

BRUNA ANDRADE AGUIAR KOGA

**Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes
(PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco
mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele**

São Paulo

2020

BRUNA ANDRADE AGUIAR KOGA

**Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes
(PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco
mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira
Nishiyama

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Árcio da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

| | |
|-----------------|--|
| T. 4015 FMVZ | <p>Koga, Bruna Andrade Aguiar Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele / Bruna Andrade Aguiar Koga. – 2020. 155 f. : il.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Oliveira Carneira Nishiyama. Coorientadora: Profa. Dra. Paula Fratini.</p> <p>1. Cicatrização de feridas. 2. PDGF-BB. 3. VEGF. 4. Células-tronco mesenquimais. 5. Exossomos. I. Título.</p> |
|-----------------|--|

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 19 de outubro de 2020
CEUA N 8941120916

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título da proposta: "Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 007872)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 12/agosto/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezada Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP, solicito as seguintes alterações para o projeto de doutorado número 8941120916: 1-Troca do modelo de estudo in vitro: De: de células-tronco mesenquimais de pele humanas Para: células-tronco mesenquimais adiposas caninas. 2- Inserção de objetivo: nº 6-Isolar, cultivar e caracterizar CTMs de tecido adiposo canino quanto ao perfil de marcadores de superfície, por citometria de fluxo, segundo o painel determinado pela ISSR(DOMINICI et al., 2006)sua capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos, condrócitos; 3-Inserção da metodologia: nº 4.3 Isolamento e Cultivo celular Para os ensaios propostos serão utilizadas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino. Para tanto serão utilizadas amostras de tecido adiposo abdominal, provenientes de cães com aproximadamente 2-3 anos, sem raça definida, de campanha de castração no estado de São Paulo. Após coletada, a amostra será acondicionada em meio de cultura com 1xampicilina/estreptomicina e armazenada em caixas térmicas a 4°C. Em seguida, as amostras serão pesadas e em fluxo estéril, lavadas 5x em meio sem SFB contendo antibióticos (amp/strep/cipro), utilizando tubos Falcon de 50 mL. Após, utilizando bisturi o tecido será dissociado e homogenizado e então transferido para 5mL de solução Colagenase a 1mg/mL em meio estéril sem SFB com antibióticos, incubado de 40 min a 1h a 37°C agitando a cada 10 min. Após esse período, a ação enzimática será interrompida com 10 mL de meio com soro, filtrada utilizando filtro CellStrainer 100 µm, e centrifugada por 800rpm 5 min. O sobrenadante lipídico será descartado e o pellet ressuspendido em 10mL de meio com soro e centrifugado novamente. Descartado sobrenadante, meio novo será adicionado ao pellet, e as células serão observadas em microscópio e incubadas a 37°C em estufa com saturação de 5% CO2. No dia seguinte o meio será trocado, e trocas a cada 2 dias serão feitas até as células atingirem a confluência. As células serão mantidas em meio Alfa MEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (100 U/mL) / estreptomicina (100 µg/mL). Para subcultivo será utilizada solução contendo tripsina. Os experimentos serão realizados com as células em até sétima passagem. As células serão congeladas em criotubos em 90% SFB contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas em tanques de nitrogênio. Todas as células utilizadas neste estudo serão testadas para a presença de diferentes espécies de micoplasmas/ureaplasma por teste de PCR (reação da cadeia em polimerase), de acordo com protocolos operacionais padrões do NUCEL. Justificativas: Uso de células humanas como proposto inicialmente, foi impossibilitado pela inviabilidade na qualidade das células selecionadas e pela demora na aprovação para nova obtenção de células humanas. Visto que o acesso à campanha de castração canina e consentimento de responsável técnico e tutores para coleta de amostra de tecido adiposo durante a castração, são alternativas viáveis, decidiu-se que a referida fonte seria melhor indicada para isolamento das células, podendo gerar dados aplicáveis à medicina veterinária, bem como estudos translacionais, sem alterar o objetivo inicial. Os documentos referente às alterações estão anexados à emenda. *.

Comentário da CEUA: "Aprovado".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: KOGA, Bruna Andrade Aguiar

Título: Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorem Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo André que sonha os meus sonhos e os realiza comigo.

Aos meus pais e à minha irmã, minha família que sempre me deu seu apoio incondicional.

À memória de Ady Rocha, que ansiou por esse momento, mas partiu antes...

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por toda proteção e bênçãos em minha vida.

Agradeço ao meu esposo André por ser um parceiro inigualável, por ser meu porto seguro, por ter passado todos esses anos que eu dediquei a este projeto me apoiando, incentivando, inspirando, não me deixando desistir, realizando junto comigo os meus sonhos, mesmo que para isso tivéssemos que estar separados por seis meses e 10 mil quilômetros, e talvez adiando tantos outros sonhos. Não há palavras para agradecer toda a sua dedicação a mim e a nossa família, sou eternamente grata e por me dar a nossa Bistequinha, que doa diariamente o amor mais puro que existe, traz alegria, torna tudo mais leve e divertido.

Agradeço aos meus pais e minha irmã, Adson, Cláudia e Nathália, por ser minha base, por todo apoio que sempre me deram nessa caminhada de formação que exigiu que morássemos longe desde o começo, mas que nunca influenciou no amor que sentimos uns pelos outros. Toda minha gratidão por sempre acreditarem em mim.

Agradeço a minha avó Matildes por ser meu exemplo de generosidade, amor e cuidado, e a minha avó Ady, a minha pequena Dizinha, tão tranqüila e divertida, que se foi, tornando minha caminhada muito mais difícil, mas que está viva em meu coração e distância alguma é capaz de apagar o amor que sinto por elas, nem mesmo a morte...

Agradeço aos meus sogros Paulo e Rosa, aos meus cunhados Marcos, Paula, Fábio e Liz, e também às princesinhas da família Isabel e Yasmin, obrigada por todo acolhimento e carinho todos esses anos, com toda certeza com vocês fui e sou mais forte para poder superar qualquer coisa.

Agradeço à Maria Angélica Arroyo pela mentoria que muito me ajudou nessa reta final de produção da tese. Agradeço a todos os meus verdadeiros amigos por todo incentivo e parceria.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88882.327814/2019-01. Agradeço às agências de fomento FAPESP e CNPq, que de forma direta ou indireta viabilizaram o desenvolvimento do estudo.

Agradeço ao grupo NUCEL, à coordenadora professora Mari Cleide Sogayar por me acolher e ensinar, e toda equipe que se tornou uma família e uma rede de apoio ao longo desse tempo, obrigada a todos os amigos.

Agradeço ao Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, à FMVZ, e à USP, por viabilizar todos os processos necessários para minha formação, bem como os técnicos que sempre disponibilizaram todo suporte técnico para tal, bem como ao CADI-FMVZ, para obtenção de imagens.

Agradeço ao colega veterinário Dr. Rafael Hayashi por sua colaboração na campanha de castração onde pude obter as amostras para meu estudo.

Agradeço ao Dr. Tiago Goss do AC Camargo por sua colaboração inicial no processo de análise de vesículas, e também a técnica Ethiene que solícitamente ajudou.

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Silveira por sua colaboração, viabilizando as análises de vesículas extracelulares no Campus USP Pirassununga, bem como o seu aluno Jorge Pinzon, por me auxiliar diretamente nas análises com muita paciência, sempre que necessário.

Agradeço ao programa PrInt USP e ao programa Globalink-MITACS da Universidade de Montreal pela oportunidade de desenvolver um doutorado sanduíche, e ao professor Dr. Lawrence Smith por me receber e orientar durante o mesmo, e agradeço à técnica Jacinthe Therrien por toda paciência e ensinamentos durante esse estágio, bem como aos amigos Rafael Sampaio, Adriana Anunciação e Laura Franco, por serem como uma família durante esse período no exterior.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira, pela orientação e oportunidade de me juntar ao seu time, e mesmo que inicialmente o estudo não fosse uma área que eu conhecia, não impediu que fosse aceita, treinada e incentivada continuamente a aprender sempre mais, agradeço por todo apoio e parceria.

“Existem apenas duas maneiras de viver a vida. Uma como se nada fosse um milagre. A outra é como se tudo fosse um milagre.”

Atribuído a Albert Einstein

RESUMO

KOGA, B. A. A. **Efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes (PDGF-BB e/ou VEGF165) no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização de pele.** 2020. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A Medicina Regenerativa visa alcançar tratamentos que acelerem as diferentes fases do processo de cicatrização em humanos e animais e a manipulação da composição dos fatores de crescimento (FC) pode melhorar ou modificar o processo de reparo e remodelação dos tecidos lesados, bem como proporcionar cicatrizes mais estéticas e funcionais. O presente estudo objetivou avaliar o efeito dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes humanos derivado de plaquetas (PDGF-BB) e/ou de crescimento endotelial e/ou vascular (VEGF165) em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (canino) e de medula óssea (equino) e seu secretoma, e em modelo de cicatrização de pele em ratos nude Rowett. Os FC foram obtidos a partir de meios purificados por cromatografia de afinidade a heparina e caracterizados por ELISA e *Western blot*, e foram utilizados em tampão como veículo ou em hidrogel de alginato 2%. As células foram obtidas, caracterizadas, cultivadas e tratadas com FC e o meio condicionado foi utilizado para isolamento de exossomos. O modelo animal de cicatrização de feridas foi estabelecido em ratos nude Rowett, onde foram aplicados 3µg/mL de FC sozinhos ou combinados em feridas no dorso dos animais, e após 7 dias a evolução da cicatrização foi avaliada macroscópica e histopatologicamente. O presente estudo demonstrou pela primeira vez o potencial da suplementação de rhPDGF-BB e/ou rhVEGF165 na cicatrização de feridas cutâneas em sete dias, estimulando angiogênese, reação de fibroblastos e reepitelização. O hidrogel de alginato 2% mostrou ser a melhor abordagem para ser usada como veículo para aplicações de FC *in vivo* em relação ao tampão veículo, mas não em ensaios *in vitro*. O tratamento com ambos os fatores combinados melhorou o perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo estimulando a migração celular e a secreção de exossomos. O estudo demonstrou pela primeira vez que o tratamento com rhVEGF165 estimulou proliferação celular, o perfil angiogênico e a secreção de exossomos por células-

tronco mesenquimais de medula óssea equina. Juntos os dados embasam futuras investigações sobre efeito da suplementação com FC *in vitro*, no conteúdo celular e molecular do secretoma de células-tronco mesenquimais, e *in vivo* em um modelo seguro e reprodutível, abrindo uma nova perspectiva para abordagem terapêutica livre de células para cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas. PDGF-BB. VEGF. Células-tronco mesenquimais. Exossomos.

ABSTRACT

KOGA, B. A. A. **Effect of recombinant human peptide growth factors (PDGF-BB and/or VEGF165) on mesenchymal stem cell secretoma and on an animal model of skin healing.** 2020. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Regenerative Medicine aims to achieve treatments that accelerate the different stages of the healing process in both humans and animals, and the manipulation of the growth factor (GF) composition can improve or modify the repair and remodeling process of injured tissues, as well as providing more aesthetic and functional scars. The present study aimed to evaluate the effect of recombinant human platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and/or endothelial vascular growth factor (VEGF165) on adipose (canine) and bone marrow (equine) mesenchymal stem cells and their secretome, as well as in a model of skin healing in nude rats. GF were obtained from purified media by heparin affinity chromatography and characterized by ELISA and Western blot, and were used in vehicle buffer or in 2% alginate hydrogel. Mesenchymal stem cells were obtained, characterized, cultured and treated with GF and exosomes were isolated from conditioned media. The animal model of wound healing was established in Rowett nude rats, where 3µg/mL of GF were applied alone or combined in wounds on the animals' backs, and after 7 days the healing evolution was evaluated macroscopically and histopathologically. The present study demonstrated for the first time the potential of rhPDGF-BB and/or rhVEGF165 supplementation in the healing of skin wounds in seven days, stimulating angiogenesis, fibroblast reaction and re-epithelialization, but a long-term evaluation is necessary. The 2% alginate hydrogel proved to be the best approach to be used as a vehicle for GF applications *in vivo* in relation to the vehicle buffer, but not *in vitro* assays. The treatment with both factors combined improved the therapeutic profile of adipose mesenchymal stem cells by stimulating cell migration and exosome secretion. The study demonstrated for the first time that treatment with rhVEGF165 stimulated cell proliferation, angiogenic profile and secretion of exosomes by equine bone marrow mesenchymal stem cells. Together, the data support future investigations into the effect of GF supplementation *in vitro*, on cellular and molecular content of the mesenchymal stem cell secretome and *in vivo*, in a safe and

reproducible model, opening a new perspective for a cell-free therapeutic approach for wound healing.

Keywords: Wound healing. PDGF-BB. VEGF. Mesenchymal stem cells. Exosomes.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC - Alofococianina

BCL-2 - *Beta cell lymphoma-2*

bFGF - Fator de crescimento de fibroblastos básico

BSA - Albumina sérica bovina

CTM - Células-tronco Mesenquimais/Estromais

CTMA - Células-tronco Mesenquimais/Estromais de Tecido Adiposo

DALYs - *Disability Adjusted Life Years*

DM - *Diabetes mellitus*

DMSO - Dimetilsulfóxido

eCTM-MO – Células-tronco Mesenquimais Equinas de Medula Óssea

EGF - Fator de crescimento epidermal

ESC - Células-tronco embrionárias

FC - Fator peptídico de crescimento

FDA - *Food and Drug Administration of EUA*

FGF - Fator de crescimento de fibroblastos

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

G-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos

GDF-11 - Fator de crescimento de diferenciação 11

GF - *Growth factor*

H&E - coloração de Hematoxilina e Eosina

HEK - Rim Embrionário Humano (*Human Embryonary Kidney*)

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos

HRP - Horseradish peroxidase

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina

iPSCs - Células-tronco pluripotentes induzidas

ISEV - Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*

KGF - Fator de crescimento de queratinócitos

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

NAHMS - *National Animal Health Monitoring System* – Sistema Nacional de Monitoramento da Saúde Animal (EUA)

OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBSA - solução tamponada fosfato salina sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBS)

PBST - solução tamponada fosfato salina sem Ca^{2+} e Mg^{2+} (PBS) contendo 0,05% Tween-20 (PBST)

PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PDGF-BB - *Platelet derived growth factor* - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PE - Ficoeritrina

PFA - Paraformaldeído

PIGF - Fator de crescimento de placenta

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

rhPDGF-BB- *fator de crescimento derivado de plaquetas BB recombinante humano*

rhVEGF - *fator de crescimento endotelial vascular 165 recombinante humano*

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SFB - Soro Fetal Bovino

TEI kit- *Total Exosome Isolation kit*

TGF- β - Fator de crescimento transformante beta

TGF- β 1 Fator de crescimento transformante 1

TMB- *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*

UC - Ultracentrifugação

UF - Ultrafiltração

UPD - Úlcera de Pé Diabético

VEGF - *Vascular endothelial growth factor* – Fator de crescimento endotelial e vascular

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 - Esquema ilustrativo das camadas da pele | 24 |
| Figura 2 - Esquema ilustrativo das fases do reparo tecidual | 29 |
| Figura 3 - Regranex – Pomada de fator de crescimento recombinante PDGF | 32 |
| Figura 4 - Ilustração do processo de purificação de FC | 47 |
| Figura 5 - Modelo de cicatrização de pele <i>in vivo</i> | 52 |
| Figura 6 - Esquema do desenho experimental <i>in vivo</i> | 53 |
| Figura 7 - Ilustração do processo de isolamento de CTMA | 57 |
| Figura 8 - Protocolos de padronização do isolamento de exossomos | 66 |
| Figura 9 - Desenho experimental do tratamento CTMA com FC e isolamento de exossomos | 68 |
| Figura 10 - Quantificação de exossomos | 69 |
| Figura 11 - Cromatograma da purificação de rhPDGF-BB | 72 |
| Figura 12 - Caracterização de rhPDGF-BB por <i>Western blot</i> | 73 |
| Figura 13 - Caracterização de rhVEGF165 por <i>Western blot</i> | 75 |
| Figura 14 - Imagens macroscópicas de feridas tratadas com FC em hidrogel de alginato | 78 |
| Figura 15 - Imagens macroscópicas de feridas tratadas com FC em tampão | 80 |
| Figura 16 - Histologia da pele de rato nude Rowett | 83 |
| Figura 17 - Histologia da ferida controle negativo 7 dias após cirurgia | 85 |
| Figura 18 - Histologia de feridas tratadas com FC em hidrogel (H&E) | 87 |
| Figura 19 - Histologia de feridas tratadas com FC em tampão (H&E) | 88 |
| Figura 20 - Histologia de feridas tratadas com FC em hidrogel (T. de Masson) | 96 |
| Figura 21 - Histologia de feridas tratadas com FC em tampão (T. de Masson) | 98 |
| Figura 22 - Imunohistoquímica de feridas tratadas com FC em tampão | 101 |
| Figura 23 - Imunohistoquímica de feridas tratadas com FC em tampão | 102 |
| Figura 24 - Cultivo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino ... | 104 |
| Figura 25 - Caracterização de CTMA por Citometria de Fluxo | 105 |
| Figura 26 - Imunocitoquímica de CTMA | 106 |
| Figura 27 - Ensaio de Diferenciação celular | 107 |
| Figura 28 - Efeito de FC em hidrogel na migração de CTMA | 109 |
| Figura 29 - Efeito de FC em tampão na migração de CTMA | 110 |
| Figura 30 - Painel demonstrativo da quantificação de exossomos de CTMA | 114 |

| | |
|--|-----|
| Figura 31- Microscopia Eletrônica de Transmissão de exossomos de CTMA..... | 115 |
| Figura 32- Cultivo de células-tronco eqüinas de medula óssea (eCTM-MO) | 133 |
| Figura 33- Microscopia Eletrônica de Transmissão de exossomos eCTM-MO ... | 134 |
| Figura 34- Efeito de rhVEGF165 na migração de eCTM-MO..... | 135 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Anticorpos primários para Imunohistoquímica..... | 56 |
| Tabela 2 - Anticorpos utilizados para ensaio de imunofenotipagem de CTMA por Citometria de Fluxo | 60 |
| Tabela 3 - Sequências de <i>primers</i> para qRT-PCR | 63 |
| Tabela 4 - Avaliação imunohistoquímica da cicatrização | 103 |
| Tabela 5 - Sequências de <i>primers</i> para análise de eCTM-MO por qRT-PCR . | 131 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1 - Quantificação de rhPDGF-BB por ELISA | 74 |
| Gráfico 2 - Evolução da cicatrização de feridas tratadas com FC em hidrogel de alginato | 79 |
| Gráfico 3 - Evolução da cicatrização de feridas tratadas com FC em tampão..... | 81 |
| Gráfico 4 - Comparação entre a área das feridas após 7 dias | 82 |
| Gráfico 5 - Perfil do infiltrado de células inflamatórias em feridas tratadas com FC em hidrogel | 89 |
| Gráfico 6 - Perfil do infiltrado de células inflamatórias em feridas tratadas com FC | 89 |
| Gráfico 7 - Grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC em hidrogel | 90 |
| Gráfico 8 - Grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC | 91 |
| Gráfico 9 - Grau de neovascularização em feridas tratadas com FC em hidrogel | 92 |
| Gráfico 10 -Grau de neovascularização em feridas tratadas com FC..... | 92 |
| Gráfico 11 - Nível de reepitelização em feridas tratadas com FC em hidrogel | 93 |
| Gráfico 12 - Nível de reepitelização em feridas tratadas com FC | 94 |

| | |
|---|-----|
| Gráfico 13 - Deposição de colágeno em feridas tratadas com FC em hidrogel | 97 |
| Gráfico 14 - Deposição de colágeno em feridas tratadas com FC | 99 |
| Gráfico 15 - Comparação da deposição de colágeno entre os grupos | 99 |
| Gráfico 16 - Caracterização de CTMA por qRT-PCR | 108 |
| Gráfico 17 - Taxa de fechamento da lesão <i>in vitro</i> por CTMA na presença ou ausência de FC em hidrogel de alginato | 110 |
| Gráfico 18 - Taxa de fechamento da lesão <i>in vitro</i> por CTMA tratadas com FC. | 111 |
| Gráfico 19 - Padronização do isolamento de exossomos | 112 |
| Gráfico 20 - Quantidade celular após tratamento com FC por 24h e 48h | 113 |
| Gráfico 21 - Concentração de exossomos derivados de CTMA após tratamento com FC | 115 |
| Gráfico 22 - Quantificação de exossomos de eCTM-MO..... | 134 |
| Gráfico 23 - Contagem e proliferação de eCTM-MO após tratamento..... | 135 |
| Gráfico 24 - Fechamento da lesão <i>in vitro</i> por de eCTM-MO tratadas | 136 |
| Gráfico 25 - Caracterização de eCTM-MO por qRT-PCR..... | 136 |
| Gráfico 26 - Caracterização do perfil angiogênico de eCTM-MO por qRT-PCR. | 137 |
| Gráfico 27 - Caracterização do perfil angiogênico de eCTM-MO por qRT-PCR. | 138 |

SUMÁRIO

| | | |
|--|--|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 22 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 24 |
| 2.1 | Feridas Crônicas | 24 |
| 2.2. | Tratamento de feridas crônicas | 27 |
| 2.3 | Reparo Tecidual..... | 28 |
| 2.4 | Fatores peptídicos de crescimento PDGF e VEGF..... | 30 |
| 2.4.1 | Potencial terapêutico dos fatores peptídicos de crescimento | 31 |
| 2.5 | Terapias alternativas para reparo tecidual..... | 33 |
| 2.5.1 | Plasma rico em plaquetas (PRP)..... | 33 |
| 2.5.2 | Terapia com células-tronco | 35 |
| 2.6 | Vesículas extracelulares..... | 38 |
| 2.7 | Modelos animais para reparo cutâneo | 41 |
| | | |
| Capítulo 1: Efeito de rhPDGF-BB e/ou rhVEGF165 no secretoma de células- | | |
| tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização..... | | |
| 3 | OBJETIVOS | 455 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 45 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 45 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 46 |
| 4.1 | Produção, Purificação e Caracterização de rhPDGF-BB e rhVEGF165 ... | 46 |
| | | |
| 4.1.1 | Produção de rhPDGF-BB e rhVEGF165 | 46 |
| 4.1.2 | Purificação por cromatografica líquida de alta performance..... | 46 |
| 4.1.3 | Quantificação por ELISA | 48 |
| 4.1.4 | Western blot | 49 |
| 4.2 | Modelo de cicatrização de pele em dorso de ratos | 50 |
| 4.2.1 | Feridas de excisão induzidas experimentalmente | 50 |
| 4.3 | Tratamento de feridas de pele com rhPDGF-BB e rhVEGF165 | 52 |
| 4.3.1 | Estimativa da taxa de cicatrização | 53 |
| 4.3.2 | Avaliação histológica das feridas cicatrizadas..... | 54 |

| | | |
|---|--|------|
| 4.3.3 | Imunohistoquímica | 56 |
| 4.4 | Isolamento, Cultivo e Caracterização de Células-tronco mesenquimais | 57 |
| 4.4.1 | Cultivo Celular | 57 |
| 4.4.2 | Caracterização Celular por Citometria de Fluxo | 58 |
| 4.4.3 | Ensaio de Diferenciação Celular | 60 |
| 4.4.4 | Imunocitoquímica | 60 |
| 4.4.5 | Validação celular para receptor de FC por qRT-PCR..... | 61 |
| 4.4.6 | Ensaio de migração celular (Scratch assay)..... | 63 |
| 4.4.6.1 | <i>Teste dos FC em Tampão veículo.....</i> | 63 |
| 4.4.6.2 | <i>Teste dos FC em Hidrogel de Alginato 2%.....</i> | 64 |
| 4.5 | Isolamento e Caracterização de Exossomos de Células-tronco mesenquimais | 65 |
| 4.5.1 | Padronização do isolamento de exossomos | 65 |
| 4.5.2 | Isolamento de Exossomos de CTMA tratadas ou não com FC | 67 |
| 4.5.3 | Caracterização de Exossomos - Microscopia Eletrônica de Transmissão . | 68 |
| 4.5.4 | Quantificação dos Exossomos | 68 |
| 4.6 | Análise Estatística | 70 |
| 5 | RESULTADOS | 71 |
| 5.1 | Purificação e Caracterização dos FC | 71 |
| 5.2 | Modelo Animal de Cicatrização de Pele | 76 |
| 5.2.1 | Cinética de fechamento das feridas | 76 |
| 5.2.2 | Processo de cicatrização de pele em ratos nude | 83 |
| 5.2.3 | Análise Imunohistoquímica das feridas | 100 |
| 5.3 | Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo (CTMA) | 104 |
| 5.4 | Exossomos derivados de células-tronco mesenquimais | 112 |
| 6 | DISCUSSÃO | 1246 |
| 7 | CONCLUSÕES | 1244 |
| Capítulo 2: Efeito de rhVEGF165 sobre o perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais de medula óssea equina e seu secretoma | | |
| 1 | INTRODUÇÃO | 126 |
| 2 | OBJETIVOS | 128 |
| 2.1 | Objetivo Geral | 128 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 128 |

| | | |
|----------|--|-------------|
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 71 |
| 3.1 | Cultivo Celular | 129 |
| 3.2 | Ensaio de migração celular | 129 |
| 3.3 | Caracterização celular por qRT-PCR | 130 |
| 3.4 | Isolamento de exossomos de eCTM-MO | 131 |
| 3.5 | Microscopia Eletrônica de Transmissão de exossomos | 132 |
| 3.6 | Quantificação de exossomos de eCTM-MO | 132 |
| 4 | RESULTADOS | 71 |
| 5 | DISCUSSÃO | 7139 |
| 6 | CONCLUSÕES | 124 |
| | REFERÊNCIAS | 142 |

1 INTRODUÇÃO

A Medicina Regenerativa há muito enfrenta desafios na busca por alternativas que assegurem um tratamento eficaz que e acelerem o processo de reparo sem alterar suas fases, especialmente na cicatrização de feridas em seu âmbito clínico, morfofisiológico e molecular, sejam úlceras ou feridas normais, além da busca por uma melhor fase de remodelamento e maturação das lesões com cicatrizes mais funcionais e estéticas evitando ou diminuindo a incidência de queloides (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007; LIN et al., 2011; CHOI et al., 2012; WAYCASTER; GILLIGAN; MOTLEY, 2016).

Dentre a busca por inovações terapêuticas no âmbito da cicatrização tecidual, está o plasma rico em plaquetas (PRP), rico em fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas que auxiliam no reparo tecidual e tem sido utilizado como uma alternativa no tratamento de lesões. Entretanto, o alto custo da preparação e a falta de padronização no seu preparo acarretam uma dificuldade em determinar quais e quanto de fatores de crescimento foram obtidos resultando na falta de garantia do tratamento (MARX, 2001; PAVLOVIC et al., 2016; SPANÒ et al., 2016). Nesse cenário, a produção e uso de fatores de crescimento peptídicos (FC) recombinantes para reparo tecidual tem se mostrado promissora, já que visa disponibilizar e manter o comportamento natural dos fatores atuantes no processo de cicatrização, porém mais investigações se fazem necessárias de modo que viabilize maior disponibilidade desses produtos visto o alto custo de mercado (GOWDA et al., 2015; WAYCASTER; GILLIGAN; MOTLEY, 2016)

Em paralelo à aplicação do PRP, o uso de células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido uma alternativa terapêutica na Medicina Regenerativa devido à conveniência de seu isolamento, sua baixa imunogenicidade, sua habilidade de se

diferenciar e criar um ambiente favorável à regeneração (DOMINICI et al., 2006; KATSUDA; OCHIYA, 2015). Inúmeras evidências sobre o potencial terapêutico dessas células impulsionam além de tudo, o estudo do seu secretoma para identificação dos agentes responsáveis por suas características regenerativas (TOH et al., 2016).

Acredita-se que o aproveitamento do secretoma de células-tronco pode influenciar benéficamente o tecido injuriado pela modulação do microambiente local, provendo efeitos cito protetores, antiinflamatórios e angiogênicos durante a fase aguda que segue a injúria, e impulsionando as células-tronco/progenitoras residentes no local com objetivo de alcançar um reparo programado mais tecido-específico e estimular progenitores endógenos residentes como um mecanismo crítico para desenvolvimento futuro de terapia parácrina farmacológica (BOLLINI et al., 2013).

No cenário de feridas crônicas que podem levar de 3 a 30 anos para cicatrizar e os altos custos gerados para o sistema público de saúde, esse projeto foi proposto para avaliar se a suplementação de células-tronco mesenquimais com fatores de crescimento recombinantes melhora o perfil terapêutico e aumenta secreção de exossomos, e avaliar se o tratamento de lesões de pele de ratos com esses fatores acelera cicatrização, visando obter um protocolo efetivo, alternativo e seguro aos tratamentos ofertados para feridas cutâneas.

O presente trabalho foi dividido em uma primeira parte de revisão de literatura e dois capítulos para melhor apresentação dos resultados, sendo eles:

- Capítulo 1: Efeito de rhPDGF-BB e/ou rhVEGF165 no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização
- Capítulo 2: Efeito de rhVEGF165 sobre o perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais equinas de medula óssea e seu secretoma

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Feridas crônicas

A pele é o maior órgão dos seres vivos e atua como barreira protetora contra microorganismos e além de prevenir contra desidratação nos seres não aquáticos, está intimamente relacionada à vigilância imunológica e detecção sensorial, sendo composta pela epiderme, uma camada mais superficial, composta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado e onde se encontram os melanócitos; pela derme, camada subjacente à primeira, composta por tecido conjuntivo denso não modelado, onde se inserem folículos pilosos e glândulas sebáceas; mais profundamente, apresenta-se a hipoderme, composta por adipócitos e tecido conjuntivo (Figura 1) (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007).

Figura 1 – Esquema ilustrativo das camadas da pele.

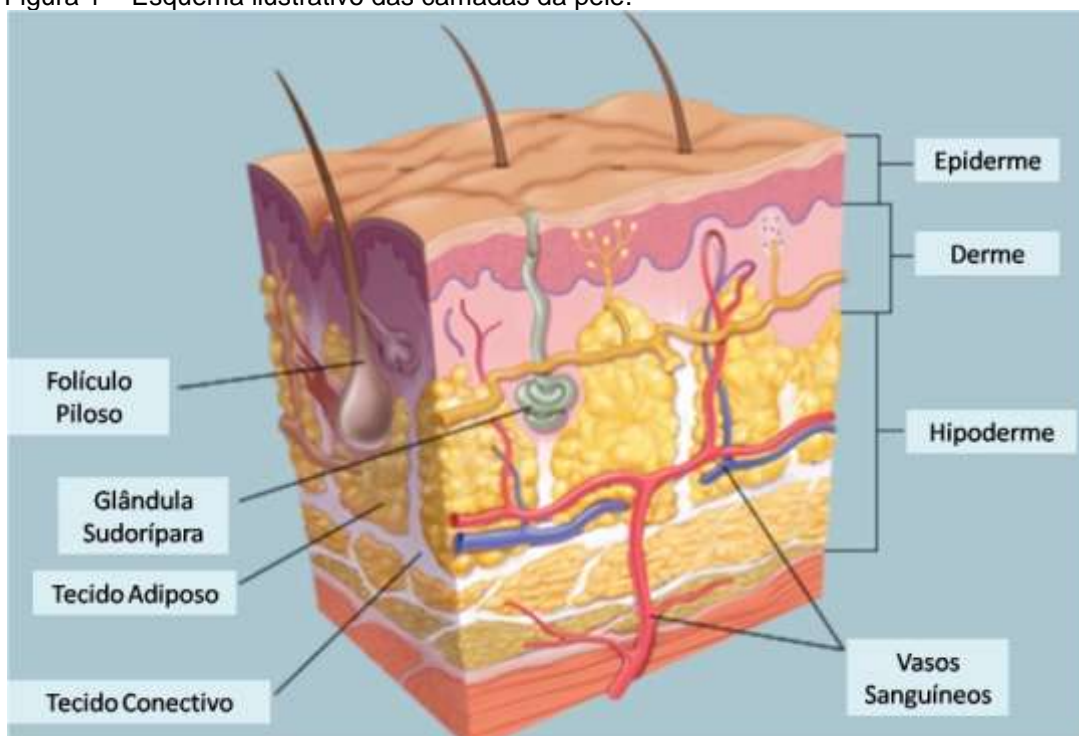


Imagem: adaptado de <https://www.webmd.com/skin-problems-and-treatments/picture-of-the-skin#1>
Legenda: Esquema ilustrando as camadas da pele.

Qualquer condição adversa externa como lesões, queimaduras, traumas ou condições patológicas que interfiram no funcionamento ou destruam a estrutura da pele, desencadeará uma resposta de reparo à lesão. Quando devido a condições patológicas não há uma cicatrização completa e eficiente, tem-se uma ferida que não evolui para a fase de remodelamento no período de 3 meses, é considerada uma ferida crônica, que permanecem constantemente inflamadas, tornando-se úlceras que trazem morbidade comprometem a qualidade de vida do paciente (STRONCEK; REICHERT, 2008). Dentre os relatos mais frequentes para causas que resultam em feridas crônicas estão o *Diabetes mellitus* (DM), lesões de pressão e injúrias.

Um estudo epidemiológico transversal com 339 idosos acima de 60 anos realizado em Teresina-PI, demonstrou uma prevalência de 11,8% que apresentavam feridas crônicas, sendo que em 5% prevaleceram úlceras de pressão, 3,2% úlceras diabéticas e 2,9% úlceras vasculogênicas crônicas (VIEIRA; ARAÚJO, 2018)

Diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica, caracterizada por índices elevados de glicose no sangue, que ocorre pela falta de produção do hormônio insulina pelo pâncreas (Tipo 1), ou devido a redução da habilidade de produção (Tipo 2) ou resistência à insulina (SBD, 2016; IDF, 2017).

No mundo, existiam cerca de 422 milhões de adultos diabéticos em 2014, comparado a 108 milhões em 1980. Na América Latina cerca de 41 milhões de adultos vivem com DM. No Brasil, a população estimada de portadores de DM está em 12,5 milhões, tendo lugar entre os quatro países com maiores números de diabéticos no mundo, com uma prevalência de 8.6% da população, 4,3 milhões de pessoas possuem 65 anos ou mais, e 25% dos portadores de DM têm risco de apresentar úlceras no pé (UPD) das quais 85% precedem amputações (IDF, 2017).

Lesões dos membros inferiores representaram cerca de 20% das internações de indivíduos com DM no SUS, e complicações de UPD foram responsáveis por 40 a 70% do total de amputações não traumáticas na população em geral (BRASIL, 2016).

As complicações de UPD geram altos custos tanto aos pacientes como aos sistemas de saúde, no mundo estimam-se que gastos 5 vezes maiores para pessoas que tem UPD comparado a pessoas sem úlceras, e 8 vezes mais quando as lesões são mais complexas (IDF, 2017). No Brasil, estimam-se 3,9 bilhões de dólares para os gastos com DM, e cálculos das despesas com o tratamento ambulatorial dos pacientes diabéticos pelo Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) são da ordem de US\$ 2.108,00 por paciente, dos quais US\$ 1.335,00 estão relacionados a custos diretos (SBD, 2016).

No Brasil o afastamento de pessoas do trabalho devido às feridas crônicas, principalmente úlceras varicosas, que são aquelas causadas pela má circulação sanguínea, e as lesões por pressão, está na 10^o posição segundo o INSS, e o Ministério da Saúde realizou um levantamento em 2011 mostrando o cenário dos tratamentos de feridas complexas no país (http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/14480/2120690_109700.pdf).

Estima-se que nos Estados Unidos da América cerca de 6 milhões de pessoas apresentem feridas crônicas em membros inferiores e que na população idosa a prevalência seja de 15% com uma projeção para o futuro, de que em 2050 cerca de 25% da população idosa vai apresentar essa lesão (ABBADÉ et al., 2005).

É estimado que a cada ano, 300 mil pessoas morram de lesões relacionadas a queimaduras, prevalecendo queimaduras químicas, eletricidade e por escaldaduras, e que as queimaduras relacionadas ao fogo sejam responsáveis por

10 milhões de anos de vida ajustados por deficiência (DALYs), sem contar que as queimaduras não fatais são a principal causa de morbidade, incluindo hospitalização prolongada, desfiguração e incapacidade, frequentemente resultantes com estigma e rejeição (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

No Brasil, dois terços dos acidentes envolvendo queimaduras são protagonizados por crianças, que passam a conviver com as sequelas, estéticas e funcionais (PROVAB, 2014).

Com o envelhecimento da população com o aumento da expectativa de vida a projeção é que a parcela de pessoas acima dos 65 anos dobre em 2050 na América Latina, e no Brasil a população acima dos 80 anos pode quadruplicar (OECD, 2020), predizendo um cenário com mais pessoas suscetíveis à desenvolverem feridas crônicas.

Assim como em humanos, feridas, lesões e traumas representam 27,8% das condições médicas mais comuns observadas em cavalos dos EUA (NAHMS, 2017). As feridas nos membros dos cavalos curam com dificuldade em comparação com as de outras áreas do corpo, tendo como características principais: inflamação crônica, acúmulo excessivo de matriz extracelular, má contração da ferida e epitelização retardada, resultando em cobertura incompleta da ferida (THEORET; WILMINK, 2013) (THEORET AND WILMINK, 2013).

2.2 Tratamento de feridas crônicas

As estratégias padrões atuais para tratar lesões de pele normais ou crônicas, como feridas decorrentes de *Diabetes mellitus*, limitam-se ao preparo da ferida que inclui remoção de tecido necrosado através do debridamento da ferida, descarga de pressão, tratamento e controle da infecção e inflamação, mantendo balanço de

umidade com curativos e avaliando as bordas da ferida (DINH; VEVES, 2006; GREGOR et al., 2008; POURMOUSSA et al., 2016). Se o tratamento padrão não permitir alcançar a epitelização do tecido lesado, intervenções cirúrgicas podem ser a única alternativa o que pode comprometer ainda mais a condição do paciente o que nos mostra um cenário de ampla necessidade de terapias avançadas como alternativas que acelerem a cicatrização seja o uso de produtos engenheirados terapias celulares / tecidos ou produtos derivados, fatores de crescimento recombinantes, que podem ser o único meio de atingir rápida e eficazmente o fechamento da ferida promovendo melhores condições de vida às pessoas.

2.3 Reparo tecidual

O processo de reparo tecidual é compreendido por três fases que se sobrepõem e são interdependentes: A fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de epitelização e remodelamento (Figura 2) (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014).

O reparo de lesões teciduais (processo cicatricial) é um processo complexo que envolve fatores sistêmicos e locais, sendo composto por três diferentes fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento/maturação, as quais se sobrepõem parcialmente e são interdependentes (STRONCEK; REICHERT, 2008; SORG et al., 2017). Durante a fase inflamatória, neutrófilos e macrófagos são recrutados para produzir dois fatores essenciais: TGF- β 1 (fator de crescimento transformador 1) e G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos). Outros fatores, como PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β 1 tem papéis cruciais no recrutamento de fibroblastos na fase proliferativa, na qual também é crítico o papel do fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, que é essencial para a formação

de vasos (angiogênese). Durante a terceira fase do processo, o remodelamento e a proliferação epidermal são mediados por GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e TGF- β 3 (fator de crescimento transformador 3). GM-CSF aumenta a neovascularização e a granulação do tecido em formação, enquanto TGF- β 1 tem um envolvimento direto na cicatrização cutânea, sendo que o fator TGF- β 3 antagoniza este efeito, evitando a cicatrização excessiva, que leva à formação de quelóides. Através da manipulação da composição de fatores de crescimento, é possível acelerar ou modificar as diferentes fases do processo de reparo tecidual, contribuindo, assim, para o reparo correto em tempo hábil (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007; GURTNER et al., 2008).

Figura 2 – Esquema ilustrativo das fases do reparo tecidual.

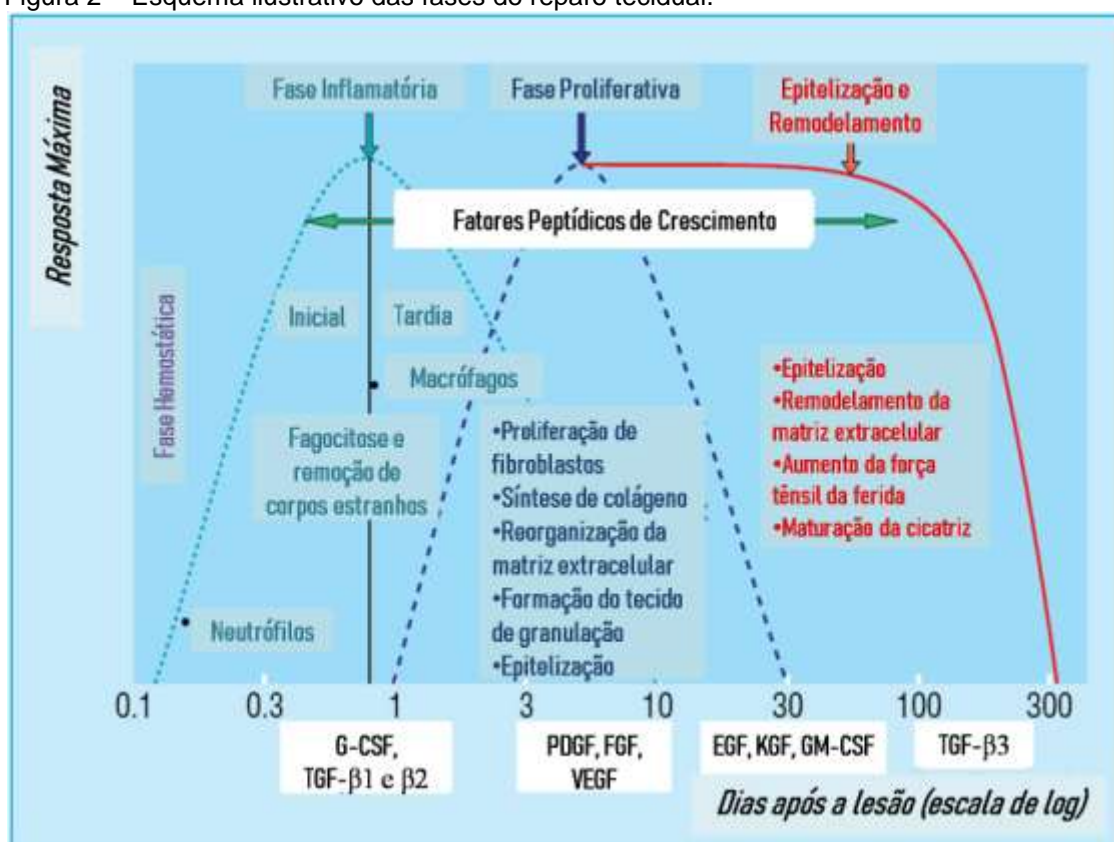


Imagem: adaptado de ENOCH, 2005)

Legenda: Fases do processo de reparo de tecidos moles em dias e FC envolvidos em cada fase.

2.4 Fatores peptídicos de crescimento PDGF e VEGF

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) são dímeros de cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto, em mamíferos, um total de nove genes diferentes codificam quatro cadeias homodiméricas de PDGF (PDGF-A,-B,-C and -D) e uma heterodimérica (PDGF-AB), e cinco cadeias diferentes de VEGF (VEGF-A,-B, -C, -D) e fator de crescimento de placenta (PIGF) (HELDIN; WESTERMARK, 1999).

PDGF/VEGF são fatores de crescimento conservados ao longo do reino animal e formam parte de uma grande superfamília de proteínas que contém nós de cisteína. PDGF-BB apresenta estrutura tridimensional similar a VEGF, que tem uma sequência de aminoácidos relacionada (HELDIN; WESTERMARK, 1999; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

Os PDGFs atuam primariamente como fatores de crescimento parácrinos, geralmente produzidos por discretas populações de células que atuam localmente para direcionar diferentes respostas celulares, enquanto os VEGFs possuem papéis fisiológicos autócrinos, como descritos para VEGF-A de células endoteliais (LEE et al., 2007).

Tanto os receptores de PDGF α e β têm papel crucial no desenvolvimento especialmente por se conectarem com diversas vias de sinalização conhecidas por atuarem em múltiplas respostas celulares, como Ras-MAPK3, PI3K e PLC, interação esta que resulta em estímulo do crescimento, diferenciação e migração celular (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008; KLINKHAMMER; FLOEGE; BOOR, 2018).

VEGF atua por meio de dois receptores de tirosina quinases de alta afinidade, VEGFR-1/FLT-1 e VEGFR2/KDR/flk-1; ambos são expressos em células normais

endoteliais vasculares e tem expressão aumentada durante angiogênese (LEE et al., 2007). Estudos recentes têm revelado o papel de VEGF-A e seus receptores além do desenvolvimento vascular, mas na homeostase dos órgãos adultos após lesões graves e através da liberação dos fatores parácrinos por células endoteliais pela ação de VEGFA, demonstrando seu papel na progressão da regeneração (MATSUMOTO; EMA, 2014).

2.4.1 Potencial terapêutico dos fatores peptídicos de crescimento

Fatores peptídicos de crescimento têm sido utilizados para transformar células, melhorar os efeitos parácrinos e a taxa de sobrevivência celular, e logo a eficiência das terapias celulares para cicatrização como a indução à osteogênese, adipogênese e condrogênese por incorporação de BMPs (proteína morfogenética óssea), bFGF (fator de crescimento de fibroblastos) e TGF β em microesferas revestidas de nanosferas por CTMs humanas (PARK et al., 2011); a indução de neovascularização em modelo de isquemia de membros inferiores por CTM de placenta transformadas com FGF2 e PDGF-BB (YIN et al., 2015); a sobrevivência celular e melhora da lesão pulmonar por isquemia/reperfusão de CTM de medula óssea transformadas com HGF (fator de crescimento de hepatócitos) (CHEN et al., 2017); o aumento do tempo de vida, angiogênese diminuição da tumorigenicidade de CTM envelhecidas de medula óssea transformadas com VEGF (TANG et al., 2013); aumento da proliferação celular, vascularização e reconstituição da epiderme após transplante de queratinócitos superprodutores de PDGF-AA em camundongos atímicos (EMING et al., 1995); aumento da proliferação, redução de apoptose e autofagia, aumento dos efeitos parácrinos e proteção de CTM transformadas com VEGF e Bcl-2 (linfoma de célula B 2) em modelo de isquemia *in vitro* (NI et al.,

2017). O tratamento da célula com fatores de crescimento recombinantes humanos ao invés da transformação genética pode ser uma alternativa que facilite o método e o tempo de obtenção das células tratadas com combinação dessas duas ferramentas terapêuticas.

O uso tópico do fator de crescimento recombinante humano derivado de plaquetas (PDGF-BB) (Becaplermin - Smith & Nephew Inc, Fort Worth, TX) (Figura 3) para tratamento de cicatrização de feridas de pés diabéticos é uma alternativa aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration of EUA*).

Figura 3 – Regranex – Pomada de fator de crescimento recombinante PDGF.

REGRANEX[®]
(becaplermin) Gel, 0.01%



Fator de crescimento recombinante derivado de plaquetas (PDGF) terapia para úlceras diabéticas neuropáticas

Imagem: Retirado de <https://www.smith-nephew.com/professional/products/all-products/regranex/>
Legenda: Foto da pomada Regranex (Becaplermin) contendo o fator de crescimento recombinante PDGF.

A eficácia do produto foi comprovada no processo de reparo tecidual inferindo-se uma manutenção da sua atividade biológica como ocorre no processo natural, entretanto, apesar das vantagens advindas com a aprovação desse composto para uso em feridas crônicas, o alto custo do produto limita seu uso à instituições ou pessoas com alto poder financeiro, ainda sendo inalcançável para a maioria da população (WAYCASTER; GILLIGAN; MOTLEY, 2016).

O uso generalizado de rhPDGF-BB estabeleceu a segurança e a eficácia do PDGF para a regeneração de tecidos moles além disso, sua atividade para regeneração óssea foi e tem sido rigorosamente testada em estudos pré-clínicos, que indicam que o PDGF tem o potencial de ser usado para dirigir e controlar a regeneração óssea em humanos (KAIGLER et al., 2011).

A utilização de rhVEGF165 foi descrita por melhorar a arquitetura pulmonar em modelo murino de dano pulmonar por hiperóxia (KUNIG et al., 2005), e um teste clínico conduzido em 178 pacientes portadores de angina administrou via intracoronária diferentes doses de rhVEGF165, e a dosagem de 50ng/kg/min promoveu melhora significativa nos testes de tolerância a exercício e diminuição na frequência de angina depois de 120 dias (HENRY et al., 2003).

2.5 Terapias alternativas para reparo tecidual

2.5.1 Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O plasma rico em plaquetas (PRP), derivado das plaquetas, tem sido muito utilizado como alternativa terapêutica em diversas aplicações visando reparo, devido à presença de diversos fatores peptídicos de crescimento e diferenciação neste produto, pois é uma fração do plasma que apresenta uma concentração de plaquetas acima dos níveis basais, sendo obtido de maneira autóloga, não sendo, portanto, imunogênico (MARX, 2001).

As plaquetas, após sua ativação, liberam diversos fatores de crescimento importantes durante o processo de cicatrização tecidual: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante (TGF- β), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento vascular endotelial

(VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (MARX, 2001; EPPLEY; WOODDELL; HIGGINS, 2004).

PRP tem sido aplicado às úlceras na perna venosa e arterial, úlceras de pés diabéticos, queimaduras de primeiro e segundo grau, injúrias superficiais, cortes, abrasão e feridas cirúrgicas, em cirurgias plásticas, problemas de perda de cabelo, rejuvenescimento facial (tratamento de rugas, danos e manchas), cicatrizes, regeneração periodontal e em áreas de reconstrução oral e maxilofacial, regeneração tendínea e ligamentar, etc (OSTVAR et al., 2015; AFRADI et al., 2016; HARA et al., 2016; MARCK et al., 2016; SPANÒ et al., 2016).

Entretanto, este produto não é bem caracterizado quanto à sua composição de fatores de crescimento, e não há um protocolo padronizado para sua preparação, o que acarreta grande variabilidade, tornando questionável a real efetividade deste produto quanto à presença de plaquetas e, conseqüentemente, de fatores de crescimento.

Existem casos nos quais são documentados aumentos da expressão gênica (SCHNABEL et al., 2007; DE MOS et al., 2008), do potencial mitogênico (TOHIDNEZHAD et al., 2011; ZHANG et al., 2015), da resistência biomecânica (ASPENBERG; VIRCHENKO, 2004; BOSCH et al., 2011) e diminuição da frouxidão ligamentar (FLEMING et al., 2010).

Um ponto crítico sobre o uso deste produto no Brasil é que a agência nacional regulatória de produtos da saúde (ANVISA) não regulamentou o uso desse produto ainda e apenas é liberado para uso em casos odontológicos, mas já é um assunto em consideração pela agência.

A associação de fatores de crescimento do PRP com hidrogel já se mostrou viável em promover maior cicatrização em menor tempo (PARK et al., 2017) e

promoveu a angiogênese através de efeitos sinérgicos resultantes da combinação de VEGF + PDGF e FGF (KIM et al., 2016). Devido à sua conformação tridimensional, afinidade à água e biocompatibilidade, o hidrogel tem sido usado como uma formulação de revestimento que é capaz de manter a umidade do ambiente/tecido ao qual foi submetido se mostrando uma ótima ferramenta para tratamento de lesões teciduais (MONTROYA et al., 2015).

Entretanto, a garantia da presença destes fatores não pode ser assegurada para a real efetividade do PRP, já que a quantidade dos fatores pode variar em cada indivíduo e, principalmente, de acordo com o método de preparo e como não existe um padrão ouro de utilização, mais estudos ainda precisam ser desenvolvidos buscando um meio de padronizar a obtenção e garantir a presença dos fatores desejáveis para tratamento.

2.5.2 Terapia com células-tronco

As células-tronco oferecem oportunidades consideráveis para melhorar a cicatrização de feridas. Células-tronco pluripotentes, como células-tronco embrionárias ou células-tronco pluripotentes induzidas, podem ser isoladas, adaptadas e propagadas indefinidamente *in vitro* em um estado indiferenciado, e têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células. As células-tronco embrionárias (ESC) são de natureza pluripotente que residem no blastocisto. Essas células têm um potencial para se diferenciar em qualquer uma das três camadas germinativas primárias, a saber, endoderme, mesoderme ou ectoderme, entretanto as questões éticas ainda limitam o uso dessas células (MITALIPOV; WOLF, 2009).

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) são as células multipotentes com propriedades de auto-renovação, que são projetadas a partir de

células somáticas adultas diferenciadas, como fibroblastos e queratinócitos, usando fatores de transcrição (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As iPSCs reduzem as chances de rejeição imunológica ao usá-las fisicamente além de eliminarem questões éticas (GUHA et al., 2013). A reprogramação única da tecnologia iPSC tornou possível a geração de linhas celulares específicas de pacientes geneticamente diversas a partir de doenças genéticas da pele ou feridas crônicas que têm um tremendo potencial para modelagem de doenças e rastreamento de drogas (LIU et al., 2014).

O trabalho pioneiro de Nagy e Smith, que foi o primeiro a desenvolver iPSC a partir de fibroblastos fetais equinos, usando uma entrega de quatro fatores (MKOS) baseada no transposon induzível por tetraciclina, abriu o caminho para a pesquisa de iPSC equinas. Comprovando que estas mantêm um cariótipo diplóide durante a cultura *in vitro* em 26 passagens, enquanto as colônias exibem morfologia semelhante à da iPSC humana e expressam AP, OCT-4, NANOG, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 (NAGY et al., 2011).

A vantagem que as iPSCs apresentam de serem induzidas à diferenciação em tipos celulares específicos tem sido explorada na busca de melhorias para o tratamento de lesões cutâneas, como descrito o uso de iPSCs equinas (eiPSCs) e sua eficiente diferenciação em linhagem de queratinócitos foi descrito como ferramenta alternativa para tratar lesões *in vitro*, sendo possível obter queratinócitos eqüinos (eiPSC-KC) com características que prometem o desenvolvimento de uma construção de pele baseada em células-tronco, com potencial para regenerar a pele perdida ou danificada (AGUIAR et al., 2016).

iPSCs diferenciadas em células endoteliais funcionais (iPSC-ECs), foram descritas por aumentarem a angiogênese e a perfusão da ferida, promoverem a

deposição fisiológica de colágeno, além de acelerarem o fechamento da ferida em um modelo de cicatrização de ferida excisional murina (CLAYTON et al., 2018). A indução de células-tronco mesenquimais derivadas de iPSC (iPSC-MSCs) com fator básico de crescimento de fibroblastos (FGF) e/ou fator de crescimento de queratinócitos (KGF) estimulou o potencial de diferenciação angiogênico e queratinogênico fornecendo uma nova e promissora fonte de células para a construção da pele manipulada de tecido vascularizado e queratinizado, além de estabelecer uma estratégia eficaz para a terapia baseada em iPSC na Engenharia de Tecidos da pele (LIN et al., 2018).

Por outro lado, células-tronco multipotentes, como células-tronco mesenquimais (CTM), entre outras, fornecem um amplo espectro de alternativas para diferentes terapias devido à conveniência de seu isolamento, sua baixa imunogenicidade, sua habilidade de se transdiferenciar e criar um ambiente favorável à regeneração (DOMINICI et al., 2006; KATSUDA; OCHIYA, 2015).

Por muito tempo e ainda hoje as células-tronco mesenquimais são utilizadas como recurso para terapia celular, portanto, seu uso é amplamente descrito em diversas aplicações, como no tratamento de feridas de Diabetes mellitus (CAO et al., 2017; DI et al., 2017), regeneração de tecidos (BRETT et al., 2017; THANGARAJAH et al., 2017), alternativa no tratamento do câncer e no entendimento da sua biologia e progressão (GOMES et al., 2017; YAO et al., 2017), nas quais sua utilização visa além de entender a função das células e seus mecanismos de ação, tratar os sintomas promovendo maior qualidade e expectativa de vida aos pacientes de maneira segura e acessível.

No entanto, apesar de permitir a manipulação *ex vivo* e sua reintrodução no paciente, grandes desafios ainda existem quanto à identificação das células-tronco

apropriadas para alcançar a eficácia desejada na cicatrização de feridas (KANJI; DAS, 2017). Inúmeras evidências sobre o potencial terapêutico dessas células impulsionam além de tudo o estudo do seu secretoma para identificação dos agentes responsáveis por suas características regenerativas (TOH et al., 2016).

2.6 Vesículas extracelulares

Apesar do vasto conhecimento e utilização das células-tronco mesenquimais, solucionar a questão da regeneração de maneira global, ou seja, esclarecer e definir os mecanismos efetores decorrentes da aplicação dessas células no processo regenerativo permaneceu desconhecido por muito tempo até quando certa atenção foi dedicada aos componentes extracelulares do conteúdo liberado por essas células: seriam esses os efetores responsáveis da terapia celular? (AKYUREKLI et al., 2015)

Esse pensamento, embora recente, despertou profunda curiosidade por parte da comunidade científica sobre o que seria libertado pelas células, o mecanismo de liberação deste conteúdo, as características dos componentes liberados e seu conteúdo molecular, os possíveis mecanismos de ação dessas moléculas secretadas, seu potencial terapêutico e muitos outros questionamentos surgiram trazendo à tona o mundo das vesículas extracelulares (PANKAJAKSHAN; AGRAWAL, 2014; MAROTE et al., 2016; DERKUS; EMREGUL; EMREGUL, 2017).

A capacidade de secretar fatores solúveis para o meio extracelular e exercer atividade parácrina no microambiente, exemplifica os efeitos benéficos das CTM sobre o reparo e a regeneração tecidual (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016). Dentre os mediadores liberados estão citocinas, RNAs codificadores e não-codificadores como microRNAs, fatores de crescimento e vesículas extracelulares (RAPOSO;

STOORVOGEL, 2013). Além disso, estudos mostram que moléculas secretadas por MSCs têm composição e papel semelhante a estas, podendo exercer atividade terapêutica, trazendo um novo cenário para uma terapia livre de células (BOLLINI et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

O tamanho das vesículas extracelulares pode variar de 30 nm a 1µm, dentre as quais pode haver alguma sobreposição nos tamanhos. As microvesículas que são as vesículas secretadas pela membrana plasmática celular podendo medir 100 e 1.000 nm; os exossomos possuem tamanho entre 30 e 150 nm são formados a partir da fusão de endossomos multivesiculares com a membrana plasmática, e liberada por exocitose por vários tipos celulares sendo encontrados em fluidos corporais e meios condicionados por células (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Enquanto os corpos apoptóticos podem compreender 1000nm a 5000nm sendo derivados de fragmentos de células mortas e liberados como bolhas externas da membrana plasmática apoptótica (RANI et al., 2015; MAROTE et al., 2016).

Os exossomos foram descritos primeiramente na década de 80 como vesículas de origem endossomal as quais foram observadas sendo liberadas na maturação de reticulócitos, como consequência da fusão de endossomas multivesiculares à membrana plasmática (JOHNSTONE et al., 1987).

Vesículas extracelulares têm apresentado muitas vantagens sobre as células-tronco, como habilidade de *homing* para tecido alvo, prevenção do seu acúmulo indesejado em outros órgãos, ausência de toxicidade inata ou associação a mal-diferenciação de células enxertadas em longo prazo, ausência de formação tumoral ou rejeição imune como ocorre após injeção de células-tronco (ABREU; WEISS; ROCCO, 2016; SARVAR; SHAMSASENJAN; AKBARZADEHLALEH, 2016).

O potencial e a eficácia dos mecanismos de ação dos exossomos derivados de CTM, como angiogênese, imunomodulação e regeneração, têm sido estudadas e confirmadas ao longo dos últimos anos e nesse cenário a segurança quanto à citotoxicidade dessas vesículas é um tema constantemente considerado já que o maior foco está voltado para usos terapêuticos dos exossomos, e apesar de poucos estudos sobre o tema, a vantagem descrita é a baixa ou ausência de imunogenicidade por parte dos exossomos para seu uso como *drug delivery* ou agentes terapêuticos como em vacinação ou biomarcadores de câncer e em distúrbios inflamatórios (ROBBINS; MORELLI, 2014) seja no sistema nervoso (LV et al., 2015) ou cardiovascular (PANKAJAKSHAN; AGRAWAL, 2014) e cicatrização de feridas (GEIGER; WALKER; NISSEN, 2015).

O meio condicionado por CTM de cordão umbilical humano foi capaz de estimular a migração de fibroblastos e produção de matriz extracelular *in vitro*, além da geração de um cosmético contendo o meio condicionado em pó crio-desidratado que promoveu o aumento da densidade dermal, podendo ser justificada pela presença de fator de crescimento de diferenciação 11 (GDF-11) e exossomos em sua composição (KIM et al., 2018)

Estudos recentes relatam exossomos como participantes ativos nos processos biológicos, regenerativos, inflamatórios e patológicos e seu conteúdo molecular tem sido alvo de investigações que almejam desvendar o que está por trás da eficácia do papel dessas vesículas, pois é sugerido que os exossomos em seu papel fundamental na comunicação intercelular podem atuar como bioindicadores ou agentes terapêuticos atuando como uma peça fundamental para além de promover melhor compreensão da terapia celular existente, abrir um caminho para uma terapia livre de células (PHINNEY; PITTENGER, 2017).

2.7 Modelos animais para reparo cutâneo

Apesar da grande demanda por modelos não-animais para se desenvolver pesquisa científica como dados *in silico*, *in vitro*, *ex vivo*, etc, os modelos animais ainda são amplamente utilizados por permitirem explorar mais fielmente a biologia da cicatrização normal ou patológica da pele visando compreender melhor e acelerar o processo (NELSON; REUSCH, 2014; BOYKO; LONGAKER; YANG, 2017).

Compreender o mecanismo e a fisiopatologia de como ocorre o processo de cicatrização é essencial para o desenvolvimento de estratégias ótimas no futuro para evitar a cicatrização tardia e a formação de cicatrizes anormais. Modelos ideais para estudo de cicatrização de feridas devem mimetizar não apenas a estrutura, mas também as interações celulares e moleculares dos tipos de feridas cutâneas (UDDIN; BAYAT, 2017; VIDMAR; CHINGWARU; CHINGWARU, 2017)

Um dos modelos animais mais utilizados para estudo da cicatrização de feridas são os ratos e camundongos. Por serem animais de laboratório de pequeno porte, com um rápido ciclo de vida baixo custo, de fácil manipulação genética, esses animais apresentam uma cicatrização rápida, o que permite o estudo de todo o processo de cicatrização em curto período de tempo. Uma das principais diferenças que estes modelos apresentam na pele é a presença de um pânículo carnoso, que é uma fina camada de músculo esquelético localizada entre a gordura subcutânea e a derme, assim, esses animais curam as feridas excisionais mais pela contração do que pela reepitelização, enquanto o oposto ocorre em humanos (ABDULLAHI; AMINI-NIK; JESCHKE, 2014). Como tal, eles são menos propensos à sepse sistêmica e à imunossupressão observados em animais maiores, pois suas feridas cicatrizam muito mais rapidamente (AGARWAL, 2019).

Dentre as vantagens de se utilizar camundongos como modelos para estudos de cicatrização, é a viabilidade de se estudar condições patológicas como o Diabetes, como no caso dos camundongos diabéticos não-obesos (NOD) que desenvolvem a doença autoimune espontaneamente (PEARSON; WONG; WEN, 2016), além da possibilidade de indução química do diabetes utilizando a aplicação de Estreptozotocina (STZ) com altas doses únicas ou várias aplicações de baixas doses da droga, a qual irá atuar destruindo as células beta das ilhotas de Langherans, levando a uma condição de hiperglicemia, a qual pode ser constatada através de testes de glicemia nos animais, provendo um modelo potencial para estudo das fases da cicatrização (GRAHAM; SCHUURMAN, 2015; DI et al., 2017).

Outra linhagem de camundongos amplamente utilizada como modelo são os animais nude. Devido ausência do timo, esses animais possuem baixa quantidade de células T, apresentando como fenótipo a ausência de pêlos. Esses animais têm sido utilizados em ensaios de tumorigênese celular como método de validação antes da terapia celular, bem como em ensaios de angiogênese (KIM et al., 2016).

Estudos têm utilizado modelos animais como ratos e camundongos para testar a eficácia de diversos tratamentos de forma direta e indireta para cicatrização de feridas pelo fato de serem de fácil cuidado e manuseio e apresentarem um processo cicatricial rápido que permite investigações das bases celulares, bioquímicas e moleculares do reparo tecidual, incluindo a aplicação de fatores peptídicos de crescimento recombinantes humanos comerciais, como PDGF-BB, e revelado que seu potencial de reparo pode está relacionado à atenuação da inflamação e ação de citocinas inflamatórias de forma exagerada por seus mediadores TNF-alfa, interleucina-1B e metaloproteinases ou modulando a contração da ferida, como mostrado por GOWDA et al., (2015).

Similaridades nos perfis de citocinas desregulados, relação entre epitelização da lesão e contração do local, desenvolvimento de desordens fibroproliferativas, dentre outras razões, o que tem atraído grande interesse no estudo da cicatrização nesses animais, visando não só o tratamento dessas lesões e inovação no ramo da Medicina Regenerativa Veterinária, bem como para a saúde humana (THEORET; WILMINK, 2013). Sendo assim, equinos tem sido utilizados como modelos para estudo dos processos biológicos da cicatrização e suas falhas (THEORET; WILMINK, 2013; FREES, 2018) bem como para teste e melhoramento das técnicas de gestão de feridas (BROECKX et al., 2015; DAHLGREN, 2018)

A similaridade nas sequências de genes imunológicos, anatomia, fisiologia e farmacocinética, estrutura e função da pele dos porcos com o ser humano, além do fato de seu grande tamanho oferecer uma grande área disponível para transplante de múltiplos pedaços de pele humana, são vantagens desse modelo sobre os ratos e têm elegido esses animais como modelos promissores para estudo do reparo tecidual cutâneo (SEATON; HOCKING; GIBRAN, 2015; LIN et al., 2019b).

Modelo de porcos com deficiência imune severa combinada (SCID) também tem sido utilizados como promissores para o estudo de cicatrizes hipertróficas, queloides e várias condições inflamatórias cutâneas ou malignas da pele (SINGER et al., 2019).

O porco tem sido descrito como um bom modelo para testar os mecanismos de ação de técnicas para cicatrização, como no caso da terapia de pressão negativa sobre feridas (SHAH et al., 2019). Entretanto, os custos associados à manutenção e medicamentos e relativa falta de facilidade com relação à modulação genética podem ser proibitivos de estudos pré-clínicos em estágio inicial (AGARWAL, 2019).

Nesse cenário, é possível usufruir das propriedades terapêuticas de fatores de crescimento recombinantes, células-tronco mesenquimais e suas vesículas extracelulares, desenvolvendo estudos que validem sua eficácia como modelos *in vitro*, testando possibilidades de combinação e inovando em tratamentos alternativos, como uma futura terapia livre de células, para que possam então promover melhor cicatrização de feridas e contribuir com informações sobre os eventos celulares e moleculares decorrentes de tal terapia por meio de teste em modelos animais.

Capítulo 1: Efeito de rhPDGF-BB e/ou rhVEGF165 no secretoma de células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de fatores peptídicos de crescimento recombinante humanos em células-tronco mesenquimais e em modelo animal de cicatrização pele.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1** Obter e validar a atividade biológica de rhPDGF-BB e rhVEGF165 *in vitro*;
- 3.2.2** Estabelecer modelo de cicatrização de pele em dorso de ratos nude Rowett;
- 3.2.3** Aplicar FC em feridas cutâneas do modelo animal de cicatrização;
- 3.2.4** Avaliar efeito de FC na taxa de cicatrização e no novo tecido formado;
- 3.2.5** Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino (CTMA);
- 3.2.6** Validar a presença do receptor para PDGF-BB e VEGF nas CTMA;
- 3.2.7** Avaliar o efeito de FC sobre a capacidade de migração de CTMA;
- 3.2.8** Padronizar o isolamento de exossomos de CTMA;
- 3.2.9** Isolar, caracterizar e quantificar exossomos de CTMA tratadas ou não com FC;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Produção, Purificação e Caracterização de rhPDGF-BB e rhVEGF165

4.1.1 Produção de rhPDGF-BB e rhVEGF165

Os protocolos de produção e purificação foram determinados previamente de acordo com Carreira et al. (em preparação) e (BELCHIOR, 2014). Resumidamente: foram gerados clones superprodutores de rhPDGF-BB e rhVEGF165 com a construção contendo o vetor lentiviral pLV/PDGF-B ou pLV/VEGF165, cujos cDNAs foram amplificados do cDNA a partir do Banco de cDNAs de linhagens e tecidos humanos, gerados no laboratório NUCEL.

Para a geração dos clones superprodutores de cada fator de crescimento humano, foram utilizadas duas estratégias diferentes:

-rhPDGF-BB: Células da linhagem 293T foram transduzidas com partículas lentivirais para a construção pLV/PDGF-B e clones superprodutores foram caracterizados por atividade *in vitro* de incorporação de H³-timidina ao DNA em células murinas A31 (Carreira et al., em preparação);

-rhVEGF165: Células da linhagem HEK293 foram co-transfectadas com a construção pLV/VEGF165 em conjunto com o vetor pX343 que confere resistência ao antibiótico, o qual foi utilizado na seleção dos clones superprodutores. A atividade biológica *in vitro* foi testada em ensaios de crescimento de vasos de acordo com (BELCHIOR, 2014).

4.1.2 Purificação por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para obtenção do rhPDGF-BB produzido por células 293T PDGF-BB Clone 9, foi realizada a expansão do cultivo dessas células e coleta de aproximadamente 1.2L de meio condicionado sem SFB por 48 horas.

Para a purificação foi utilizado o sistema ÄktaPurifier UPC-100 (GE Healthcare), de cromatografia líquida de alta performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (Figura 4).

Figura 4 - Ilustração do processo de produção e purificação dos FC.



Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Esquema ilustrativo do processo de produção e purificação dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes. FC (rhPDGF-BB e rhVEGF165) foram purificados a partir de meio condicionado (sem SFB) de células 293 superprodutoras por cromatografia de afinidade a heparina.

Para a purificação do rhPDGF-BB, por cromatografia de afinidade, foi utilizada uma coluna de heparina de 5mL e tampões filtrados e degaseificados, a citar: tampão de equilíbrio (20mM Tris-Cl, pH 7,2) e de eluição (20mM Tris-Cl, 100mM NaCl, pH 7,2). Durante todo o processo, foi utilizado um fluxo constante de 5mL/min, respeitando o limite de pressão de 1,0MPa. Antes da aplicação da amostra, a coluna foi preparada com 3VC de tampão de equilíbrio (20mM Tris-Cl, pH 7,2) e em seguida a amostra de meio condicionado foi carregada ao sistema. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 2VC para retirada das proteínas não ligadas e em seguida as proteínas ligadas foram eluídas em um gradiente segmentado de NaCl com quatro *steps*, a citar: *step 1* - 32% NaCl; *step 2* - 44% NaCl; *step 3* - 77%; e *step 4* - 100% de NaCl. Após a purificação a coluna foi lavada com 2VC de tampão 20mM

Tris com 1,5M de NaCl e reequilibrada com 5VC de tampão de equilíbrio. A purificação do rhVEGF165 se deu pelo método de BELCHIOR, 2014.

4.1.3 Quantificação por ELISA

Para determinar a concentração de rhPDGF-BB das frações resultantes das purificação, foi realizado o ensaio de ELISA utilizando o *kit Human PDGF-BB DuoSet ELISA Development System* (R&D System). Foram adicionados 100 µL do anticorpo de captura (100ug/mL) a cada poço e a placa foi selada e incubada *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, o anticorpo de captura foi descartado, por inversão da placa, e foram realizadas três lavagens com PBST. Para o bloqueio dos poços foram adicionados 300 µL da solução 1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS e após 1h, a solução foi descartada e a placa foi novamente lavada três vezes com PBST. Uma curva do padrão (rhPDGF-BB) foi feita de 0,03 ng/mL até 2ng/mL. As amostras foram diluídas 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:5000 na mesma solução de bloqueio.

Após adição de 100µL dos padrões e das amostras, estas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente e, então, foram descartadas. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBST. Foram adicionados 100µL do anticorpo de detecção (100µg/mL) em cada poço. Após 2h a solução foi descartada e os poços foram lavados três vezes com PBST. Em seguida, foram adicionados 50µL da solução diluída (1:200) de estreptavidina conjugada à HRP por poço. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 20min ao abrigo da luz. A solução foi descartada e foram realizadas três lavagens com PBST. Em cada poço foi adicionado 100µL do reagente *TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) ELISA Substrate* (Pierce). Após 20 minutos de incubação, a reação foi parada com a adição

de 50µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro para placas (*SpectraMax Paradigm Microplate Reader*, Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm. Os dados foram gerados utilizando o software GraphPad Prism v. 6.0.

4.1.4 *Western blot*

Diferentes frações/coletas da purificação das proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As amostras foram tratadas com tampão de amostra 1X (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% glicerol, e 0.3% azul de bromofenol) em condição redutora (contendo 5% de beta-mercaptoetanol) para rhPDGF-BB e condição não-redutora para rhVEGF165, e desnaturadas à 95 °C por 5 min, e mantidas em gelo a seguir.

As proteínas presentes nas amostras foram fracionadas em 15% gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Um gel foi utilizado para coloração por Prata utilizando *Silver Stain Kit* (Sigma-Aldrich) e outro para análise das proteínas pela técnica de *Western blot*, utilizando anticorpo específico para cada proteína. Após a eletroforese, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare), por transferência úmida, utilizando o sistema *Mini Trans-blot[®] Cell* (Bio-rad), em tampão contendo 0.3% de Tris-HCl, 1.44% de glicina, 0.1% de SDS e 20% metanol, à 100V por 2h a 4 °C. A membrana de nitrocelulose foi bloqueada em solução de bloqueio *Starting Block PBS Solution* (Pierce) acrescida de 0.05% Tween-20 *overnight* a 4°C sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada em solução tamponada fosfato salina sem Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBS) contendo 0,05% Tween (PBST) e incubada com o anticorpo policlonal anti-PDGF-BB (1:1.000 - Abcam, Cat No. ab23914) ou

anticorpo policlonal anti-VEGF (1:500 - Santa Cruz Biotechnology, Cat No. SC507) por 3h à 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução tampão PBS contendo 0.05% de Tween-20 (v/v) (PBST) por 5min cada, sob leve agitação a temperatura ambiente. A membrana foi, então, incubada por 2h com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho-HRP conjugado à peroxidase (1:2.000 para PDGF-BB e 1:1000 para VEGF – Sigma-Aldrich) por 1 hora sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi novamente lavada como descrito acima e incubada durante 5min à temperatura ambiente com o substrato *C larity Western ECL Substrate* (Bio-rad). Após a retirada do excesso de solução, a membrana foi visualizada no sistema de fotodocumentação *Image Quant LAS4000 Mini* (GE) e as imagens adquiridas com tempo de exposição de 5min.

4.2 Modelo de cicatrização de pele em dorso de ratos Nude Rowett NIH

Para gerar o modelo de cicatrização foram utilizados ratos da linhagem nude Rowett (NTac: NIH-*Foxn1^{mu}*, FCF-IQ), que é uma linhagem de animais mutantes espontâneos, atímicos que não desenvolvem células T funcionais maduras (HANES, 2006; CAMPOS, 2018). Animais (machos/fêmeas) de três meses de idade e cerca de 130-150g, obtidos do biotério da Faculdade de Ciência Farmacêuticas/Instituto de Química FCF/IQ-USP e deixados em quarentena durante uma semana, acondicionados em gaiolas para ratos (até 4 animais por gaiola) com cama de maravalha e água e ração esterilizadas à vontade e ciclo de 12h luz/12h escuro a 22°C.

4.2.1 Feridas de excisão induzidas experimentalmente

A região dorsal foi escolhida para evitar o acesso dos animais à própria ferida e o processo de estabelecimento do modelo ocorreu como ilustrado na Figura 5. Previamente, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de tramadol 50mg/mL (200 µL) e solução Ringer (500 µL), via subcutânea. Em seguida, foram submetidos, também à anestesia inalatória com isoflurano (0,08%). A pele que continha pêlos foi cuidadosamente raspada e desinfetada com iodo e álcool 70%. Em seguida quatro feridas de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram excisadas com o auxílio de um *punch* e tesoura cirúrgica estéreis, uma ao lado da outra com uma distância entre elas de aproximadamente 3mm. Durante todo procedimento evitou-se a incisão da camada muscular para que a tensão da pele não fosse afetada. As feridas no dorso foram identificadas da seguinte maneira:

Ferida 1- localizada no lado superior esquerdo;

Ferida 2- localizada no lado superior direito;

Ferida 3- localizada no lado inferior esquerdo;

Ferida 4- localizada no lado inferior direito.

Figura 5 – Modelo de cicatrização de pele *in vivo*.



Imagem: KOGA, 2018.

Legenda: Painel ilustrativo do estabelecimento do modelo animal em ratos nude Rowett, desde a anestesia até a realização de feridas através de excisão da pele dorsal para aplicação tópica dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes.

4.3 Tratamento de feridas de pele com rhPDGF-BB e rhVEGF165

Para avaliar o potencial de reparo dos FC *in vivo*, foram testadas duas condições de veículo para os fatores de crescimento, representados em dois grupos como exemplificado na Figura 6. G1 onde nas feridas foi administrado FC em hidrogel de Alginato 2%, n=12 animais; e G2 onde nas feridas foi administrado FC em tampão veículo, n=12 animais. Ambos os grupos foram compostos por 3 subgrupos com 4 animais, para os seguintes tratamentos:

- Grupo A – 3 μ g rhPDGF-BB
- Grupo B – 3 μ g rhVEGF165

- Grupo C – 3 μ g rhPDGF-BB+rhVEGF165

Figura 6 – Esquema do desenho experimental *in vivo*.

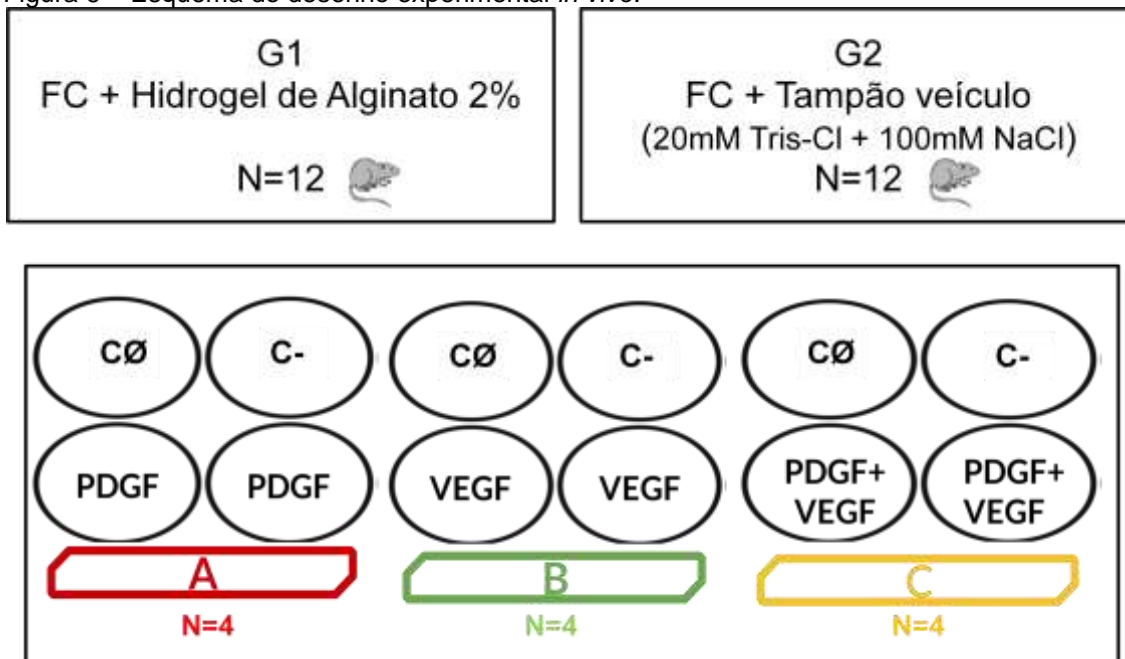


Imagem: KOGA, 2020

Legenda: Ilustração dos grupos de animais (ratos nude Rowett) para tratamento de feridas com FC em hidrogel de Alginato 2% e tampão veículo.

A ferida número 1 foi determinada controle negativo de cada animal, devido à possível variação individual no processo de cicatrização, a qual não recebeu nenhum tratamento. À ferida 2 foram aplicados 10 μ L de solução veículo dos FC (Tampão veículo 20mM Tris-Cl + 100mM NaCl) ou 10 μ L de hidrogel de Alginato 2% sem fatores, determinada como controle negativo do experimento. Às feridas 3 e 4 foram aplicados 3 μ g dos FC em 10 μ L de solução veículo ou em 10 μ L hidrogel de Alginato 2%.

4.3.1 Estimativa da taxa de cicatrização (Fechamento da ferida)

Os animais foram avaliados diariamente por 7 dias, e as feridas foram fotodocumentadas nos dias 0, 1, 3, 5 e 7 com escala de 1 cm nos registros. Assim, as medidas da área da ferida foram feitas através do software ImageJ 1.8.0 (NIH)

estabelecendo uma escala de 1cm (referência baseada em medida por régua) considerando a área mais externa da ferida. Para analisar corretamente as áreas das feridas, foi medida a área das feridas nos diferentes dias utilizando-se a média das feridas 3 e 4 que receberam o mesmo tratamento. A taxa de fechamento da ferida foi expressa como a porcentagem da área da ferida comparada com a do dia pós-operatório; isto é, a mudança no tamanho da ferida foi expressa como uma porcentagem do tamanho original da ferida no dia zero (100%). A redução do tamanho da ferida foi determinada usando a seguinte fórmula: % área recuperada = $(\text{Área inicial} - \text{Área final}) / \text{Área inicial}$.

4.3.2 Avaliação histológica das feridas cicatrizadas

Após sete dias de tratamento, com avaliação diária dos animais e fotodocumentação das lesões a cada dois dias, amostras de tecido cutâneo de todos os grupos foram coletadas imediatamente após eutanásia dos animais utilizando sobredosagem da associação de anestésicos cetamina e xilazina administrada via intraperitoneal (Cetamina - 100 mg/kg e Xilazina - 10 mg/kg IP 20-30 min), seguido por deslocamento cervical para comprovar a eutanásia (conforme recomendado pelo CEUA-FMVZ). As amostras foram fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4%, desidratadas e incluídas em parafina para seccionamento. Os tecidos da ferida foram cortados com 5 μm de espessura perpendicular à ferida, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), Tricômio de Masson (TM) e examinados em microscópio óptico de luz e capturados utilizando câmera e software Moticam.

As lâminas histológicas coradas com Hematoxilina & Eosina foram enviadas para análise histopatológica da área da ferida cicatrizada. Um patologista qualificado padronizou critérios histológicos válidos para caracterizar a área da ferida. Para

tanto, foram classificados por meio de parâmetros subjetivos não quantificáveis (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2013; DE MAYO et al., 2017):

- Infiltrado inflamatório:
 - Leve
 - Moderado
 - Severo
- Grau de resposta fibroblástica:
 - Ausente
 - Discreta
 - Moderada
 - Marcada
- Neovascularização,
 - Ausente
 - Discreta
 - Moderada
 - Marcada
- Reepitelização
 - Ausente
 - Incompleta
 - Completa

As lâminas coradas com Tricrômio de Masson foram utilizadas para análise histopatológica sobre a deposição de colágeno, e uma avaliação morfológica bruta das fibras de colágenos na área da ferida cicatrizada, utilizando o software ImageJ.

4.3.3 Imunohistoquímica

Para avaliar a cicatrização das feridas tratadas a nível molecular, foi realizado o ensaio de imunohistoquímica com anticorpos específicos para a fase proliferativa do processo de reparo. Para tanto, amostras do tecido cicatrizado, incluídas em parafina, foram preparadas em lâmina de vidro silanizadas e em seguida desparafinizadas em estufa a 60°C por 12 horas. Após esse período, foi realizada a recuperação antigênica em solução de recuperação do kit DAKO, por 5 min. a 100°C em panela de pressão, seguido por 30 min. de resfriamento das lâminas. Após 3 lavagens de 5 min. com PBS, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena por 10 min. ao abrigo da luz. Após lavagem, foi realizado bloqueio de sítios inespecíficos com solução de bloqueio (1% BSA em PBSA) por 20 min. ao abrigo da luz. Em seguida enxugou-se o excesso de solução e adicionou-se cerca de 100µL de anticorpo primário (Tabela 1) diluído em solução BSA 1% em PBS, sob o tecido e incubou-se *overnight* a 4°C em câmara úmida escura. Após duas lavagens de 5 min. com PBS, incubou-se com anticorpo secundário enzima HRP (Dako-K81) por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se e revelou-se com DAB por 6 min. Por fim as amostras foram lavadas em água corrente e contra-coradas com Hematoxilina, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 95% e 100%), diafanizadas em xilol por 2 min e montadas com lamínula e *VectaMount Permanent Mounting Medium* (Vector Laboratories).

Tabela 1- Anticorpos primários para Imunohistoquímica

| Marcador | Código | Diluição |
|--|---------------------|-----------------|
| Anti-Ki67 (cabra polyclonal) | Sc7844 (Santa Cruz) | 1:25 |
| Anti-Pró-Colágeno III (cabra polyclonal) | Sc8779 (Santa Cruz) | 1:50 |
| Anti-CD31 (coelho polyclonal) | ab28364 (Abcam) | 1:50 |
| Anti-VEGF (coelho polyclonal) | Sc507 (Santa Cruz) | 1:50 |
| Anti-Fibronectina (coelho polyclonal) | Ab2413 (Abcam) | 1:50 |
| Anti-Elastina (camundongo monoclonal) | Ab9519 (Abcam) | 1:50 |

As lâminas de imunohistoquímica foram analisadas quanto à expressão dos anticorpos específicos na área da ferida cicatrizada, representada pela coloração resultante da degradação da peroxidase no tecido. As amostras foram classificadas de forma cega por meio de escala numérica modificada de 0 a 4 (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2013), onde: 0 - ausência de marcação (fundo), 1 - marcação fraca (amarelo claro), 2 - marcação moderada (amarelo escuro), 3 - marcação positiva (marrom) e 4 - marcação fortemente positiva (marrom escuro).

4.4 Isolamento, Cultivo e Caracterização de células-tronco mesenquimais

4.4.1 Cultivo celular

Para os ensaios propostos foram utilizadas células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino (CTMA), as quais foram provenientes de amostras de tecido adiposo abdominal de cães com aproximadamente 2-3 anos, sem raça definida, de campanha de castração no estado de São Paulo.

Após coletada, a amostra foi acondicionada em meio de cultura com 1xampicilina/estreptomicina e armazenada em caixas térmicas a 4°C e transportadas para o Laboratório de Cultivo Celular do NUCEL/USP e seguiu-se o protocolo como exemplificado na Figura 7.

Figura 7 – Ilustração do processo de isolamento das CTMA.

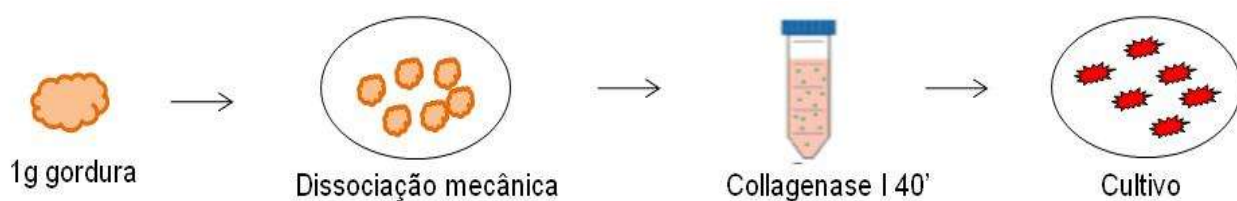


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Esquema ilustrativo do processo de isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, sua dissociação mecânica e enzimática e cultivo.

As amostras foram pesadas (1g) e lavadas com 5x em meio sem SFB contendo antibióticos (amp/strep/cipro), utilizando tubos Falcon de 50 mL. Em fluxo laminar estéril, com auxílio de bisturi o tecido foi dissociado e homogenizado e então transferido para 5mL de solução Colagenase a 1mg/mL em meio estéril sem SFB com antibióticos, incubado de 40 min a 1h a 37°C agitando a cada 10 min. Após esse período, a ação enzimática foi interrompida com 10 mL de meio com SFB, filtrada utilizando filtro tipo peneira (CellStrainer), e centrifugada por 800rpm 5 min. O sobrenadante lipídico foi descartado e o pellet ressuspendido em 10mL de meio com soro e centrifugado novamente. Descartado sobrenadante, meio novo foi adicionado ao pellet, e as células foram observadas em microscópio e incubadas a 37°C em estufa com saturação de 5% CO₂. No dia seguinte o meio foi trocado, e trocas a cada dois dias foram feitas até as células atingirem a confluência em cerca de uma semana.

As células foram mantidas em meio Alfa MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e penicilina (100 U/mL) / estreptomicina (100 µg/mL). Para subcultivo foi utilizada solução contendo tripsina. Os experimentos foram realizados com as células em até sétima passagem. As células foram congeladas em criotubos em 90% SFB contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidas em tanques de nitrogênio. Todas as células utilizadas neste estudo foram testadas para a presença de diferentes espécies de micoplasmas/ureaplasma por teste de PCR (reação da cadeia em polimerase), de acordo com Protocolos Operacionais Padrões do NUCEL, e estavam livres de micoplasmas/ureaplasma.

4.4.2 Caracterização celular por Citometria de Fluxo

A identificação e expressão dos marcadores de superfície das culturas de CTMA foram avaliadas através de ensaios de citometria de fluxo e de acordo com o perfil de imunofenotipagem de (DOMINICI et al., 2006).

Para caracterização das CTMA, 1×10^6 células foram coletadas utilizando solução Versene (EDTA 0,56mM em PBSA), posteriormente centrifugadas, e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida as células foram lavadas com PBSA e fixadas com 4% Paraformaldeído por 20 min e então se centrifugou, lavou-se e o pellet celular foi ressuspendido com 1mL de PBSA.

Para marcação das células, retirou-se o PBSA e adicionou-se solução de bloqueio (2,5% BSA) por 30 min a temperatura ambiente. Após bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 2) diluídos 1:250 em PBSA por 30 min. à temperatura ambiente ao abrigo da luz, sendo diferentes anticorpos conjugados aos fluorocromos ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e alofocianina (APC). Após esse período as amostras foram centrifugadas a 400xg por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em PBS e lavado duas vezes. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para tubos de citometria e os quais foram analisados em citômetro de fluxo (FACS Aria BD Sorter II Biosciences, CA, EUA).

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para ensaio de imunofetonipagem de CTMA por Citometria de fluxo

| Anticorpo | Fluoróforo | Código (BD Bioscience) | Diluição |
|-----------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------|
| IgG1 controle isotipo | PE | BD555749 | 1:100 |
| IgG1 controle isotipo | FITC | BD555548 | 1:100 |
| IgG2 controle isotipo | PE | BD555774 | 1:100 |
| CD105 | PE | BD560839 | 1:66 |
| CD90 | FITC | BD555595 | 1:100 |
| CD73 | PE | BD550257 | 1:66 |
| CD45 | APC | BD555485 | 1:100 |
| CD44 | APC | BD559942 | 1:100 |
| CD34 | PE | BD550761 | 1:100 |
| CD29 | PE | BD556049 | 1:100 |
| CD14 | FITC | BD555397 | 1:100 |

Legenda: Tabela com as características dos anticorpos conjugados a fluoróforos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. A diluição foi previamente padronizada em experimentos com diferentes concentrações dos anticorpos no laboratório.

4.4.3 Ensaio de Diferenciação celular

Para validar a capacidade das CTMA de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares, foi realizado o ensaio de diferenciação utilizando os kits de indução da StemPro® (GIBCO Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para tanto, 10^3 células foram cultivadas em placas de 24 poços até atingirem confluência e induzidas com meio específicos. Para diferenciação osteogênica utilizou-se meio indutor osteogênico (código A1007201) e para diferenciação condrogênica meio indutor condrogênico (código A1007001). As placas foram incubadas por 15 dias, com duas trocas de meio semanais. Após esse período, o meio indutor foi retirado, as células foram lavadas com PBSA 1x, e fixadas em paraformaldeído a 4%, lavadas e coradas com Vermelho de Alizarina 2% pH 5,0 (osteogênica) e Azul de

Toluidina 0,1% (condrogênica), e então as amostras foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas.

4.4.4 Imunocitoquímica

Para complementar a validação do perfil de células-tronco mesenquimais, realizou-se a imunofenotipagem celular por imunofluorescência utilizando dois marcadores específicos, CD90 e CD105. Para tanto 10^4 células foram semeadas em lamínula de vidro circular 15 mm (Glasscyto), em placas de cultivo 24 poços, e incubadas em meio Alfa MEM com nucleosídeos durante 48 horas. Após atingirem 70% de confluência, retirou-se o meio de cultivo, as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com 4% paraformaldeído. Em seguida lavou-se em solução de PBS 1X para retirar o fixador. Foi realizada a permeabilização da membrana celular através da adição de Triton X-100 a 0,1% (LGC Biotecnologia, Brasil) por 10 minutos a 4°C, e então as células foram lavadas com PBS. Em seguida, para evitar reações inespecíficas, foi realizado bloqueio com solução tampão IF 1:1 [(Triton X-100 0,2% + Tween 20) + 2% Albumina Sérica Bovina (BSA)] (LGC Biotecnologia) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, foram incubados com os anticorpos primários anti-CD90 (monoclonal coelho - ab133350 - Abcam) e anti-CD105 (monoclonal camundongo IgG1 – MA5-17041 Invitrogen) por 24 horas a 4°C. Após a primeira incubação, as células foram lavadas duas vezes, por 5 minutos cada, com PBS 1X e logo em seguida, incubadas com os anticorpos secundários Cabra anti-coelho IgG H+L Alexa Fluor 488 – (LifeTechnologies - 1:500) e Cabra anti-camundongo IgG Alexa Fluor 488 (LifeTechnologies - 1:500), por 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens, de 5 minutos cada, com PBS 1x, as lâminas foram montadas com Vectashield com 2,6-diamino-2fenilindole diclorato (DAPI) (Vector Laboratories,

EUA), e analisadas em microscópio Luz Confocal a Laser FV 1000 (Olympus), através do software Olympus FluoView versão 3.1, do CADI no Departamento de Cirurgia, área de Anatomia de Animais Domésticos e Silvestres, FMVZ-USP.

4.4.5 Validação celular para o receptor de FC por PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Como o tratamento das CTMA com os fatores de crescimento recombinantes humanos PDGF-BB e VEGF165 foi proposto, primeiramente foi necessário comprovar a presença dos receptores dos fatores de interesse. Para tanto, o RNA total das células foi extraído utilizando o *illustra™ RNAspin Mini Isolation Kit* (GE Healthcare), conforme recomendado pelo fabricante. Para a reação de transcrição reversa foi utilizado 1 µg de RNA tratado com 2U *DNaseI* (RNase free, Fermentas, Thermo-Fischer), 20U *RNaseOUT™* (Invitrogen) e 1X *SuperScript® III Buffer* (Invitrogen) e água deionizada (Milli-Q®, Millipore) em um volume total de 10µL de reação. Esta mistura foi incubada inicialmente a 65°C por 10 min e depois a 4°C por 1 min. Posteriormente, foi adicionado para cada reação 0,77mM dNTP (Fermentas, Thermo-Scientific), 500 µg *OligodT₁₈ primer* (Fermentas, Thermo-Scientific) e 1 µL água deionizada e a mistura foi incubada por 10 min. a 65°C. A seguir foi acrescentado à reação: 1X *SuperScript® III Buffer* (Invitrogen), 5mM Ditioneitol (Invitrogen), 20U *RNaseOUT™* (Invitrogen), 1 µL enzima *SuperScript® III* (Invitrogen) e 0,5 µL água deionizada e incubado a 25 °C por 10 min, a 55 °C por 2 horas e a 75 °C por 15 min.

Por fim, foi adicionado a cada reação 1 µL RNaseH (Fermentas, ThermoFischer) e incubado por 30 min a 37 °C e por 10 min. a 72 °C. Cada amostra

(20 µL) foi diluída com a adição de 40 µL de água deionizada e armazenadas em alíquotas a -20°C.

Para quantificar a amplificação dos genes de interesse, a transcrição reversa (RT) foi realizada usando o kit *Mix SYBR Green* com os primers RT (Tabela 3) e a mistura fornecida pelo kit. A reação foi realizada a 42°C por 30 min. Para todas as amostras, um RT negativo foi utilizado como controle, consistindo em uma reação de RT omitindo a transcriptase reversa. A reação em cadeia quantitativa da RT-polimerase (PCR) foi realizada no cDNA no *ViiA 7 Real-Time PCR* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições de amplificação: 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60 ° C por 1 min.

Tabela 3– Sequências de *primers* para qRT-PCR

| <i>Primers</i> | Símbolo | Direção do gene |
|---|----------------|--|
| PDGFRb | RPDGF | <i>Forward</i> 5' CAAGAAGCGGCCATGAATCA 3' <i>Reverse</i> 5' CGGCCCTAGTGAGTTGTTGT 3' |
| <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> | GAPDH | <i>Forward</i> 5' AGTATGATTCTACCCACGGCAAA 3' <i>Reverse</i> 5' CACAACATACTCAGCACCAGCAT 3' |
| <i>Endoglin</i> | CD105 | <i>Forward</i> 5' CACAACCTGGCACCCTTACCT 3' <i>Reverse</i> 5' CATGCAACGGAAGGATGGTC 3' |
| <i>Fms-related tyrosine kinase</i> | FLT1 | <i>Forward</i> 5' CGGGGATTTCACTGTACATCT 3' <i>Reverse</i> 5' AAGCAAACCACACTGGCTTC 3' |
| <i>Thy-1 cell surface antigen</i> | CD90/ Thy-1 | <i>Forward</i> 5' TGTGAGGGGTAGAAGGGTAGA 3' <i>Reverse</i> 5' TATATGCTAGGCCAGATGCAC 3' |

4.4.6 Ensaio de migração celular (*Scratch Assay*)

A capacidade migratória das CTMA tratadas ou não com FC foi avaliada através do ensaio *in vitro* de cicatrização de lesão em monocamada (*Scratch Assay*), utilizando FC em diferentes condições: tampão veículo ou em 2% hidrogel de Alginato.

4.4.6.1 Teste dos FC em tampão veículo

Para tanto 1×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 6 poços e cultivadas em meio Alfa MEM suplementado com 10% SFB e antibióticos, até a monocamada atingir 80% de confluência. A lesão na monocamada foi feita com o auxílio da ponta de uma ponteira de 10 μ L. O meio de cultura foi então substituído por uma das seguintes condições:

- A) Meio 1% SFB (Controle negativo);
- B) Meio 1% SFB contendo 10ng/mL de Tampão veículo (Controle Tampão);
- C) Meio 1% SFB contendo 10ng/mL de rhPDGF-BB;
- D) Meio 1% SFB contendo 10ng/mL rhVEGF165;
- E) Meio 1% SFB contendo 10ng/mL de rhPDGF-BB+rhVEGF165.

4.4.6.2 Teste dos FC em hidrogel de alginato 2%

Para avaliar o efeito dos FC em hidrogel como veículo de aplicação e liberação, foi preparado hidrogel de alginato na concentração de 2%. Para tanto 0,1g de alginato ultrapuro foi diluído em 5 mL de cloreto de sódio 0,9%. Após total diluição, filtrou-se em filtro 0,22 μ m e em seguida, foram adicionados os FC ao hidrogel. Em placa de 24poços, 10^3 células foram semeadas e cultivadas em 500 μ L meio Alfa MEM suplementado com 10% SFB e antibióticos, até a monocamada atingir 80% de confluência e a lesão na monocamada foi feita com o auxílio da ponta de uma ponteira de 10 μ L. Após a lesão na monocamada, adicionou-se 450 μ L de meio de cultura 1%SFB e sobre o poço foram adicionados poços *Transwell* devidamente esterilizados, com hidrogel de Alginato 2% nas seguintes condições:

- A) 50 μ L Meio 1% SFB + Hidrogel (Controle negativo);

- B) 50µL Meio 1% SFB + Hidrogel contendo 10ng/mL de Tampão veículo (Controle hidrogel);
- C) 50µL Meio 1% SFB +Hidrogel contendo 10ng/mL de rhPDGF-BB;
- D) 50µL Meio 1% SFB + Hidrogel contendo 10ng/mL rhVEGF165;
- E) 50µL Meio 1% SFB + Hidrogel contendo 10ng/mL de rhPDGF-BB+rhVEGF165.

O ensaio foi analisado e registrado em microscópio Invertido Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Americas) nos tempos 0h, 6h, 12h, 24h e 48h no local da lesão. A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ do NIH (do inglês *National Institutes of Health*), através do cálculo percentual da área regenerada após o período de 48 horas, utilizando a equação, (LIANG; PARK; GUAN, 2007):

$$\% \text{ área recuperada} = (\text{Área inicial} - \text{Área final}) / \text{Área inicial}.$$

4.5 Isolamento e caracterização de Exossomos de Células-tronco mesenquimais

4.5.1 Padronização do isolamento de exossomos

Para garantir o melhor protocolo a ser utilizado para isolar as vesículas celulares do meio condicionado por células, após extensa consulta bibliográfica dos métodos mais utilizados, foram testados dois protocolos (Figura 8) os quais constituíram:

- 1) Isolamento pelo Kit TEI – *Total Exosomes Isolation* (Invitrogen);
- 2) Concentração do meio por Ultrafiltração e isolamento por Ultracentrifugação (UC);

Para tanto, meio condicionado sem SFB, de 5 tipos celulares diferentes (linhagens e células-tronco) foram utilizados para testar os protocolos.

Figura 8 - Protocolos de padronização do isolamento de exossomos.

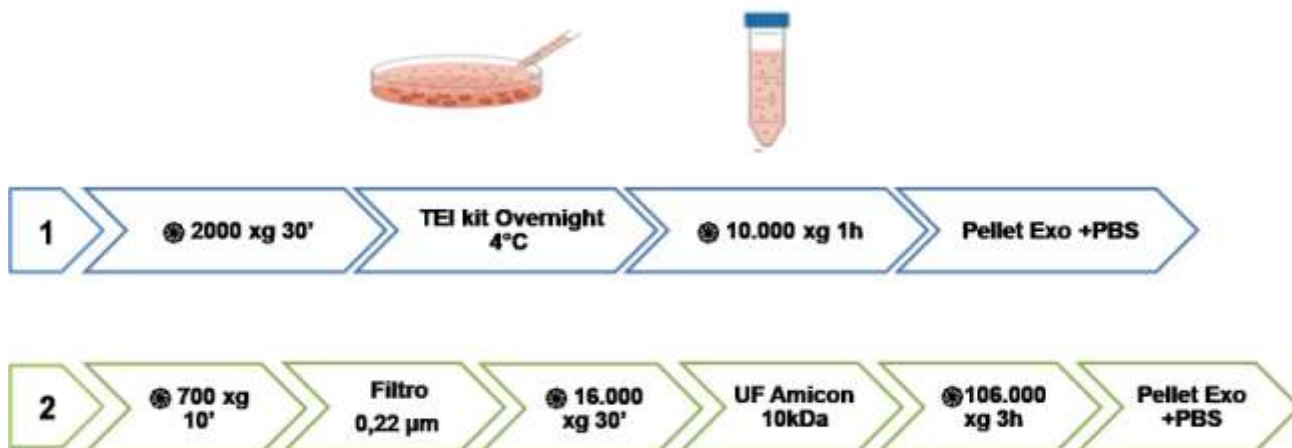


Imagem: KOGA,2019.

Legenda: Fluxograma dos protocolos utilizados para padronizar o isolamento de exossomos de meio condicionado por células. Protocolo nº 1 em azul, utilizando kit TEI; Protocolo nº 2 em verde, utilizando ultracentrifugação.

O primeiro protocolo foi testado o kit de acordo as instruções do fabricante. Foi utilizado 10 mL de meio condicionado pelas células, o qual foi centrifugado a 2000 xg para remoção de debris celulares, o pellet foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado metade do volume do reagente do kit TEI, incubado overnight a 4°C. Em seguida, o meio foi centrifugado a 10.000 xg por 1h e então o pellet foi ressuspenso em 120 µL de PBS filtrado e as amostras de exossomos foram armazenadas a -20°C para análises posteriores.

O segundo protocolo consistiu na coleta de meio condicionado o qual foi centrifugado a 700 xg por 10 minutos para sedimentação de debris celulares, em seguida o sobrenadante foi filtrado com filtro 0,22µm saturado com 10 mL de PBS. A seguir, o volume foi centrifugado a 16.000 xg por 30 min a 4°C para retirar possíveis organelas como mitocôndrias e lisossomas, e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, devido a necessidade de adequar o volume de meio condicionado para a

ultracentrífuga, o meio foi concentrado em ultrafiltro com corte de 10kDa (Amicon Ultra-15 10K, Merck) previamente lavado com 10mL de água deionizada (miliQ®, Millipore). Para concentração das amostras, o meio foi adicionado ao ultrafiltro e centrifugado em rotor basculante a 3000 xg por 10 minutos e o procedimento foi repetido até que todo o volume fosse completamente concentrado. O volume final concentrado foi de 1mL o qual foi submetido à ultracentrifugação (UC) a 106.000 xg por 3 horas (Ultracentrífuga Beckman-Counter – rotor TLS55), e o pellet contendo os exossomos foi ressuspensionado em 120µL de PBS e armazenado a -20°C para futuras análises.

Após o isolamento as amostras foram quantificadas no aparelho Nanosight LM14C do Instituto AC Camargo, para comparar em qual protocolo foi possível obter maior quantidade de vesículas.

4.5.2 Isolamento de Exossomos de CTMA tratadas ou não com FC

Após a escolha do melhor método para isolamento dos exossomos, foi possível utilizá-lo para isolar as amostras das células de interesse.

Para avaliar o efeito dos FC sobre o secretoma de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, 10^6 células foram semeadas em frascos com 75 cm², cultivadas e expandidas com meio Alfa MEM 10% SFB em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ úmida até atingirem quase a confluência (80% - cerca de 48h). Em seguida, o meio de cultivo foi retirado, e as células foram lavadas uma vez com PBS e incubou-se 24 e 48 horas com meio de cultivo sem SFB contendo os seguintes tratamentos, em duplicata a cada repetição (Figura 9):

- Controle negativo – apenas 10 mL de meio sem soro;

- Controle negativo 10ng tampão veículo (20mM Tris-Cl +100mM NaCl) em 10 mL de meio sem soro;
- 10ng rhPDGF-BB em 10 mL de meio sem soro;
- 10ng rhVEGF165 em 10 mL de meio sem soro;
- 10ng rhPDGF-BB+ rhVEGF165 em 10 mL de meio sem soro;

Após os tempos de incubação determinados o meio foi coletado e submetido ao protocolo de isolamento de ultracentrifugação, previamente descrito.

Figura 9 – Desenho experimental do tratamento das CTMA com FC e isolamento de exossomos.

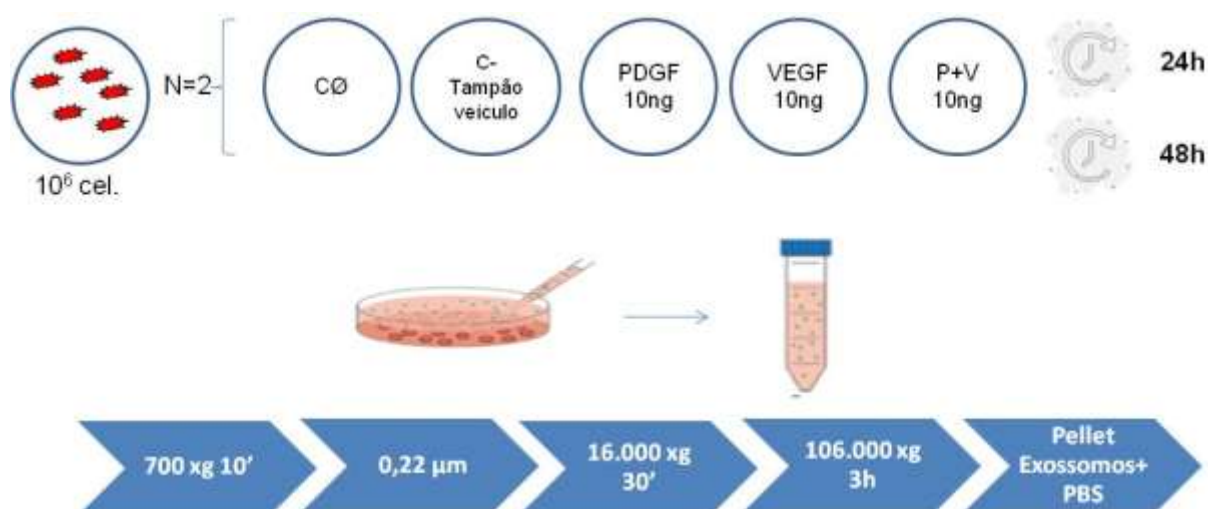


Imagem: KOGA, 2019.

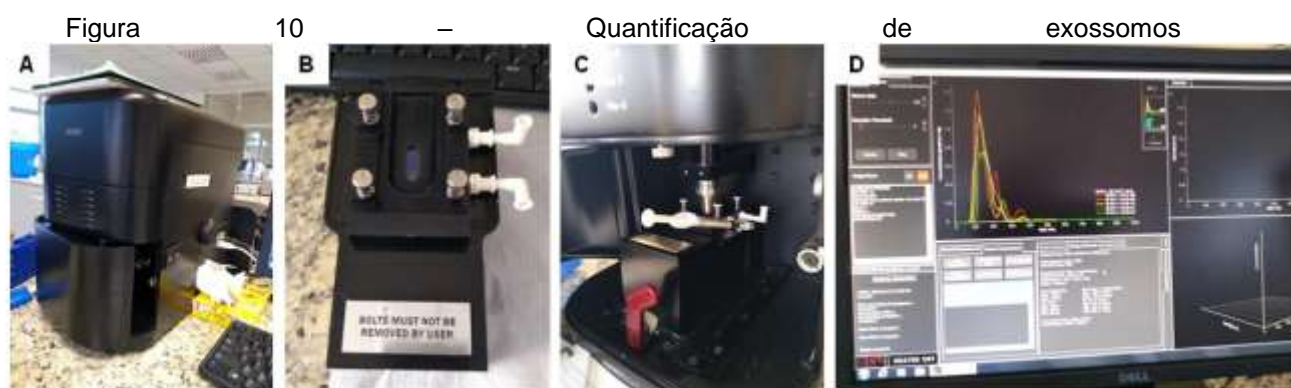
Legenda: Ilustração do processo de tratamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo para coleta de meio condicionado e isolamento de exossomos.

4.5.3 Caracterização de Exossomos por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para análise morfológica dos exossomos isolados foi realizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Para tanto os exossomos foram gotejados na tela de resina e após secagem foram pós-fixados em 0,5% de acetato de uranila e então analisados e fotografados no aparelho JEOL JEM 1010, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Medicina da USP.

4.5.4 Quantificação dos exossomos de CTMA

Após serem isolados a partir do meio condicionado de CTMA, os exossomos foram quantificados no aparelho Nanosight NS300 (Malvern Panalytical) (Figura 10A) no Departamento de Medicina Veterinária FZEA-USP Pirassununga. Para tanto, 0,5 mL das amostras foram inseridas na câmara do aparelho utilizando uma seringa estéril (Figura 10B), então a câmara foi acoplada ao aparelho (Figura 10C) onde a leitura se deu através da incidência de um laser sobre as nanopartículas em suspensão e os dados foram capturados e exportados pelo software que realiza a medição da distribuição de tamanho e concentração em alta resolução (Figura 10D).



| Valores de Referência | Amostra | Moda (nm) | Concentração partículas/mL | Total Valid Tracks | Partículas/Frame | Fator de Diluição |
|-----------------------|----------------|---------------|----------------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| | | <u>PBS</u> | ≤ 150 nm | - | < 500 | < 20 |
| | <u>Amostra</u> | ≤ 150 nm | - | ≥ 500 | > 20 e < 100 | - |

Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Ilustração das etapas de quantificação de exossomos pelo aparelho Nanosight 3000. A) Fotografia do aparelho; B) Câmara onde foram aplicadas amostras de exossomos por meio dos acessos; C) Seringa contendo amostras, acoplada à câmara de leitura do aparelho; D) Imagem da tela de operação do Software utilizado; Tabela: Valores de referência (PBS) e parâmetros utilizados para quantificação dos exossomos.

O Nanosight ilumina as nanopartículas em movimento com uma fonte de laser, o espalhamento de luz dessas partículas é detectado por uma câmera através de um microscópio óptico, as partículas são rastreadas individualmente e todas ao mesmo tempo, o que permite gerar dados de alta resolução do número de partículas versus a distribuição de tamanho da amostra em minutos. Uma plataforma óptica motorizada controlada pelo software permite troca rápida da amostra e novo foco após a limpeza do sistema, aprimorando a reprodutibilidade. A temperatura da amostra é totalmente programável através do software do Nanoparticle Tracking Analysis (NTA 3.4 Build 3.4.003).

Após obtenção dos dados, os parâmetros da tabela de referência (Figura 10) foram utilizados para comparação dos resultados, sempre utilizando o valor do PBS diluente como controle.

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizadas no software GraphPadPrism 6.0, Software Inc, USA, realizando o teste ANOVA para comparação entre os diferentes tratamentos, considerando significância $p > 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES PEPTÍDICOS DE CRESCIMENTO RECOMBINANTES

O processo de purificação da proteína rhPDGF-BB produzida em células HEK293 se deu pelo meio condicionado pelas células em uma coluna de afinidade por heparina por HPLC. O cromatograma obtido (Figura 11) mostra o processo de purificação com uma coluna de afinidade por heparina em um gradiente de NaCl segmentado em três etapas. A linha azul representa a absorvância no comprimento de onda UV e a linha marrom representa a condutância da amostra. Foi possível observar a presença de dois picos de absorvância no comprimento de onda UV 100nm, e um pico no comprimento de onda UV aproximadamente 50nm, um em cada platô de NaCl, indicando a liberação de proteína com diferentes graus de afinidade à coluna. Esse resultado foi observado em gel corado com prata (Figura 12A) contendo as proteínas totais, e comprovado pelo ensaio de *Western blot* (Figura 12B) realizado com as frações da purificação, utilizando anticorpo específico e demonstrou que a proteína foi liberada preferencialmente em duas etapas de concentração de NaCl correspondendo ao pico 2 com 44% NaCl (Frações C4-C6, *Step 2*) e ao pico 3 com 77% NaCl (Frações D4 e D3, *Step 3*).

Figura 11 - Cromatograma da purificação de rhPDGF-BB.

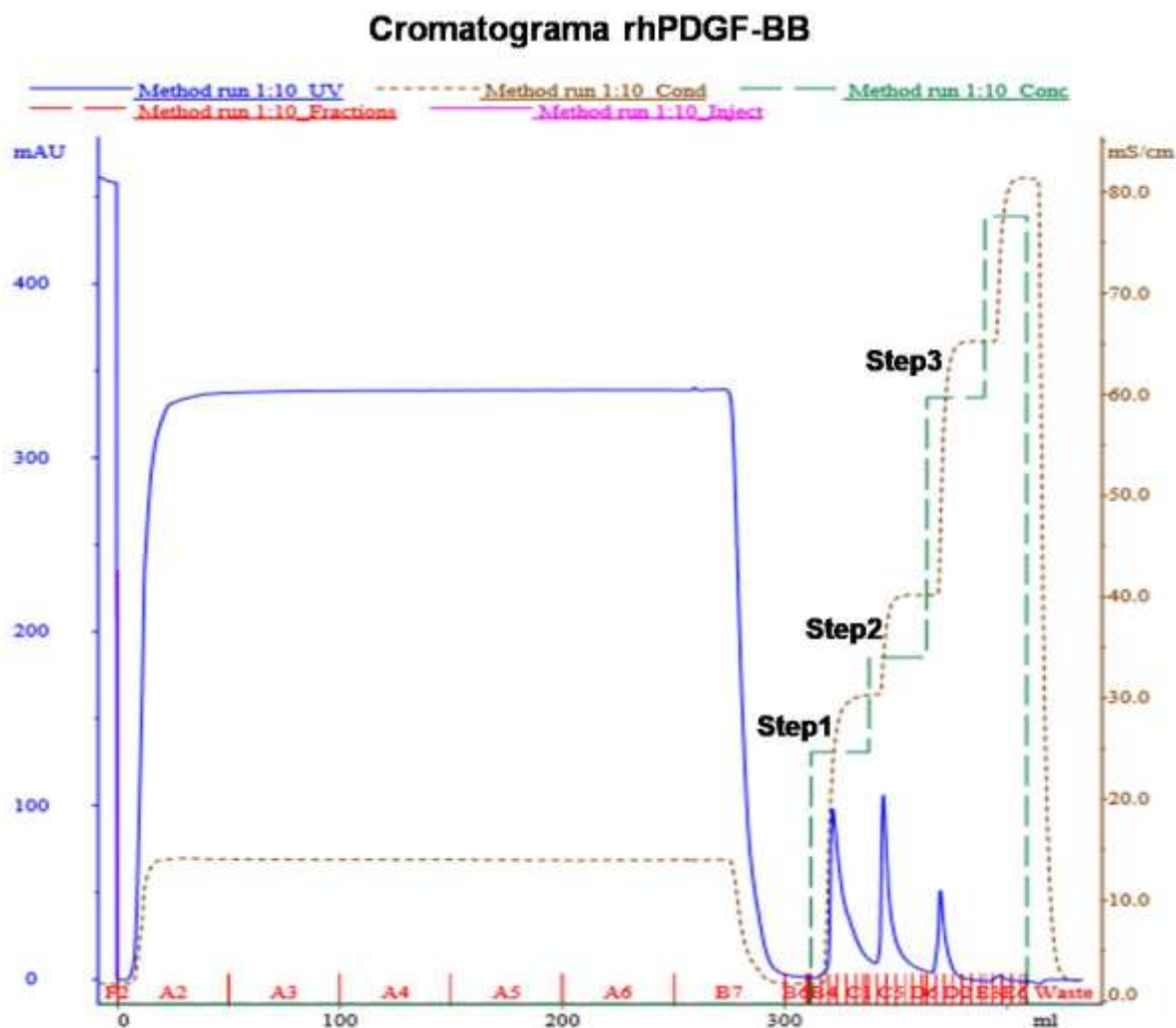


Imagem: KOGA, 2018.

Legenda: Cromatograma da Purificação PDGF-BB de meio condicionado por células 293T PDGF-BB clone 9 em passagem 24, em HPLC por afinidade à coluna de Heparina 5 mL. rhPDGF-BB purificado por cromatografia de afinidade à heparina: Frações B3-C1 (Pico 1-Step 1); Frações C4-C6 (Pico 2 - Step 2); Frações D4 e D3 (Pico 3 - Step 3); Fração residual (Resíduo); Meio condicionado original (C+MC).

Figura 12 – Caracterização de rhPDGF-BB por *Western blot*.

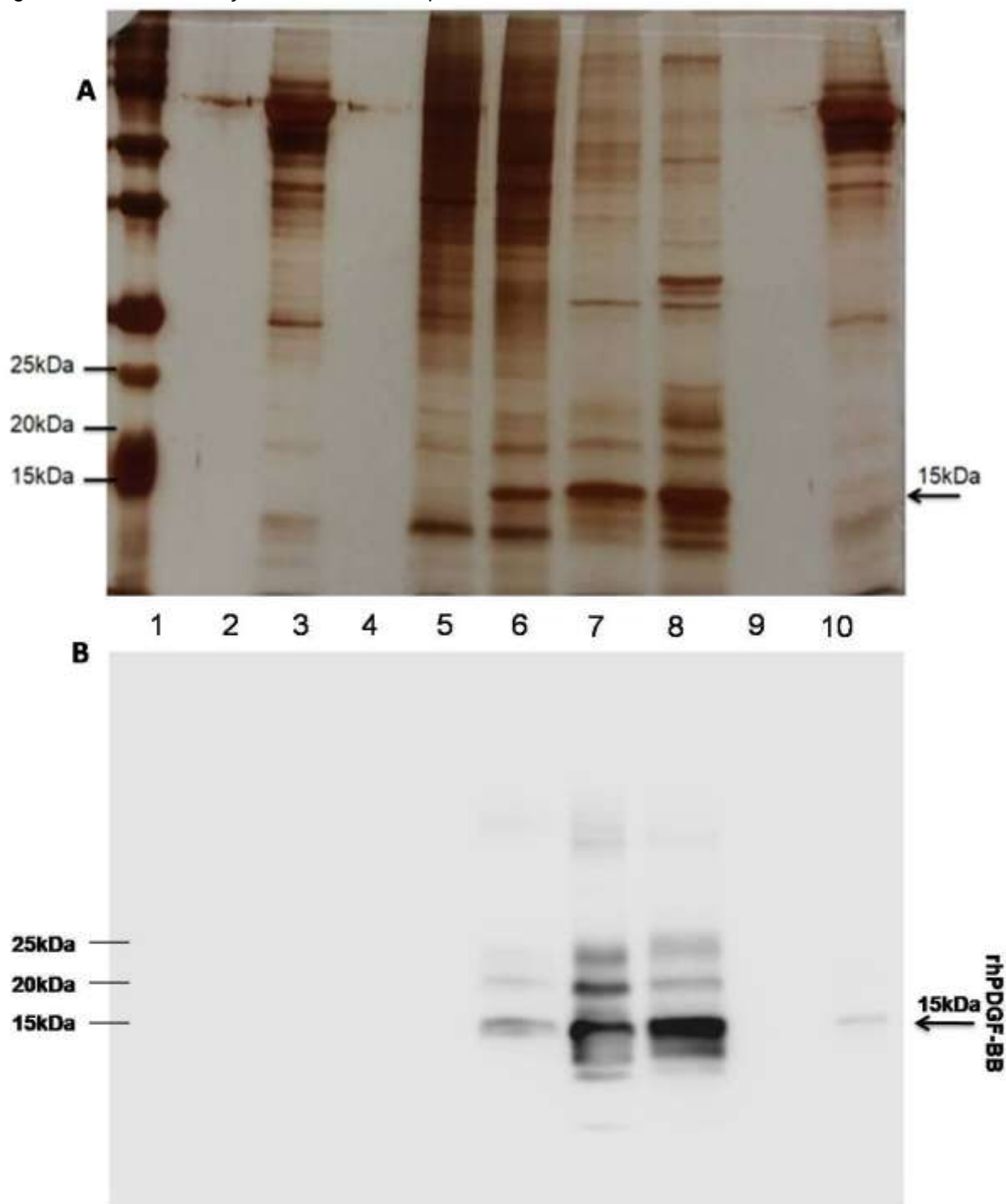


Imagem: AGUIAR,2018

Legenda: Análise das frações de purificação de rhPDGF-BB por cromatografia de afinidade à heparina (HPLC). (A) Análise de rhPDGF-BB em gel SDS-PAGE corado com prata; (B) *Western blot* com anticorpo anti-PDGF-BB indicando as frações contendo a proteína. Amostras: 1- marcador de peso molecular; 2- Tampão de eluição (C- Tampão); 3- *Flowthrough*; 4-Fração lavagens; 5- Pico 1-*Step* 1 (Frações B3-C1); 6- Pico 2 – *Step* 2 (Frações C4-C6); 7- Pico 3-*Step* 3 (Fração D4); 8- Pico 3-*Step* 3 (Fração D3); 9- Fração residual; 10- Controle positivo (Meio condicionado original).

Através da quantificação de rhPDGF-BB (Gráfico 1) pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), foi possível determinar que a média de produção após a purificação foi da concentração de 200 a 400 μ g/mL.

Gráfico 1- Quantificação de rhPDGF-BB por ELISA.

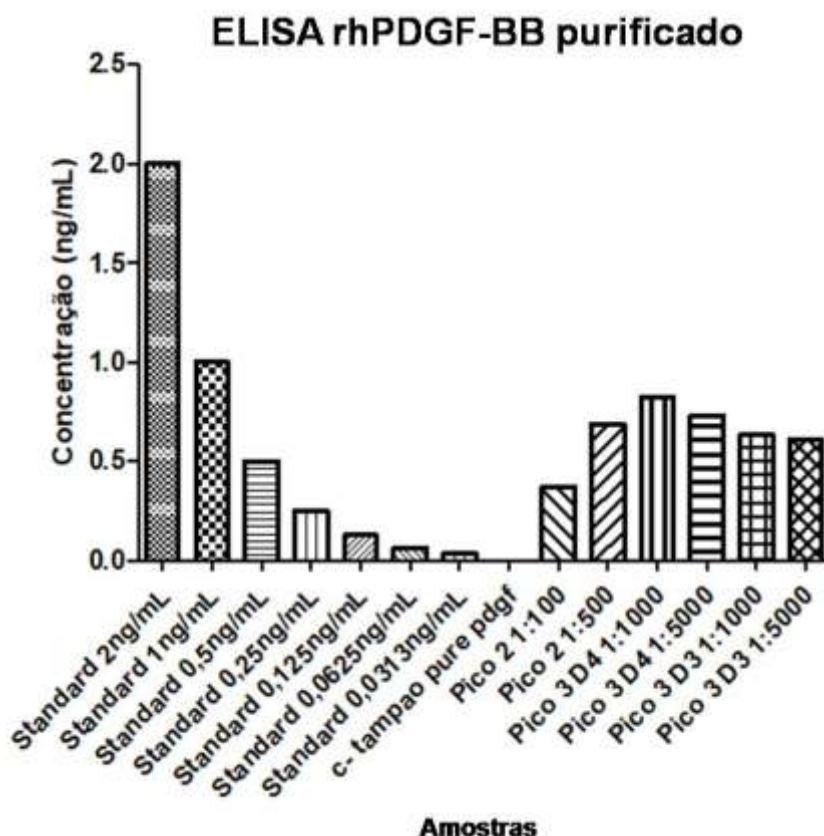


Imagem: KOGA, 2017

Legenda: Gráfico de quantificação de rhPDGF-BB por ELISA. O gráfico mostra os resultados obtidos por regressão não-linear da curva padrão kit ELISA Human-PDGF-BB interpolado com os dados dos eluatos da purificação; Gráfico das amostras das frações resultantes da purificação, em diferentes diluições onde pico 2 se refere ao *step* 2; pico 3 se refere ao *step* 3.

A proteína rhVEGF165 utilizada estava disponível no NUCEL e foi previamente purificada por colaboradores também por método de cromatografia de acordo com sua característica de afinidade a heparina (BELCHIOR, 2014). A proteína presente na fração purificada utilizada foi precipitada e aplicada em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE), e fracionada por eletroforese. Um gel foi corado com prata (Figura

13A), no qual é possível ver a precipitação de proteínas totais da amostra, e outro gel foi submetido à transferência das proteínas por *eletroblotting* e imunolocalização com um anticorpo anti-VEGF e revelação por quimiluminescência, o que permitiu a identificação de bandas múltiplas (23-25 kDa) como esperado para a isoforma rhVEGF165 obtida dos clones de células HEK293, como indicado na figura 13B, confirmando a presença da proteína na fração purificada utilizada.

Figura 13 – Caracterização de rhVEGF165 por *Western blot*.

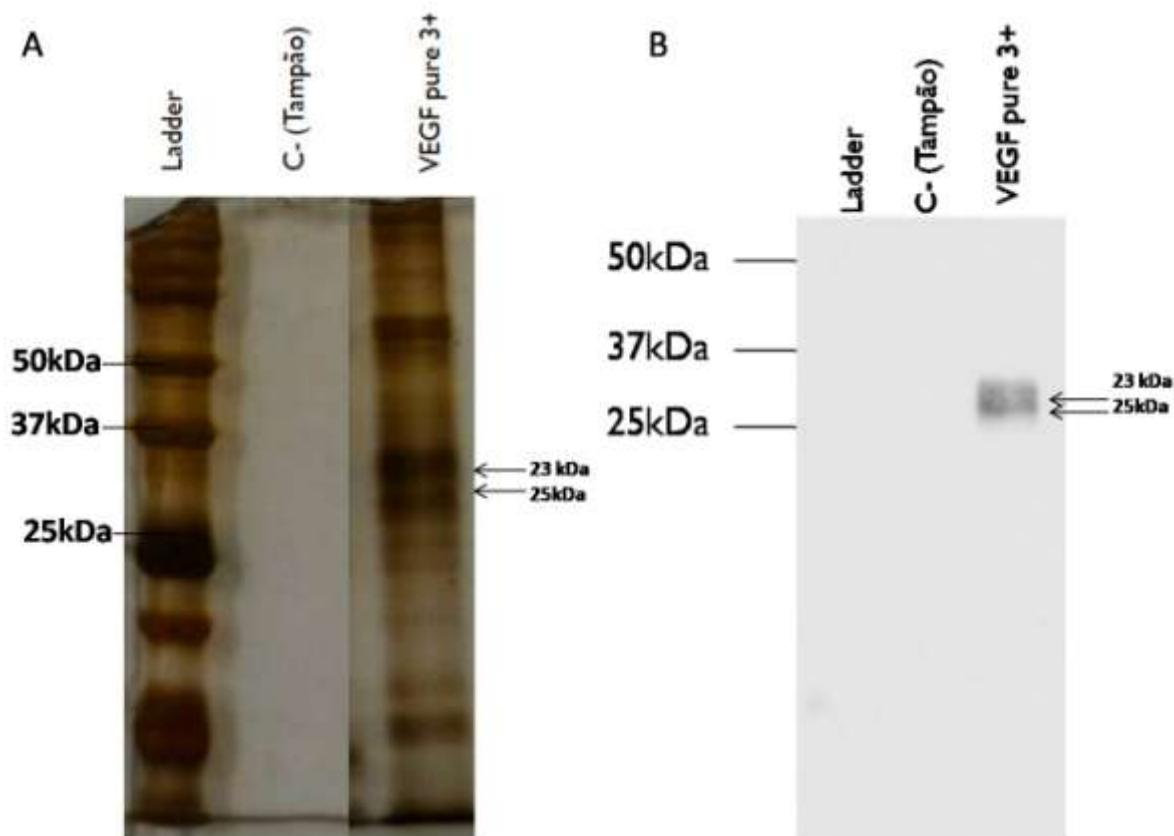


Imagem: KOGA, 2018.

Legenda: Análise de rhVEGF165 purificada por cromatografia de afinidade à heparina por HPLC, por SDS-PAGE corado com prata e *Western Blot*. (A) Análise de rhVEGF165 em gel SDS-PAGE corado com prata; (B) *Western blot* com anticorpo anti-VEGF indicando as frações contendo a proteína. Amostras: 1 - marcador de peso molecular; 2 - Tampão de eluição (C- Tampão); 3 -VEGF purificado.

5.2 MODELO ANIMAL DE CICATRIZAÇÃO DE PELE

5.2.1 CINÉTICA DE FECHAMENTO DAS FERIDAS

A fim de determinar o efeito de rhPDGF-BB e rhVEGF165 no processo de cicatrização de pele, os FC foram aplicados uma única vez no dia zero nas feridas excisionais nos ratos nude. Os painéis da evolução da cicatrização dos animais tratados com FC em Hidrogel (Figura 14) e com FC em tampão (Figura 15) mostram o aspecto macroscópico das feridas cutâneas após a cirurgia no dia zero.

Após a aplicação dos FC foi possível observar o aspecto úmido e a camada rosada muscular exposta, algumas regiões com certo acúmulo de sangue no local, decorrente da excisão da pele. No dia 1 após a cirurgia foi possível observar a formação do coágulo na região da ferida em aspecto avermelhado e amarelado mais no centro da lesão, e vermelho mais escuro nas bordas entre a pele íntegra. No dia 3 após a cirurgia foi possível observar o aumento do coágulo (região vermelho escuro sobre a ferida) e início da mudança do aspecto úmido da ferida para mais seco e rígido, nos animais que receberam ambos FC em hidrogel combinados já foi possível observar a diminuição do tamanho da ferida (Figura 14M). No dia 5 foi possível observar o avanço do fechamento da ferida, o ressecamento da crosta, bem como a diminuição da vermelhidão no local. No dia 7 o fechamento da ferida se tornou mais evidente em todos os grupos, com a diminuição do seu tamanho em relação ao dia 0 após a cirurgia. A permanência da crosta em algumas lesões foi observado, e seu desprendimento em outras permitiu observar um novo tecido formado, de coloração rosada e aspecto macio, preenchendo a área anteriormente exposta. As feridas tratadas com os fatores rhPDGF-BB + rhVEGF165 em hidrogel (Figura 14 L-O) apresentaram sinais avançados de cicatrização e nos dias 1, 3 e 5 cicatrizaram significativamente mais rápido em relação às feridas controle ou

tratadas apenas com os FC rhVEGF165 ou rhPDGF-BB (Gráfico 2A). Por outro lado, as feridas que receberam FC em tampão veículo, apresentaram um fechamento da lesão mais tardio, por volta do dia 5 após cirurgia, com crostas mais protuberantes que em sua maioria se desprenderam apenas no dia 7, e não houve diferença entre os tratamentos e os controles em relação à redução do tamanho da ferida após 7 dias (Gráfico 3A).

A mudança no tamanho da ferida foi expressa como porcentagem da área da ferida nos dias após a cirurgia em comparação com a área da ferida no dia 0 (100%) nos diferentes grupos, o que demonstrou que ambos os grupos alcançaram um fechamento de cerca de 75% da área inicial das feridas (Gráfico 2B e 3B), o que foi demonstrado também quando comparamos macroscopicamente os grupos tratados no dia 7 após cirurgia, não havendo diferença entre o tamanho das feridas tratadas com FC em hidrogel de Alginato 2% e FC em tampão veículo (Gráfico 4).

Figura 14 – Imagens macroscópicas de feridas do grupo tratado com FC em hidrogel de alginato.

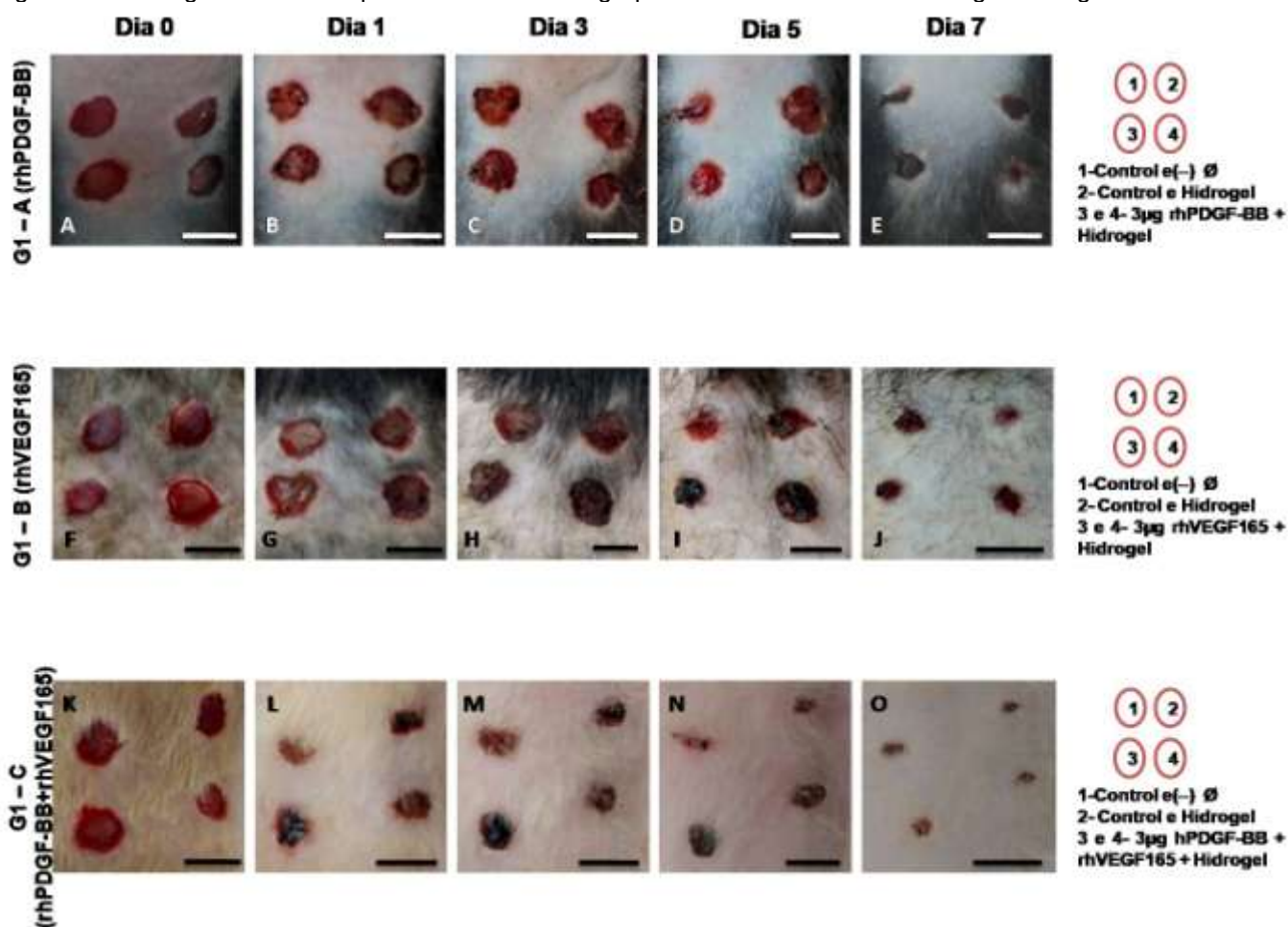


Imagem: KOGA,2019.

Legenda: Imagens macroscópicas das feridas no dorso de ratos nude Rowett tratados com FC em hidrogel de alginato 2%. Os animais receberam uma aplicação de FC ou veículo (controle) em hidrogel, no dia 0 da da cirurgia. Os animais foram acompanhados ao longo de 7 dias, com registros fotográficos em D0, D1, D3, D5 e D7. G1A: Grupo tratado com rhPDGF-BB; G1B: Grupo tratado com rhVEGF165; G1C: Grupo tratado com rhPDGF-BB+ rhVEGF165. Em todos os grupos de animais foram realizadas quatro feridas: 1- Controle sem adição de FC; 2- Controle do hidrogel de alginato; 3 e 4µg de FC. A, F, K: Dia 0, dia da cirurgia e tratamento; Dia 1: B, G, L; Dia 3: C, H, M; Dia 5: D, I, N; Dia 7: E, J, O. A barra indica 1 cm. N= 4 animais/grupo.

Gráfico 2 – Evolução da cicatrização de feridas tratadas FC em hidrogel de alginato.

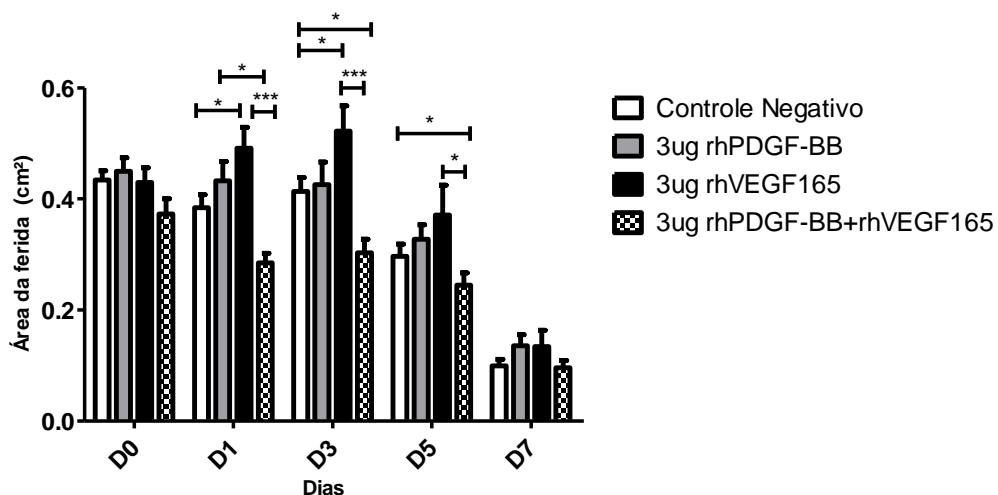
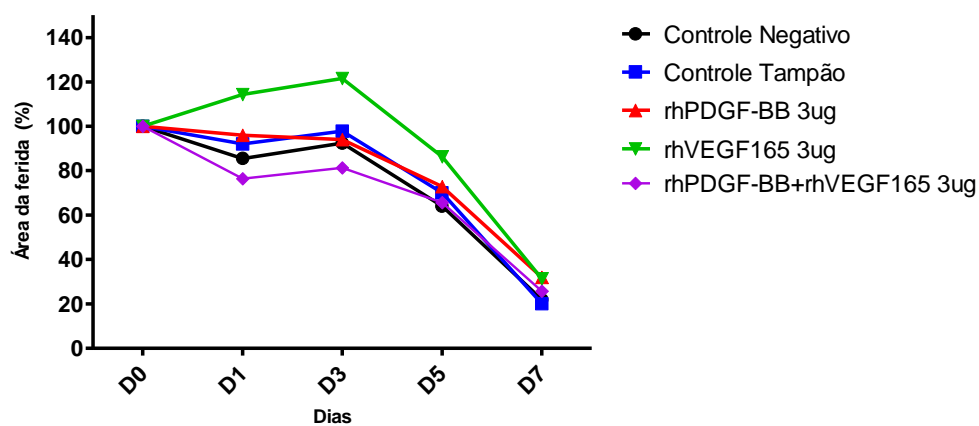
A Efeito dos Fatores de Crescimento *in vivo* (Hidrogel)**B** Taxa de fechamento da lesão *in vivo* (Hidrogel)

Gráfico: KOGA,2020.

Legenda: Efeito de FC em hidrogel na redução da área da ferida (A) e (2way ANOVA, pós-teste Bonferroni- $P=0,017$; * $P<0,5$; *** $P<0,001$), Taxa (%) de cicatrização de feridas em modelo animal nude (B).

Figura 15 – Imagens macroscópicas de feridas do grupo tratado com FC.

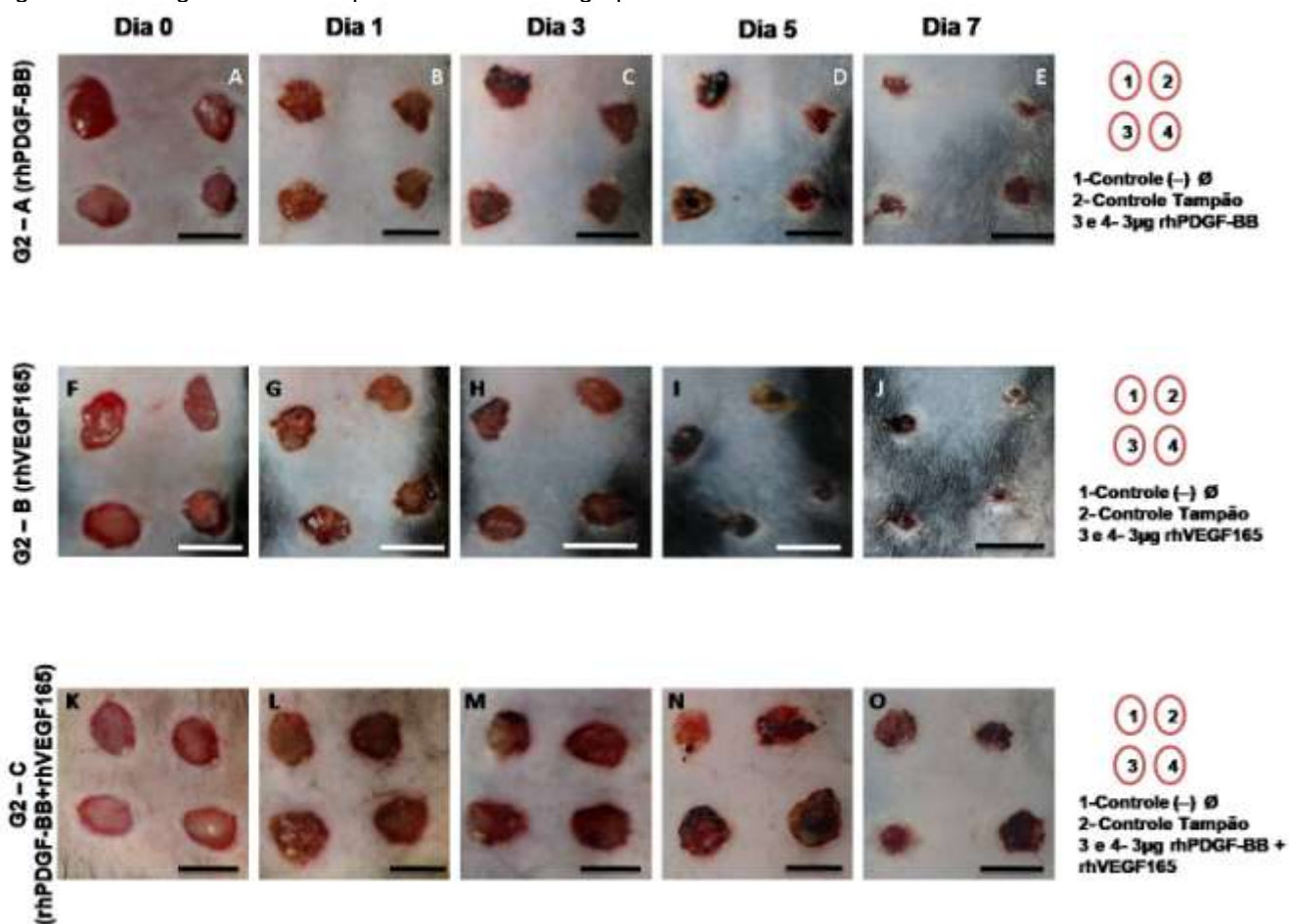


Imagem: KOGA,2019.

Legenda: Imagens macroscópicas das feridas no dorso de ratos nude Rowett tratados com FC. Os animais receberam uma aplicação de FC ou veículo (controle), no dia 0 da da cirurgia. Os animais foram acompanhados ao longo de 7 dias, com registros fotográficos em D0, D1, D3, D5 e D7. G1A: Grupo tratado com rhPDGF-BB; G1B: Grupo tratado com rhVEGF165; G1C: Grupo tratado com rhPDGF-BB+rhVEGF165. Em todos os grupos de animais foram realizadas quatro feridas: 1- Controle sem adição de FC; 2- Controle do hidrogel de alginato; 3 e 4µg de FC. A, F, K: Dia 0, dia da cirurgia e tratamento; Dia 1: B, G, L; Dia 3: C, H, M; Dia 5: D, I, N; Dia 7: E, J, O. A barra indica 1 cm. N= 4 animais/grupo.

Gráfico 3 – Evolução da cicatrização de feridas tratadas FC em tampão

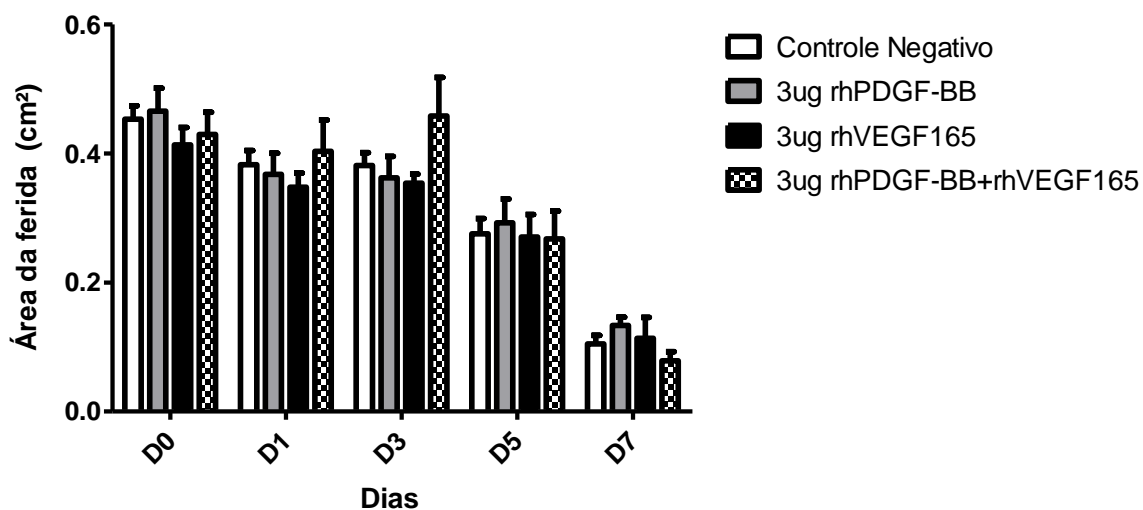
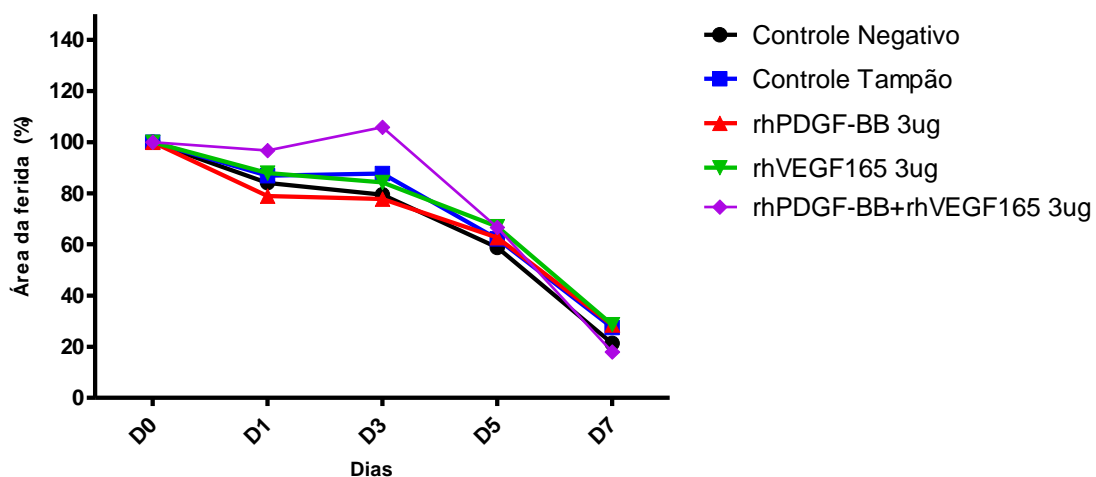
A**Efeito dos Fatores de Crescimento *in vivo* (Tampão)****B****Taxa de fechamento da lesão *in vivo* (Tampão)**

Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Efeito de FC em tampão veículo na redução da área da ferida (A) e porcentagem (%) de cicatrização de feridas em modelo animal nude (B) ($P=0,1132$).

Gráfico 4 – Comparação entre a área das feridas após 7 dias.

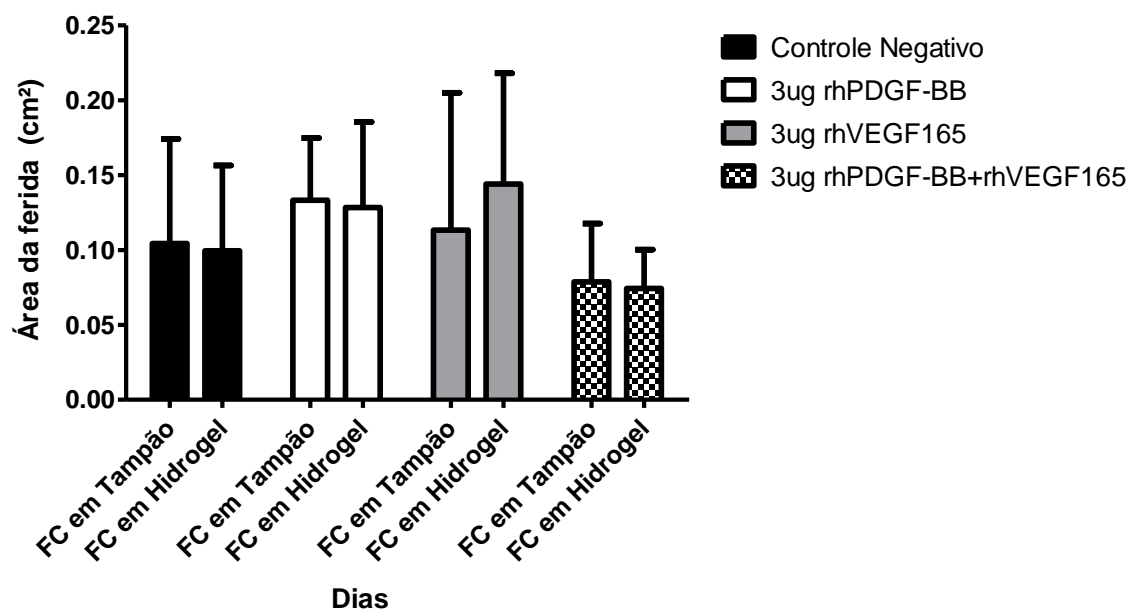


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico comparativo da área externa das feridas tratadas com FC em hidrogel de alginato 2% e em tampão veículo ao sétimo dia após a cirurgia.

5.2.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DA PELE EM RATOS NUDE

Para avaliar a cicatrização a nível microscópico foi realizada histologia da pele para padronização da técnica, e posteriormente das feridas controles e tratadas. Na Figura 16A é possível observar a estrutura íntegra da pele dos ratos modelos para o estudo *in vivo*. A epiderme, camada mais externa, é composta pelo epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, enquanto a derme apresenta-se composta de tecido conjuntivo denso não modelado, com fibras colágenas mais espessas (Figura 16B), onde se inserem porções de folículos pilosos (pêlo representado em amarelo em cortes transversais) margeado por seu epitélio e associado a glândulas sebáceas (Figura 16C). Mais profundamente, é possível observar a hipoderme que é composta por adipócitos e tecido conjuntivo (Figura 16D).

Figura 16 – Histologia da pele de rato nude Rowett.

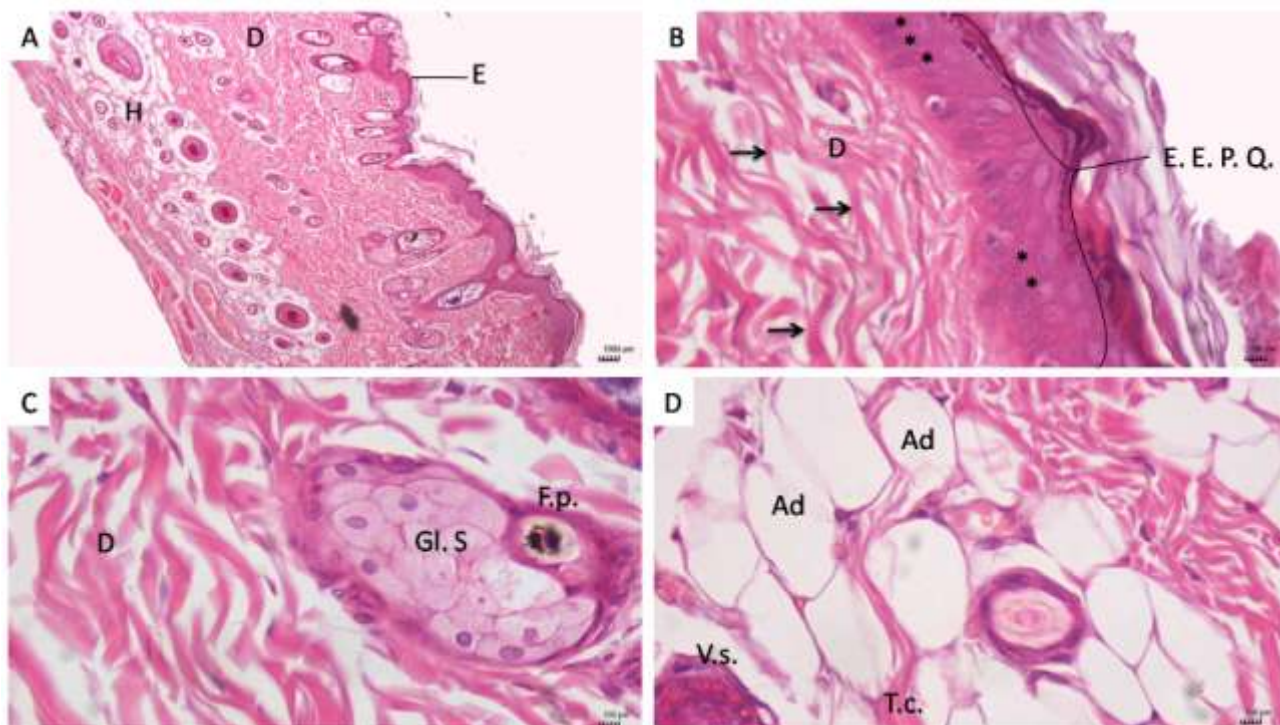


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Fotomicrografias da pele íntegra de ratos nude coradas com H&E. A) Camadas da pele em aumento de 100x: E: Epiderme; D: Derme; H: Hipoderme. B) Em chave o E.E.P.Q: Epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, células epiteliais em (*), setas: fibras mais espessas do tecido conjuntivo não modelado; C) F.p: Folículo piloso; Gl.S.: Glândula sebácea; D) Ad: Adipócitos; T.c. Tecido conjuntivo; V.s: Vaso sanguíneo.

Como podemos observar na ferida controle aos sete dias pós-cirurgia (Figura 17A), a incisão da pele na cirurgia provocou a destruição das camadas epiderme, derme e hipoderme o que desencadeou o processo de reparo, iniciado pela formação do coágulo para evitar maior perda sanguínea, deposição de fibrina e atração de células na fase inflamatória.

A ferida alcançou a fase proliferativa aos 7 dias após a cirurgia, pois foi possível observar o ressecamento da superfície do coágulo com a presença de restos celulares e fibrina (Figura 17B). Abaixo da região da epiderme formou-se o tecido de granulação no qual foi observada a presença de fibroblastos de núcleos alongados e sua ativação seguida por um aumento na síntese de fibras colágenas finas e flexíveis, mas já suficientes para preencher a área lesada e unir as bordas da lesão (Figura 17A e C).

Nessa fase, houve proliferação de vasos sanguíneos ou angiogênese, observando-se mais capilares com hemácia responsáveis por nutrir o novo tecido formado, mas em alguns locais da lesão, especialmente na borda entre o coágulo e o novo tecido, ainda foi possível observar células sanguíneas fora de vasos (Figura 17D e F).

O infiltrado inflamatório persistiu no local da lesão e nas bordas, observando-se a presença de leucócitos nesta ferida (Figura 17D e E).

No limite entre o coágulo e o novo tecido formado próximo às bordas da lesão, em alguns animais foi possível observar o início da proliferação das células epidermais provenientes das bordas íntegras da pele (Figura 17F), provocando uma re-epitelização na área lesada as quais vão se proliferar até que estejam completamente fundidas.

Figura 17 - Histologia da ferida controle 7 dias após cirurgia.

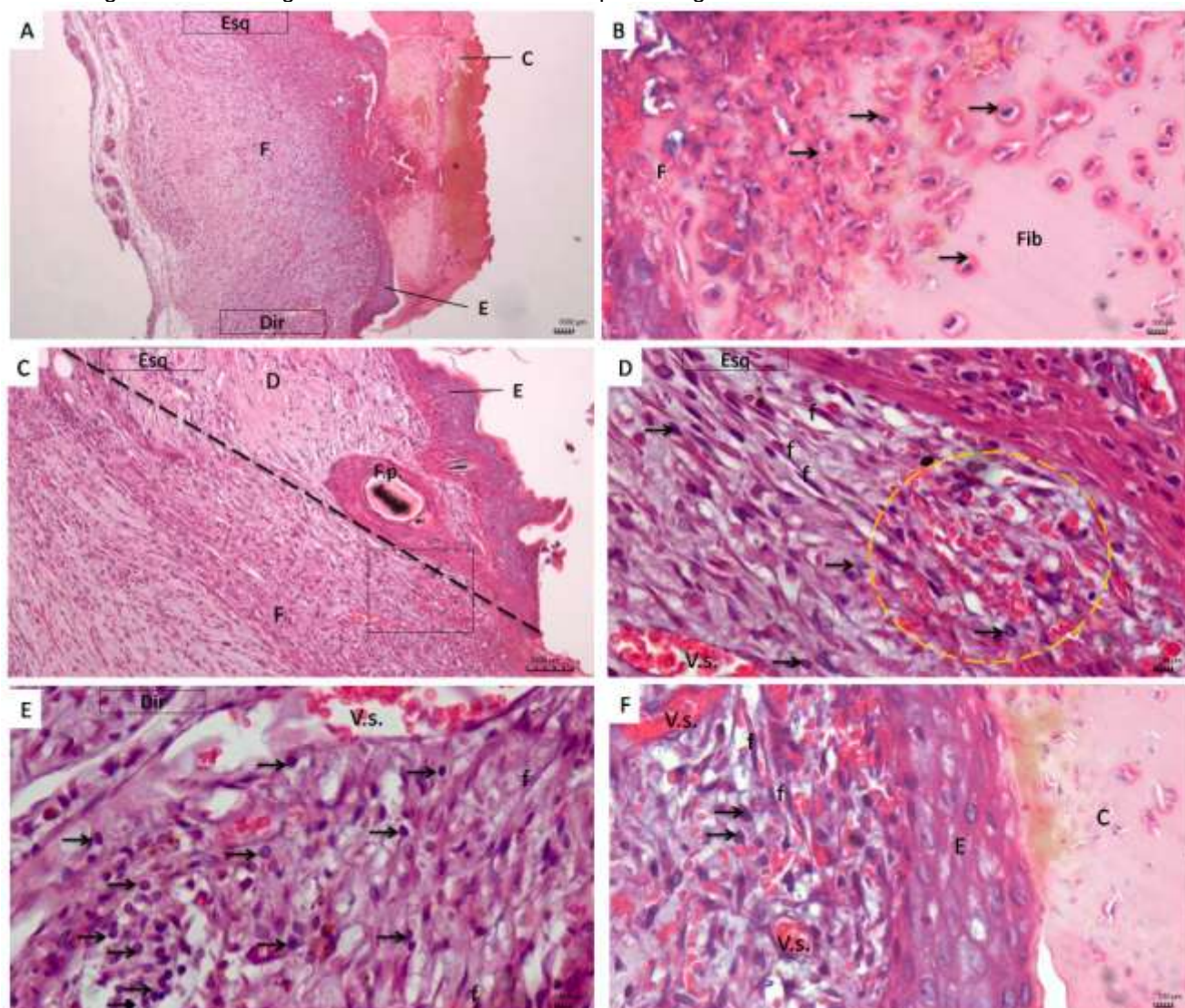


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Fotomicrografia da ferida controle cicatrizada após 7 dias, corada com H&E. A) Vista panorâmica da área da ferida, aumento 40x, F: Ferida; C: Coágulo; E: Epiderme; Esq: Borda esquerda; Dir: Borda direita. B) Área do coágulo, aumento 400x, Fib: Fibrina; Setas: restos necróticos e células inflamatórias absorvidas. C) aumento 100x Linha pontilhada: Limite entre a pele íntegra e a ferida na borda esquerda; F.p.: Folículo piloso; Quadrado: Área ampliada em D. D) Área da ferida próximo à borda esquerda; Círculo pontilhado: Hemácias fora de vasos; Setas: células inflamatórias; f: fibroblastos; V.s.: Vasos sanguíneos. E) Área da ferida próximo à borda direita com grande quantidade de células inflamatórias (setas). F) Área limite entre coágulo (C) e novo tecido formado, E: Epiderme.

Para determinar a qualidade da pele neoformada após 7 dias da cirurgia, foi realizada histologia das feridas controle e tratadas com FC em hidrogel de alginato 2% (Figura 18) e tratadas com FC em tampão veículo (Figura 19), e realizada coloração com Hematoxilina & Eosina para análise histopatológica. Para tanto, avaliou-se o grau do infiltrado inflamatório, a resposta fibroblástica, neovascularização e reepitelização das feridas no dia 7.

As feridas tratadas com os FC em hidrogel em geral apresentaram inflamação moderada na área cicatrizada. Metade das feridas que receberam rhPDGF-BB apresentaram grau leve e 30% das tratadas com rhVEGF165, e apesar de pouco freqüente, um grau severo de inflamação foi encontrado no grupo tratado nos grupos controles e com ambos FC combinados (Gráfico 5).

As feridas que receberam os FC em tampão veículo apresentaram um grau inflamatório de severo a moderado, onde apenas o grupo tratado com rhPDGF-BB já apresentou diminuição da inflamação em 10% das amostras, enquanto 70% das amostras tratadas com rhVEGF165 apresentaram grau moderado. Ao final de 7 dias ainda foi possível observar um grau severo de inflamação, especialmente no grupo controle tampão, com uma freqüência de 70% das amostras (Gráfico 6).

Figura 18 – Histologia das feridas tratadas com FC em hidrogel (H&E).

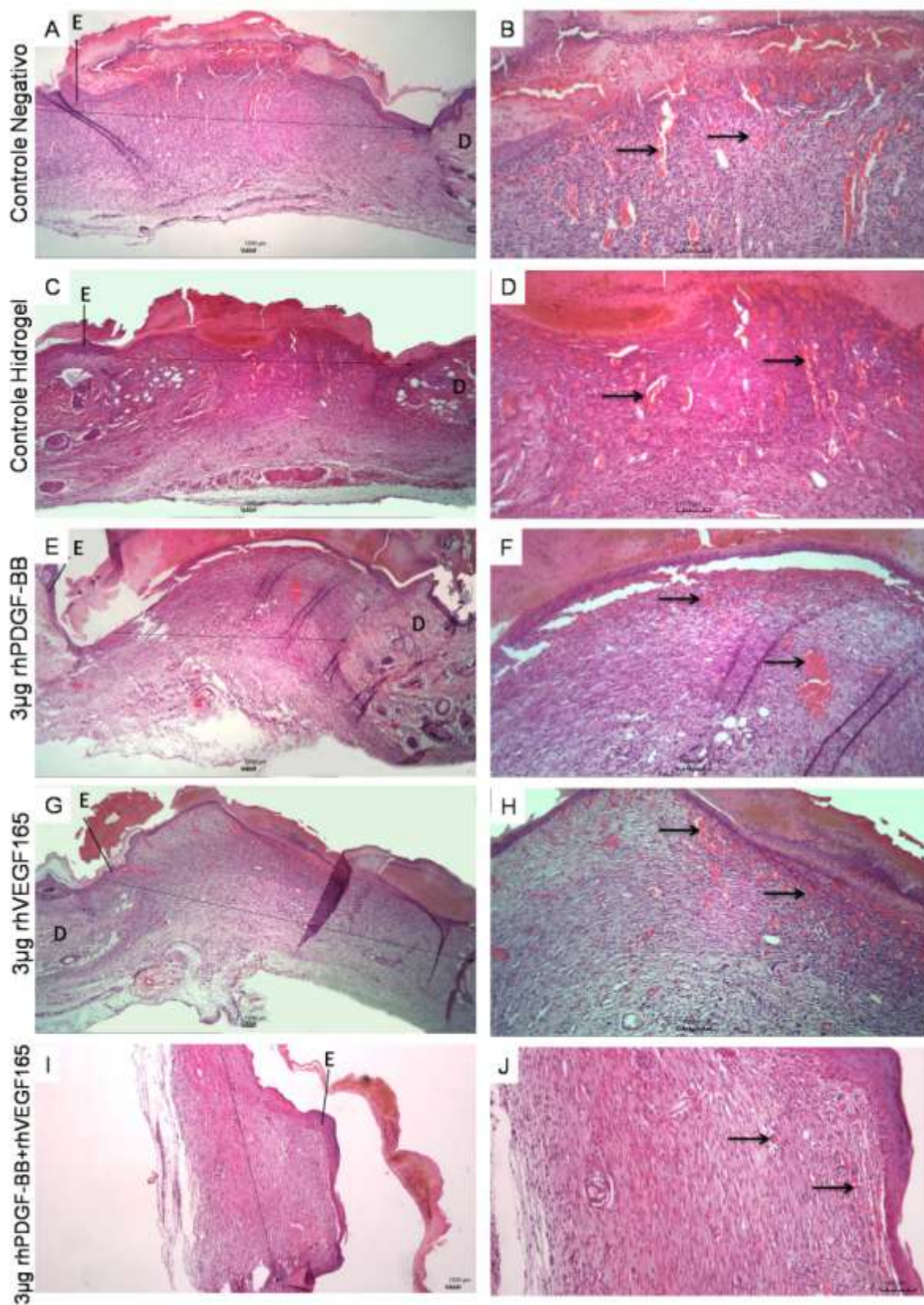
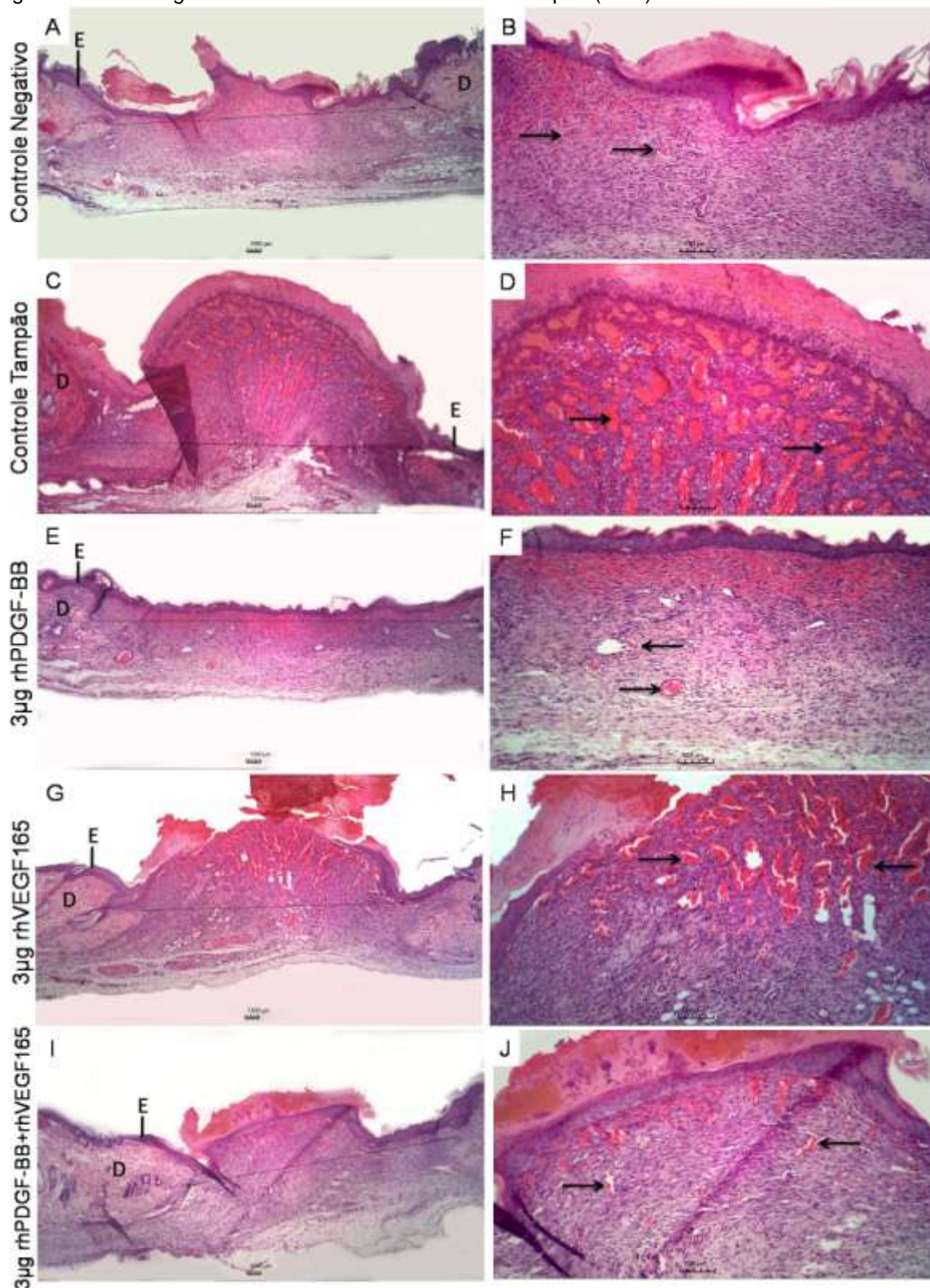


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Secções histológicas das lesões dos grupos tratados com FC em hidrogel de alginato 2% no dia 7 após cirurgia, coradas com Hematoxilina-Eosina. Fotomicrografias do tecido da ferida em diferentes ampliações são mostradas nas colunas: esquerda (40x) e direita (400x). E: epiderme; D: derme; Seta longa: Interface entre a pele normal e a ferida cicatrizada; seta curta: vasos sanguíneos.

Figura 19 – Histologia das feridas tratadas com FC em tampão (H&E).



Legenda: Secções histológicas das lesões dos grupos tratados com FC em tampão veículo no dia 7 após cirurgia, coradas com Hematoxilina-Eosina. Fotomicrografias do tecido da ferida em diferentes ampliações são mostradas nas colunas: esquerda (40x) e direita (400x). E: epiderme; D: derme; Seta longa: Interface entre a pele normal e a ferida cicatrizada; seta curta: vasos sanguíneos.

Gráfico 5 – Perfil do infiltrado de células inflamatórias de feridas tratadas com FC em hidrogel.

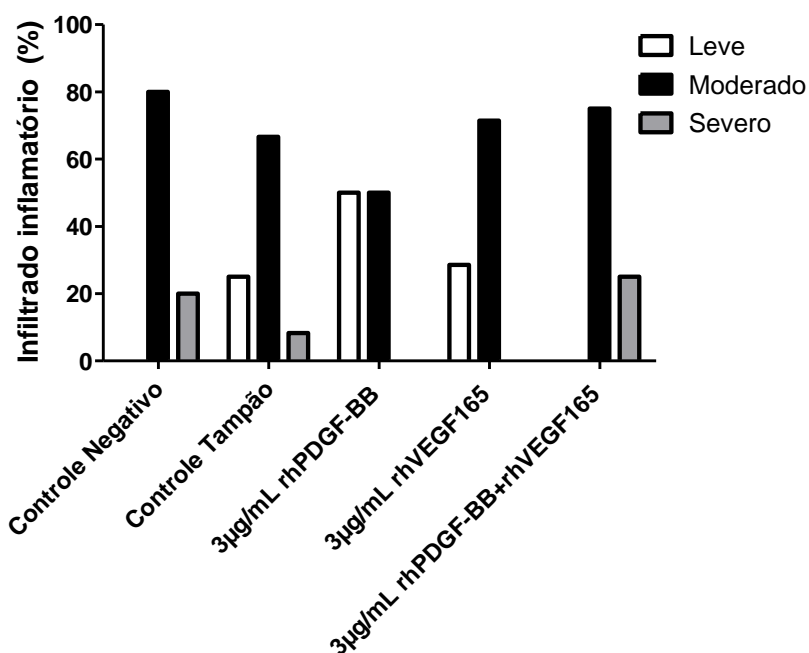


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para perfil do infiltrado inflamatório de feridas tratadas com FC em hidrogel. A pontuação foi atribuída com base no grau inflamatório encontrado na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Gráfico 6 – Perfil do infiltrado de células inflamatórias de feridas tratadas com FC.

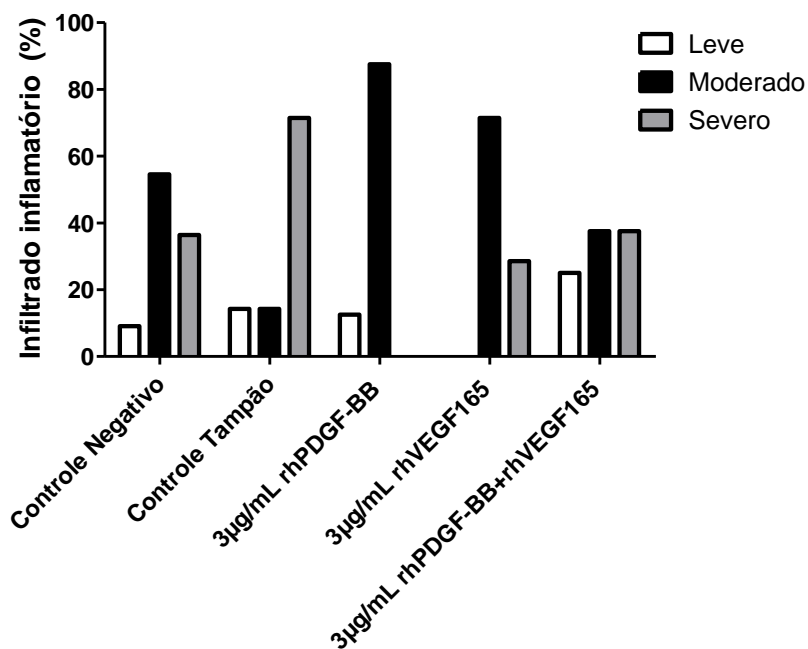


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para perfil do infiltrado inflamatório de feridas tratadas com FC em tampão. A pontuação foi atribuída com base no grau inflamatório encontrado na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

A análise histopatológica das feridas permitiu avaliarmos o grau de resposta dos fibroblastos no local da lesão após 7 dias. O grupo tratado com FC em hidrogel em geral apresentou resposta marcada de fibroblastos, destacando-se as feridas que receberam rhPDGF-BB (~65%), enquanto que nas feridas tratadas com rhVEGF165 ou ambos os FC, a resposta foi moderada (Gráfico 7).

No grupo tratado com FC em tampão, também observou-se uma reação fibroblástica mais pronunciada, destacando-se as feridas tratadas com rhVEGF165 e no controle negativo, nos grupos tratados com rhPDGF-BB e ambos os FC, variou entre marcada e moderada (Gráfico 8).

Gráfico 7 – Grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC em hidrogel

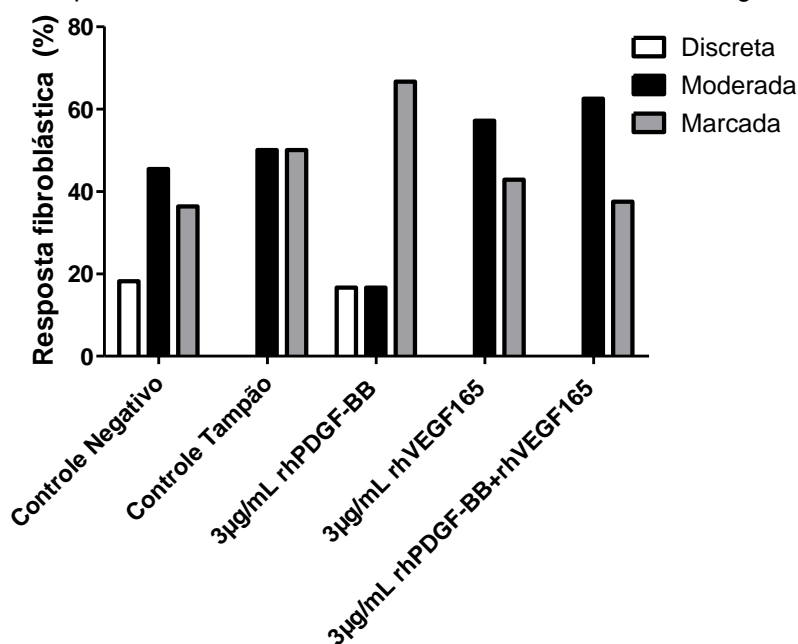


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Freqüência relativa de amostras para grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC em hidrogel. A pontuação foi atribuída com base na presença de fibroblastos na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Gráfico 8 – Grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC.

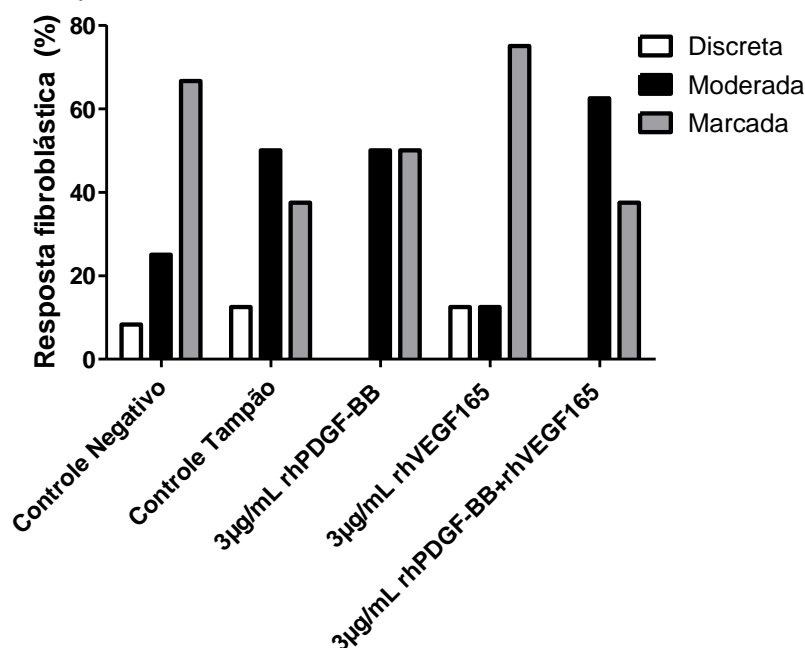


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Freqüência relativa de amostras para grau de resposta fibroblástica em feridas tratadas com FC em tampão. A pontuação foi atribuída com base na presença de fibroblastos na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

A presença de formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização) na área da ferida foi avaliada no dia 7 após a cirurgia. Alto grau de angiogênese foi observado no grupo tratado com FC em hidrogel, em especial as feridas que receberam rhPDGF-BB (~70%), os grupos tratados com rhVEGF165 e controle negativo apresentaram um perfil semelhante, o último com menor grau de angiogênese. As feridas tratadas com ambos FC combinados apresentaram diminuição da neovascularização identificada como discreta em aproximadamente 40% das amostras deste grupo (Gráfico 9).

No grupo tratado com FC em tampão veículo, o perfil de neovascularização na área cicatrizada foi de angiogênese marcada, especialmente o grupo tratado com rhVEGF165 (~80%), com exceção do grupo tratado com ambos FC combinados onde observou-se transição para angiogênese discreta (~40%) (Gráfico 10).

Gráfico 9 – Grau de neovascularização em feridas tratadas com FC em hidrogel.

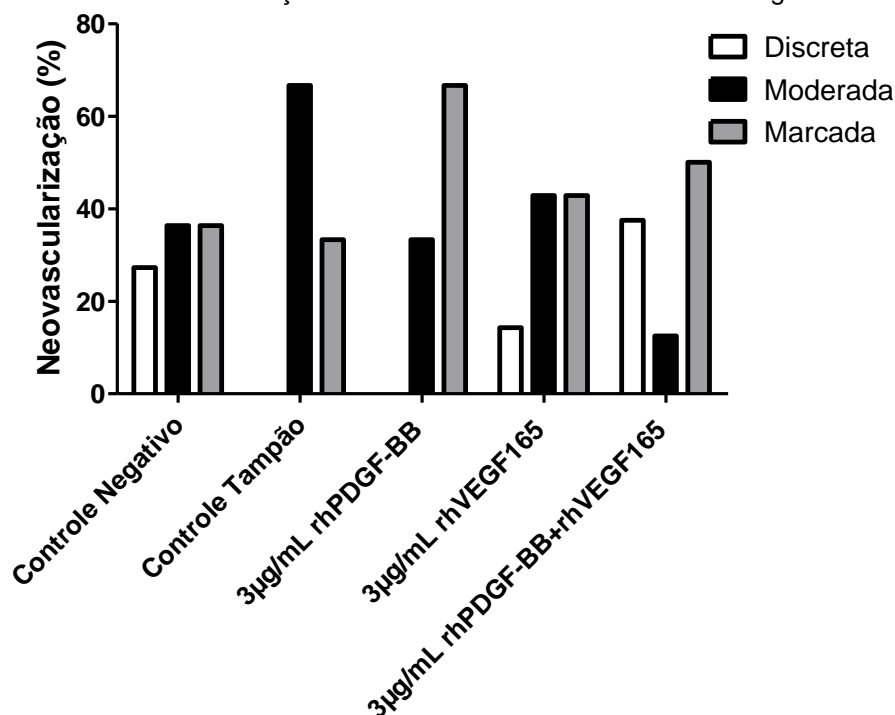


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para grau de neovascularização em feridas tratadas com FC em hidrogel. A pontuação foi atribuída com base na presença de vasos sanguíneos na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Gráfico 10 – Grau de neovascularização em feridas tratadas com FC.

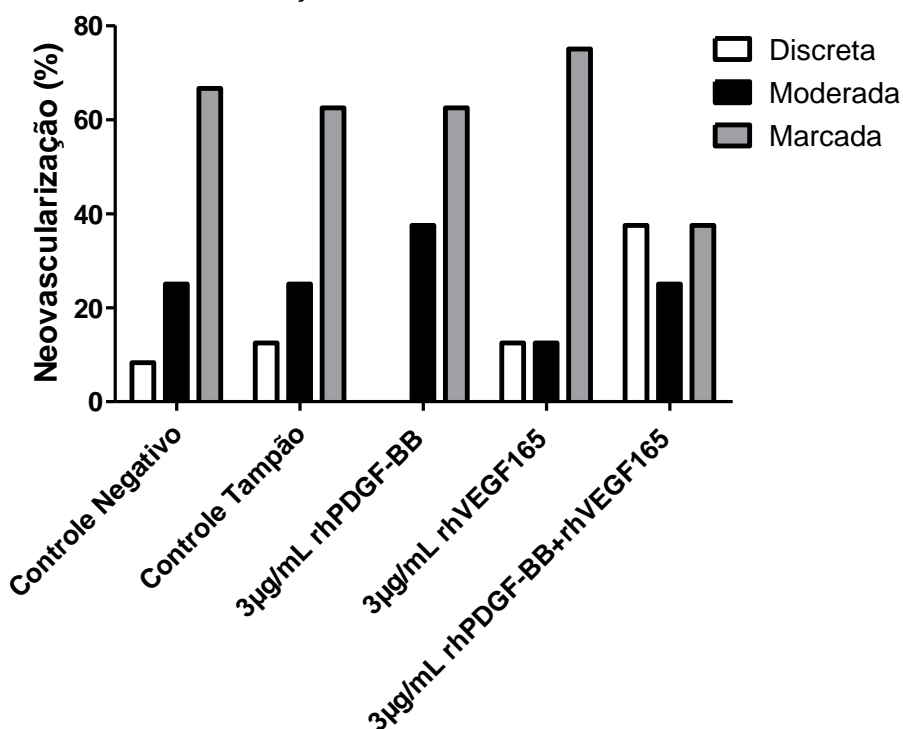


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para grau de neovascularização em feridas tratadas com FC em tampão. A pontuação foi atribuída com base na presença de vasos sanguíneos na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

No grupo tratado com FC em hidrogel a reepitelização completa foi observada entre as lesões cutâneas tratadas especialmente no grupo tratado com rhPDGF-BB e 70% das amostras do controle negativo. Entretanto, nos grupos tratados com rhVEGF165 e ambos os FC combinados, ainda houveram feridas em processo de reepitelização incompleta ou ausente como no grupo controle tampão (Gráfico 11).

No grupo tratado com FC em tampão veículo, os grupos que receberam rhPDGF-BB apresentaram quase 80% das feridas com reepitelização completa, mas 50% das feridas tratadas com rhVEGF165 ainda estavam ausentes de epitélio (Gráfico 12).

Gráfico 11 – Nível de reepitelização em feridas tratadas com FC em hidrogel.

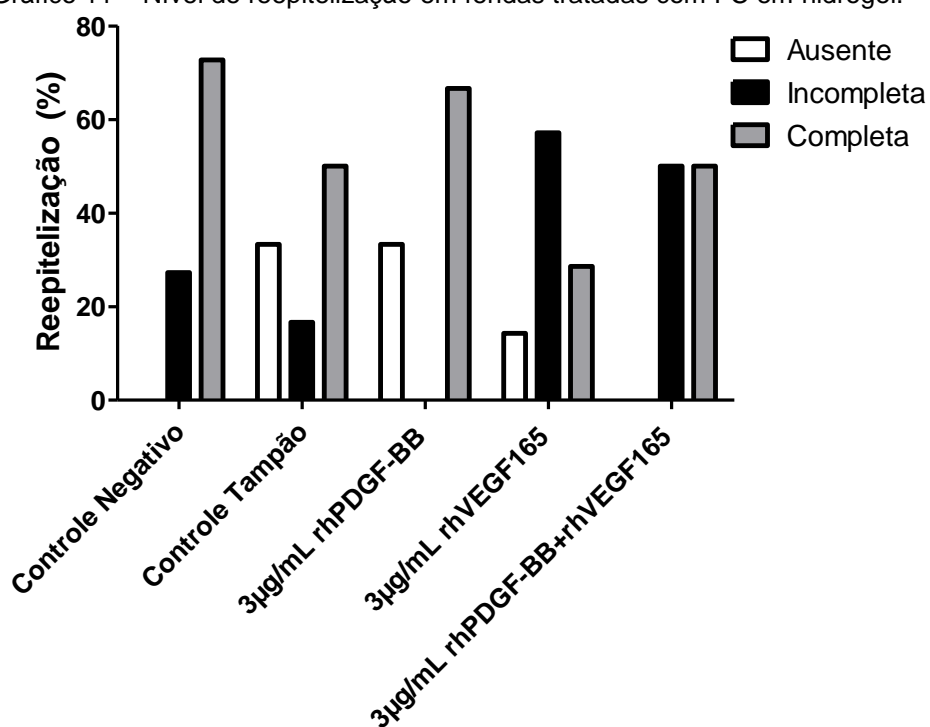


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para nível de reepitelização em feridas tratadas com FC em hidrogel. A pontuação foi atribuída com base na presença de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Gráfico 12 – Nível de reepitelização em feridas tratadas com FC.

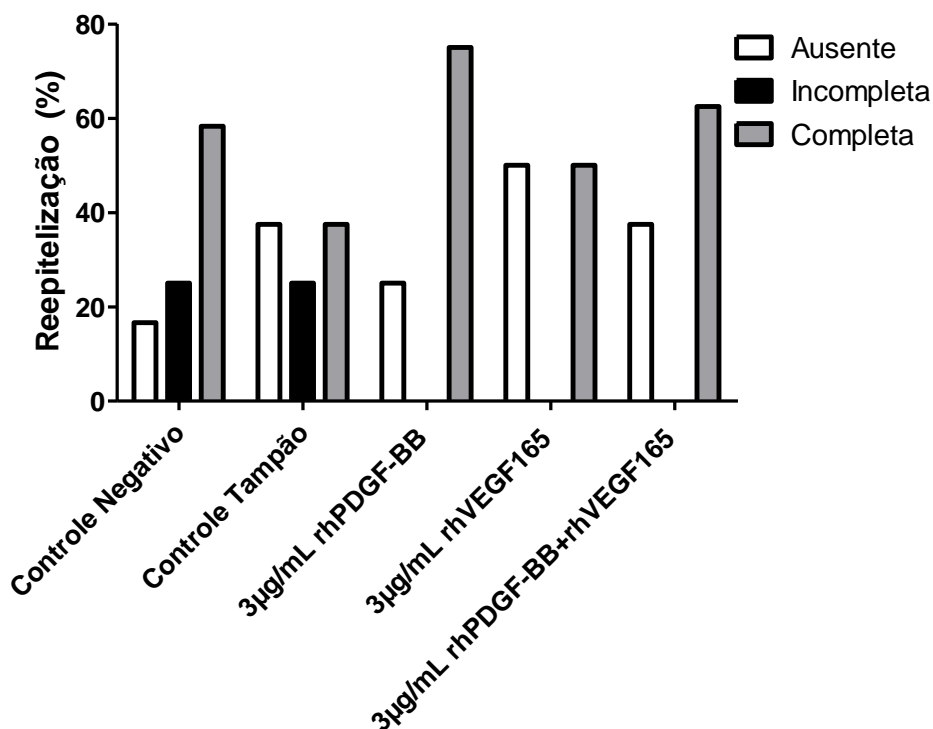


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para nível de reepitelização em feridas tratadas com FC em tampão. A pontuação foi atribuída com base na presença de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

A coloração das lâminas histológicas das feridas com Tricrômio de Masson é demonstrada na Figura 20, para os grupos tratados com FC em Hidrogel, e na Figura 21 para os grupos tratados com FC em tampão. Foi possível observar a presença de fibroblastos (setas) com núcleos alongados por toda área da ferida cicatrizada e vasos sanguíneos (*) permeando o tecido recém-formado.

A análise histopatológica permitiu uma avaliação qualitativa do grau de deposição de fibras colágenas na área das feridas tratadas com FC em hidrogel, nas quais, apesar de discreta, já foi possível observar início de deposição de colágeno em todas as feridas tratadas e controle, mas com maior porcentagem para tratadas com rhVEGF165 (~40%) (Gráfico 13). Já no grupo tratado com FC em tampão, observamos que metade das feridas que receberam rhPDGF-BB e ambos FC

combinados já apresentavam deposição discreta de colágeno comparado aos controles, os quais ainda ausentes para deposição, e nas que receberam rhVEGF165 apenas 20% apresentavam deposição discreta ou moderada (Gráfico 14).

Já em análise comparativa utilizando o software ImageJ para deposição de fibras colágeno na área cicatrizada, observamos que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à porcentagem de fibras colágenas encontradas na área da ferida (Gráfico 15).

Figura 20 – Histologia das feridas tratadas com FC em hidrogel (Tricrômio de Masson)

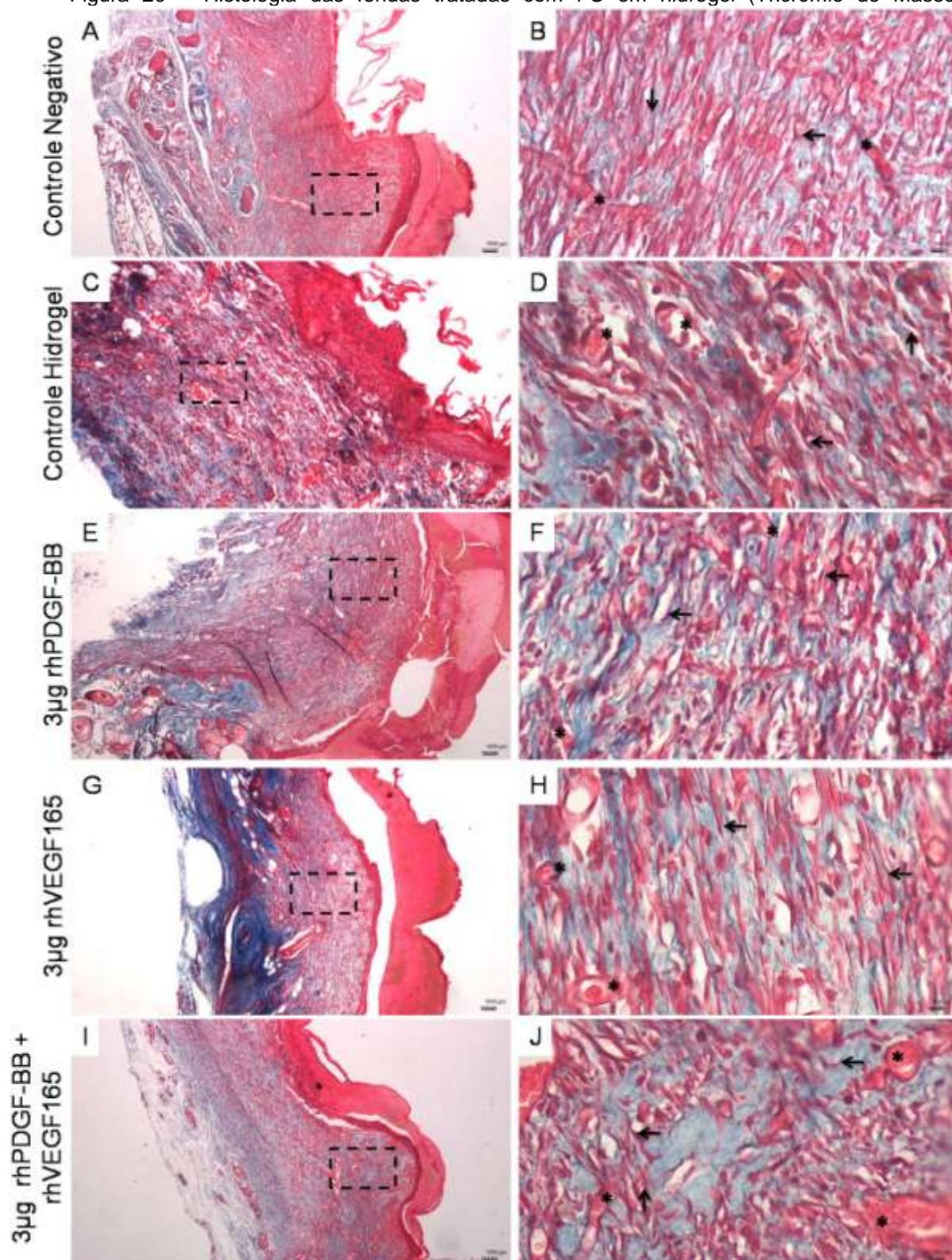


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Secções histológicas das lesões dos grupos tratados com FC em Hidrogel de Alginato 2% no dia 7 após cirurgia, coradas com Tricrômio de Masson. Fotomicrografias do tecido da ferida em diferentes ampliações são mostradas nas colunas. A região pontilhada na coluna da esquerda é representada no aumento de 400x à direita. Setas indicam fibroblastos e (*) vasos sanguíneos, e os diferentes níveis de deposição de colágeno representados pela intensidade da cor azul.

Gráfico 13 – Deposição de colágeno em feridas tratadas com FC em hidrogel.

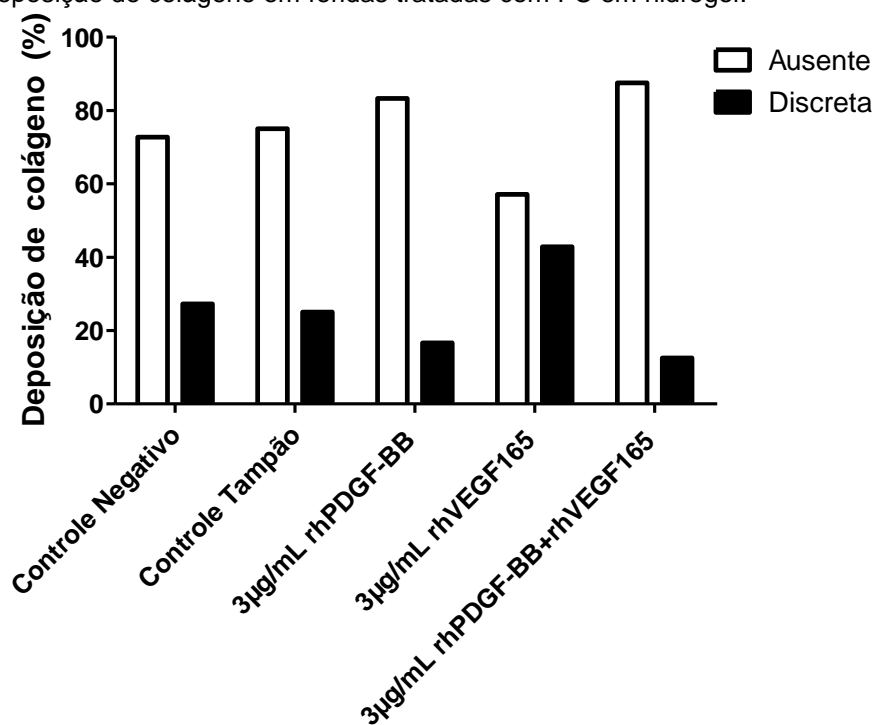


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Freqüência relativa de amostras para o grau de deposição de colágeno em feridas tratadas com FC em hidrogel, a pontuação foi atribuída com base na presença de na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Figura 21 – Histologia das feridas tratadas com FC em tampão (Tricrômio de Masson)

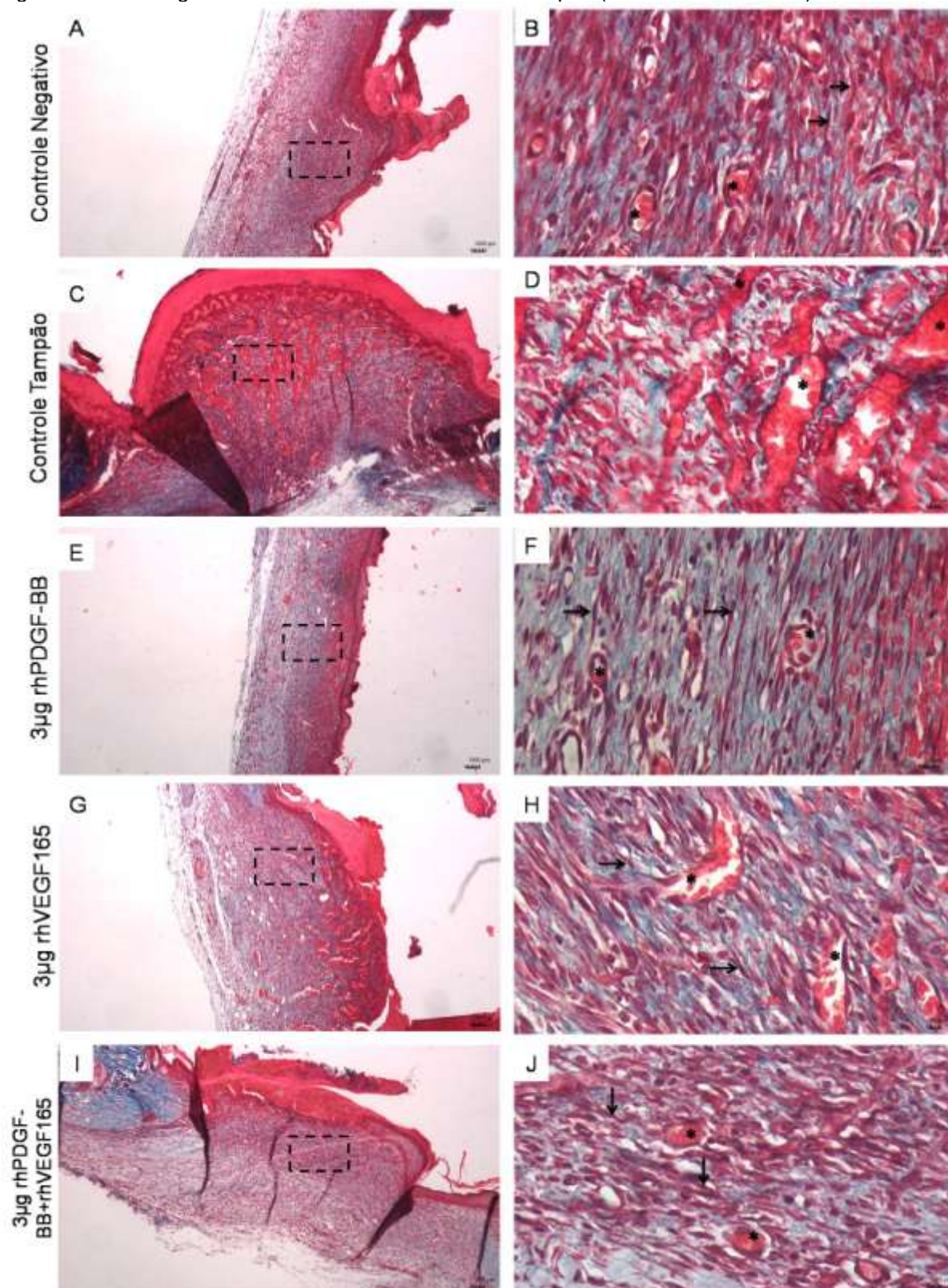


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Secções histológicas das lesões dos grupos tratados com FC em tampão veículo no dia 7 após cirurgia, coradas com Tricrômio de Masson. Fotomicrografias do tecido da ferida em diferentes ampliações são mostradas nas colunas: esquerda (40x) e direita (400x). A região pontilhada na coluna da esquerda é representada no aumento de 400x à direita. Setas indicam fibroblastos e (*) vasos sanguíneos, e os diferentes níveis de deposição de colágeno representados pela intensidade da cor azul.

Gráfico 14 – Deposição de colágeno em feridas tratadas com FC.

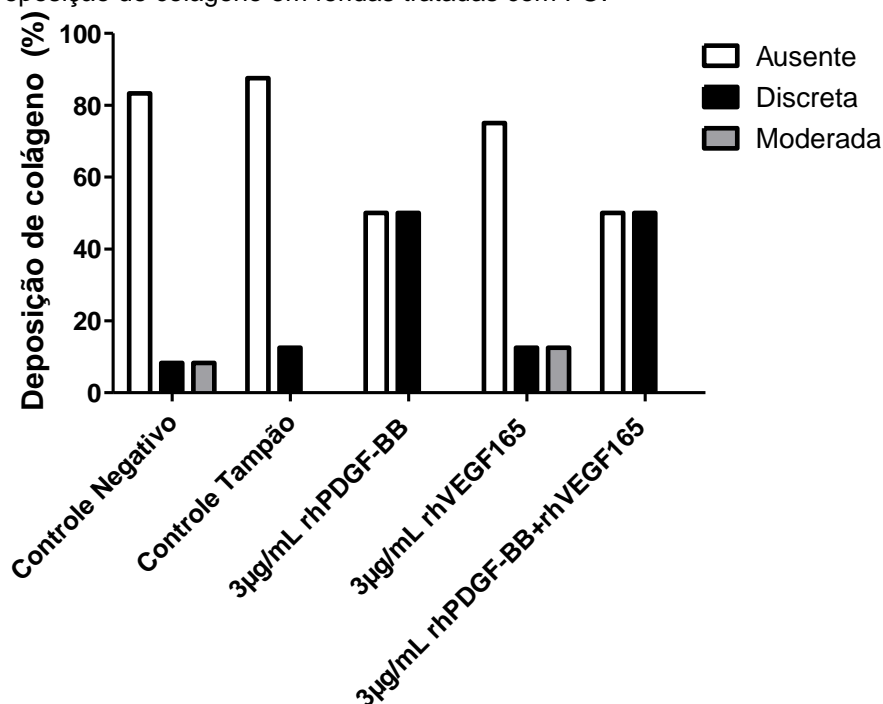


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Frequência relativa de amostras para o grau de deposição de colágeno em feridas tratadas com FC em tampão, a pontuação foi atribuída com base na presença de na área cicatrizada. (n= 12 para controles, 8 para tratados).

Gráfico 15 – Comparação da deposição de colágeno entre os grupos.

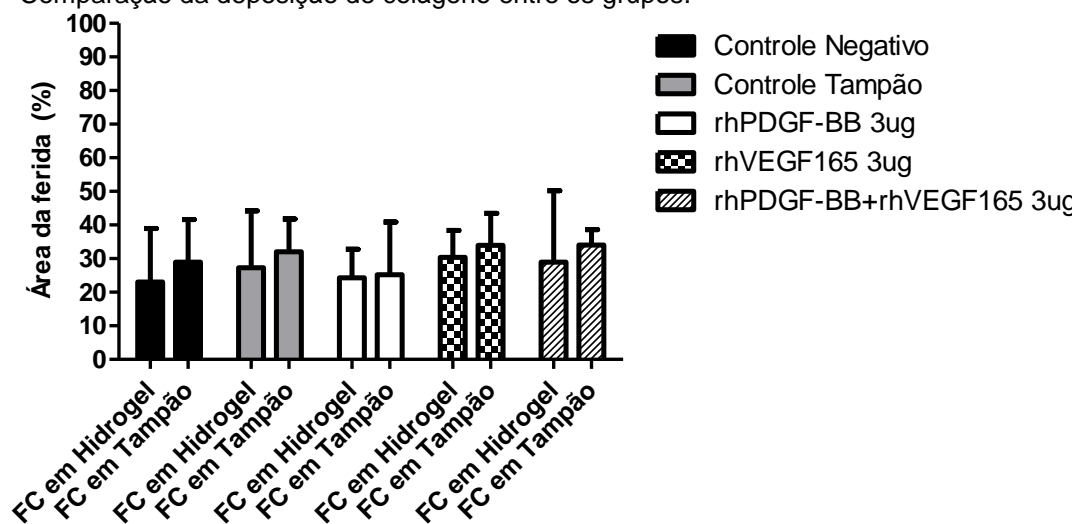


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico de análise comparativa sobre deposição de colágeno entre feridas tratadas com FC em hidrogel de alginato 2% e FC em tampão veículo.

5.2.3 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DAS FERIDAS

A análise imunohistoquímica foi realizada em algumas amostras do grupo tratado com FC em Tampão veículo. Foi possível observar de forma preliminar e qualitativamente, a presença de antígenos específicos da fase proliferativa do reparo tecidual na área cicatrizada da lesão, através da expressão dos seguintes marcadores, indicada pelas setas: vasos sanguíneos/células endoteliais (CD31) especialmente próximo a capilares sanguíneos ou em células ao longo da área da ferida (Figura 22: A- D); marcador para angiogênese (VEGF) (Figura 22: E-H); marcador de proliferação celular (Ki67) (Figura 22: I-L); marcador de fibras colágenas (Pró-COL3) (Figura 23: A-D); marcadores de proteínas de matriz Fibronectina (Figura 23: E-H) e Elastina (Figura 23: I-L).

Os índices de intensidade de marcação segundo escala numérica, onde: 0 – ausência de marcação, 1 – marcação fraca, 2 – marcação moderada, 3 – marcação positiva e 4 – marcação fortemente positiva; foram analisados de forma subjetiva e não quantificável. Os dados demonstraram que as feridas tratadas com rhPDGF-BB apresentaram forte presença de vasos sanguíneos e angiogênese em comparação aos outros grupos. Todos os grupos apresentaram expressão fraca para proliferação celular e pouca ou nenhuma marcação para elastina. Encontrou-se mais fibronectina nas feridas tratadas com rhPDGF-BB e quantidade fraca à moderada de colágeno em todos os grupos.

Figura 22 – Imunohistoquímica de feridas tratadas com FC.

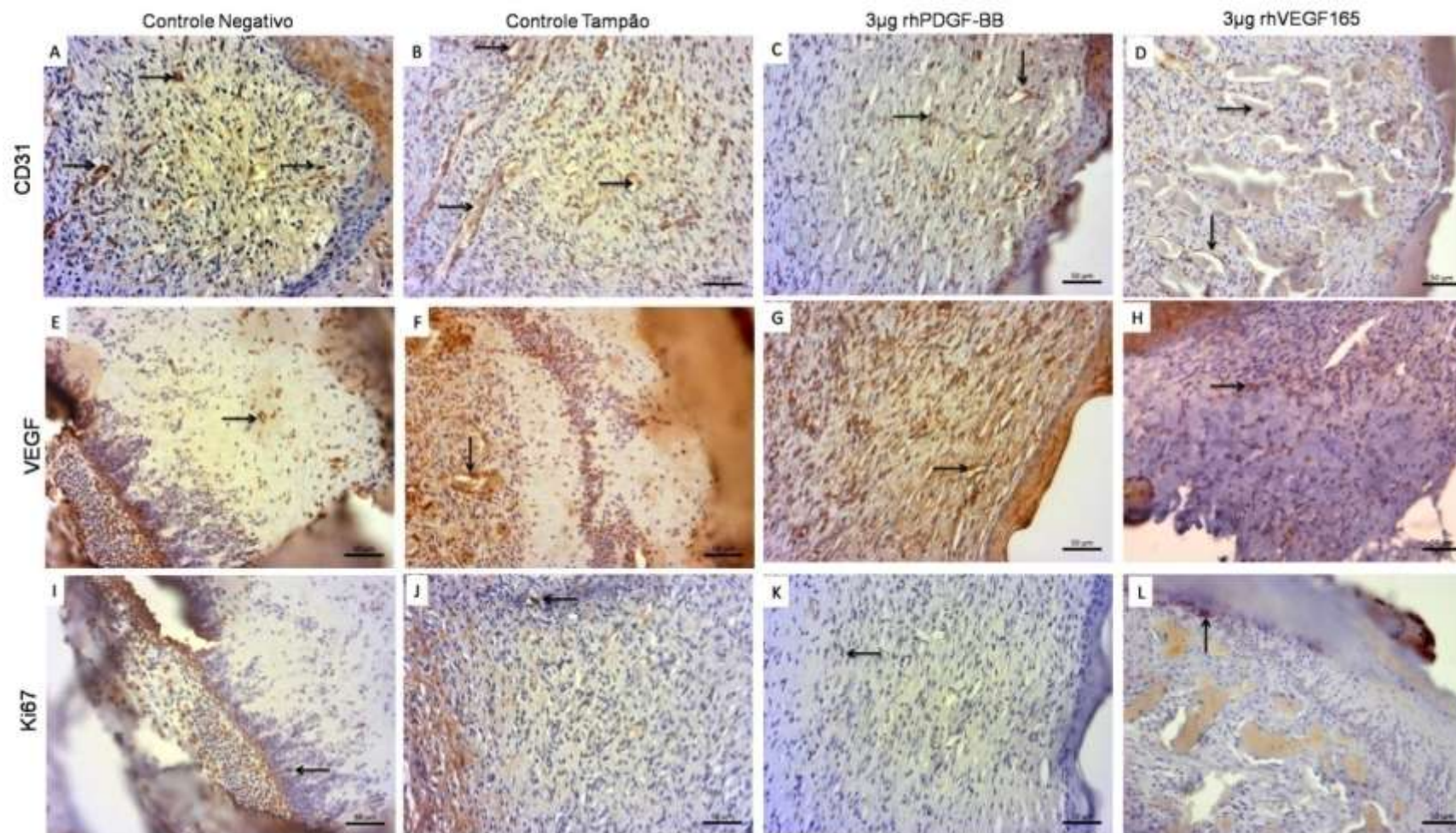


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Secções imunohistoquímicas das lesões dos grupos tratados com FC em tampão veículo no dia 7 após cirurgia, contra-coradas com Hematoxilina. Fotomicrografias do tecido da área ferida em ampliações 400x. Setas indicam a expressão de CD31 (A-D), de VEGF (E-H) e de Ki67 (I-L) nos diferentes grupos controles e tratados.

Figura 23 – Imunohistoquímica de feridas tratadas com FC

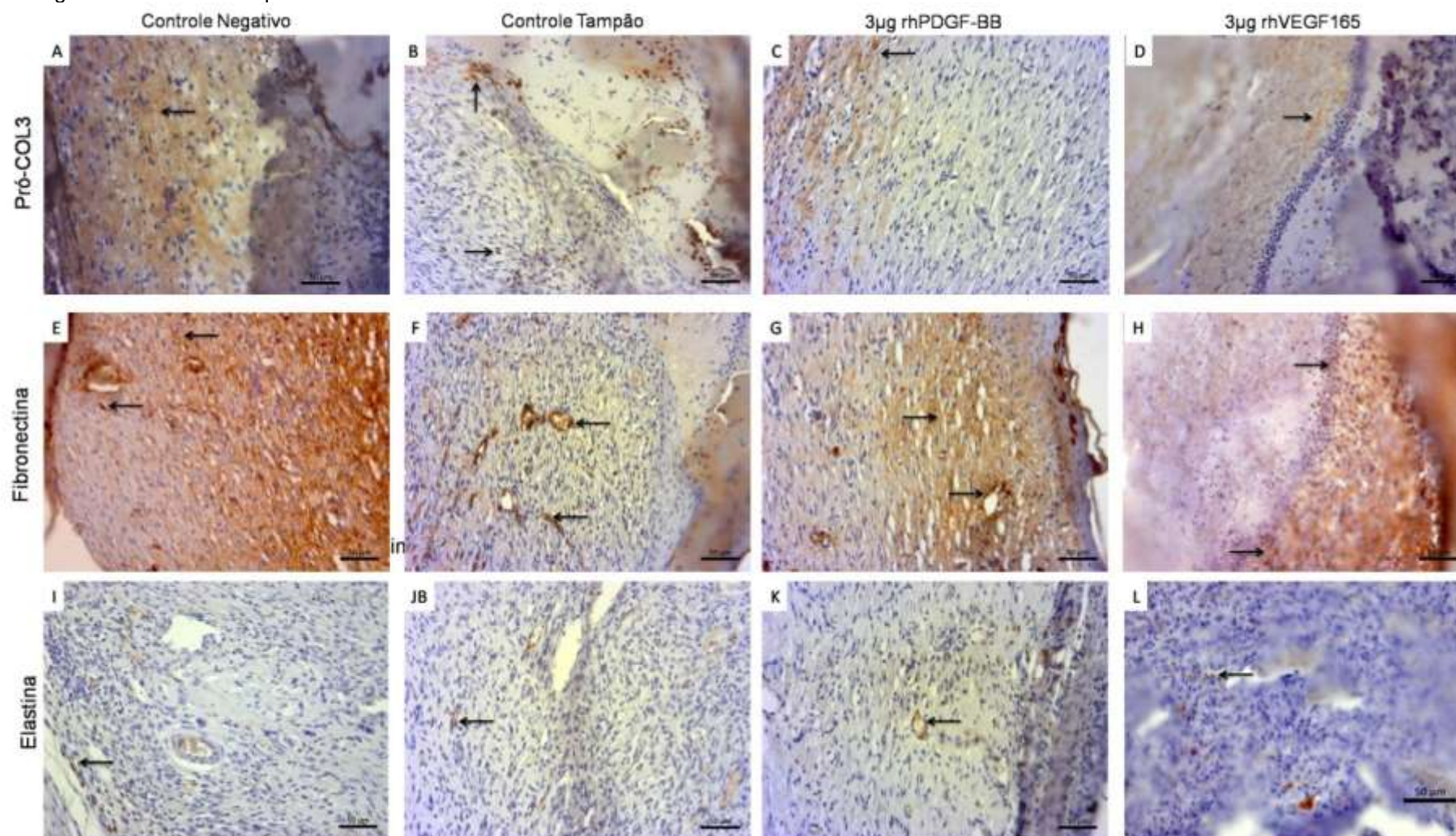


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Secções imunohistoquímicas das lesões dos grupos tratados com FC em tampão veículo no dia 7 após cirurgia, contra-coradas com Hematoxilina. Fotomicrografias do tecido da área ferida em ampliações 400x. Setas indicam a expressão de Pró-Colágeno 3 (A-D), de Fibronectina (E-H) e de Elastina (I-L) nos diferentes grupos controles e tratados.

Tabela 4: Avaliação imunohistoquímica da cicatrização

| Grupos | CD31 | VEGF | Ki67 | Pró-COL3 | Fibronectina | Elastina |
|-------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| Controle Negativo | 3 | 3,5 | 1,5 | 2 | 1,5 | 1 |
| Controle Tampão | 1,5 | 2 | 1,5 | 2,5 | 3 | 0,5 |
| 3µg rhPDGF-BB | 3,5 | 4 | 0,5 | 2,5 | 2 | 1 |
| 3µg rhVEGF165 | 2,5 | 1,5 | 1,5 | 2 | 4 | 2 |

Legenda: Os dados são expressos como média (Controle negativo n=3; Controle Tampão n=2; rhPDGF-BB n=2; rhVEGF165 n=2). Escala numérica: 0 - ausência de marcação, 1 – marcação fraca, 2 – marcação moderada, 3 – marcação positiva e 4 – marcação fortemente positiva.

5.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO CANINO (CTMA)

As CTMA foram cultivadas aderidas ao plástico e apresentaram morfologia fibroblastóide (Figura 24). Quando analisadas por citometria de fluxo, observou-se expressão de anticorpos marcadores de células-tronco mesenquimais como CD90 e CD105, bem como a ausência de expressão para marcadores endoteliais (Figura 25). A presença de CD90 e CD105 nas CTMA foi confirmada por imunocitoquímica, (FiguraX).

Figura 24—Cultivo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino.

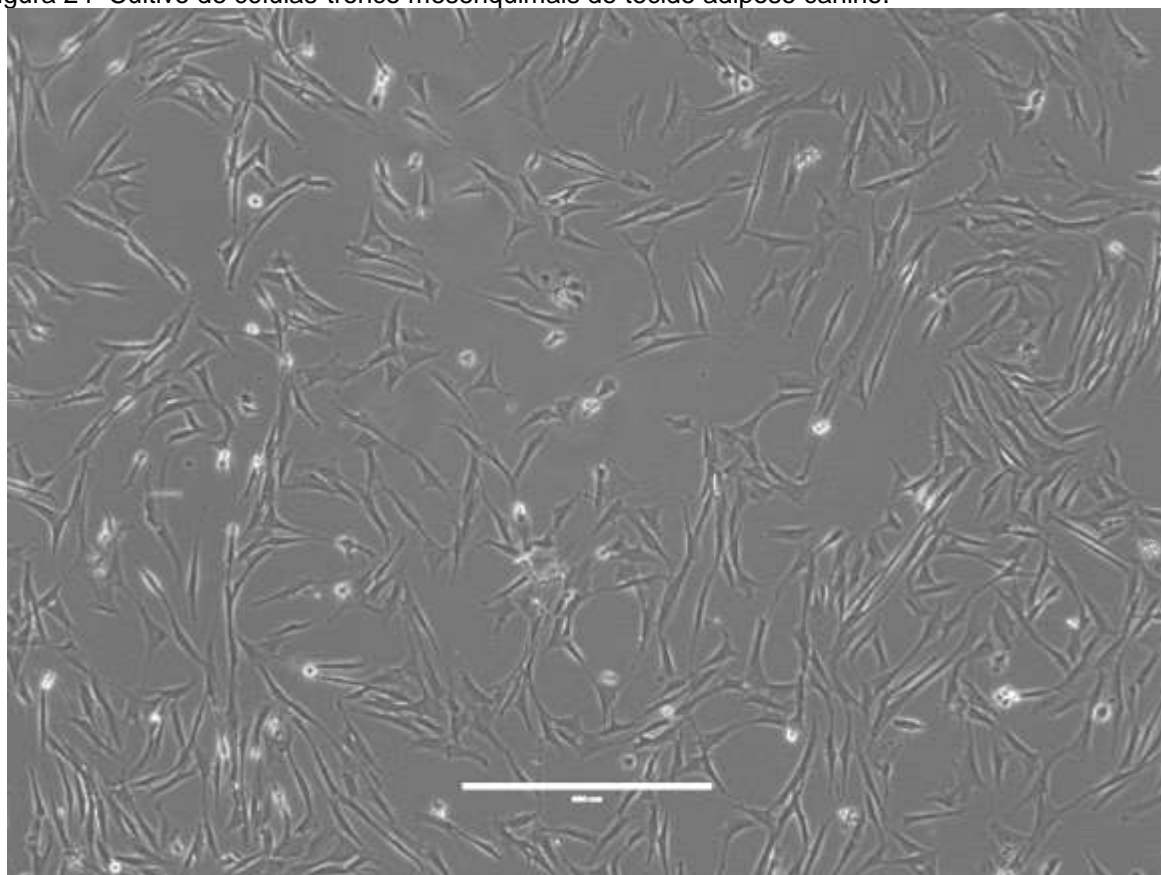


Imagem: KOGA, 2018.

Legenda: Fotomicrografia do cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo canino em quarta passagem. Aumento 10x.

Figura 25—Caracterização de CTMA por Citometria de Fluxo.

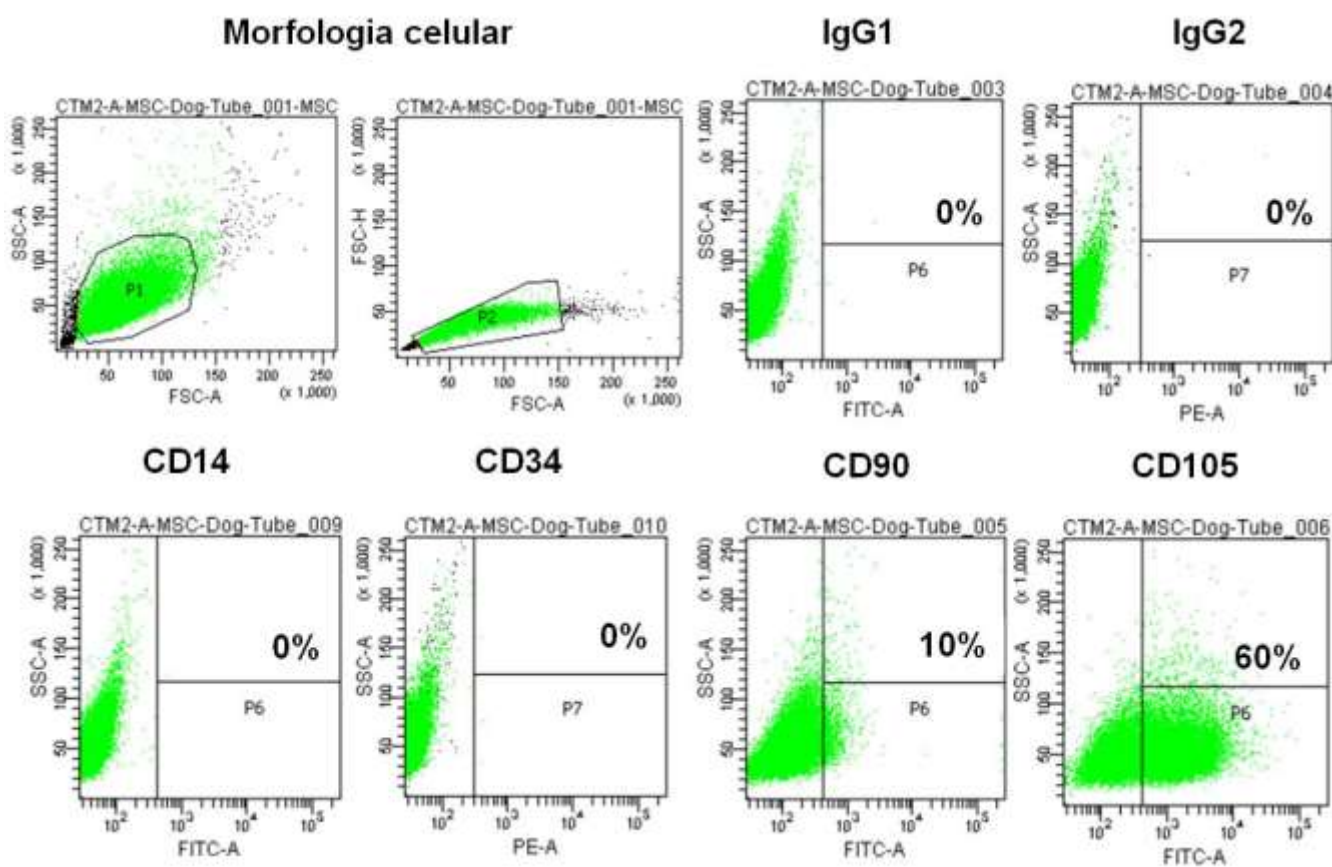


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Citometria de fluxo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino expressando marcadores celulares mesenquimais CD90 e CD105 e ausência de expressão de marcadores endoteliais CD14, CD34, HLA-DR.

Figura 26 – Imunocitoquímica das CTMA.

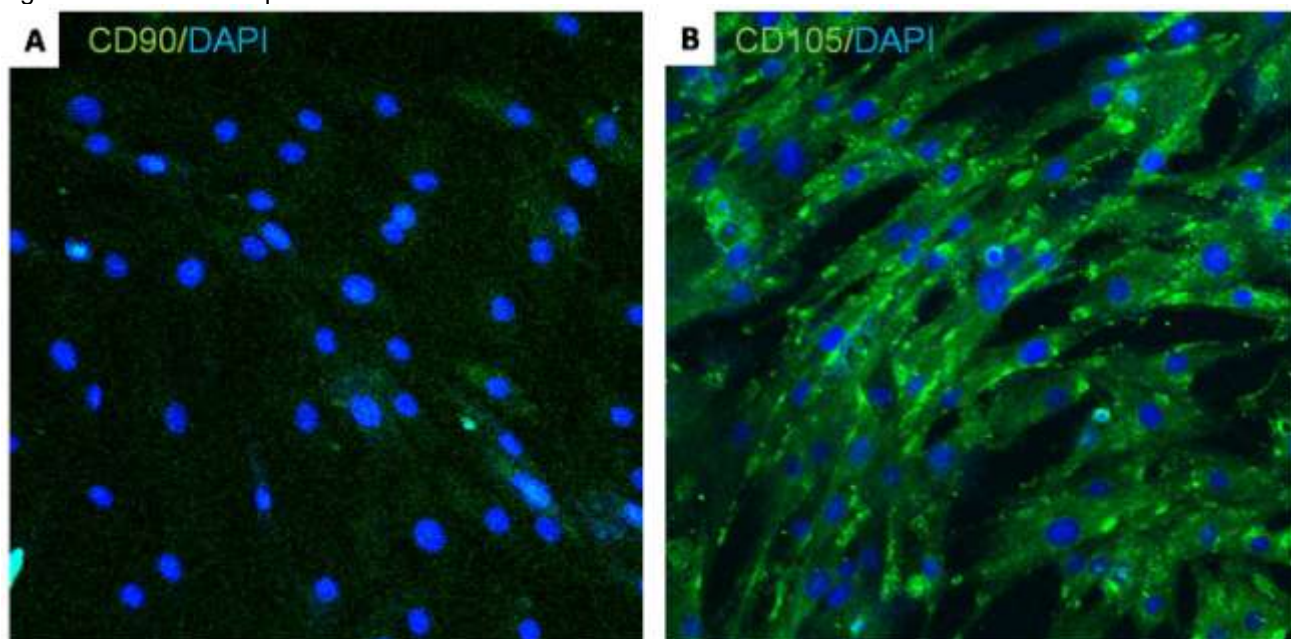


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Imagens obtidas de microscópio confocal da Imunocitoquímica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino expressando marcadores celulares mesenquimais A) CD90 e B) CD105.

As células foram capazes de se diferenciarem após indução em linhagens condrogênica (Figura 27B) e osteogênica (Figura 27D) como é característico de células-tronco mesenquimais, em comparação aos controles não induzidos que permaneceram com seu fenótipo fibroblastóide (Figura 27 A e C, respectivamente) .

Figura 27 – Ensaio de diferenciação celular.

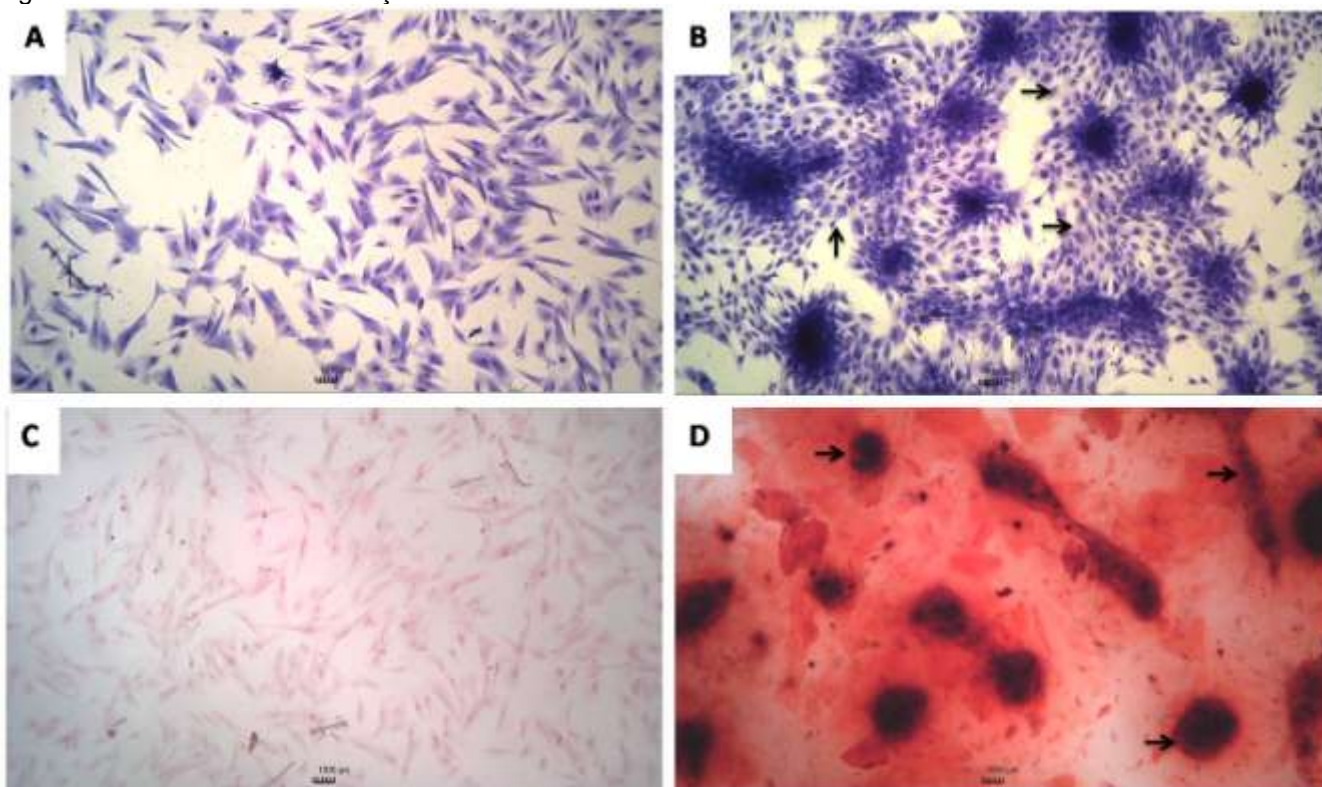


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Ensaio de diferenciação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino. A e C Controles negativos. B) Células diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com Azul de Toluidina. (D) Células diferenciadas em linhagem osteogênica coradas com vermelho de Alizarina.

As CTMA foram caracterizadas por qRT-PCR e a expressão dos genes CD90 e CD105 comprovou o perfil de células-tronco mesenquimais no nosso modelo (Gráfico 16A), bem como a expressão dos receptores para as proteínas PDGF e VEGF nas CTMA foi validada através da expressão dos genes PDGFRb e FLT1 respectivamente (Gráfico 16B).

Gráfico 16 – Caracterização de CTMA por qRT-PCR

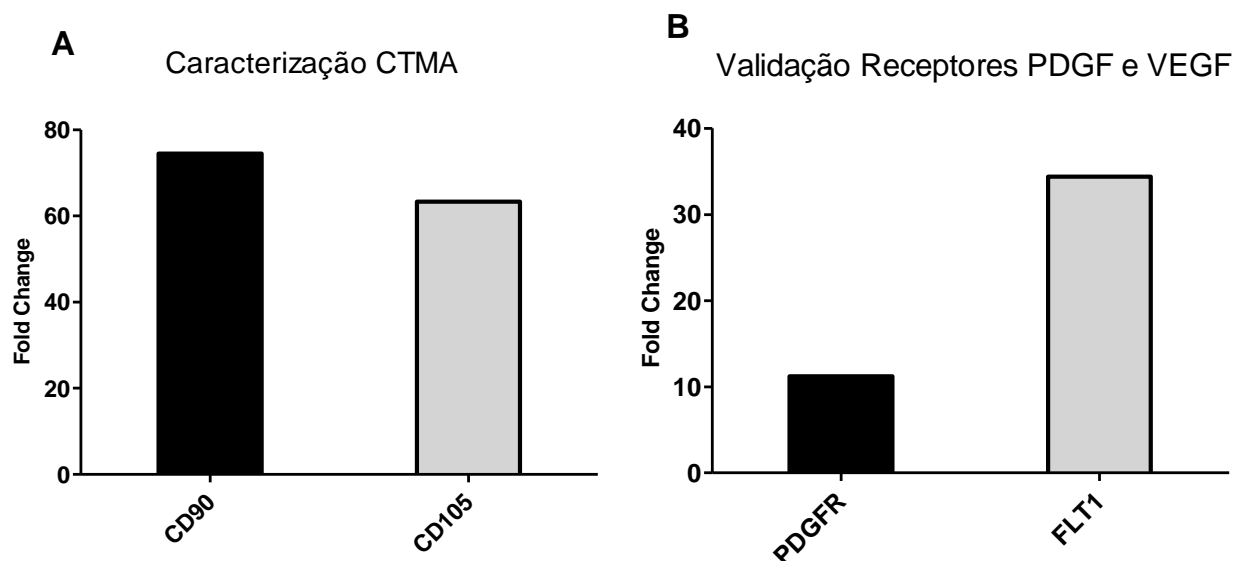


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da expressão gênica de marcadores de perfil mesenquimal CD90 e CD105 nas CTMA (A), bem como validação para expressão de receptores de PDGF e VEGF em CTMA (B).

Para avaliar o efeito dos FC sobre a capacidade de migração das CTMA, foi realizado o ensaio de migração celular (*Scratch assay*) e os FC foram utilizados para tratamento em hidrogel de Alginato 2%, o qual foi aplicado em poços *transwell* para haver liberação para o meio das CTMA, ou em tampão veículo, o qual foi adicionado diretamente ao meio de cultivo.

Monocamadas confluentes de CTMA foram riscadas, e incubadas na presença de meio contendo 10ng/mL dos FC. Após mensurar a área da lesão *in vitro* ao longo dos períodos avaliados, foi possível observar que o tratamento com os FC em Hidrogel de Alginato 2% não afetou a habilidade das CTMA fecharem a lesão no plástico no período de 48h, como avaliado na Figura 28. Entretanto, houve uma tendência ao fechamento da lesão no plástico mais rápido pelas células tratadas com ambos FC combinados ou apenas com rhVEGF165 (Gráfico 17).

O tratamento com os FC em tampão não afetou a habilidade das CTMA fecharem a lesão no plástico em 48 horas, como avaliado na Figura 29. Entretanto,

as células tratadas com ambos os FC combinados rhPDGF-BB+rhVEGF165 foram capazes de fechar a lesão em menor tempo, em 24h de tratamento já havia fechado cerca de 92% da área total, seguido pelo tratamento com rhVEGF165 (~74%) comparado ao tratamento com apenas rhPDGF-BB e ao grupo controle (Gráfico 18).

Figura 28 – Efeito de FC em hidrogel na migração de CTMA.

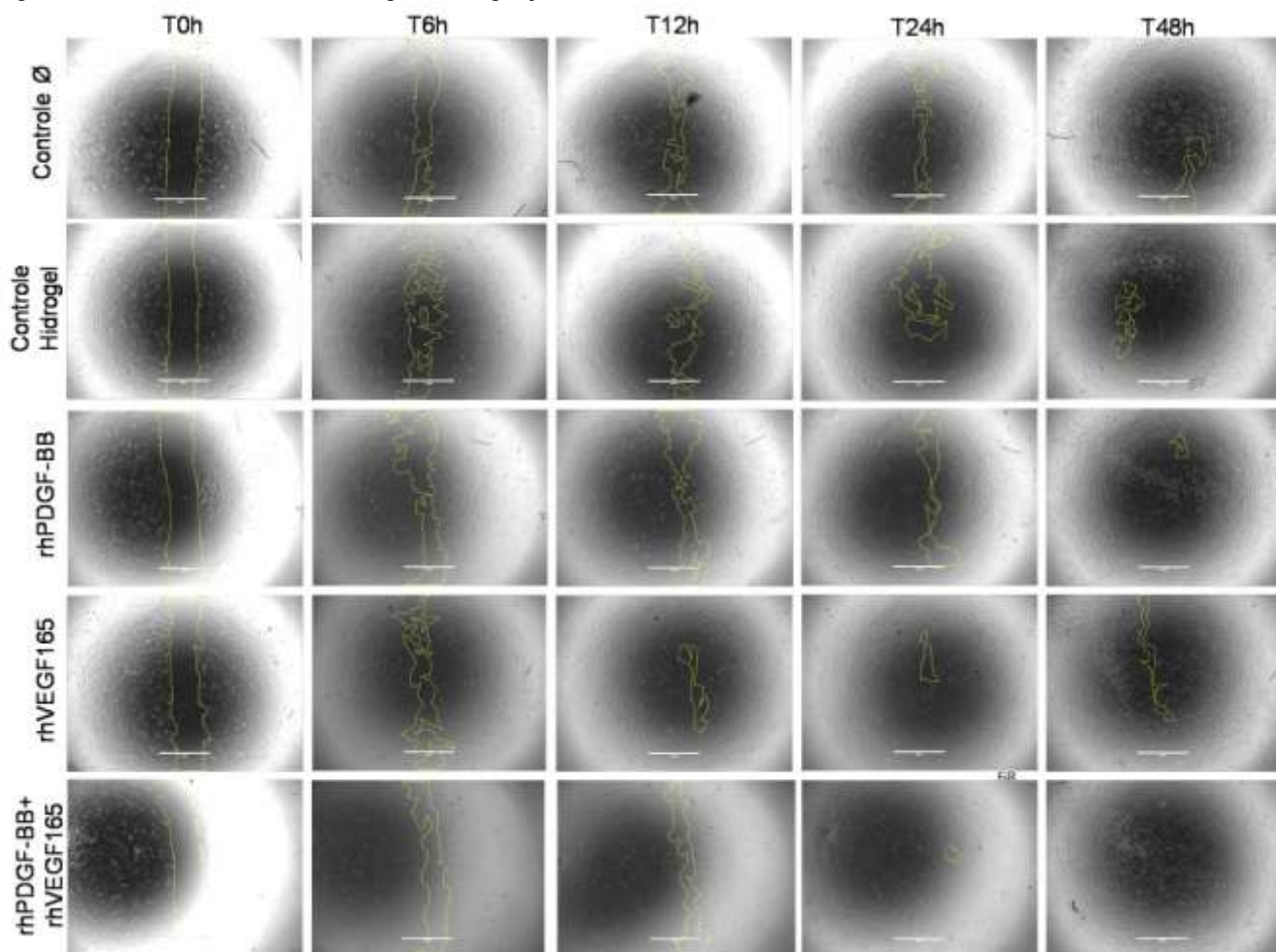


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Painel representativo do ensaio de migração celular das CTMA na presença ou ausência de FC em hidrogel de alginato. Foi avaliado o efeito de 10ng/mL de FC em hidrogel de alginato 2% sob a capacidade de CTMA de fechar a lesão *in vitro* (delimitada em amarelo no tempo 0) em 48 horas utilizando o software ImageJ. Aumento 10x.

Gráfico 17 – Taxa de fechamento da lesão *in vitro* por CTMA na presença ou ausência de FC em hidrogel de alginato.

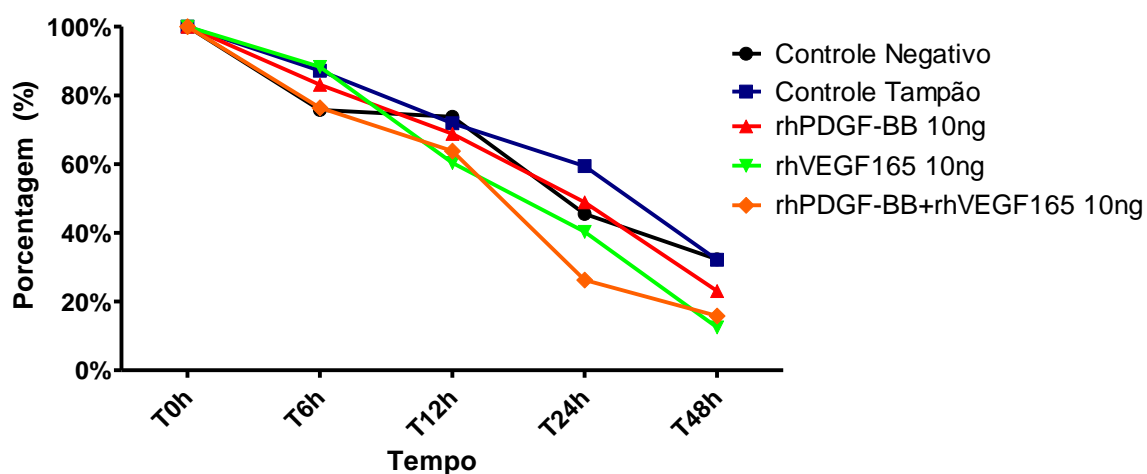


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Taxa de fechamento da lesão *in vitro* por CTMA na presença ou ausência de FC em hidrogel de alginato. Os resultados são relatados como porcentagem da distância do intervalo em 48h em comparação com o tempo 0.

Figura 29 – Efeito de FC em tampão na migração de CTMA.

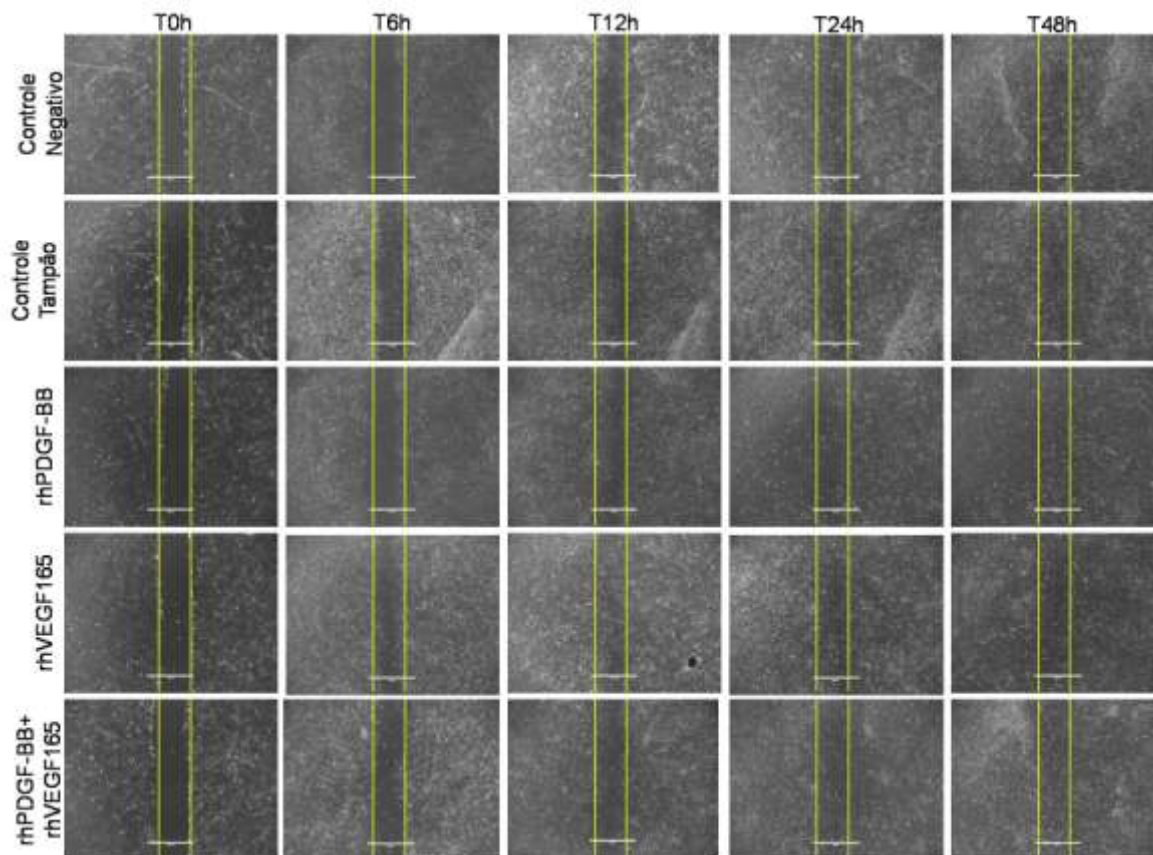


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Painel representativo do ensaio de migração celular das CTMA na presença ou ausência de FC. Foi avaliado o efeito de 10ng/mL de FC sob a capacidade de CTMA de fechar a lesão *in vitro* (delimitada em amarelo no tempo 0) em 48 horas utilizando o software ImageJ. Aumento 10x.

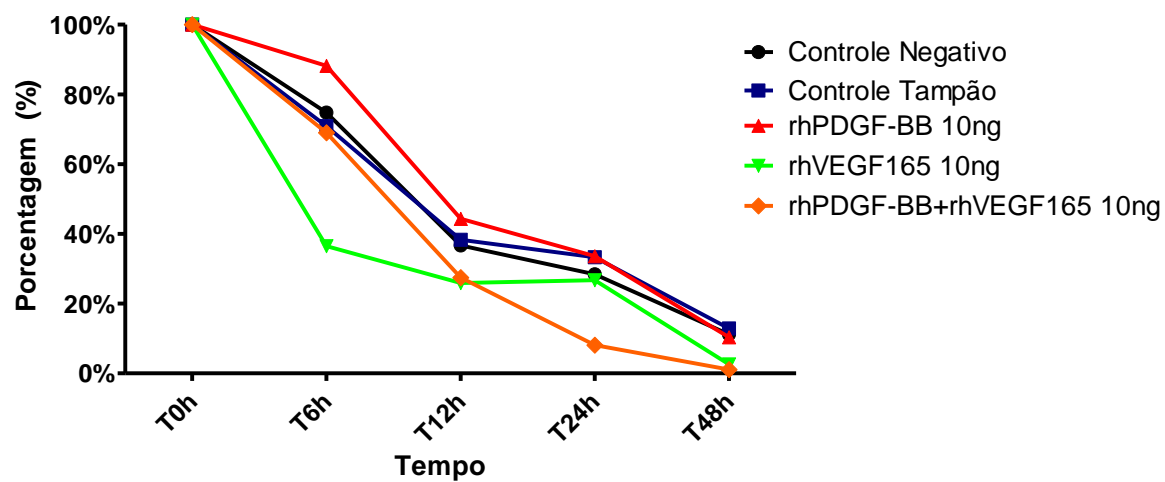
Gráfico 18 – Taxa de fechamento da lesão *in vitro* por CTMA tratadas com FC.

Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Taxa de fechamento da lesão *in vitro* por CTMA na presença ou ausência de FC. Os resultados são relatados como porcentagem da distância do intervalo em 48h em comparação com o tempo 0.

5.4 EXOSSOMOS DERIVADOS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

O resultado da quantificação das vesículas extracelulares provenientes do meio condicionado de diferentes tipos celulares, utilizados para padronização do método de isolamento, demonstrou que os protocolos utilizados foram eficientes para isolamento, porém não houve diferença significativa entre a quantidade obtida comparando os protocolos para o mesmo tipo celular (Gráfico 19). Portanto, pensando em reduzir custos e facilitar a reprodutibilidade do ensaio, o protocolo nº 2, que consiste na concentração do meio condicionado (se necessário), seguida por sua ultracentrifugação, foi escolhido para ser utilizado durante o projeto.

Gráfico 19 – Padronização do isolamento de exossomos.

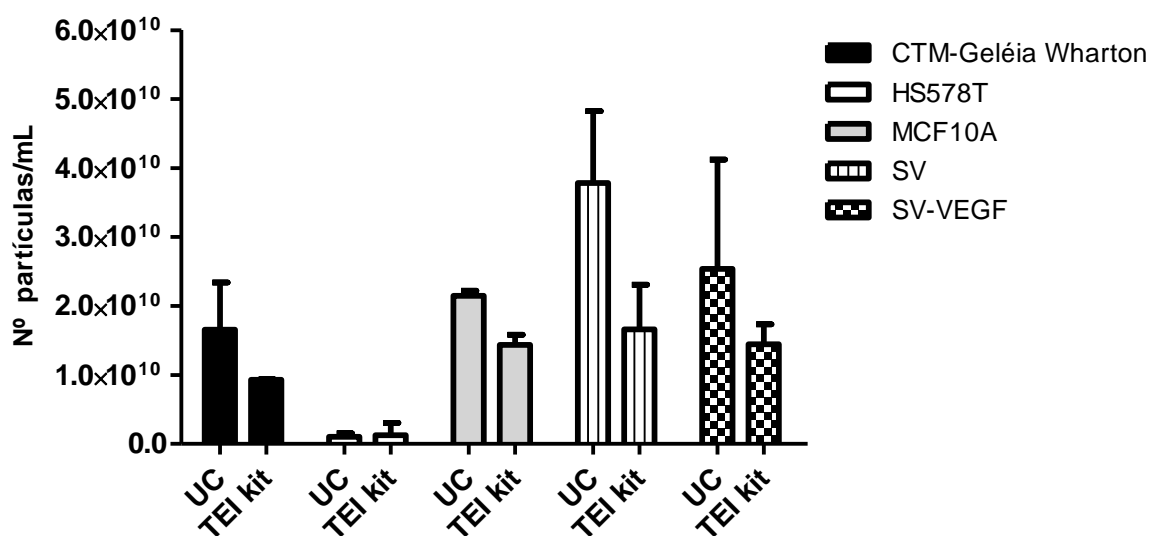


Gráfico: KOGA, 2019.

Legenda: Gráfico da padronização da técnica de isolamento de vesículas extracelulares de diferentes tipos celulares CTM (célula-tronco mesenquimal); HS578T (linhagem de célula tumoral de mama); MCF10A (linhagem de célula de mama); SV (célula de saco vitelino canino); SV-VEGF (célula de saco vitelino transformada com VEGF). UC: Ultracentrifugação; TEI: *Total Exosome Isolation kit*; Os valores representam o número de exossomos encontrados após isolamento pelos diferentes protocolos. Barras representam a média ± DP. Análise estatística 2way-ANOVA, pós-teste Bonferroni,

Após semear 10⁶ células/mL, tratá-las com os FC, nos tempos de 24h e 48h, e coletarmos o meio condicionado para isolamento dos exossomos, foi realizada

contagem celular e foi possível observar que o tratamento com 10ng/mL de ambos os FC combinados teve efeito significativo sobre a quantidade de células obtidas ao final de 24h em relação aos outros grupos de tratamento e controle, e o tratamento com rhVEGF165 apresentou aumento significativo da quantidade de células em relação ao grupo controle tampão (Gráfico 20), entretanto os tratamentos não impactaram a quantidade celular após 48h.

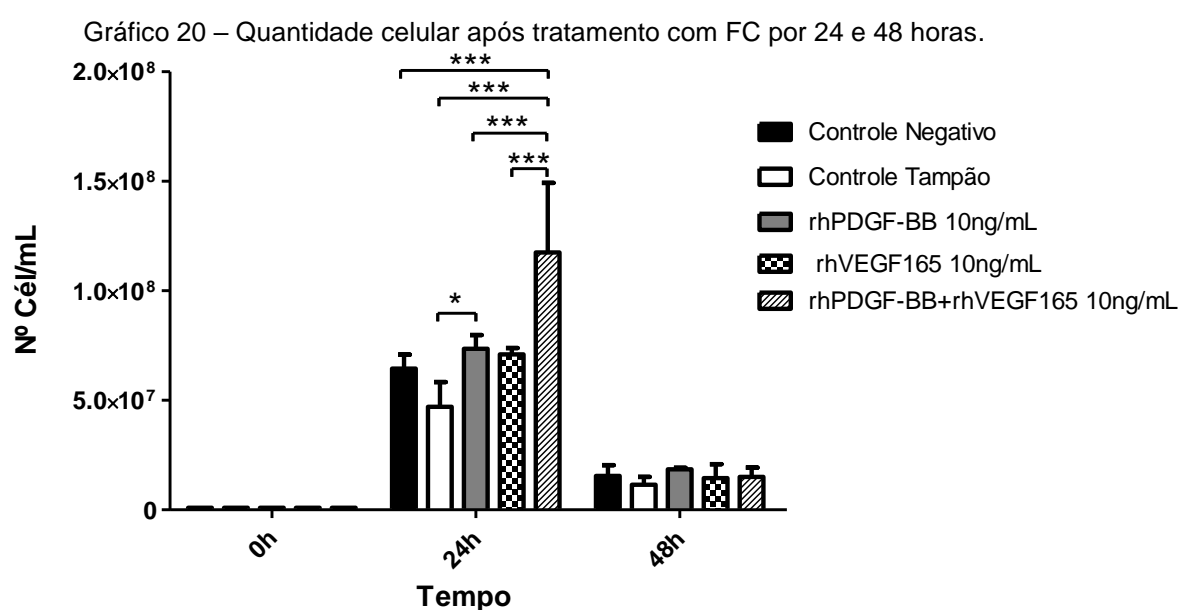


Gráfico: KOGA, 2019.

Legenda: Contagem celular após 24h e 48h de tratamento com FC. Barras representam a média \pm DP. Análise estatística 2way-ANOVA, pós-teste Bonferroni, (*=P<0.05; ***=P< 0.001).

Amostras de meio condicionado pelas CTMA utilizadas para isolamento dos exossomos e após sua obtenção, as vesículas foram quantificadas no aparelho Nanosight N300, no qual as amostras foram analisadas em cinco leituras de 30 segundos e em diferentes campos para contagem das partículas existentes de acordo com o tamanho, o que representa replicata conforme recomendação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV). Importante destacar o pico da concentração de partículas identificadas nos resultados obtidos foi

representado pela moda (valor que mais se repetiu na contagem das amostras) e em sua maioria compreendeu a faixa de tamanho que é determinada por caracterizar os exossomos, entre 40 nm e 150 nm, demonstrando que o protocolo de isolamento foi eficiente, como exemplificado no tempo de 24h (Figura 30.)

Figura 30 – Painel demonstrativo da quantificação de exossomos de CTMA.

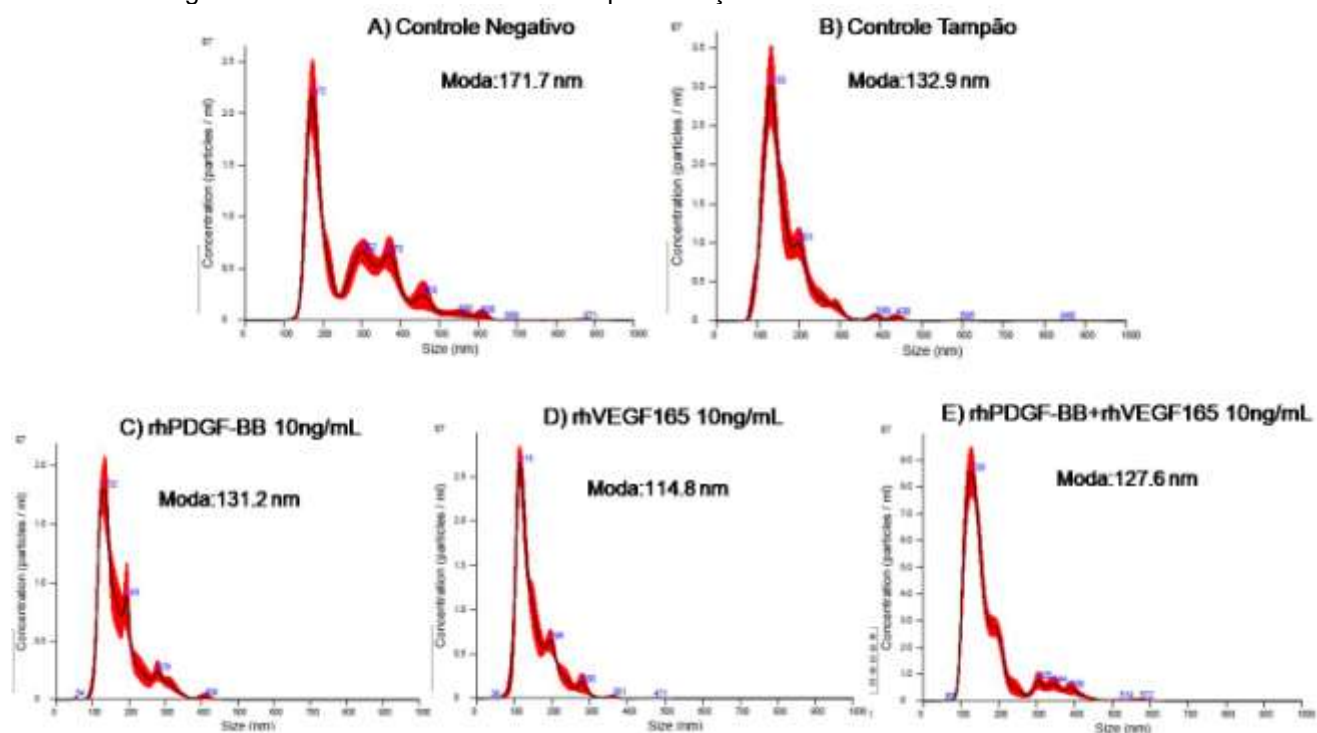


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Painel demonstrativo dos gráficos obtidos da quantificação de exossomos, representando a concentração média de tamanho de vesículas por leitura; barras de erro indicam +/- 1 erro padrão da média.

O isolamento dos exossomos derivados de CTMA foi eficiente, e a partir da quantificação foi possível observar que o tratamento das células com FC, especialmente quando combinados rhPDGF-BB+rhVEGF165, estimulou a secreção de uma maior quantidade de vesículas quando comparado aos grupos controles no período de 24h (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Concentração de exossomos derivados de CTMA após tratamento com FC.

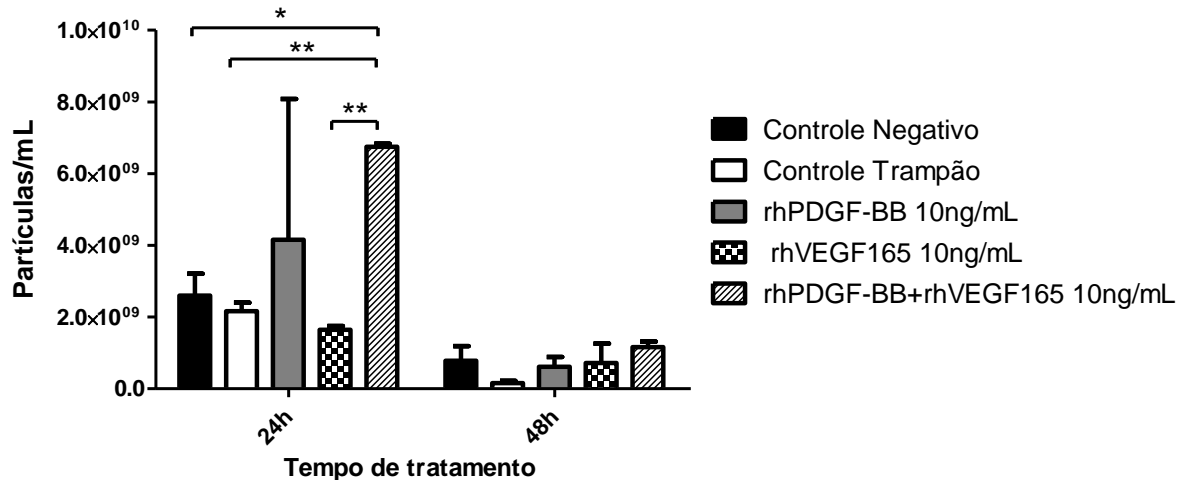


Gráfico: KOGA, 2019.

Legenda: Concentração de exossomos após 24h e 48h de tratamento com FC. Barras representam a média \pm DP. Análise estatística 2Way-ANOVA, pós-teste Bonferroni, (*= $P < 0.05$; **= $P < 0.01$).

Os exossomos derivados de CTMA (controle) foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão, que demonstrou a presença de estruturas com formato de “copo” podem ser identificadas como exossomos (Figura 31).

Figura 31 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de exossomos de CTMA.

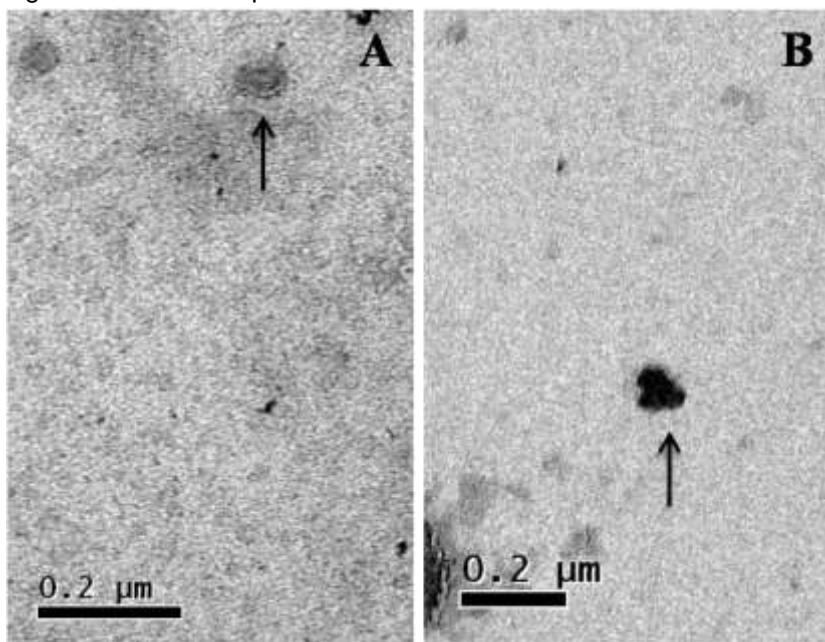


Imagem: AGUIAR, 2018

Legenda: (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrando exossomos isolados (setas) de CTMA.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo foi desenhado para avaliar o efeito de fatores de crescimento peptídicos recombinantes humanos PDGF-BB e VEGF165 em modelo animal de cicatrização de pele e em células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e seu secretoma, buscando uma nova abordagem terapêutica para tratamento de feridas.

Os resultados demonstraram que os FC utilizados estavam presentes nas frações purificadas e a concentração de 3µg/mL foi suficiente para promover o fechamento de feridas cutâneas em 7 dias no modelo de cicatrização em ratos nude Rowett, o qual foi escolhido buscando viabilizar o estudo da eficácia de fatores de crescimento recombinantes, buscando melhorar a cicatrização cutânea. O rato nude além de apresentar vantagem de baixos custos de manutenção e fácil manuseio, se mostrou favorável especialmente por suas características anatômicas, como uma maior área para estudo se comparado aos camundongos, e pouca ou ausência de pêlos no dorso, o que facilitou a geração das feridas na região, o acompanhamento da evolução da cicatrização em tempo hábil, e também por sua condição de imunodeficiência, o que possibilitou validar a atividade dos FC e aumentando o controle e a segurança do tratamento, sendo possível verificar a eficiência da dosagem de proteínas escolhida, garantindo a ausência de formações tumorais induzidas pelo tratamento. A mesma espécie foi utilizada para avaliar a toxicidade em longo prazo dos fatores recombinantes humanos de coagulação IX (26 semanas) e do fator recombinante VIII (52 semanas) aos quais adicionaram uma molécula de 40kDa de polietilenoglicol visando estender sua meia-vida, e visto que as mesmas são imunogênicas em animais, o modelo se mostrou adequado pois não

desenvolveu anticorpos contra as proteínas estudadas (RASMUSSEN et al., 2016, 2017).

Os ratos nude Rowett também foram usados como modelo de defeitos femorais, para avaliar o potencial regenerativo de células-tronco mesenquimais encapsuladas com hidrogel de alginato visando diferenciação osteogênica, onde o modelo, quando comparado a ratos imunocompetentes, apresentou maiores índices de formação óssea e menor quantidade de células de morfologia linfocitária no local, e apesar do biomaterial ter sido eficiente em entregar as células e iniciar ossificação, o tratamento foi insuficiente para induzir o fechamento completo do defeito ósseo (GARSKE et al., 2020)

O tratamento de feridas cutâneas com 3µg/mL de ambos os FC combinados (rhPDGF-BB+rhVEGF165) em hidrogel de alginato 2%, acelerou o processo de cicatrização nos dias 1, 3 e 5 após a cirurgia, resultando em feridas de menor área macroscópica em relação aos outros tratamentos e controles no dia 7, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos tratados com FC em hidrogel e tampão, ambos os tratamentos resultaram em cicatrizes aproximadamente 80% menores no dia 7 em relação a área da ferida no dia 0.

Ao avaliar o efeito de rhPDGF-BB em hidrogéis de alginato e sulfato de alginato sobre a cicatrização em dorso de ratos, BABAVALIAN et al., (2018) concluíram que 4µg/mL de rhPDGF-BB em hidrogel de sulfato de alginato foi ideal para promover a cicatrização da lesão em 7 dias, devido à liberação mais lenta da proteína quando utiliza-se o hidrogel como veículo, corroborando nosso estudo no período porém utilizando maior quantidade da proteína.

Cerca de metade das feridas tratadas com rhPDGF-BB em hidrogel, apresentaram menor grau de inflamação, enquanto que feridas que receberam o

mesmo FC em tampão veículo, apresentaram inflamação moderada em 90% das amostras, enquanto as feridas tratadas com rhVEGF165 apresentaram grau moderado de inflamação em ambos os grupos, apesar que estudos futuros avaliando a expressão de marcadores inflamatórios se fazem necessários. Uma reação pronunciada de fibroblastos foi encontrada em feridas de ambos os grupos de FC em hidrogel ou tampão, bem como alto grau de neovascularização, a qual foi discreta apenas quando se utilizou ambos FC combinados, e a expressão de CD31 e VEGF em feridas tratadas com rhPDGF-BB em tampão, comprovam preliminarmente o aumento da angiogênese.

rhPDGF-BB já foi descrito por atenuar inflamação e promover cicatrização cutânea em modelo de ratos onde foram feitas aplicações tópicas diárias por 14 dias de gel Regranex (0,1% rhPDGF-BB em carboximetilcelulose) as quais fecharam 50% em menos de 7 dias, e feridas isquêmicas em 9 dias (GOWDA et al., 2015).

Concentrações crescentes de PDGF (10 e 150ng/mL) foram descritas por modelar o processo de cicatrização de tendão com três aplicações durante uma semana de maneira dose dependente, aumentando a proliferação e síntese de matriz extracelular por células de tendão de coelho (KANG; KANG, 1999). Já um estudo que avaliou o efeito tópico de fatores de crescimento sozinhos ou combinados, em modelo de camundongo, concluiu que os melhores resultados foram obtidos com uma combinação de EGF (10 ng) e PDGF-BB (15 ng). O PDGF-AA mesmo na concentração máxima de 20 ng não intensificou o processo de reparo de feridas (GOPE, 2002).

A angiogênese é fundamental para a cicatrização adequada, o que explica os altos níveis de neovascularização nas amostras aos 7 dias após a cirurgia, e ambos os fatores estão envolvidos na angiogênese que ocorre durante o período de reparo,

pois enquanto VEGF é essencial para formação de novos vasos sanguíneos durante a fase inicial da angiogênese para nutrir o novo tecido formado através da rede de novos capilares, além de promover a permeabilidade vascular, PDGF atua na maturação promovendo maior oxigenação dos vasos e sua ação foi descrita recrutando e estimulando pericitos, os quais foram capazes de secretar moléculas pró-regenerativas sob influência de PDGF-BB (DIPIETRO, 2016; GACEB et al., 2018). Assim, uma posterior retração dos capilares maduros é esperada à medida que a inflamação diminui, o que pode explicar o menor grau de neovascularização após combinação dos FC (rhPDGF-BB e rhVEGF165) de modo que a cicatrização poderá evoluir para a fase seguinte (LEE et al., 2007; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

A combinação desses fatores já foi descrita, juntamente com fator de crescimento de fibroblastos (FGF), onde se observou efeito sinérgico da angiogênese *in vitro* e *in vivo* provocando aumento da proliferação de células endoteliais bem como a expressão actina de músculo liso (KIM et al., 2016) eventos favoráveis ao reparo tecidual.

O efeito positivo dos FC avaliados neste estudo pode ser demonstrado através da reação fibroblástica pronunciada no local da injúria, a qual é esperada à medida que a inflamação seja resolvida como resposta à quimioatração de células de defesa e endoteliais do organismo, iniciando a formação do novo tecido através do estímulo da proliferação de fibroblastos dermais, já descritas como funções de PDGF (WERNER; GROSE, 2003). Como consequência espera-se maior deposição de matriz extracelular, como observado preliminarmente expressão pronunciada da proteína de matriz fibronectina em amostras tratadas com rhPDGF-BB em tampão veículo.

O conjunto dos resultados sugerem que após 7 dias do tratamento com FC, as feridas se encontravam em fase de transição entre a fase inflamatória e a fase proliferativa do reparo tecidual, com indícios de discreta deposição de colágeno, assim como observado no mesmo período em ratos por SABOL et al., (2012), comprovada preliminarmente pela expressão de Pró-Colágeno 3 encontrado em feridas que receberam FC em tampão veículo sozinhos ou combinados.

Durante os primeiros dias de cicatrização, a reestruturação da epiderme das feridas é importante para criar uma barreira entre ambiente interno e externo, protegendo para que o reparo não seja interrompido, além de após esse processo, as células epiteliais podem atuar no processo de cicatrização e sua maturação ocorrerá até que a cicatriz se assuma a força tênsil e apresente função novamente (SABOL et al., 2012). Entretanto, feridas de espessura total destroem a epiderme, a derme e possivelmente mais, portanto, ocorrerá a cicatrização não apenas por reepitelização, mas pela formação do tecido de granulação antes da cobertura epitelial (RITTIÉ, 2016). Os resultados mostraram que aos sete dias após cirurgia, não houve diferença entre os grupos em relação à reepitelização das feridas, onde controle negativo e tratadas com rhPDGF-BB em hidrogel ou tampão veículo apresentaram reepitelização completa em cerca de 70% das amostras, sugerindo que a resposta fisiológica do animal foi eficiente para reepitelizar a lesão no mesmo período, confirmando a presença do tecido de granulação aos 7 dias após a cirurgia.

A ação dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e epidermal (EGF) já foi descrita por estimular a reepitelização da ferida de maneira parácrina, sugerindo uma possível ação desses fatores em conjunto para cicatrizar as feridas cutâneas (WERNER; GROSE, 2003).

O mecanismo de ação parácrino de PDGF na cicatrização de feridas foi descrito ao se observar padrões de expressão de seus receptores e ligantes em lesões onde estes foram expressos predominantemente na epiderme, enquanto aqueles foram encontrados na derme e tecido de granulação, e a falta de PDGF já foi associada à cicatrização deficiente (WERNER; GROSE, 2003; GURTNER et al., 2008), reforçando a importância de estudos como este, que viabilizar protocolos de suplementação exógena com dosagens eficazes de FC recombinantes.

Células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMA) têm sido amplamente utilizadas como modelos para estudos *in vitro*, devido sua capacidade de proliferação e diferenciação em tipos celulares de interesses terapêuticos, como produção de hormônios para terapia do Diabetes mellitus (TIMPER et al., 2006); diferenciação em linhagens celulares (ZUK et al., 2001); e por suas características regenerativas (LIU et al., 2011; LIN et al., 2019a). O uso de CTM de tecido adiposo canino vem sendo explorado e viabilizado, do ponto de vista regulatório, devido à alta demanda por tratamentos alternativos na clínica veterinária, em patologias como osteoartrite e doença renal para cães, gatos e cavalos nos últimos anos, e pela possibilidade de prover mais informações científicas permitindo translação para Medicina Humana (MARX; SILVEIRA; BEYER NARDI, 2015).

A capacidade de secreção de moléculas bioativas regenerativas pelas CTMA tem sido alvo de diversos estudos e as vesículas secretadas para o meio extracelular já foram descritas como potenciais efetoras da comunicação intercelular atuando como alternativa promissora especialmente para fins regenerativos, estimulando proliferação e migração celular *in vitro* (HU et al., 2016; CHOI et al., 2018).

O tratamento com 10ng/mL de rhPDGF-BB e VEGF165 combinados em tampão, aumentou a quantidade de CTMA em 24h, e estimulou migração celular, permitindo fechamento da lesão *in vitro* em 24h quando comparado aos outros tratamentos e ao grupo de FC em hidrogel. Conseqüentemente, o tratamento com ambos os fatores combinados em tampão estimulou maior secreção de exossomos pelas células em comparação aos grupos controle e tratados.

O estímulo de CTMA de pacientes diabéticos tipo 2 com 20ng/mL de PDGF-BB reverteu fenótipo aumentando a capacidade proliferativa e migratória e efeito de *homing* para tecido lesado *in vivo* (CAPILLA-GONZÁLEZ et al., 2018), fato este que pode embasar novas perspectivas para utilização dos FC propostos no presente estudo, para avaliação dos efeitos sobre modelos diabéticos *in vitro* e outras opções de concentrações do fator de crescimento.

O encapsulamento polimérico com ácido láctico-co-glicólico (PLGA), foi descrito como eficiente para prolongar a meia vida de rhPDGF-BB e as microesferas foram capazes de estimular a migração celular *in vitro* para fechar lesão no plástico em 24h (BAE et al., 2016).

A associação de CTMA com formas recombinantes ou não de VEGF165 diferentemente do presente estudo é descrita através da transfecção celular, onde observaram o aumento da expressão da proteína e estímulo de proliferação celular *in vitro* (JUN-JIANG; HUAN-JIU, 2015). Enquanto outros estudos utilizam células-tronco de medula óssea, já descritas por serem transformadas com VEGF165 e BMP2 *in vitro* exibindo maiores efeitos osteogênicos celulares para reparo de osteonecrose de cabeça femoral de coelhos (MA; CUI; ZHAO, 2015).

Associação de CTMA com FGF e induziu a produção de vesículas extracelulares com potencial pró-angiogênico (MAZZEO, 2014), e LOPATINA et al.,

(2014) tratou as células com PDGF, e também observou aumento do potencial angiogênico dessas células.

Através de análise proteômica, um estudo encontrou TGF β 1 na membrana de exossomos de mastócitos, elucidando que exossomos foram capazes de entregar a proteína em sua membrana induzindo sinalização de células receptoras no compartimento intercelular da membrana, induzindo fenótipo migratório em células-tronco mesenquimais primárias (SHELKE et al., 2019). O tratamento de células-tronco mesenquimais com FC, pode melhorar seu perfil de migração, podendo ser possível que a qualidade das vesículas liberadas também seja melhorada, abrindo novos caminhos e oportunidades para estudo dos efeitos do estímulo de FC no secretoma celular.

7 CONCLUSÕES

- Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que a suplementação de fatores de crescimento recombinantes humano PDGF-BB e/ou VEGF165 em feridas cutâneas.
- 3µg/mL de fatores foi efetivo para promover o fechamento das feridas no dia 7 após a cirurgia em 80% em relação ao dia 0, estimulou angiogênese, fibroplasia e deposição discreta de colágeno nas feridas;
- Os fatores em hidrogel de alginato 2% combinados reduziram angiogênese em ambos os grupos e aceleraram o fechamento de feridas cutâneas nos 5 primeiros dias após cirurgia em relação aos outros tratamentos e FC em veículo;
- rhPDGF-BB em hidrogel atenuou inflamação em relação FC em tampão veículo e aos outros tratamentos;
- A resposta fisiológica do animal foi eficiente para reepitelizar a lesão no mesmo período que rhPDGF-BB em hidrogel ou tampão, em relação aos outros tratamentos;
- O tratamento de CTMA com FC combinados em tampão estimulou migração celular, permitindo fechamento da lesão *in vitro* em 24h quando comparado aos outros tratamentos;
- Estudos futuros avaliando a expressão de marcadores inflamatórios, de proliferação, angiogênese e deposição de colágeno se fazem necessários.

Cumulativamente, nossos dados sugerem que o rhPDGF-BB ou combinado com rhVEGF165 apresentam potencial para a estimular a cicatrização de pele, mas estudos que prolonguem a observação do ensaio *in vivo* por mais tempo, podem oferecer mais dados para validar essa afirmação.

O hidrogel de alginato 2% mostrou ser uma abordagem interessante de fácil preparo e baixo custo para ser usada como veículo para aplicações de fatores *in vivo* em relação ao tampão veículo, mas não em ensaios *in vitro*, apesar de que mais estudos sobre a cinética de liberação de FC e sua estabilidade no período se fazem necessários.

O tratamento com ambos os fatores combinados melhoraram o perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo canino estimulando a migração celular e a secreção de exossomos, que poderão ser utilizados como modelos para investigações do seu conteúdo molecular e embasar uma nova abordagem terapêutica livre de células para cicatrização.

O modelo animal foi validado e poderá ser utilizado para avaliar o efeito tanto de células como exossomos tratados com FC na cicatrização de feridas cutâneas.

Capítulo 2: Efeito de rhVEGF165 sobre o perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais de medula óssea equina e seu secretoma

1. INTRODUÇÃO

A cicatrização e reparo de tecidos e vários outros processos estão intimamente relacionados à angiogênese e formação vascular, e nesse sentido o VEGF já demonstrou exercer seus efeitos em células endoteliais ao interagir com dois receptores de membrana de alta afinidade exibindo atividade de tirosina quinase, FLT1 e KDR (WERNER; GROSE, 2003). VEGF165 secretado por células endoteliais já foi descrito como fator mais ativo com papel vital em angiogênese, vascularização e diferenciação de células mesenquimais (MATSUMOTO; EMA, 2014; QUAN et al., 2017).

A expressão de VEGF é induzida em células expostas à hipoxia ou isquemia, e o estímulo da neovascularização é importante em diversas condições patológicas como em feridas crônicas, e o fator indutor de hipoxia (HIF1) já foi descrito por estar relacionado com a ativação de VEGF nessas condições (FORSYTHE et al., 1996; POURMOUSSA et al., 2016; KANJI; DAS, 2017). Este mesmo fator foi descrito por regular a expressão, em hipoxia, de proteínas associadas à matriz extracelular em fibroblastos dermais equinos que apresentavam a condição de Tecido de Granulação Exuberante (TGE) (DESCHENE et al., 2012).

Cavalos, assim como humanos, dependem da atividade de células epiteliais e contração de miofibroblastos para cicatrizar feridas cutâneas, e ambos sofrem de distúrbios fibro-proliferativos cutâneos, como o TGE, disfunção que ocorre primariamente nos membros, onde uma ferida permanece na fase proliferativa do reparo, impedida de alcançar a cicatrização completa, e estudos mostraram que

tanto TGE quanto quelóides humanas apresentam apoptose de fibroblastos deficientes e disfunção microvascular causada por oclusão luminal (LEPAULT et al., 2005).

No presente estudo hipotetizamos que o tratamento com rhVEGF165 seria capaz de melhorar o perfil angiogênico de células-tronco mesenquimais de medula óssea eqüina e aumentar a quantidade de exossomos liberados, visando fornecer uma fonte terapêutica alternativa de células ou vesículas que possam ser aplicadas na cicatrização de feridas em modelos como equinos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de rhVEGF165 no perfil terapêutico de células-tronco mesenquimais da medula óssea equinas (eCTM-MO) e seu secretoma.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Cultivar e caracterizar eCTM-MO;
- 2.2.2 Validar a presença do receptor de VEGF;
- 2.2.3 Tratar CTM-MO com rhVEGF165;
- 2.2.4 Avaliar os efeitos de rhVEGF165 sobre o perfil angiogênico das células;
- 2.2.5 Isolar e caracterizar exossomos de eCTM-MO tratadas com rhVEGF165.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo foi desenvolvido durante estágio no Centro de Pesquisa em Reprodução e Fertilidade (CRRF) da Universidade de Montréal - Québec, Canadá, realizado no período de Setembro/2019 a Fevereiro/2020 com auxílio obtido pelo processo CAPES-PRINT 88887.365003/2019-00 e pelo Mitacs-Globalink, sob orientação do Prof. Dr. Lawrence Smith.

3.1 Cultivo celular

As células-tronco mesenquimais da medula óssea equina (eCTM-MO) foram cultivadas em meio Dulbecco com baixa glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1x penicilina/estreptomicina. As células foram cultivadas em cultura de monocamada e quando atingiram 80% de confluência, foram expandidas usando Tripsina 0,25%.

3.2 Ensaio de migração celular – “*Scratch assay*”

Para tanto, 1×10^5 células/mL foram cultivadas em placas de 6 poços, e após 24h foram riscadas ao meio do poço com uma ponteira de 10uL de pipeta para criar um espaço reto e, após a remoção de detritos, as células foram lavadas 1x com PBSA, e incubadas para crescer por 48h na presença dos seguintes tratamentos:

- Controle negativo: meio de cultura 1% SFB;
- Controle tampão: meio de cultura 1% SFB + tampão veículo dos fatores (20 mM Na_3PO_4 e 100 mM NaCl).
- 20ng/mL de rhVEGF165 + meio de cultura 1% SFB
- 100ng/mL de rhVEGF165 no meio de cultura 1% SFB

As placas foram mantidas em uma incubadora a 37°C e examinadas periodicamente (0, 6, 12 e 24 h), e para avaliar o mesmo campo durante a aquisição da imagem utilizando um microscópio de contraste de fase, foram marcados pontos de referência próximos aos arranhões. A área aberta da ferida foi quantitativamente em cada momento usando o software do programa ImageJ.

3.3 Caracterização celular por qRT-PCR

O RNA total foi extraído utilizando o mini kit RNeasy, depois transcrito reversamente para mRNA e cDNA utilizando o kit SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen – 11754250) e o termociclador T300 (Biometra), a transcrição reversa (RT) foi realizada usando o kit Mix Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen) com os primers RT e a mistura fornecida pelo kit. A reação foi realizada a 42 ° C por 30 min. Para todas as amostras, um RT negativo foi utilizado como controle, consistindo em uma reação de RT omitindo a transcriptase reversa. A reação em cadeia quantitativa da RT-polimerase (PCR) foi realizada no cDNA em termociclador Rotor-gene Q-PCR sob as seguintes condições de amplificação: 95 ° C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 ° C por 15 se a 60 ° C por 1 min. A eficiência igual de PCR de todos os pares de iniciadores foi validada por diluição serial de cDNA. Os primers foram projetados para amplificar apenas os genes alvo específicos de eqüinos e os genes de manutenção GAPDH, RPL-32 e SDHA (Tabela 1).

Tabela 5: Seqüência de *primers* para análise de eCTMMO por qRT-PCR

| Gene | Forward | Reverse |
|--------------|------------------------|-----------------------|
| GAPDH | GAGATCCCGCCAACATCAAA | AAGTGAGCCCCAGCCTTCTC |
| RPL32 | GAAGCACATGCTGCCAGT | CACGATGGCTTTGCGGTTT |
| SDHA | GCACCTACTTCAGCTGCACG | AACTCCAAGTCCTGGCAGGG |
| CD90 | CGCCACACCCATCCAGTA | CCTCGCACTTGACCAGTTTGT |
| CD105 | CACCCTACGTGTCCTGGCTC | CCACATAGGACGCTACGACGC |
| PCNA | AAGATAACGCGGACACCTTGG | CGGCATATACGTGCAAATTCG |
| FLT1 | TTAAAAGGCACCCAGCACGTC | ACTGTTTGCCGTTTCTTCCAC |
| VEGFA | GGAGAGCATAAAACCCATGAAG | GCACACAGGATGGCTTGAAGA |
| TGFb1 | TATGTTCTTCAATGCGTCGGA | TGAGGTAGCGCCAGGAATTAT |
| HIF1 | TCGAAGTCGAACAGCCTCAC | TCTGCAACGCCAGGATCTTT |

3.4 Isolamento de exossomos de eCTM-MO

Para o isolamento dos exossomos, 10^6 células/mL em garrafas T-75mL com 10mL de meio de cultura por 48h e após enxágue com PBS, as células foram incubadas por 48h com:

- Controle negativo: meio de cultura 0% SFB;
- Controle tampão: meio de cultura 0% SFB + tampão veículo dos fatores (20 mM Na_3PO_4 e 100 mM NaCl).
- 20ng/mL de rhVEGF165 + meio de cultura 0% SFB
- 100ng/mL de rhVEGF165 no meio de cultura 0% SFB

Em seguida, o meio condicionado foi coletado e seguido o protocolo de isolamento. Centrifugou-se o meio a 700 xg por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi coletado e o pellet descartado, em seguida filtrou-se com filtro de 0,22 um e novamente centrifugação a 16.000 xg por 30 min a 4°C e então o sobrenadante foi

ultracentrifugado a 100.000 xg por 2h a 4°C, e então o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo exossomos foi diluído com PBS e armazenado a -20°C para análises posteriores.

3.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão de exossomos

Os exossomos isolados de células-tronco mesenquimais de medula óssea eqüina foram submetidos ao protocolo de pós-fixação com ácido fosfotungstênio e analisado em microscópio eletrônico de transmissão.

3.6 Quantificação de exossomos de eCTM-MO

Após isolamento, as amostras foram enviadas para análise em equipamento para nanopartículas Zetaview, e quantificação no Software ZetaView (version 8.05.11 SP4).

4. RESULTADOS

As células-tronco mesenquimais de medula óssea equina (eCTM-MO) foram cultivadas *in vitro* em monocamada, apresentando morfologia fibroblastóide (Figura 32). Durante 48h de cultivo na ausência de soro fetal bovino, as células secretaram vesículas com diâmetro de aproximadamente 120nm contendo formato típico de exossomos, como identificado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 33). A análise preliminar permitiu observar que o tratamento com rhVEGF165 estimulou a liberação de maior quantidade de exossomos pelas células, na dosagem de 100ng/mL em comparação aos grupos controle no período de 48 horas (Gráfico 22).

Figura 32–Cultivo de células-tronco mesenquimais de medula óssea equina.

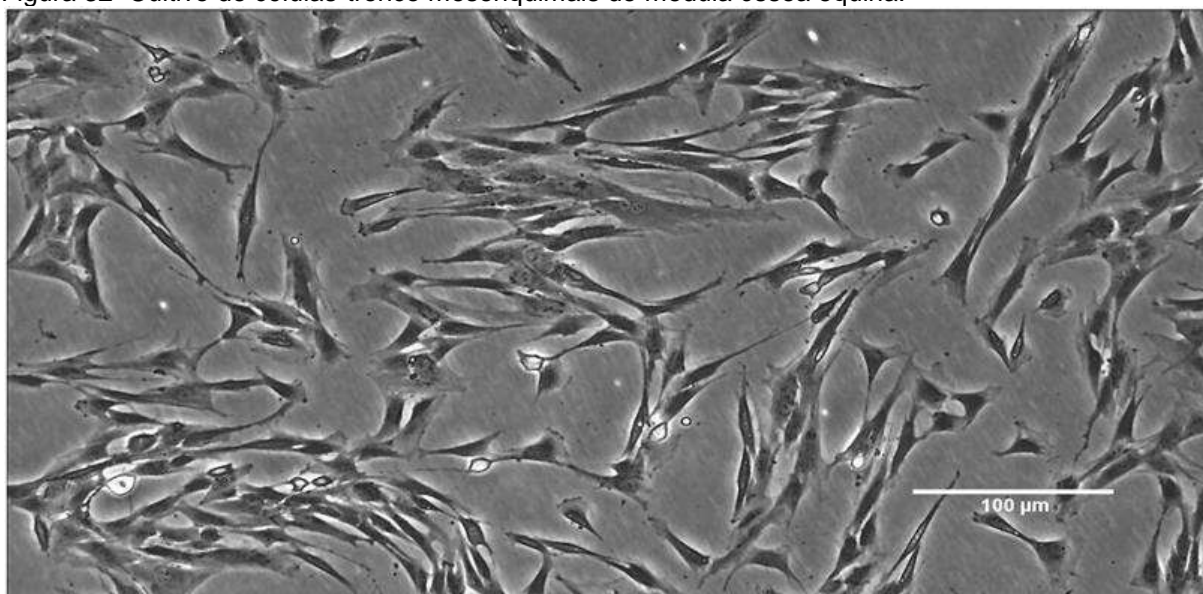


Imagem: KOGA,2019

Legenda: Fotomicrografia do cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo canino em quarta passagem. Aumento 100x.

Figura 33 – Microscopia eletrônica de transmissão de exossomos.

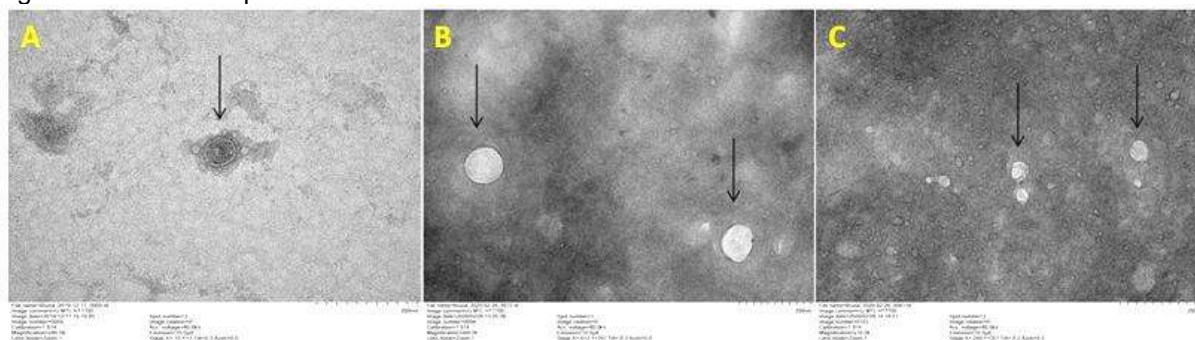


Imagem: KOGA, 2020.

Legenda: Fotomicrografia de Exossomos isolados de (A) eCTMs controle, (B) eCTMs tratadas com 20ng/mL de rhVEGF165 e (C) eCTMs tratadas com 100ng/mL de rhVEGF165.

Gráfico 22 – Quantificação de exossomos derivados de eCTM-MO.

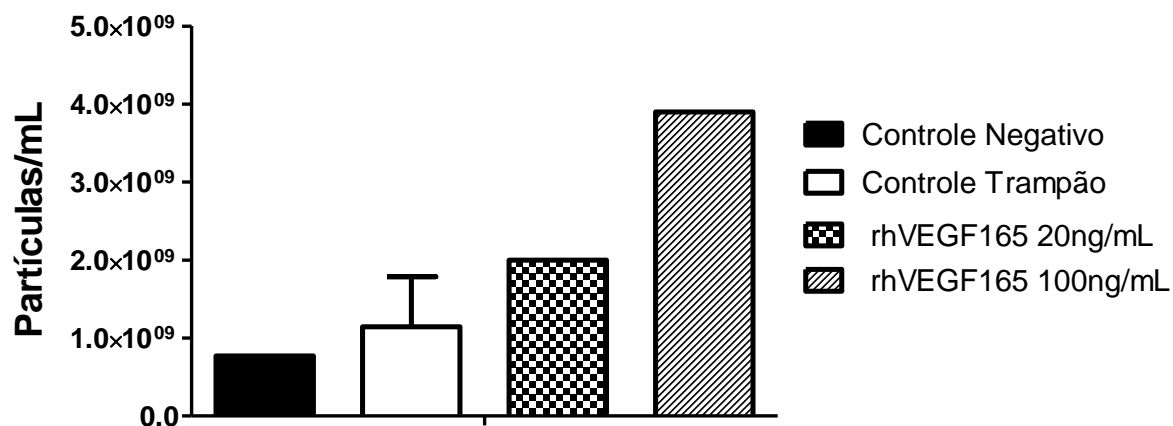


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da quantificação de exossomos derivados de eCTM-MO após tratamento com diferentes concentrações de rhVEGF165. As barras indicam a quantidade de exossomos encontrados após o isolamento; barras indicam desvio padrão.

A exposição à rhVEGF165 não afetou o número de células, mas afetou os transcritos de PCNA, diminuindo sua expressão com o tratamento a 20ng/mL de rhVEGF165 e aumentando a 100ng/mL (Gráfico 23).

Gráfico 23 – Contagem e proliferação de eCTM-MO após tratamento.

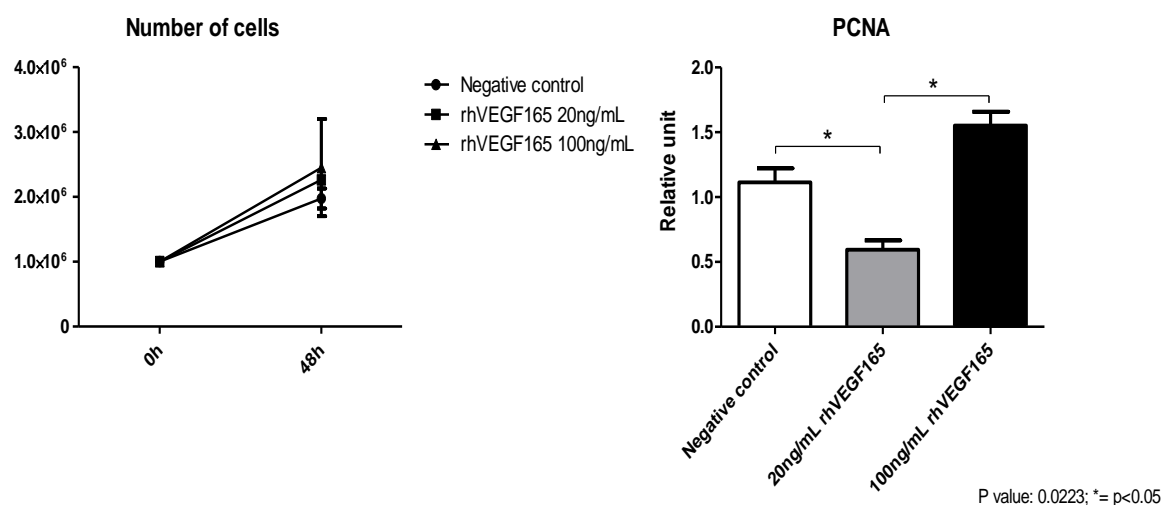


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da contagem celular e expressão gênica de marcadores de receptor de PCNA nas CTM-MO após tratamento com diferentes concentrações de rhVEGF165.

O tratamento com rhVEGF165 não afetou a habilidade das eCTM-MO fecharem a lesão no plástico, avaliado pelo ensaio de “Scratch *in vitro*” (Figura 34, Gráfico 24).

Figura 34 – Efeito de rhVEGF165 em hidrogel na migração de eCTM-MO.

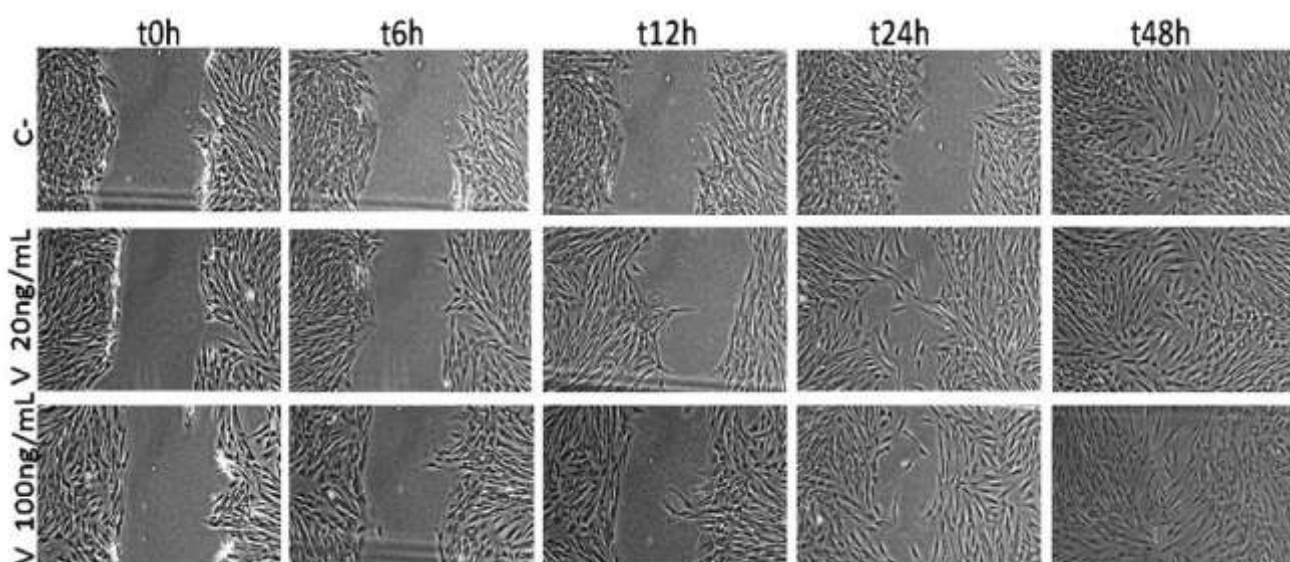


Imagem: KOGA, 2019.

Legenda: Painel representativo do ensaio de migração celular de eCTM-MO na presença ou ausência de FC. Foi avaliado o efeito de 20ng/mL e 100ng/mL de rhVEGF165 sob a capacidade de eCTM-MO de fechar a lesão *in vitro* em 48 horas.

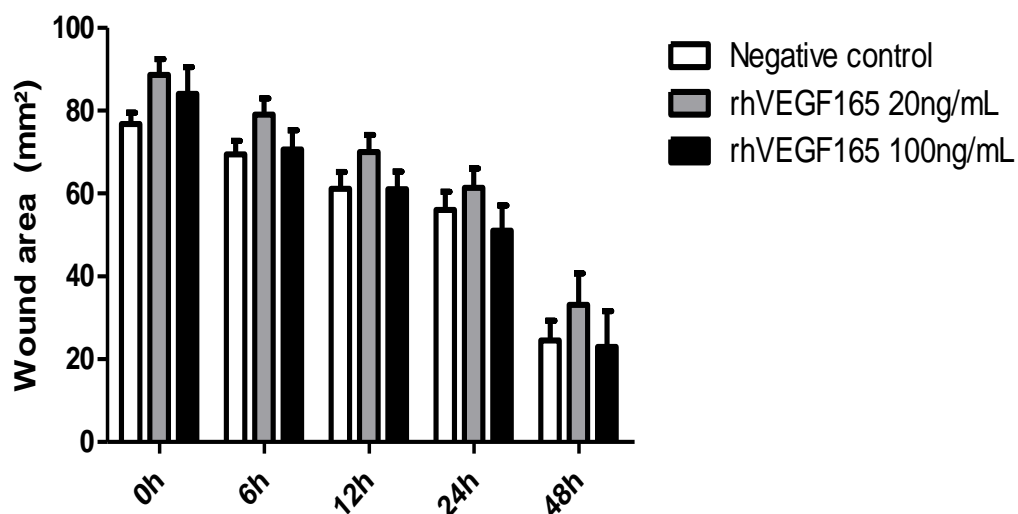
Gráfico 24 – Fechamento da lesão *in vitro* por eCTM-MO tratadas com rhVEGF165.

Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico de fechamento da lesão *in vitro* por eCTM-MO tratadas com rhVEGF165. Os resultados são relatados como tamanho da área *in vitro* em 48h em comparação com o tempo 0.

As eCTM-MO mantiveram a expressão dos marcadores mesenquimais (CD105 e CD90) após a exposição às diferentes concentrações de 20ng/mL e 100ng/mL de rhVEGF165 (Gráfico 25).

Gráfico 25 – Caracterização de eCTM-MO por qRT-PCR.

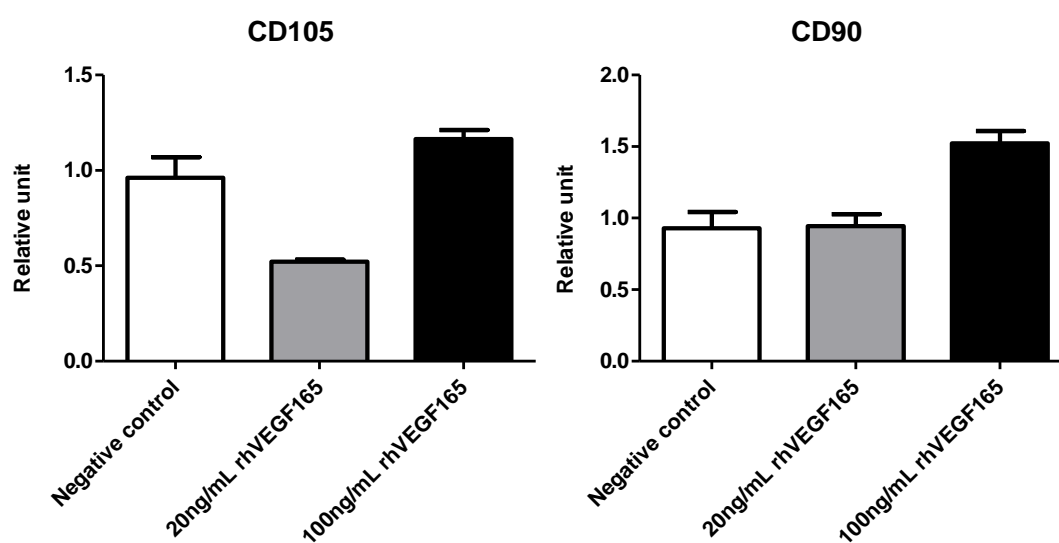


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da expressão gênica de marcadores de perfil mesenquimal CD90 e CD105 nas CTM-MO após tratamento com diferentes concentrações de rhVEGF165. Barras indicam desvio padrão.

As eCTM-MO expressaram o receptor de VEGF, FLT1, e os níveis de transcritos de VEGFA aumentaram após tratamento com 20ng/mL (Gráfico 26).

Gráfico 26 – Caracterização do perfil angiogênico de eCTM-MO por qRT-PCR.

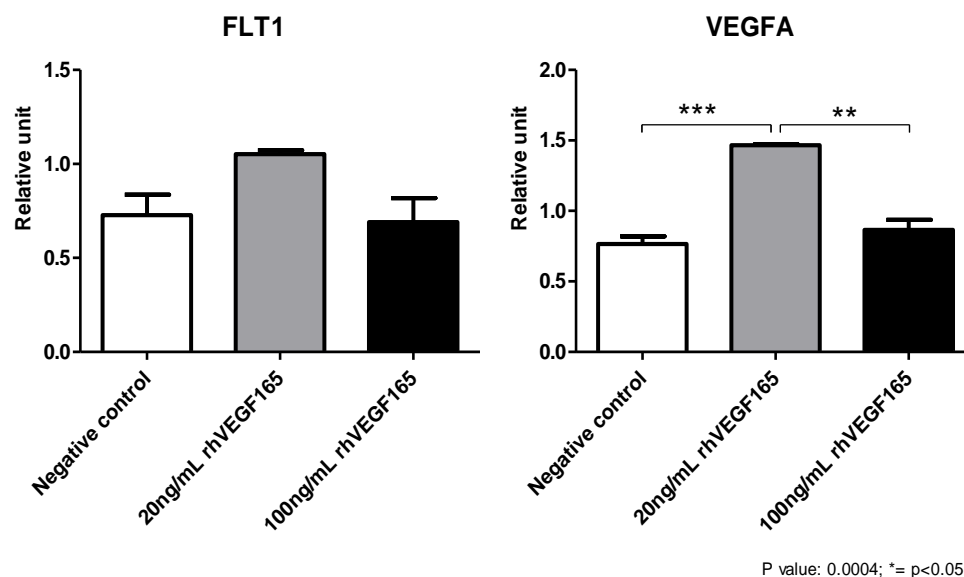


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da expressão gênica de marcadores de receptor de VEGF, FLT1 e a proteína (VEGFA) nas CTM-MO após tratamento com diferentes concentrações de rhVEGF165.

As eCTM-MO expressaram os transcritos de dois fatores chaves envolvidos em angiogênese, TGF β 1 e HIF1. No entanto, o tratamento com 20ng/mL rhVEGF165 diminuiu a expressão desses fatores (Gráfico 27).

Gráfico 27 – Caracterização do perfil angiogênico de eCTM-MO por qRT-PCR

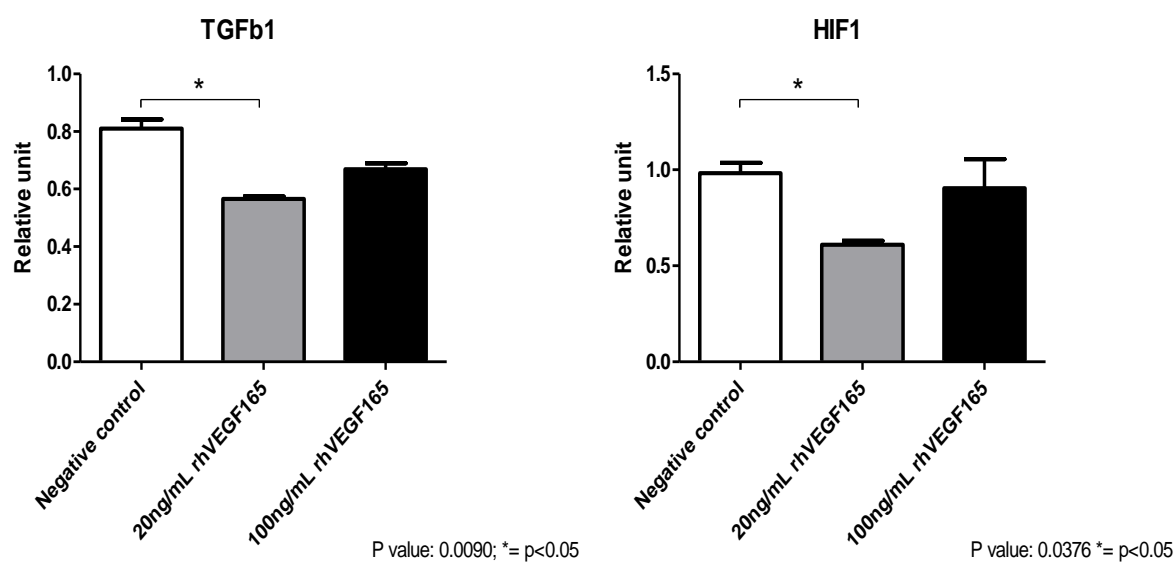


Gráfico: KOGA, 2020.

Legenda: Gráfico da expressão gênica de marcadores de receptor de TGF β 1 e HIF1 nas CTM-MO após tratamento com diferentes concentrações de rhVEGF165.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito de pela primeira vez a suplementação com fator de crescimento recombinante humano endotelial e vascular (rhVEGF165) em células-tronco mesenquimais de medula óssea eqüina. Os resultados demonstraram que o tratamento com 100ng/mL rhVEGF165 estimulou a proliferação celular a secreção de mais vesículas extracelulares pelas eCTM-MO.

Um estudo demonstrou que o tratamento células-tronco de folículo piloso com 10ng/mL de VEGF165 por uma semana, induziu a diferenciação em células endoteliais vasculares *in vitro* e promoveu neovascularização *in vivo*, descrevendo que a via de sinalização Notch estava envolvida no processo (QUAN et al., 2017).

A expressão de *VEGF* é regulada de maneira parácrina, mas a atividade autócrina em “loop” de *VEGF* foi descrita em células endoteliais microvasculares dermais humanas mediada pelo receptor *KDR*, havendo aumento da sua expressão ocorrendo ao nível da transcrição, após tratamento com *VEGF* recombinante, o que pode estar relacionado à amplificação do mecanismo de ação da proteína no processo de microvascularização (VEGA-DIAZ; HERRON; MICHEL, 2001). Entretanto, não existem dados que comprovem esse efeito na espécie eqüina, que como nossos achados mostram, apresentou o receptor *FLT1*, e uma quantificação da proteína específica para a espécie poderia explicar a origem desse aumento nos níveis de expressão após o tratamento.

A atuação do fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), é descrita por estimular a liberação e ativação de fibroblastos e a síntese de colágeno em decorrência no processo de reparo tecidual (WERNER; GROSE, 2003). Distúrbios fibroproliferativos cutâneos foram descritos em condições de hipóxia onde foi

observado um aumento de HIF1, e apresentaram um aumento nas concentrações de TGF β 1 em fibroblastos dermais equinos, desbalanceando a ação de proteínas da matriz extracelular, resultando em acúmulo de matriz caracterizando fibrose (DESCHENE et al., 2012).

A diminuição da expressão de *HIF1* e *TGF β 1* em células-tronco mesenquimais de medula óssea equina, provocada tratamento com 20ng/mL rhVEGF165 é um resultado promissor, podendo ser sugerido como tratamento, proposto para o tratamento de TGE em equinos, num cenário onde a fonte de células é viável e de fácil obtenção, que por ser da mesma espécie evitará possíveis reações imunológicas somadas ao perfil terapêutico já descritos pelas células-tronco mesenquimais. Outra alternativa é utilizar o secretoma destas células tratadas para avaliar seu efeito sobre fibroblastos dermais e a expressão de *TGF β 1* e *HIF1*, como observado em modelo de CTM de sangue periférico, que foi capaz de diminuir a atividade de *TGF β 1* em fibroblastos normais, mas não sua proliferação ou migração em fibroblastos TGE (HARMAN; BIHUN; VAN DE WALLE, 2017).

6. CONCLUSÕES

- 20ng/mL de rhVEGF165 aumentaram os níveis de transcritos de *VEGFA* nas eCTM-MO.
- A concentração de 100ng/mL de rhVEGF165 estimulou os transcritos de *PCNA* e manteve o perfil angiogênico como os das células controle, e estimulou maior secreção de vesículas extracelulares;
- Portanto, o rhVEGF165 poderia potencialmente ser usado para obter um melhor perfil terapêutico das eCTM-MO ou outros modelos celulares, como fibroblastos dermais equinos, visando acelerar o processo de cicatrização. No entanto, uma concentração ideal de rhVEGF165 necessita ser encontrada.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. P. F.; LASTORIA, S.; DE ALMEIDA ROLLO, H.; OMETTO STOLF, H. A sociodemographic, clinical study of patients with venous ulcer. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 12, p. 989–992, dez. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-4632.2004.02276.x>>.

ABDULLAHI, A.; AMINI-NIK, S.; JESCHKE, M. G. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 17, p. 3241–3255, 9 set. 2014. Disponível em: <<https://insights.ovid.com/crossref?an=00007890-200710270-00012>>.

ABREU, S. C.; WEISS, D. J.; ROCCO, P. R. M. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? **Stem cell research & therapy**, v. 7, n. 1, p. 53, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0317-0>>.

AFRADI, H.; SAGHAEI, Y.; KACHOEI, Z. A.; BABAEI, V.; TEIMOURIAN, S. Treatment of 100 chronic thalassemic leg wound by plasma-rich platelets. **International Journal of Dermatology**, p. 171–175, 2016.

AGARWAL, S. Discussion : A Novel Model for Cutaneous Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 143, n. 2, p. 478–479, 2019.

AGUIAR, C.; THERRIEN, J.; LEMIRE, P.; SEGURA, M.; SMITH, L. C.; THEORET, C. L. Differentiation of equine induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage. **Equine Veterinary Journal**, v. 48, n. 3, p. 338–345, 2016.

AKYUREKLI, C.; LE, Y.; RICHARDSON, R. B.; FERGUSON, D.; TAY, J.; ALLAN, D. S. A Systematic Review of Preclinical Studies on the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 11, n. 1, p. 150–160, 2015.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. **Genes and Development**, v. 22, n. 10, p. 1276–1312, 2008.

ASPENBERG, P.; VIRCHENKO, O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. **Acta Orthopaedica Scandinavica**, v. 75, n. 1, p. 93–99, 8 jan. 2004. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00016470410001708190>>.

BABAVALIAN, H.; TEBYANIAN, H.; LATIFI, A. M.; SHOKRGOZAR, M. A.; BONAKDAR, S.; SHAKERI, F. The effect of synthetic alginate sulfate hydrogels with recombinant PDGF-BB on Wound healing. **Bratislava Medical Journal**, v. 119, n. 06, p. 391–396, 2018.

BAE, Y. J.; CHO, C. H.; LEE, W. J.; HUH, J. S.; LIM, J. O. Optimization of recombinant human platelet-derived growth factor-BB encapsulated in Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres for applications in wound healing. **Tissue**

Engineering and Regenerative Medicine, v. 13, n. 1, p. 13–20, 2016.

BELCHIOR, G. G. **Geração de clones de células hek293 superprodutores de isoformas recombinantes de vegf-a (fator de crescimento endotelial e vascular a) humano visando à produção de biofármacos para terapia molecular e engenharia tecidual**. 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

BOLLINI, S.; GENTILLI, C.; TASSO, R.; CANCEDDA, R. The Regenerative Role of the Fetal and Adult Stem Cell Secretome. **Journal of Clinical Medicine**, v. 2, p. 302–327, 2013.

BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R.; VAN SCHIE, H. T. M. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, n. 4, p. 554–561, ago. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0838.2009.01070.x>>.

BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Laboratory Models for the Study of Normal and Pathologic Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 139, n. 3, p. 654–662, 2017.

BRASIL. **Manual do pé diabético: estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica**. [s.l.: s.n.]

BRETT, E.; CHUNG, N.; LEAVITT, W. T.; MOMENI, A. A Review of Cell-Based Strategies for Soft Tissue Reconstruction. **Tissue Engineering Part B**, v. 23, n. 4, p. 336–346, 2017.

BROECKX, S. Y.; BORENA, B. M.; VAN HECKE, L.; CHIERS, K.; MAES, S.; GUEST, D. J.; MEYER, E.; DUCHATEAU, L.; MARTENS, A.; SPAAS, J. H. Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. **Cytotherapy**, v. 17, n. 10, p. 1434–1446, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.06.004>>.

CAMPOS, R. de A. **Efeitos do plasma rico em plaquetas (prp) fresco e liofilizado na regeneração de pele em ratos**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

CAO, Y.; GANG, X.; SUN, C.; WANG, G. Mesenchymal Stem Cells Improve Healing of Diabetic Foot Ulcer. **J Diabetes Res**, v. 2017, n. ID9328347, p. 1–10, 2017.

CAPILLA-GONZÁLEZ, V.; LÓPEZ-BEAS, J.; ESCACENA, N.; AGUILERA, Y.; DE LA CUESTA, A.; RUIZ-SALMERÓN, R.; MARTÍN, F.; HMADCHA, A.; SORIA, B. PDGF Restores the Defective Phenotype of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Diabetic Patients. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 11, p. 2696–2709, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.011>>.

CHEN, S.; CHEN, X.; WU, X.; WEI, S.; HAN, W.; LIN, J.; KANG, M.; CHEN, L. Hepatocyte growth factor-modified mesenchymal stem cells improve ischemia/reperfusion-induced acute lung injury in rats. **Gene Therapy**, v. 24, n. 1, p. 3–11, 2017.

CHOI, E. W.; SEO, M. K.; WOO, E. Y.; KIM, S. H.; PARK, E. J.; KIM, S. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v. 27, n. 10, p. 1170–1172, 12 out. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ijlh.12426>>.

CHOI, J. S.; KIM, J. D.; YOON, H. S.; CHO, Y. W. Full-Thickness Skin Wound Healing Using Human Placenta-Derived Extracellular Matrix Containing Bioactive Molecules. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 3–4, p. 329–339, 2012.

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue Engineering for Cutaneous Wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018–1029, maio 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15333662>>.

CLAYTON, Z. E.; TAN, R. P.; MIRAVET, M. M.; LENNARTSSON, K.; COOKE, J. P.; BURSILL, C. A.; WISE, S. G.; PATEL, S. Induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells promote angiogenesis and accelerate wound closure in a murine excisional wound healing model. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 4, p. 1–11, 2018.

DAHLGREN, L. A. Regenerative Medicine Therapies for Equine Wound Management. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 605–620, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.07.009>>.

DE MAYO, T.; CONGET, P.; BECERRA-BAYONA, S.; SOSSA, C. L.; GALVIS, V.; ARANGO-RODRÍGUEZ, M. L. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0177533, 8 jun. 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0177533>>.

DE MOS, M.; VAN DER WINDT, A. E.; JAHR, H.; VAN SCHIE, H. T. M.; WEINANS, H.; VERHAAR, J. A. N.; VAN OSCH, G. J. V. M. Can Platelet-Rich Plasma Enhance Tendon Repair? **The American Journal of Sports Medicine**, v. 36, n. 6, p. 1171–1178, 30 jun. 2008. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0363546508314430>>.

DERKUS, B.; EMREGUL, K. C.; EMREGUL, E. A new approach in stem cell research — Exosomes: Their mechanism of action via cellular pathways. **Cell Biology International**, v. 41, p. 466–475, 2017.

DESCHENE, K.; CÉLESTE, C.; BOERBOOM, D.; THEORET, C. L. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. **Journal of Dermatological Science**, v. 65, n. 1, p. 12–18, 2012.

DI, G.; DU, X.; QI, X.; ZHAO, X.; DUAN, H.; LI, S.; XIE, L.; ZHOU, Q. Mesenchymal Stem Cells Promote Diabetic Corneal Epithelial Wound Healing Through TSG-6-Dependent Stem Cell Activation and Macrophage Switch. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 58, n. 10, p. 4344, 2017. Disponível em: <<http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.17-21506>>.

DINH, T. L.; VEVES, A. Treatment of diabetic ulcers. **Dermatologic Therapy**, v. 19, n. 6, p. 348–355, 2006.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 979–984, nov. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1189/jlb.4MR0316-102R>>.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324906708817>>.

EMING, S. A.; LEE, J.; SNOW, R. G.; TOMPKIN, R. G.; YARMUSH, M. L.; MORGAN, J. R. Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice - Implications for the use of genetically modified keratinocytes to modulate dermal re. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 105, n. 6, p. 756–763, 1995.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, v. 23, n. 2, p. 37–42, fev. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931906700679>>.

EPPLEY, B. L.; WOODSELL, J. E.; HIGGINS, J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 114, n. 6, p. 1502–8, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15509939>>.

FLEMING, B. C.; PH, D.; SPINDLER, K. P.; PALMER, M.; MAGARIAN, E.; MURRAY, M. M. Biomechanical Properties of Healing Acl Grafts in a. v. 37, n. 8, p. 1554–1563, 2010.

FORSYTHE, J. A.; JIANG, B. H.; IYER, N. V.; AGANI, F.; LEUNG, S. W.; KOOS, R. D.; SEMENZA, G. L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 9, p. 4604–4613, 1996.

FREES, K. E. Equine Practice on Wound Management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 34, n. 3, p. 473–484, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2018.07.004>>.

GACEB, A.; ÖZEN, I.; PADEL, T.; BARBARIGA, M.; PAUL, G. Pericytes secrete pro-regenerative molecules in response to platelet-derived growth factor-BB. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 38, n. 1, p. 45–57, 2018.

GARSKE, D. S.; SCHMIDT-BLEEK, K.; ELLINGHAUS, A.; DIENELT, A.; GU, L.; MOONEY, D. J.; DUDA, G. N.; CIPITRIA, A. Alginate Hydrogels for In Vivo Bone Regeneration: The Immune Competence of the Animal Model Matters. **Tissue**

Engineering Part A, v. 26, n. 15–16, p. 852–862, 1 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2019.0310>>.

GEIGER, A.; WALKER, A.; NISSEN, E. Human fibrocyte-derived exosomes accelerate wound healing in genetically diabetic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 467, n. 2, p. 303–309, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.166>>.

GOMES, J. P. A.; ASSONI, A. F.; PELATTI, M.; COATTI, G.; OKAMOTO, O. K.; ZATZ, M. Deepening a Simple Question: Can MSCs Be Used to Treat Cancer? **Anticancer Research**, v. 37, n. 9, p. 4747–4758, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870893>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28870893>>.

GOPE, R. The effect of epidermal growth factor & platelet-derived growth factors on wound healing process. **The Indian journal of medical research**, v. 116, p. 201–6, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12710550>>.

GOWDA, S.; WEINSTEIN, D. A.; BLALOCK, T. D.; GANDHI, K.; MAST, B. A.; CHIN, G.; SCHULTZ, G. S. Topical application of recombinant platelet-derived growth factor increases the rate of healing and the level of proteins that regulate this response. **International Wound Journal**, v. 12, n. 5, p. 564–571, 2015.

GRAHAM, M. L.; SCHUURMAN, H. Validity of animal models of type 1 diabetes , and strategies to enhance their utility in translational research. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 221–230, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.054>>.

GREGOR, S.; MAEGELE, M.; SAUERLAND, S.; KRAHN, J. F.; PEINEMANN, F.; LANGE, S. Negative pressure wound therapy: A Vacuum of Evidence? **Arch Surg**, v. 143, n. 2, p. 189–196, 1 set. 2008. Disponível em: <<http://dvd.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/14746514070070050601>>.

GUHA, P.; MORGAN, J. W.; MOSTOSLAVSKY, G.; RODRIGUES, N. P.; BOYD, A. S. Brief Report Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cell**, v. 12, n. 4, p. 407–412, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.006>>.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07039>>.

HAJIAGHAALIPOUR, F.; KANTHIMATHI, M. S.; ABDULLA, M. A.; SANUSI, J. The effect of camellia sinensis on wound healing potential in an animal model. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/386734/>>.

HANES, M. A. The Nude Rat. In: **The Laboratory Rat**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 733–759.

HARA, T.; KAKUDO, N.; MORIMOTO, N.; OGAWA, T.; LAI, F.; KUSUMOTO, K. Platelet-rich plasma stimulates human dermal fibroblast proliferation via a Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. **Journal of Artificial Organs**, v. 19, n. 4, p. 372–377, 2016.

HARMAN, R. M.; BIHUN, I. V.; VAN DE WALLE, G. R. Secreted factors from equine mesenchymal stromal cells diminish the effects of TGF- β 1 on equine dermal fibroblasts and alter the phenotype of dermal fibroblasts isolated from cutaneous fibroproliferative wounds. **Wound Repair and Regeneration**, v. 25, n. 2, p. 234–247, abr. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/wrr.12515>>.

HELDIN, C. H.; WESTERMARK, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1283–1316, 1999.

HENRY, T. D.; ANNEX, B. H.; MCKENDALL, G. R.; AZRIN, M. A.; LOPEZ, J. J.; GIORDANO, F. J.; SHAH, P. K.; WILLERSON, J. T.; BENZA, R. L.; BERMAN, D. S.; GIBSON, C. M.; BAJAMONDE, A.; RUNDLE, A. C.; FINE, J.; MCCLUSKEY, E. R. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. **Circulation**, v. 107, n. 10, p. 1359–1365, 2003.

HU, L.; WANG, J.; ZHOU, X.; XIONG, Z.; ZHAO, J.; YU, R.; HUANG, F.; ZHANG, H.; CHEN, L. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 32993, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27615560>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5018733>%5Cn<http://www.nature.com/articles/srep32993>>.

IDF. **Diabetes atlas 2020 - international diabetes federation**. 8th. ed. [s.l.: s.n.]

JOHNSTONE, R. M.; ADAM, M.; HAMMOND, J. R.; ORR, L.; TURBIDE, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9412–9420, 1987.

JUN-JIANG, C.; HUAN-JIU, X. Vascular endothelial growth factor 165-transfected adipose-derived mesenchymal stem cells promote vascularization-assisted fat transplantation. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1–9, 26 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2015.1011808>>.

KAIGLER, D.; AVILA, G.; WISNER-LYNCH, L.; NEVINS, M. L.; NEVINS, M.; RASPERINI, G.; LYNCH, S. E.; GIANNOBILE, W. V. Platelet-derived growth factor applications in periodontal and peri-implant bone regeneration. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 3, p. 375–385, 3 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2011.554814>>.

KANG, H. J.; KANG, E. S. **Ideal Concentration of Growth Factors in Rabbit's Flexor Tendon Culture** *Yonsei Medical Journal*, 1999. .

KANJI, S.; DAS, H. Review Article Advances of Stem Cell Therapeutics in Cutaneous Wound Healing and Regeneration. **Mediators of Inflammation**, v. 2017, p. 14, 2017.

KATSUDA, T.; OCHIYA, T. Molecular signatures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair. **Stem cell research & therapy**, v. 6, n. 212, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s13287-015-0214-y>>.

KIM, S. K.; LEE, J.; SONG, M.; KIM, M.; HWANG, S. J.; JANG, H.; PARK, Y. Combination of three angiogenic growth factors has synergistic effects on sprouting of endothelial cell/mesenchymal stem cell-based spheroids in a 3D matrix. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 8, p. 1535–1543, nov. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33498>>.

KIM, Y. J.; SEO, D. H.; LEE, S. H.; LEE, S. H.; AN, G. H.; AHN, H. J.; KWON, D.; SEO, K. W.; KANG, K. S. Conditioned media from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells stimulate rejuvenation function in human skin. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 16, n. April, p. 96–102, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2018.10.007>>.

KLINKHAMMER, B. M.; FLOEGE, J.; BOOR, P. PDGF in organ fibrosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 62, p. 44–62, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.11.008>>.

KUNIG, A. M.; BALASUBRAMANIAM, V.; MARKHAM, N. E.; MORGAN, D.; MONTGOMERY, G.; GROVER, T. R.; ABMAN, S. H. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 289, n. 4 33-4, p. 529–535, 2005.

LEE, S.; CHEN, T. T.; BARBER, C. L.; JORDAN, M. C.; MURDOCK, J.; DESAI, S.; FERRARA, N.; NAGY, A.; ROOS, K. P.; IRUELA-ARISPE, M. L. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. **Cell**, v. 130, n. 4, p. 691–703, 17 ago. 2007. Disponível em: <<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>>.

LEPAULT, E.; CELESTE, C.; DORE, M.; MARTINEAU, D.; THEORET, C. L. Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, n. 5, p. 520–529, set. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1067-1927.2005.00073.x>>.

LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

LIN, C.; CHEN, Y.; TANG, K.; YANG, K.; CHENG, N.; YU, J. Keratin Scaffolds with Human Adipose Stem Cells: Physical and Biological Effects toward Wound Healing. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. term.2855, 2019a. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2855>>.

LIN, C. H.; CHIU, P. Y.; HSUEH, Y. Y.; SHIEH, S. J.; WU, C. C.; WONG, T. W.;

CHUONG, C. M.; HUGHES, M. W. Regeneration of rete ridges in Lanyu pig (*Sus scrofa*): Insights for human skin wound healing. **Experimental Dermatology**, n. October 2018, p. 1–8, 2019b.

LIN, Q.; FANG, D.; FANG, J.; REN, X.; YANG, X.; WEN, F.; SU, S. B. Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 6, p. 3710–7, 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/186/6/3710.full>>.

LIN, W.; CHEN, M.; HU, C.; QIN, S.; CHU, C.; XIANG, L.; MAN, Y.; QU, Y. Endowing iPSC-Derived MSCs with Angiogenic and Keratinogenic Differentiation Potential: A Promising Cell Source for Skin Tissue Engineering. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 8, 2018.

LIU, J.; JOGLEKAR, M. V.; SUMER, H.; HARDIKAR, A. A.; TEEDE, H.; VERMA, P. J. Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cells From Type 1 Diabetes Patient Skin Fibroblasts Show Increased Abundance of Pancreas-Specific microRNAs. v. 7, p. 15–24, 2014.

LIU, S.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; LU, W.; HUANG, X.; XIE, H.; ZHOU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; DENG, Z.; JIN, Y. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. **Tissue engineering. Part A**, v. 17, n. 5–6, p. 725–739, 2011.

LOPATINA, T.; BRUNO, S.; TETTA, C.; KALININA, N.; PORTA, M.; CAMUSSI, G. Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. **Cell Communication and Signaling**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2014.

LV, L.; ZENG, Q.; WU, S.; XIE, H.; CHEN, J.; JIANG GUO, X.; HAO, C.; ZHANG, X.; YE, M.; ZHANG, L. Exosome-Based Translational Nanomedicine: The Therapeutic Potential for Drug Delivery. In: TANG, Y.; DAWN, B. (Ed.). **Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes**. USA: Elsevier, 2015. p. 161–176.

MA, X.; CUI, D.; ZHAO, D. Vascular endothelial growth factor / bone morphogenetic protein-2 bone marrow combined modification of the mesenchymal stem cells to repair the avascular necrosis of the femoral head. v. 8, n. 9, p. 15528–15534, 2015.

MARCK, R. E.; GARDIEN, K. L. M.; STEKELENBURG, C. M.; VEHMEIJER, M.; BAAS, D.; TUINEBREIJER, W. E.; BREEDERVELD, R. S.; MIDDELKOOP, E. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 24, n. 4, p. 712–720, 2016.

MAROTE, A.; TEIXEIRA, F. G.; MENDES-PINHEIRO, B.; SALGADO, A. J. MSCs-derived exosomes: Cell-secreted nanovesicles with regenerative potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. AUG, p. 1–8, 2016.

MARX, C.; SILVEIRA, M. D.; BEYER NARDI, N. Adipose-derived stem cells in

veterinary medicine: characterization and therapeutic applications. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 7, p. 150205112613009, 2015.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225–8, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11813662>>.

MATSUMOTO, K.; EMA, M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. **Journal of Biochemistry**, v. 156, n. 1, p. 1–10, 2014.

MAZZEO, A. The Angiogenic Potential of Adipose Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles is modulated by Basic Fibroblast Growth Factor. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v. 04, n. 10, 2014.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. **NIH Public Access**, v. 114, p. 185–199, 2009.

MONTOYA, T. I.; ACEVEDO, J. F.; SMITH, B.; KELLER, P. W.; SAILORS, J. L.; TANG, L.; WORD, R. A.; WAI, C. Y. Myogenic stem cell-laden hydrogel scaffold in wound healing of the disrupted external anal sphincter. **International Urogynecology Journal**, v. 26, n. 6, p. 893–904, 2015.

NAGY, K.; SUNG, H.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHAMOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts. **Stem Cell Rev and Rep**, v. 7, p. 693–702, 2011.

NAHMS. Equine Mortality in the United States 2015. **Animal and Plant Health Inspection Service**, n. February, 2017.

NELSON, R.; REUSCH, C. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. **The Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. 1–9, 2014.

NI, X.; OU, C.; GUO, J.; LIU, B.; ZHANG, J.; WU, Z.; LI, H.; CHEN, M. Lentiviral vector-mediated co-overexpression of VEGF and Bcl-2 improves mesenchymal stem cell survival and enhances paracrine effects in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 40, n. 2, p. 418–426, 2017.

OECD. **Health at a glance: latin america and the caribbean 2020**. [s.l.] Organisation for Economic Cooperation and Development OECD, 2020.

OSTVAR, O.; SHADVAR, S.; YAHAGHI, E.; AZMA, K.; FAYYAZ, A. F.; AHMADI, K.; NOWROUZIAN, I. Effect of platelet-rich plasma on the healing of cutaneous defects exposed to acute to chronic wounds: a clinico-histopathologic study in rabbits. **Diagnostic pathology**, v. 10, p. 85, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4487960&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PANKAJAKSHAN, D.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors

in Vascular Repair and Regeneration. **Journal of Biomedical Technology and Research**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2014.

PARK, J. S.; YANG, H. N.; WOO, D. G.; JEON, S. Y.; PARK, K. H. The promotion of chondrogenesis, osteogenesis, and adipogenesis of human mesenchymal stem cells by multiple growth factors incorporated into nanosphere-coated microspheres. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 28–38, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.088>>.

PARK, Y. G.; LEE, I. H.; PARK, E. S.; KIM, J. Y. Hydrogel and platelet-rich plasma combined treatment to accelerate wound healing in a nude mouse model. **Archives of Plastic Surgery**, v. 44, n. 3, p. 194–201, 2017.

PAVLOVIC, V.; CIRIC, M.; JOVANOVIC, V.; STOJANOVIC, P. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. **Open Medicine**, v. 11, n. 1, p. 242–247, 2016. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/med.2016.11.issue-1/med-2016-0048/med-2016-0048.xml>>.

PEARSON, J. A.; WONG, F. S.; WEN, L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. **Journal of Autoimmunity**, v. 66, n. 5, p. 76–88, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841115300378>>.

PHINNEY, D. G.; PITTENGER, M. F. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591–599, mar. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0439>>.

POURMOUSSA, A.; GARDNER, D. J.; JOHNSON, M. B.; WONG, A. K. An update and review of cell-based wound dressings and their integration into clinical practice. **Annals of translational medicine**, v. 4, n. 23, p. 457, 2016. Disponível em: <<http://atm.amegroups.com/article/view/12913/13266%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28090513>>.

PROVAB. **Eventos agudos em situações clínicas - queimaduras**. Santa Catarina: UFSC, 2014.

QUAN, R.; DU, W.; ZHENG, X.; XU, S.; LI, Q.; JI, X.; WU, X.; SHAO, R.; YANG, D. VEGF165 induces differentiation of hair follicle stem cells into endothelial cells and plays a role in in vivo angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1593–1604, 2017.

RANI, S.; RYAN, A. E.; GRIFFIN, M. D.; RITTER, T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 5, p. 812–823, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/mt.2015.44>>.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

RASMUSSEN, C. E.; NOWAK, J.; LARSEN, J. M.; BOTTOMLEY, A.; ROWLES, A.; OFFENBERG, H. Evaluation of Nonacog Beta Pegol Long-term Safety in the Immune-deficient Rowett Nude Rat (CrI:NIH- Foxn1rnu). **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 5, p. 726–737, 2016.

RASMUSSEN, C. E.; NOWAK, J.; LARSEN, J. M.; MOORE, E.; BELL, D.; LIU, K. C.; SORENSEN, N. S.; KAPPERS, W. A.; KROGH-MEIBOM, T.; OFFENBERG, H. Long-Term Safety of PEGylated Coagulation Factor VIII in the Immune-Deficient Rowett Nude Rat. **Journal of Toxicology**, v. 2017, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jt/2017/8496246/>>.

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v. 10, n. 2, p. 103–120, 12 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12079-016-0330-1>>.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. **Nature immunology**, v. 14, n. 3, p. 195–208, 2014.

SABOL, F.; DANCAKOVA, L.; GAL, P.; VASILENKO, T.; NOVOTNY, M.; SMETANA, K.; LENHARDT, L. Immunohistological changes in skin wounds during the early periods of healing in a rat model. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n. 2, p. 77–82, 2012.

SARVAR, D. P.; SHAMSASENJAN, K.; AKBARZADEHLALEH, P. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: New Opportunity in Cell-Free Therapy. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 3, p. 293–299, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15171/apb.2016.041>>.

SBD. **Diretrizes sociedade brasileira de diabetes**. [s.l.] Grupo Editorial Nacional, 2016. v. 5

SCHNABEL, L. V.; MOHAMMED, H. O.; MILLER, B. J.; MCDERMOTT, W. G.; JACOBSON, M. S.; SANTANGELO, K. S.; FORTIER, L. A. Platelet Rich Plasma (PRP) Enhances Anabolic Gene Expression Patterns in Flexor Digitorum Superficialis Tendons. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 2, p. 230–240, 2007.

SEATON, M.; HOCKING, A.; GIBRAN, N. S. Porcine models of cutaneous wound healing. **ILAR Journal**, v. 56, n. 1, p. 127–138, 2015.

SHAH, A.; SUMPIO, B. J.; TSAY, C.; SWALLOW, M.; DASH, B.; THORN, S. L.; SINUSAS, A. J.; KOO, A.; HSIA, H. C.; AU, A. Incisional Negative Pressure Wound Therapy Augments Perfusion and Improves Wound Healing in a Swine Model Pilot Study. **Annals of plastic surgery**, v. 82, n. 4S Suppl 3, p. S222–S227, 2019.

SHELKE, G. V.; YIN, Y.; JANG, S. C.; LÄSSER, C.; WENNMALM, S.; HOFFMANN, H. J.; LI, L.; GHO, Y. S.; NILSSON, J. A.; LÖTVALL, J. Endosomal signalling via exosome surface TGF β -1. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2019.

SINGER, A. J.; TUGGLE, C.; AHRENS, A.; SAUER, M.; MCCLAIN, S. A.; TREDGET, E.; ROSENBERG, L. Survival of human cadaver skin on severe

combined immune deficiency pigs : Proof of concept. p. 1–5, 2019.

SORG, H.; TILKORN, D. J.; HAGER, S.; HAUSER, J.; MIRASTSCHIJSKI, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **European Surgical Research**, v. 58, n. 1–2, p. 81–94, 2017.

SPANÒ, R.; MURAGLIA, A.; TODESCHI, M. R.; NARDINI, M.; STRADA, P.; CANCEDDA, R.; MASTROGIACOMO, M. Platelet Rich Plasma-based Bioactive Membrane as a New Advanced Wound Care Tool. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/term.2357>>.

STRONCEK, J.; REICHERT, W. Overview of Wound Healing in Different Tissue Types. In: REICHERT, W. (Ed.). **Indwelling Neural Implants: Strategies for Contending with the In Vivo Environment**. Boca Raton FL: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. v. 2, p. 663–676, 2006.

TANG, H.; XIANG, Y.; JIANG, X.; KE, Y.; XIAO, Z.; GUO, Y.; WANG, Q.; DU, M.; QIN, L.; ZOU, Y.; CAI, Y.; CHEN, Z.; XU, R. Dual expression of hTERT and VEGF prolongs life span and enhances angiogenic ability of aged BMSCs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 4, p. 502–508, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.053>>.

THANGARAJAH, T.; SANGHANI-KERAI, A.; HENSHAW, F.; LAMBERT, S. M.; PENDEGRASS, C. J.; BLUNN, G. W. Application of a Demineralized Cortical Bone Matrix and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in a Model of Chronic Rotator Cuff Degeneration. **The American Journal of Sports Medicine**, p. 036354651772751, 26 set. 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0363546517727512>>.

THEORET, C. L.; WILMINK, J. M. Aberrant wound healing in the horse: Naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 365–371, maio 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/wrr.12018>>.

TIMPER, K.; SEBOEK, D.; EBERHARDT, M.; LINSCHIED, P.; CHRIST-CRAIN, M.; KELLER, U.; MU, B.; ZULEWSKI, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 1135–1140, 2006.

TOH, W. S.; LAI, R. C.; HUI, J. H. P.; LIM, S. K. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, nov. 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2016.11.008>>.

TOHIDNEZHAD, M.; VAROGA, D.; WRUCK, C. J.; BRANDENBURG, L. O.;

SEEKAMP, a; SHAKIBAEI, M.; SÖNMEZ, T. T.; PUFE, T.; LIPPROSS, S. Platelet-released growth factors can accelerate tenocyte proliferation and activate the antioxidant response element. **Histochemistry and cell biology**, v. 135, n. 5, p. 453–60, maio 2011.

UD-DIN, S.; BAYAT, A. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 25, n. 2, p. 164–176, 2017.

VEGA-DIAZ, B.; HERRON, G. S.; MICHEL, S. An autocrine loop mediates expression of vascular endothelial growth factor in human dermal microvascular endothelial cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 116, n. 4, p. 525–530, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.01294.x>>.

VIDMAR, J.; CHINGWARU, C.; CHINGWARU, W. Mammalian cell models to advance our understanding of wound healing: a review. **Journal of Surgical Research**, v. 210, p. 269–280, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2016.10.016>>.

VIEIRA, C. B. de; ARAÚJO, T. M. E. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 52, n. e3415, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1980-220X2017051303415>>.

WAYCASTER, C. R.; GILLIGAN, A. M.; MOTLEY, T. A. Cost-effectiveness of Becaplermin gel on wound healing of diabetic foot ulcer healing. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 106, n. 4, p. 273–282, 2016.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835–870, 1 abr. 2003. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00031.2002>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A who plan for burn prevention and care**. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-Publication Data, 2008.

YAO, S.; LI, X.; LIU, J.; SUN, Y.; WANG, Z.; JIANG, Y. Maximized nanodrug-loaded mesenchymal stem cells by a dual drug-loaded mode for the systemic treatment of metastatic lung cancer. **Drug Delivery**, v. 24, n. 1, p. 1372–1383, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10717544.2017.1375580>>.

YIN, T.; HE, S.; SU, C.; CHEN, X.; ZHANG, D.; WAN, Y.; YE, T.; SHEN, G.; WANG, Y.; SHI, H.; YANG, L.; WEI, Y. Genetically modified human placenta-derived mesenchymal stem cells with FGF-2 and PDGF-BB enhance neovascularization in a model of hindlimb ischemia. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 5093–5099, 2015.

ZHANG, B.; WANG, M.; GONG, A.; ZHANG, X.; WU, X.; ZHU, Y.; SHI, H.; WU, L.; ZHU, W.; QIAN, H.; XU, W. HucMSc-exosome mediated-Wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. **Stem Cells**, v. 33, n. 7, p. 2158–2168, 2015.

ZHANG, B.; YEO, R. W. Y.; TAN, K. H.; LIM, S. K. Focus on extracellular vesicles: Therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, 2016.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J. I.; FUTRELL, W. J.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–28, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456>>.