do Uso de Células da Fração Vásculo-Estromal (FVE) e de Células Tronco Mesenquimais Culturadas (Derivadas de Adipócitos) em lesões Radio induzidas: Efeitos na Cicatrização de Feridas**” e que recebi uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Eu tratei, pessoalmente, com a Dra. Angélica Maria Schettino sobre minha decisão em participar deste estudo. Está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação neste estudo é isenta de despesas. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento.

Paciente/Representante Legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Investigador: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura

Data: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

### APÊNDICE 3: Tabela de Coeficientes de Correlação de Spearman entre as Citocinas e as áreas das feridas

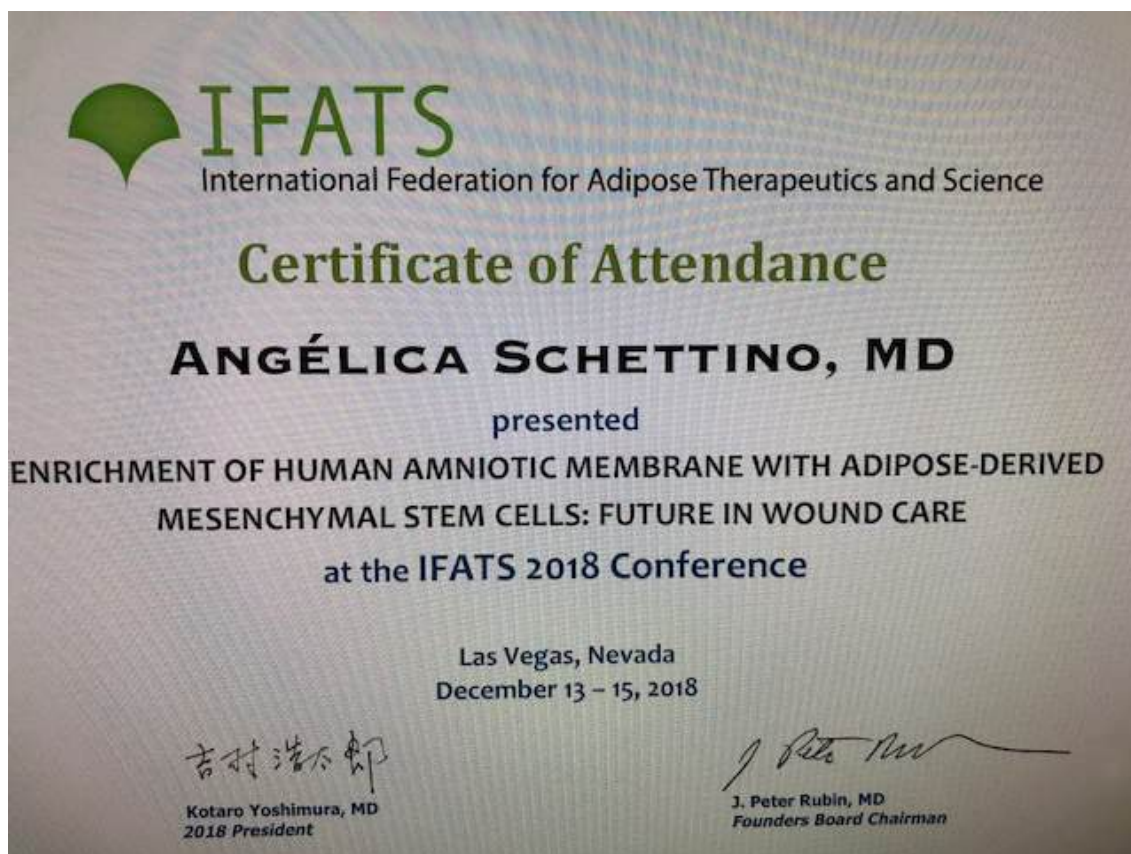
Coeficientes de correlação de Spearman ( $r_s$ ) entre as citocinas e as áreas das feridas em ratos experimentais, segundo os grupos e os momentos das										
Citocinas		Correlações de Spearman ( $r_s$ ) com as áreas das feridas								
		G1: Neomicina (n=5)			G2: MAH (n=8)			G3: CTMDA (n=7)		
		D30	D35	D30-D35	D30	D35	D30-D35	D30	D35	D30-D35
GM-CSF	$r_s$	0,205	-0,100	-0,400	0,467	0,222	-0,321	0,336	0,321	-0,445
	p-valor	0,741	0,873	0,505	0,243	0,597	0,438	0,461	0,483	0,317
EOTAXINA	$r_s$	-0,616	-0,900	0,500	-0,216	0,012	0,321	-0,126	-0,291	0,018
	p-valor	0,269	0,037	0,391	0,608	0,977	0,438	0,788	0,527	0,969
IL 1 $\alpha$	$r_s$	-0,205	-0,300	0,300	-0,311	0,074	0,442	0,306	0,109	-0,414
	p-valor	0,741	0,624	0,624	0,453	0,862	0,272	0,504	0,816	0,355
LEPTINA	$r_s$	0,359	-0,100	-0,500	0,500	0,516	0,446	0,396	0,655	-0,126
	p-valor	0,553	0,873	0,391	0,207	0,191	0,268	0,379	0,111	0,788
MIP 1 $\alpha$	$r_s$	-0,368	-0,667	0,359	-0,120	0,173	0,085	-0,631	-0,400	0,577
	p-valor	0,542	0,219	0,553	0,778	0,682	0,842	0,129	0,374	0,175
IL 1 $\beta$	$r_s$	-0,154	-0,100	0,100	0,119	0,160	0,072	-0,414	-0,291	0,252
	p-valor	0,805	0,873	0,873	0,779	0,706	0,865	0,355	0,527	0,585
IL 2	$r_s$	-0,026	-0,103	0,154	0,119	0,246	0,265	0,360	0,618	-0,090
	p-valor	0,966	0,870	0,805	0,779	0,558	0,526	0,427	0,139	0,848
IL 6	$r_s$	0,154	0,100	0,000	0,072	0,235	0,170	-0,234	-0,145	0,072
	p-valor	0,805	0,873	1,000	0,866	0,576	0,688	0,613	0,756	0,878
IL 12p70	$r_s$	-0,132	-0,205	0,205	0,071	0,184	0,301	0,450	0,218	-0,559
	p-valor	0,833	0,741	0,741	0,867	0,662	0,468	0,310	0,638	0,192
IFN $\gamma$	$r_s$	-0,526	-0,872	0,410	-0,252	0,037	0,345	-0,216	-0,218	0,054
	p-valor	0,362	0,054	0,493	0,548	0,931	0,402	0,641	0,638	0,908
IL 18	$r_s$	-0,359	-0,700	0,300	0,000	0,172	0,313	0,234	0,400	-0,180
	p-valor	0,553	0,188	0,624	1,000	0,684	0,450	0,613	0,374	0,699
TNF $\alpha$	$r_s$	-0,359	-0,600	0,400	-0,095	0,184	0,253	0,245	0,385	-0,327
	p-valor	0,553	0,285	0,505	0,823	0,662	0,545	0,596	0,393	0,474
IL 5	$r_s$	0,395	-0,103	-0,462	0,262	-0,074	0,012	0,577	0,582	-0,523
	p-valor	0,511	0,870	0,434	0,531	0,862	0,977	0,175	0,170	0,229
IL 17A	$r_s$	0,564	0,600	-0,400	0,333	0,393	0,410	0,450	0,655	-0,342
	p-valor	0,322	0,285	0,505	0,420	0,336	0,313	0,310	0,111	0,452
MCP-1	$r_s$	0,872	0,700	-0,800	0,214	0,356	0,410	-0,108	0,036	0,270
	p-valor	0,054	0,188	0,104	0,610	0,387	0,313	0,818	0,938	0,558
IP-10	$r_s$	-0,872	-1,000	0,800	0,310	0,405	0,566	0,396	0,291	-0,342
	p-valor	0,054	<0,01	0,104	0,456	0,319	0,143	0,379	0,527	0,452
GRO/KC/CIN	$r_s$	-0,500	-0,667	0,564	0,000	0,160	0,253	-0,270	0,000	0,324
	p-valor	0,391	0,219	0,322	1,000	0,706	0,545	0,558	1,000	0,478
FRACTALKIN	$r_s$	-0,205	-0,300	0,300	0,048	0,233	0,253	0,613	0,837	-0,396
	p-valor	0,741	0,624	0,624	0,911	0,578	0,545	0,144	0,019	0,379
LIX	$r_s$	-0,872	-0,900	0,900	0,381	0,577	0,289	-0,234	0,127	0,450
	p-valor	0,054	0,037	0,037	0,352	0,134	0,487	0,613	0,786	0,310
MIP-2	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,190	0,000	-0,036	-0,414	-0,218	0,360
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,651	1,000	0,932	0,355	0,638	0,427
RANTES	$r_s$	0,154	-0,200	-0,300	0,683	0,525	0,218	0,337	0,396	-0,056
	p-valor	0,805	0,747	0,624	0,062	0,182	0,604	0,460	0,379	0,905
G-CSF	$r_s$	-0,342	-0,359	0,462	0,096	0,420	0,406	-0,252	-0,455	0,144
	p-valor	0,573	0,553	0,434	0,821	0,300	0,318	0,585	0,305	0,758
IL 4	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,619	-0,454	-0,193	-0,252	-0,364	0,306
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,102	0,258	0,647	0,585	0,423	0,504
IL 13	$r_s$	-0,725	-0,707	0,707	-0,026	0,237	0,355	0,219	0,140	-0,219
	p-valor	0,165	0,182	0,182	0,952	0,572	0,388	0,638	0,764	0,638
IL 10	$r_s$	-0,154	-0,500	0,200	0,096	0,056	-0,018	-0,324	-0,127	0,270
	p-valor	0,805	0,391	0,747	0,821	0,896	0,966	0,478	0,786	0,558
EGF	$r_s$	-0,462	-0,400	0,600	-0,024	0,098	0,229	-0,306	-0,164	0,198
	p-valor	0,434	0,505	0,285	0,955	0,817	0,586	0,504	0,726	0,670
VEGF	$r_s$	-0,616	-0,700	0,700	-0,762	-0,442	0,036	-0,180	-0,200	-0,036
	p-valor	0,269	0,188	0,188	0,028	0,273	0,932	0,699	0,667	0,939

**APÊNDICE 4:** Tabela de dados do grupo controle

Valores brutos das citocinas, em µg/g, nos 4 ratos controles (sem intervenção ou irradiação)						
Citocinas		Ratos experimentais				Média
		1	2	3	4	
Pró-inflamatórias	GM-CSF	198	513.262	79.762	129.879	180.775
	EOTAXINA	53,4	24,0	19,7	15,5	28,1
	IL 1 $\alpha$	301	7.433	7.433	1.920	4.272
	LEPTINA	14.364	2.379	1.646	6.730	6.280
	MIP 1 $\alpha$	25,7	4,2	2,6	5,2	9,4
	IL 1 $\beta$	269	121	113	64	142
	IL 2	213,0	5,5	5,0	5,5	57,3
	IL 6	3.174	497	293	248	1.053
	IL 12p70	27,3	10,9	14,5	13,2	16,5
	IFN $\gamma$	2.135	29	49	24	559
	IL 18	2.026	1.704	1.231	1.372	1.583
	TNF $\alpha$	24,6	28,3	25,1	32,9	27,7
	IL 5	205	110	70	92	119
	IL 17A	68,2	7,3	4,8	6,0	21,6
	MCP-1	608	189	166	234	299
	IP-10	38,7	19,2	16,5	10,2	21,1
	GRO/KC/CINC1	201,4	0,0	0,0	0,0	50,4
	FRACTALKINE	280	75	45	58	114
LIX	417	3.328	6.380	3.939	3.516	
MIP-2	656,9	6,4	1,7	9,0	168,5	
RANTES	442	50	31	44	142	
Anti-inflamatórias	G-CSF	5,8	2,1	1,8	2,3	3,0
	IL 4	106	101	115	79	100
	IL 13	62,9	24,2	4,9	18,7	27,7
	IL 10	142,4	5,0	1,6	4,3	38,3
Fatores de crescimento	EGF	4,8	14,6	13,7	17,8	12,7
	VEGF	131	212	309	106	189



**Anexo A:** Certificado apresentação Poster. Congresso IFATS, Dezembro/ 2018.





**Anexo B:** Certificado de apresentação ASPS, outubro/ 2022.



*Certificate of Presentation*

**The American Society of Plastic Surgeons® (ASPS®)**  
certifies that

***Angelica Schettino, MD***

Presented and authored a Global Partner E-Poster On-Demand entitled

**“Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Amniotic Membrane for the  
Treatment of Experimental Radiodermatitis”**

presented during the activity titled

***Plastic Surgery 2022***

in Boston, MA – October 27 – October 30, 2022

The American Society of Plastic Surgeons is accredited by the Accreditation Council for Continuing Medical Education (ACCME) to provide continuing medical education for physicians.

***Mary Ellen Bogucki***

*Mary Ellen Bogucki*

*Educational Programs Administrator*

*American Society of Plastic Surgeons, Arlington Heights, Illinois*

## Anexo C: Certificado de 1º Lugar Categoria Poster, Jornada Científica do HNMD

