

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS  
POR QUEIMADURA TÉRMICA EM RATOS**

Maisa Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloisio S. Vulcani

GOIÂNIA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL  
DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação       Tese

2. Nome completo do autor

Maisa Ribeiro

3. Título do trabalho

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO  
TECIDO ADIPOSEO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS POR QUEIMADURA TÉRMICA  
EM RATOS

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Valcinir Aloísio Scalla Vulcani**, **Professor do Magistério Superior**, em 25/08/2020, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maisa Ribeiro**, **Usuário Externo**, em 25/08/2020, às 21:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orcao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orcao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1507714** e o código CRC **A069C200**.

MAISA RIBEIRO

**EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS  
POR QUEIMADURA TÉRMICA EM RATOS**

Tese apresentada para obtenção do título de  
Doutora em Ciência Animal junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Goiás.

**Área de Concentração:**

Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica

**Orientador:**

Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani –  
EVZ/UFG

**Cômite de orientação:**

Profa. Dr<sup>a</sup>. Julia de M. Moraes

Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Junior

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro, Maisa

EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO NA REPARAÇÃO DE FERIDAS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM RATOS [manuscrito] / Maisa Ribeiro. - 2020.

xv, 148 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani; co orientador Dr. Julia de Miranda Moraes; co-orientador Dr. Ruy de Souza Lino Junior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Células-tronco. 2. Tecido Adiposo. 3. Laserterapia. 4. Bioestimulação. 5. Queimadura. I. Scalla Vulcani, Valcinir Aloisio , orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº 300 da sessão de Defesa de Tese de **Maisa Ribeiro** que confere o título de Doutor(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica**.

Aos **trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte** a partir da(s) **09h00min**, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE E LASER DE BAIXA POTÊNCIA NA REGENERAÇÃO DE FERIDAS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM RATOS”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani (PPGCA)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora, todos de forma remota: **Prof. Dr. Klaus Casaro Saturnino (UFJ)**, membro titular externo; **Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araújo (UFJ)** membro titular externo; **Prof. Dr. Rodrigo Paschoal Prado (UFCAT)**, membro titular externo; **Prof. Dr. Ricardo de Mattos Santa Rita (UFJ)**, membro titular externo a UFG. Durante a arguição os membros da banca **fizeram** sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **trinta e um dias do mês de julho de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

**“EFEITO DA FOTOBIMODULAÇÃO E DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE NA REPARAÇÃO DE FERIDAS POR QUEIMADURA TÉRMICA EM RATOS”**.



Documento assinado eletronicamente por **Valcinir Aloisio Scalla Vulcani, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Klaus Casaro Saturnino, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo De Mattos Santa Rita, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 13:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Paschoal Prado, Chefe**, em 31/07/2020, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Marques Araujo, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2020, às 14:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1462896** e o código CRC **6B18D0DF**.

Dedico esse trabalho a meus pais, José Reinaldo  
Ribeiro e Geneci Terezinha Vernier, e meus irmãos,  
João Victor V. dos Santos e Arildo M. dos Santos Jr.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	16
1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Caracterização do tecido cutâneo .....	18
1.2 Queimaduras .....	23
1.3 Cicatrização do tecido cutâneo.....	28
1.4 Células-tronco .....	33
1.5 Cicatrização cutânea e células-tronco derivadas do tecido adiposo.....	38
1.6 Laser de Baixa Potência .....	39
1.7 Laser de Baixa Potência na cicatrização cutânea .....	41
1.8 Fotobiomodulação das células-tronco derivadas do tecido adiposo .....	45
1.9 Modelo experimental de queimaduras .....	46
Referências .....	49
CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1 - EVALUATION OF THE EFFECTS OF PHOTOBIMODULATION OF LOW-LEVEL LASER ON TOTAL THICKNESS BURN INDUCED IN ANIMAL MODEL.....	58
Précis .....	59
Abstract.....	60
1 Introduction .....	61
2 Material and methods .....	62
2.1 Animal handling and induction of lesions .....	62
2.2 Low-level laser application .....	63
2.3 Macroscopic analysis of lesions .....	63
2.4 Biopsies and microscopic analysis .....	63
2.5 Statistical analysis .....	64
3 Results .....	64
4 Discussion.....	67
5 Conclusion.....	70
Bibliografic references .....	71
Tables and figures.....	75
CAPÍTULO 3 - ARTIGO 2 – ISOLAMENTO MAGNÉTICO E DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.....	86

Resumo .....	86
Abstract.....	87
Introdução.....	88
Objetivos.....	89
Metodologia.....	89
Resultados.....	93
Discussão.....	99
Conclusão .....	103
Referências .....	104
CAPÍTULO 4 – ARTIGO 3 - TRATAMENTO DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL COM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO ASSOCIADO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELO PRÉ-CLÍNICO .....	107
Resumo .....	107
Abstract.....	109
Introdução.....	110
Objetivos.....	111
Metodologia.....	111
Resultados.....	116
Discussão.....	133
Conclusão .....	138
Referências .....	139
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	142
ANEXO A .....	143
ANEXO B .....	144

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 – Imunomarcadores expressos na superfície de células-tronco mesenquimais e derivadas do tecido adiposo.....	37
--	----

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Average in cm <sup>2</sup> of the morphometric measurements of the wounds, in the control and LLL groups, at 3, 7, 15, and 21 days after the burn lesions in rats.....	75
---	----

TABELA 2 – Average values of the scores (0 to 4) of histopathological evaluations by HE staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.....	76
--	----

TABELA 3 – Average values of the scores (0 to 4) of histopathological evaluations by Gomori's trichrome staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.....	77
--	----

TABELA 4 - Average values of collagen quantification, in pixels, by histopathological evaluations by Picrosirius red staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.....	77
---	----

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Primers da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR).....	93
--	----

### CAPÍTULO 4

TABELA 1 - Valores da moda, mediana e erro padrão da média dos escores (0 a 4) das avaliações histopatológicas pela coloração de HE dos grupos controle e tratados nos dias 5, 14 e 21 dias após a lesão por queimadura em ratos.....	120
---	-----

TABELA 2 - Valores de mediana, erro padrão e moda dos escores (0 a 4) das avaliações histopatológicas pela coloração de Tricrômio de Gomori dos grupos controle e LBP nos dias 3, 7, 15 e 21 após a lesão por queimadura em ratos.....	129
--	-----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 - Camadas da pele.....	19
FIGURA 2 - Principais constituintes da epiderme.....	20
FIGURA 3 - Camadas da derme.....	21
FIGURA 4 - Classificação das lesões por queimadura.....	25
FIGURA 5 - Fisiologia das lesões térmicas.....	26
FIGURA 6 - Fases do processo de cicatrização de feridas.....	28
FIGURA 7 - Fase inflamatória da cicatrização.....	30
FIGURA 8 - Fase proliferativa da cicatrização.....	32
FIGURA 9 - Fase de remodelamento da cicatrização.....	40
FIGURA 10 - Intervalo do Espectro Eletromagnético onde o Laser de baixa potência atua terapeuticamente.....	40

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 - Photos of the third degree burn lesions on the biopsy day of each group.....	78
FIGURA 2 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by HE staining.....	79
FIGURA 3 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by HE staining (continuation).....	80
FIGURA 4 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosíríus red and Gomori staining.....	81
FIGURA 5 - Histological scores assessed by Gomori's trichrome staining in third-degree burn lesions in rats.....	82
FIGURA 6 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosíríus red and Gomori staining (continuation).....	83
FIGURA 7 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosíríus red and Gomori staining (continuation 1).....	84
FIGURA 8 - Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosíríus red and Gomori staining (continuation 2).....	85
FIGURA 9 - Quantification of collagen in pixels assessed by Picrosirius red staining in third- degree burn lesions in rats.....	85

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1 - Isolamento e separação das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC).....	91
FIGURA 2 - Proliferação celular de cultivos ADSC CD49d+ e CD49d-.....	94
FIGURA 3 - Potencial de diferenciação celular com 14 dias de indução.....	95
FIGURA 4 - Potencial de diferenciação celular com 21 dias de indução.....	97
FIGURA 5 - Expressão dos genes <i>ITGA4</i> (CD49d) e <i>VCAM-1</i> (CD106) em cultivos ADSC CD49d+ e CD49d-.....	99

### CAPÍTULO 4

FIGURA 1 - Porcentagem de diminuição do tamanho da área das lesões por queimadura de em ratos nas diferentes fases do processo de cicatrização (5, 15 e 21 dias).....	116
FIGURA 2 - Fotos das lesões por queimadura de espessura total no dia da biópsia de cada grupo.....	117
FIGURA 3 - Retração da ferida e reepitelização.....	119
FIGURA 4 - Média dos escores histológicos de necrose e crosta avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos.....	122
FIGURA 5 - Média dos escores histológicos de edema e hemorragia avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos.....	123
FIGURA 6 - Média dos escores histológicos de infiltrados polimorfonucleares (PNM) e mononucleares (MN) avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos.....	124
FIGURA 7 - Média dos escores histológicos de angiogênese, fibroblastos e tecido de granulação avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos.....	125
FIGURA 8 - Fotomicrografia das lesões por queimadura de espessura total em ratos, pela coloração de HE.....	126
FIGURA 9 - Fotomicrografia das lesões por queimadura de espessura total em ratos, pela coloração de HE (continuação).....	127
FIGURA 10 - Fotomicrografia histopatológica das lesões por queimadura de espessura total em ratos, Coloração: Tricrômio de Gomori.....	131
FIGURA 11 - Fotomicrografia histopatológica das lesões por queimadura de espessura total em ratos. Coloração: Tricrômio de Gomori (continuação). .....	133

**LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS**

<b>ADSC</b>	- Do inglês <i>Adipose Derived Stem Cells</i> traduzido como Células-tronco derivadas do tecido adiposo
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CD34</b>	Do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i> traduzido como Proteína CD34
<b>CT</b>	Células-tronco
<b>CTA</b>	Células-tronco Adultas
<b>CTA-MO</b>	Células-tronco Adultas de Medula Óssea
<b>CTE</b>	Células-tronco Embrionárias
<b>CTH</b>	Células-tronco Hematopoiéticas
<b>CTM</b>	Células-tronco Mesenquimais
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EGF</b>	Do inglês <i>Epidermal Growth Fator</i> traduzido como Fator de Crescimento Epidérmico
<b>FEV</b>	Fração Estromal Vascular
<b>FGF</b>	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> traduzido como Fator de Crescimento derivado dos Fibroblastos
<b>IL - 1</b>	Interleucina 1

<b>KGF</b>	Do inglês <i>Fibroblast Growth Factor</i> traduzido como Fator de Crescimento derivado dos fibroblastos
<b>LASER</b>	Do inglês <i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> traduzido como Amplificação da Luz por Emissão Estimulada de Radiação
<b>LBP</b>	Laser de baixa potência
<b>LLL</b>	Low-level laser
<b>MSC</b>	Do inglês <i>Mesenchymal Stem Cell</i> traduzido como Célula-tronco mesenquimal
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>NO</b>	Oxido Nitroso
<b>PDGF</b>	Do inglês <i>Platelet Derivate Growth Factor</i> traduzido como Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutase
<b>TAB</b>	Tecido Adiposo Branco
<b>TAM</b>	Tecido Adiposo Marrom
<b>TAS</b>	Tecido Adiposo Subcutâneo

<b>TAV</b>	Tecido Adiposo Visceral
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Do inglês <i>Trasforming growth fator beta</i> traduzido como Fator de Crescimento de Transformação Beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Do inglês <i>Tumoral necrosi fator beta</i> traduzido como Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>VEGF</b>	Do inglês <i>Vasculary endothelial growth fator beta</i> traduzido como Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## RESUMO

**Introdução:** Lesões provocadas por queimadura de espessura total são consideradas como uma forma severa de trauma, com elevado índice de morbimortalidade mundialmente, capaz de promover destruição do tecido cutâneo e comprometer morfuncionalmente o organismo. O uso de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) e laser de baixa potência (LBP) são alternativas terapêuticas promissoras exploradas pela medicina regenerativa. O objetivo deste estudo foi estabelecer um modelo de isolamento eficaz para células ADSC mais homogêneas; avaliar os efeitos das ADSC e LBP no processo de cicatrização cutânea e investigar a associação das técnicas (LBP e ADSC) no tratamento para queimadura de espessura total em modelo experimental de rato. **Material e métodos:** As obtenções das ADSC foram realizadas por meio do isolamento imonumagnético por proteína CD49d e cultivo convencional. Um total de 150 ratos Wistar foram divididos em grupo controle e grupos tratados com ADSC CD49d positiva, ADSC CD49d negativa, células-tronco de isolamento convencional (CULT), LBP, ADSC+LBP e ADSC-LBP. Foram induzidas queimaduras por escaldadura no dorso de cada animal, com posterior debridamento cirúrgico. Utilizou-se LBP com comprimento de onda de 660 nm, 30 mW de potência em cinco pontos da ferida, sob fluência total de 450 Joules/cm<sup>2</sup> e aplicação total de 5 Joules. Foram realizadas análises macroscópicas e histopatológicas de acordo com biópsias coletadas nos dias 5, 14 e 21 pós-lesão, processadas e coradas pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Gomori (TG). As análises estatísticas foram feitas por Teste de Tukey e análise de Variância (ANOVA), Teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) e Teste de T-Pareado. Para todas as análises empregou-se o nível de significância de 5% (p<0,05). **Resultados:** Os resultados apontaram diferença estatística na morfometria entre os grupos com melhor grau de reepitelização e diminuição da área de lesão apresentado pelos tratamentos ADSC+ e CULT aos 21 dias de biópsia. A análise histopatológica evidenciou que os tratamentos ADSC+, LBP e ADSC+LBP influenciaram significativamente o processo de cicatrização apresentando melhora quanto ao aumento de infiltrados inflamatórios mononuclear, maior angiogênese, diminuição do edema, aumento no tecido de granulação, no número de fibroblastos no início do reparo tecidual, além de promover reepitelização de forma mais organizada com maior deposição de colágeno e formação de anexos epiteliais aos 21 dias após a lesão. **Conclusão:** A fotobiomodulação por laser de baixa potência das células ADSC potencializou o processo de reparo em feridas por queimadura de espessura total demonstrando uma interação significativa para o remodelamento da matriz extracelular e tecido cutâneo. Estudos adicionais são necessários para mensurar os efeitos do LBP e a atividade das ADSCs no reparo do tecido cutâneo.

**Palavras-chave:** Células-tronco. Tecido adiposo. CD49d. ADSC. MSC.

## ABSTRACT

**Introduction:** Injuries caused by full-thickness burns are considered a severe form of trauma with a high worldwide morbidity and mortality rate capable of promoting destruction of skin tissue and morphologically compromising the organism. The use of stem cells derived from adipose tissue (ADSC) and low-level laser (LLL) are promising therapeutic alternatives explored by regenerative medicine. The aim of this study was to establish an effective isolation model for more homogeneous ADSC cells; to evaluate the effects of ADSC and LBP on the skin healing process and to investigate the association of techniques (LBP and ADSC) in the treatment for full-thickness burn in an experimental rat model. **Material and methods:** The obtaining of the ADSC was carried out by means of immunomagnetic isolation by CD49d protein and conventional culture. A total of 150 Wistar rats were divided into a control group and groups treated with ADSC CD49d positive, ADSC CD49d negative, conventionally isolated stem cells (CULT), LLL, ADSC+LLL, ADSC-LLL. Scald burns were induced on the back of each animal, with subsequent surgical debridement. LLL with a wavelength of 660 nm, 30 mW of power at five points of the wound was used, under total fluence of 450 Joules / cm<sup>2</sup> and total application of 5 Joules. Macroscopic and histopathological analyzes were performed according to biopsies collected on days 5, 14 and 21 post-injury, processed and stained using the techniques of Hematoxylin and Eosin (HE) and Gomori's Trichrome (GT). Statistical analyzes were performed using Tukey's test and analysis of variance (ANOVA), Kruskal-Wallis test (non-parametric) and T-Paired test. For all analyzes, a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was used. **Results:** The results showed a statistical difference in morphometry between the groups with the best degree of reepithelization and reduction in the lesion area presented by the ADSC+ and CULT treatments at 21 days of biopsy. Histopathological analysis showed that ADSC+, LLL and ADSC+LLL treatments significantly influenced the healing process, showing improvement in the increase of mononuclear inflammatory infiltrates, greater angiogenesis, decreased edema, increased granulation tissue, in the number of fibroblasts at the beginning of tissue repair, in addition to promoting re-epithelialization in a more organized manner with greater deposition of collagen and formation of epithelial attachments at 21 days after the injury. **Conclusion:** low-power laser photobiomodulation of ADSC cells enhanced the repair process in full-thickness burn wounds, demonstrating a significant interaction for the remodeling of the extracellular matrix and skin tissue. Additional studies are needed to measure the effects of LBP and the activity of ADSCs on skin tissue repair.

**Keywords:** Stem cells. Adipose tissue. CD49d. ADSC. MSC.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. Introdução

As lesões provocadas por queimaduras térmicas são consideradas formas severas de dano ao tecido biológico capazes de destruir diversas estruturas e camadas do epitélio, provocando prejuízo local e sistêmico para o organismo. Podem ser causadas por chamas, vapores, líquidos ou objetos quentes dependentes da temperatura e do tempo de contato com a pele<sup>1</sup>. De acordo com o Ministério da Saúde<sup>2</sup> aproximadamente 1 milhão de pessoas no Brasil sofrem acidentes por queimadura ao ano. No mundo, estima-se que 11 milhões de pessoas sejam acometidas anualmente<sup>3,4</sup>.

As lesões por queimadura podem ser classificadas segundo o grau de destruição celular de forma que a capacidade da pele em regenerar-se depende da profundidade da lesão<sup>5</sup>. Na derme estão presentes elementos como macrófagos, fibroblastos, fatores de crescimento e de reserva epitelial formada pelos folículos pilosos, que são responsáveis pela regeneração tecidual. Assim, lesões mais superficiais limitadas a epiderme e derme papilar apresentam tendência à rápida recuperação com sequelas mínimas, enquanto as lesões de derme reticular possuem recuperação mais demorada, com potencial de cicatrizes hipertróficas e sequelas mais sérias<sup>6</sup>.

O tratamento convencional para ferida por queimadura profunda tem como objetivo prevenir processos infecciosos e remover tecidos necróticos, sendo realizado por meio do desbridamento cirúrgico seguido de curativo oclusivo que contém agentes umidificantes e microbicidas (p.e. sulfatiazida de prata a 2%) que favorecem o processo de reparo<sup>6</sup>. Embora este tipo de tratamento tenha se mostrado eficiente, aumentando a taxa de sobrevivência, há também um aumento do número de indivíduos que passam a apresentar graves disfunções motoras e problemas de ordem psico-emocional e social em consequência às contraturas cicatriciais e deformidades estéticas resultantes<sup>7</sup>.

O desenvolvimento de novas perspectivas terapêuticas nas últimas décadas tem demonstrado que a terapia celular e laserterapia são abordagens bastante promissoras para diminuir as sequelas geradas pelas cicatrizes extensas, favorecendo a reconstrução morfológica e restauração funcional de órgãos e sistemas<sup>8,9</sup>. Entretanto o uso de populações celulares capazes de otimizar os processos de reparo e regeneração tecidual em diferentes condições clínicas depende de vários fatores, como cultivo adequado, purificação celular e expansão *in vitro*<sup>10</sup>.

A terapia com Células-Tronco (CT) tem se mostrado um importante alternativo terapêutico, cujo resultados podem variar desde uma melhora na qualidade de vida do paciente até a cura em alguns casos<sup>11</sup>. As células-tronco se diferem das demais por preservar seu potencial de autorenovação, autoproliferação e capacidade de diferenciação. Podem ser encontradas durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos, onde são classificadas como Células-Tronco Embrionárias (CTE) e Células-Tronco Adultas (CTA) do tipo hematopoiética (CTH) ou mesenquimal (CTM)<sup>12</sup>.

Na medicina regenerativa, a fonte de CTM mais utilizada é o tecido adiposo, devido à sua fácil acessibilidade, abundância, propriedades de autorrenovação, plasticidade e capacidade de proliferar e diferenciar-se. Embora o tecido adiposo tenha sido inicialmente considerado apenas um local de armazenamento de substratos para produção de energia e regulação térmica, atualmente, diversas atribuições de natureza endócrina e imunoregulatória também são vistas como aspectos fundamentais de sua atividade fisiológica<sup>13</sup>.

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) demonstram potencial terapêutico para várias doenças crônicas, alterações neurológicas, osteoartrites, lesões tendinosas e diabetes<sup>14,15</sup>. Lim e Yoo (2010)<sup>16</sup>, por exemplo, mostraram que a aplicação de ADSC em modelos de ferida cutânea experimental em ratos é capaz de acelerar o fechamento da ferida, promover reepitelização parcial e aumento da deposição de tecido de granulação. Além disso, a capacidade regenerativa das células ADSC parece estar associada à síntese de fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator básico de crescimento fibroblástico (FGF), que estimulam a proliferação e diferenciação celular<sup>16</sup>. Assim, o potencial de reparo tecidual das ADSC apresentou equivalente a capacidade regenerativa dos fibroblastos dermais no tratamento de feridas cutâneas em ratos<sup>11</sup>.

Outro método terapêutico promissor é a laserterapia de baixa potência (LBP). Pesquisas demonstram que o laser atua na aceleração do processo de reparo tecidual, com efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e de regeneração<sup>17,18</sup>. Esse método trata de dispositivos que geram radiação eletromagnética em diferentes comprimentos de onda, de acordo com seu agente emissor, por um processo de emissão estimulada. Na dermatologia, os lasers se classificam de acordo com seu tipo, comprimento de onda e suas funcionalidades, podendo ser definido como Laser de Baixa Potência ou Laser de Alta Potência<sup>18</sup>.

O LBP é classificado, pela *International Electrotechnical Commission*, com base no conceito de Limites de Emissão Acessível, e possui como características a fotoativação biológica sem gerar efeitos térmicos com potência óptica útil de até 500mW<sup>19</sup>. A bioestimulação promovida pela irradiação deste equipamento tem demonstrado promover aumento da angiogênese, proliferação e diferenciação celular no local da lesão, contribuindo assim para o reparo tecidual mais rápido<sup>19</sup>.

Em estudo de lesões cutâneas em ratos atômicos, utilizando ADSC mutualmente ou não com o LBP, foi observado que as associações entre ambas as terapias foram capazes de potencializar o processo de cicatrização, aumentar a neovascularização, melhorar a regeneração dos anexos dérmicos, reduzir o número de apoptose no leito da ferida e aumentar a produção de fatores de crescimento<sup>19</sup>. Dessa forma, a utilização do LBP, como agente bioestimulador para células-tronco parece proporcionar melhores resultados no reparo de tecidos lesionados, pois possui alta capacidade de indução da proliferação e diferenciação celular<sup>11</sup>.

Assim, o desenvolvimento da medicina regenerativa com a utilização de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) associadas à estimulação por LBP têm proporcionado o surgimento de uma terapia promissora, capaz de melhorar a qualidade de cicatrização das lesões com a diminuição do custo, devido à redução do tempo de tratamento e menor risco de contaminação secundária bem como aumentar significativamente o percentual de pacientes que sobrevivem a tais lesões<sup>9,15,20</sup>. Estudos apontam que há divergências nos resultados devido a impasses metodológicos, como potência e comprimento de onda ideais do laser, regime de aplicação e tipos de análises realizadas<sup>11, 13, 14-20</sup>. Dessa forma, investigações que permitam elucidar os riscos e padronização dos parâmetros utilizados na terapia por ADSC isoladas ou associadas ao LBP são necessárias para a determinação do possível papel destas terapias no tratamento de feridas por queimaduras.

### **1.1 Caracterização do tecido cutâneo**

A pele é o órgão que promove a interação entre o organismo e o meio ambiente de forma que envolve processos físico-químicos bastante elaborados se submetida a ações de agentes agressores. É considerada o maior órgão do corpo humano por ocupar uma área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>, o que representa cerca de 15% do peso corporal seco de um indivíduo adulto<sup>26</sup>. Esse sistema além de atuar como um manto

protetor, também desempenha outras funções consideradas vitais, como: conservação homeostática, termorregulação, sensibilidade, secreção de resíduos metabólicos e síntese da vitamina D<sup>28</sup>.

Embora, atualmente, a pele seja considerada um sistema multifuncional de grande importância, por muito tempo foi definida apenas como um órgão de revestimento com função de barreira. Essa classificação só foi possível graças a estudos que revelaram uma estrutura complexa com diversas camadas, sendo cada uma com características peculiares. Histologicamente a pele é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em duas camadas distintas: a epiderme e a derme (Figura 1)<sup>28</sup>.

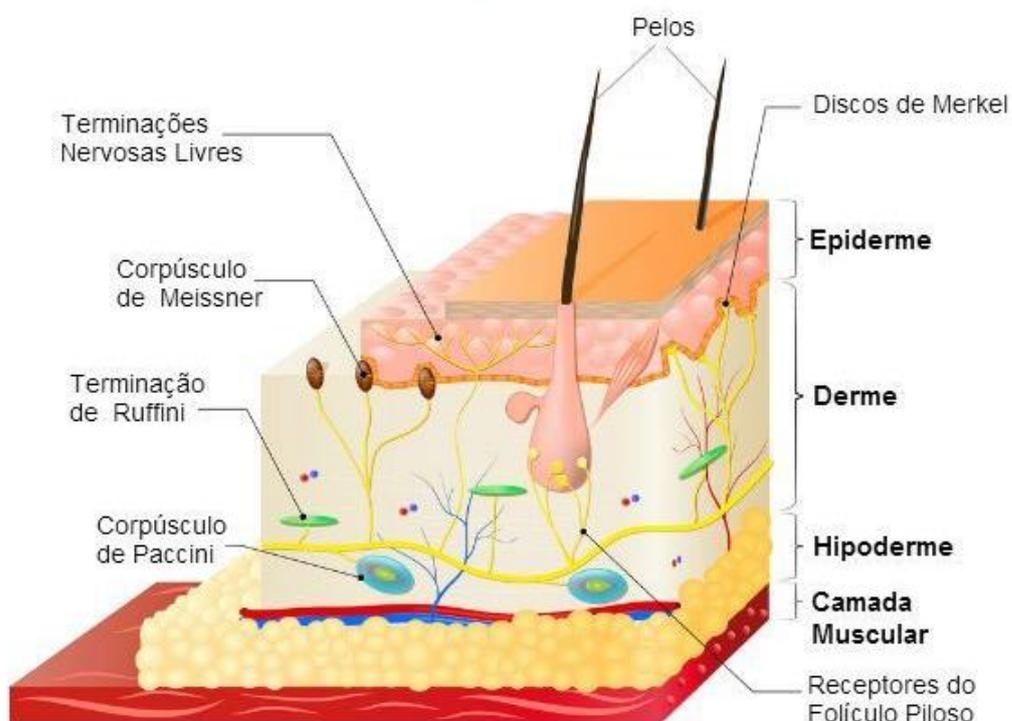


FIGURA 1 – Camadas da pele. Diferentes camadas e anexos que compõe o tecido epitelial.

Fonte: Adaptado de Tortora e Nielsen<sup>30</sup>

A epiderme é um tecido epitelial estratificado queratinizado, com variações estruturais e funcionais significativas na dependência do seu sítio anatômico e espessura. De forma geral, é uma camada avascular que apresenta terminações nervosas livres e células migratórias. Anatomicamente pode ser subdividida em quatro a cinco subcamadas, de acordo com a localização em: extrato córneo, extrato lúcido, extrato espinhoso, camada granulosa e camada basal (Figura 2)<sup>29</sup>.

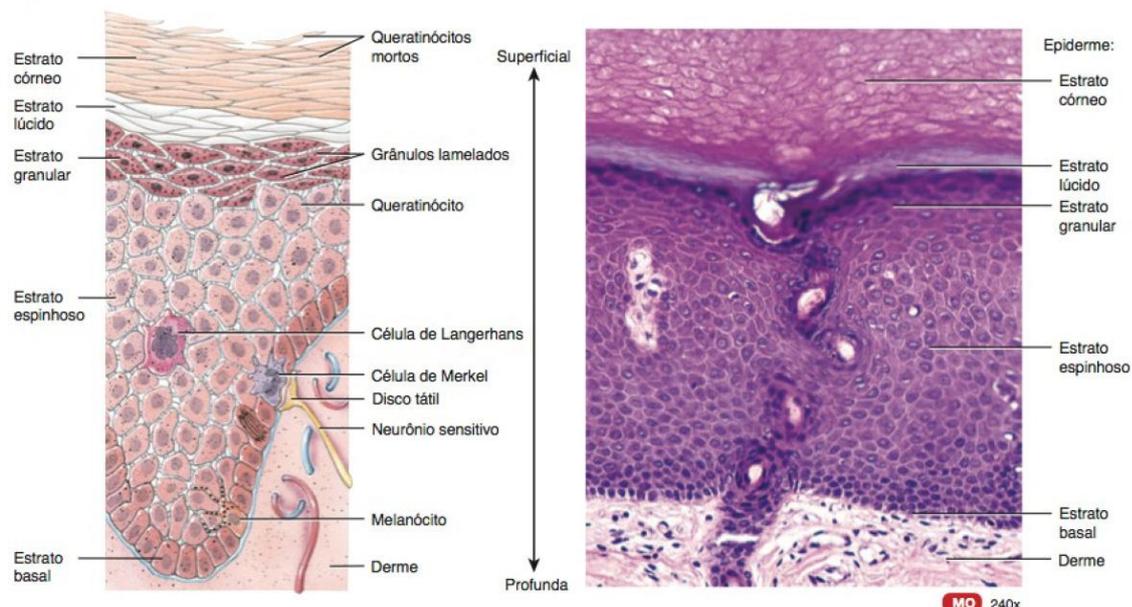


FIGURA 2 – Principais constituintes da epiderme. Subcamadas da epiderme em imagem esquemática e fotomicrografia.  
Fonte: Adaptado de Tortora e Nielsen<sup>30</sup>.

Ao longo da epiderme encontram-se o sistema ceratinocítico, constituído por células denominadas queratinócitos, cuja principal função é produzir queratina, uma proteína fibrosa maleável responsável por garantir a impermeabilidade cutânea e proteção, bem como a formação de alguns anexos (pelos e unhas); o sistema melânico, formado por ninhos de melanócitos, produtores de melanina, um pigmento castanho que absorve os raios UV; o sistema imunológico, composto por células imunitárias, principalmente células de Langerhans, também chamadas de células gigantes e com prolongamentos membranares; e o sistema sensorial composto por células de Merkel, integrada ao sistema nervoso, e células dendríticas indeterminadas, cuja função está relacionada com a interação do organismo ao meio externo<sup>31-33</sup>.

A derme localiza-se abaixo da epiderme e é formada por uma extensa variedade de células, redes de fibras proteicas ricas em colágeno, elastina e proteoglicanos<sup>28</sup>. É caracterizada por apresentar resistência, maleabilidade, com propriedades visco elásticas, formada principalmente por proteínas envolvidas em substância basal amorfa<sup>34</sup>. Nesta camada também estão presentes vasos linfáticos e sanguíneos, que fornecem a nutrição de todo o epitélio, glândulas sebáceas e sudoríparas, nervos, receptores adicionais e músculos eretores dos pêlos<sup>30</sup>. Dentre os sensores presentes na derme podemos incluir vários tipos: Corpúsculo de Vater-Pacini, sensores de adaptação rápida que detectam vibrações nas faixas de 30 – 800 Hz;

Corpúsculo de Meissner com função de detecção de pressões de frequência diferente; Corpúsculo de Krause, sensíveis ao frio (pele glabra); Órgão de Ruffini, sensíveis ao calor; Célula de Merckel, sensíveis a tacto e pressão; Folículo piloso, com terminações nervosas associadas; e terminação nervosa livre, com dendritos livres sensíveis à dor e temperatura<sup>29</sup>.

Além disso, a derme é quase 25 vezes mais grossa do que a epiderme e pode ser subdividida em duas camadas: camada papilar em contato com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, e a camada reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colagenosas. Como todo tecido conjuntivo frouxo, a derme contém muitos tipos de células, incluindo fibroblasto, fibrócitos, macrófagos teciduais, melanófagos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, particularmente neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos<sup>35</sup>(Figura 3).

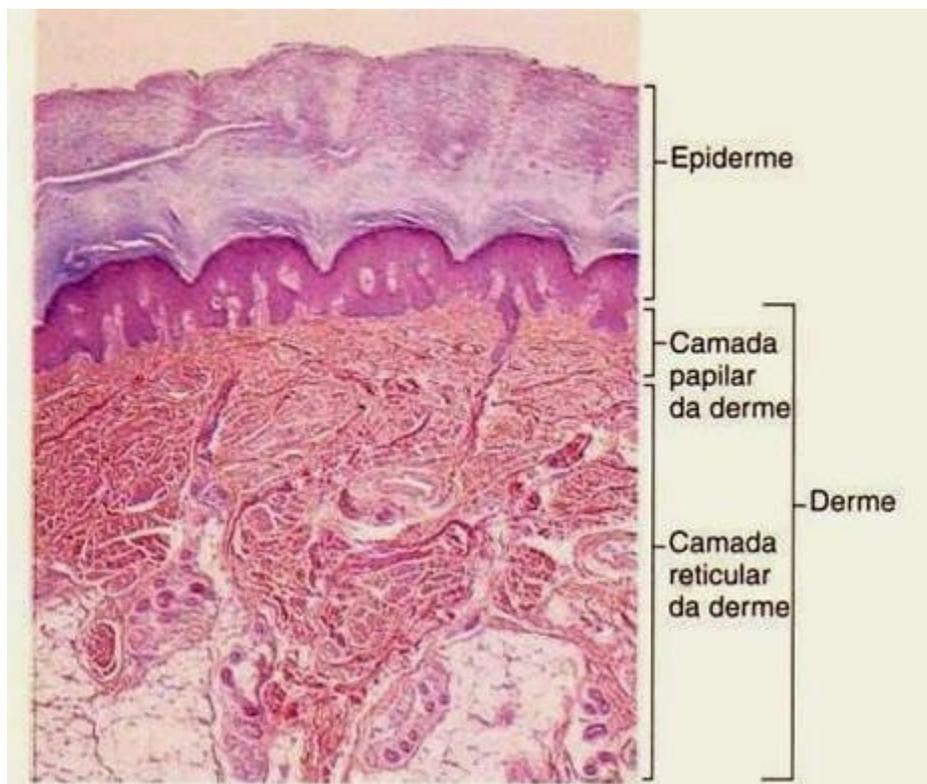


FIGURA 3 – Camadas da derme. Subdivisões da derme em camada papilar e reticular.

Fonte: Adaptado de Junqueira e Carneiro<sup>29</sup>.

Durante a vida, a pele sofre várias mudanças, desde o ambiente hídrico da gestação até o contato com ar ao nascimento. Mudanças adicionais também podem ocorrer, como enfermidades, traumas, exposição ao meio ambiente, além do processo de envelhecimento<sup>36</sup>. Quando essa barreira é rompida, uma cascata de eventos celulares e

moleculares são ativadas para reparar os danos e restaurar sua integridade. Entretanto, se as mudanças de adaptação celular frente a um estímulo nocivo não ocorrer, ou este estímulo for excedido, instalam-se danos que, dependendo do estágio, podem não ser revertidos<sup>27</sup>.

Estímulos exógenos por danos de origem térmica, como a queimadura em particular, geram morte celular por necrose na região mais afetada, que se manifesta pela tumefação ou ruptura das células, desnaturação e coagulação das proteínas citoplasmáticas com falência das organelas celulares<sup>37,38</sup>. A queimadura é estímulo que também pode provocar reações complexas da microvasculatura do tecido conjuntivo (derme), gerada pela liberação de mediadores inflamatórios, principalmente de histamina e de bradicinina. Estes levam ao aumento da permeabilidade vascular, com perda de fluidos e proteínas do espaço intravascular para o interstício, fenômeno conhecido como inflamação. A resposta inflamatória é um mecanismo de proteção do organismo e ocorre em favor da regeneração tecidual. No entanto, quando a qualidade do reparo é diminuída, há uma maior deposição de biomoléculas cicatriciais que, dependendo do tamanho da área afetada, pode produzir cicatrizes espessas, retráteis e/ou desfigurantes, comprometendo morfofisiologicamente o tecido cutâneo e prejudicando a qualidade de vida do paciente<sup>38,39</sup>.

Além da aparência, as cicatrizes comprometem as funções cutâneas, pois o tecido reparado não possui nenhum dos anexos epidérmicos atuando basicamente como uma barreira de proteção física. Em casos de pequenas lesões, o tecido cicatricial não é capaz de promover morbidade, entretanto, em casos mais severos, as cicatrizes podem provocar deformações e retrações graves. Isso acontece porque a pele cicatrizada possui menos elastina e colágeno, o que torna o tecido muito mais rígido, podendo até dificultar a movimentação, caso esteja presente em áreas de articulações<sup>40</sup>.

## **1.2 Queimaduras**

Por definição, as lesões por queimadura podem ser caracterizadas pela destruição parcial ou total da pele, provocada por trauma térmico, elétrico, químico ou radioativo. De acordo com a profundidade, extensão da superfície corporal queimada, localização do corpo, idade do indivíduo, doenças preexistentes e lesões associadas, define-se a gravidade e o prognóstico da lesão<sup>41,42</sup>.

No Brasil, estima-se em torno de 1.000.000 de incidentes por queimaduras ao ano, sendo que apenas 10% dos pacientes buscam atendimento hospitalar e, destes, cerca de 2,5% irão a óbito direta ou indiretamente em função de suas lesões<sup>2</sup>.

Embora as queimaduras pequenas sejam a maioria e geralmente não causem risco de vida, as queimaduras maiores ainda representam ameaça quando não tratada adequadamente pois podem causar maior morbidade devido a dor, cicatrizes hipertróficas, quelóides e contraturas<sup>43</sup>. Além disso, o comprometimento funcional e estético causado por cicatrizes podem resultar em níveis de incapacidade equivalentes aos de doenças crônicas, afetando a capacidade de relacionamento, o trabalho e a autoestima, seguindo para o sofrimento psicossocial com altos índices de depressão, ansiedade e pensamentos suicida<sup>44</sup>.

Fisiopatologicamente, as queimaduras podem ser definidas como uma lesão ocasionada por intenso estresse de oxigênio, produzido por uma associação de isquemia inicial com reperfusão subsequente, acompanhada de uma reação inflamatória<sup>45</sup>. No local da lesão por queimadura é possível observar macroscopicamente a formação de três regiões: (1) a área de coagulação, que esteve em íntimo contato com o agente agressor e onde ocorre necrose imediata do tecido com desnaturação das proteínas e liberação de fatores moleculares; (2) a área de estase vascular, localizada de forma periférica à anterior e a responsável por reter o fluxo sanguíneo mantendo a viabilidade tissular; (3) a região de hiperemia, mais extensa, onde ocorre o aumento da perfusão local, e com fácil recuperação tecidual mesmo com hipoperfusão prolongada ou infecção<sup>46</sup>. Ao nível microscópico, é possível observar destruição severa das células com extravasamento capilar que acentua o estado de choque hipovolêmico. Neste contexto ocorre a ativação da resposta imune, com consequente aumento na produção de óxido nítrico sintase, o que aumenta a vasodilatação e a hemorragia<sup>46</sup>.

Alterações sistêmicas dependem da superfície corporal afetada. Quando a queimadura acomete mais de 10% da área corporal, normalmente a homeostase é alterada severamente devido à liberação de hormônios reguladores da insulina e citocinas pró-inflamatórias. Alterações dos níveis hormonais favorecem a hiperglicemia e a hiperinsulinemia e induzem estados hipercatabólicos, imunodeficiências humoral e celular, distúrbios do equilíbrio hidro-eletrolítico, alteração na temperatura corporal, alteração da absorção hemodinâmica e de nutrientes, que aumentam o risco de desenvolvimento de infecções secundárias<sup>47</sup>. Nestes casos a internação hospitalar em centros especializados e suporte em unidade de terapia intensiva (UTI) se faz

necessária, principalmente devido as mudanças sistêmicas e alteração da homeostase corpórea que podem levar o paciente a um quadro de choque hipovolêmico e resultar em morte<sup>48</sup>.

Segundo o Ministério da Saúde (2012)<sup>2</sup>, as lesões por queimadura podem ser classificadas de acordo com sua extensão e profundidade. A profundidade da queimadura varia segundo o grau de destruição celular e, conforme a Sociedade Brasileira de Queimaduras<sup>49</sup>, pode ser identificada como: (1) espessura superficial ou de primeiro grau, quando atinge apenas a epiderme e a camada papilar da derme; (2) espessura parcial ou segundo grau, quando alcança a camada reticular da derme; e (3) espessura total ou terceiro grau, em que ocorre lesão profunda, atingindo o tecido subcutâneo, até mesmo tecido muscular e ósseo.

As queimaduras de espessura superficial afetam somente a epiderme, promovendo edema, dor e eritema e geralmente não há formação de bolhas. Estas lesões são curadas em torno de 4 a 6 dias e não deixam cicatrizes (Figura 4A). As queimaduras de espessura parcial podem ser superficiais, quando afetam epiderme e a porção superficial da derme, ou mais profundas, quando atingem epiderme e uma parte inicial da derme reticular (Figura 4B). As mais superficiais apresentam bolhas cuja base é rósea, úmida e dolorosa, enquanto as mais profundas, além de apresentarem bolhas, estas possuem base esbranquiçada ou enegrecida e são menos doloridas que as queimaduras mais superficiais, devido a destruição de algumas fibras nervosas da região. A restauração destas lesões ocorre dentro de 14 a 21 dias e pode haver certo grau de formação de cicatriz<sup>49</sup>.

As queimaduras de espessura total atingem toda a epiderme e derme, podendo atingir os tecidos adjacentes, abaixo da pele. É uma lesão esbranquiçada ou enegrecida e após a lesão total, passa a ser indolor, pela destruição das fibras nervosas locais. Nesses casos pode ser necessária a realização de enxerto de pele, pois, a reepitelização espontânea não ocorre facilmente (Figura 4C)<sup>41</sup>. Lesões profundas e extensas como as lesões causadas por algumas queimaduras de espessura parcial profundas e de espessura total, favorecem a formação de cicatrizes patológicas e inestéticas que se desenvolvem em bandas fibróticas sem elasticidade, com cor ou texturas normais representando um grande desafio terapêutico<sup>2,36,47</sup> (Figura 4C).

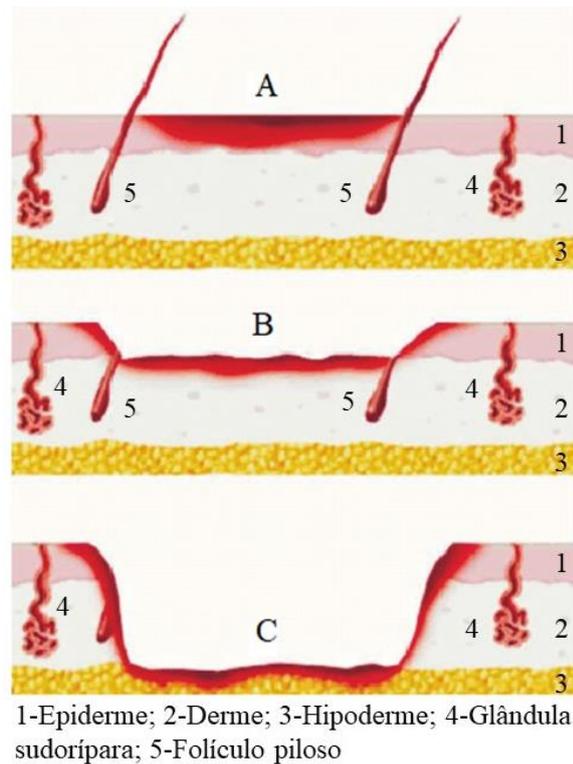


FIGURA 4 – Classificação das lesões por queimadura. (A) espessura superficial, (B) espessura parcialmente profunda e (C) espessura total. Adaptado de Paggiaro AO e Bertolli E<sup>50</sup>.

Além dos efeitos locais, quando a queimadura é extensa, com mais de 25% da superfície corporal atingida, a lesão térmica pode exercer efeitos deletérios sobre os diferentes sistemas do organismo (Figura 5). A resposta fisiológica que ocorre nestes pacientes queimados é complexa e pode ser dividida em duas fases. A primeira fase se inicia nas primeiras 48 horas após o trauma térmico, enquanto a segunda fase ocorre após esse período<sup>48</sup>.

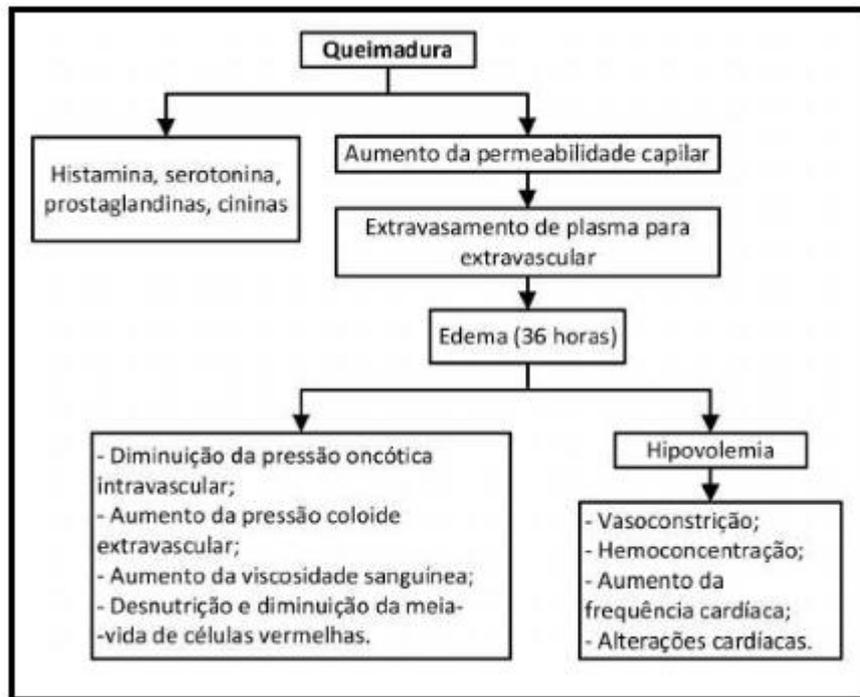


FIGURA 5 – Fisiopatologia das lesões térmicas. Eventos fisiológicos envolvidos na queimadura.  
Fonte: Paggiaro AO e Bertolli E<sup>50</sup>.

Durante as primeiras 48 horas após o trauma, é possível observar alterações hemodinâmicas devido a liberação de substâncias vasoativas a partir da área traumatizada. Dessa forma, ocorre a modificação na permeabilidade capilar, promovendo a perda de líquidos e proteínas para o meio extravascular, com conseqüente hipotensão. Além disso, observa-se a formação de edema, que costuma atingir o seu pico entre 36 e 48 horas. Primariamente o débito cardíaco diminui proporcionalmente ao tamanho da queimadura e em associação ao aumento da resistência vascular periférica<sup>50</sup>.

Com o fim das primeiras 48 horas se inicia a segunda fase da resposta fisiológica que corresponde à resposta hipermetabólica, caracterizada pelo aumento do débito cardíaco, aumento da contratilidade miocárdica, baixa resistência vascular periférica, aumento da produção de proteínas de fase aguda pelo fígado (fibrinogênio, haptoglobina, entre outras), e diminuição da síntese de proteínas constitutivas, como albumina e transferrina. Esse processo é um mecanismo de defesa do organismo que busca potencializar a resposta imunológica, da cicatrização das feridas e da coagulação<sup>48</sup>.

Concomitantemente ocorrem alterações hematológicas em que há perda de plasma, bem como destruição de eritrócitos em proporção direta com a extensão da queimadura. As células eritrocitárias sofrem lise pelo calor e trombose microvascular nas áreas de tecido lesionado, representando uma perda contínua entre 8 e 12% da massa eritrocitária por dia. Além disso, ocorre déficit na síntese de novas hemácias devido ao desvio do metabolismo proteico em favorecimento da reepitelização (Figura 5)<sup>50</sup>.

Sistemicamente, ocorrem, ainda, modificações do padrão endócrino-catabólico, caracterizado por níveis elevados de glucagon, cortisol e catecolaminas e por níveis diminuídos de insulina e tri-iodotironina (T3). Os níveis são reestabelecidos após a hidratação, favorecendo o anabolismo<sup>50</sup>. No início da lesão, o trato gastrointestinal também sofre modificações e responde com um quadro de íleo paralítico, principalmente em casos com mais de 25% da Superfície Corpórea Queimada (SCQ) que retorna à normalidade após o 3º até o 5º dia. Essas alterações precisam ser observadas, pois o quadro pode ser agravado pelo desenvolvimento de lesões da mucosa gástrica e duodenal, secundárias a isquemia focal, com risco de desenvolvimento de úlceras de Curling, adicionando a chance de hemorragia digestiva<sup>49</sup>.

Por fim, o sistema imunológico se torna bastante comprometido devido a secreção de fatores presentes no exsudato liberado pelas células necróticas. Além da perda da barreira mecânica natural da pele, a presença de tecido necrótico favorece a colonização por microrganismos resultando em complicações e risco aumentado de morte<sup>43</sup>.

Desse modo, as lesões térmicas podem comprometer significativamente a sobrevivência e qualidade de vida do paciente acometido visto que as alterações fisiológicas da pele provocadas pela queimadura podem gerar uma insuficiência cutânea aguda com comprometimento das funções como barreira, termorregulatória, imune, hormonal e de interação com o meio. Em geral, a insuficiência cutânea aguda pode aparecer quando a área afetada representa mais de 20% da superfície corporal e devido à sua gravidade e extensão, podem levar ao aparecimento de múltiplas complicações sistêmicas com risco de morte<sup>51</sup>. Portanto, métodos terapêuticos capazes de acelerar o processo de cicatrização bem como favorecer a regeneração das funções cutâneas são extremamente necessários.

### 1.3 Cicatrização do tecido cutâneo

O processo de cicatrização pode ser classificado em primeira e segunda intenção de acordo com a proximidade das bordas da lesão. Na cicatrização por primeira intenção as bordas da ferida estão próximas, os danos tissulares são menores de forma que a reepitelização é facilitada com baixa taxa de fibrose. Na cicatrização por segunda intenção há perda extensa de tecido, alto índice de angiogênese com intensa proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno, favorecendo a formação de uma cicatriz mais densa que posteriormente sofrerá contração<sup>52,53</sup>.

Esses eventos podem ser divididos em três fases: (1) a inflamação, na qual haverá o aumento do fluxo sanguíneo e a migração de leucócitos para a área lesionada; (2) a proliferação de fibroblasto e deposição da matriz extracelular e por fim (3) a remodelação tecidual<sup>24</sup> (Figura 6). Nessas etapas ocorrerão eventos como coagulação, inflamação, proliferação celular, contração da ferida e remodelação que possuem características específicas fundamentais para o avanço do processo de cicatrização<sup>28,55,56,57</sup>.

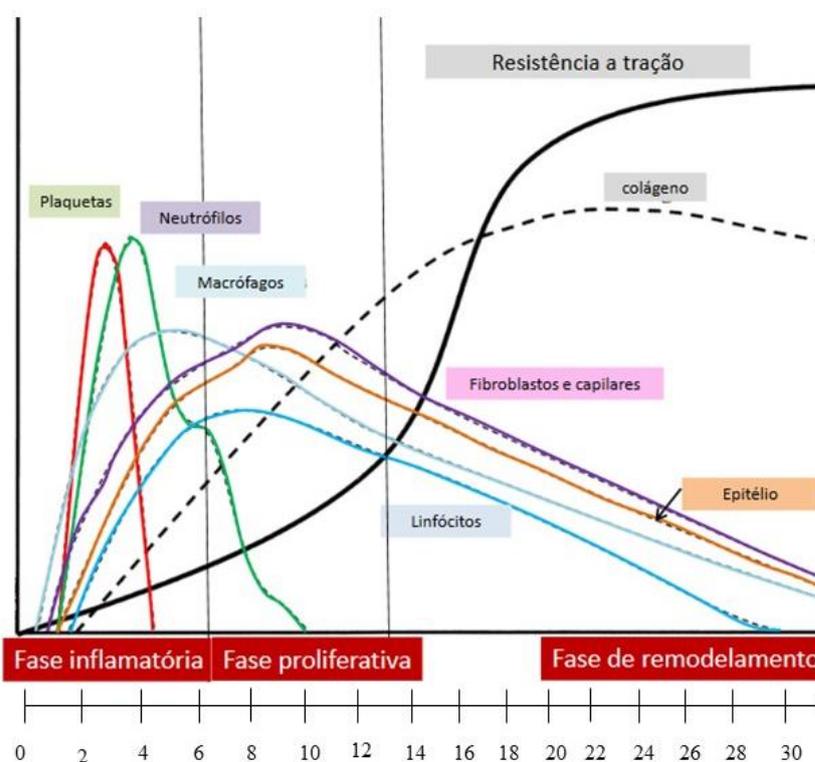


FIGURA 6 - Fases do processo de cicatrização de feridas.

Fonte: Adaptado de Campos ACL et al.<sup>58</sup>.

Inicialmente, logo após a queimadura cutânea, ocorre a coagulação com desnaturação das proteínas celulares, formação de trombo e vasodilatação, o que promove aumento da pressão osmótica intercelular, liberação de aminas vasoativas como: a serotonina, a histamina e as prostaglandinas, concomitante com a adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio<sup>29</sup>. De modo geral, nas lesões causadas pelo calor, há necrose coagulativa da epiderme e tecidos adjacentes, com profundidade determinada pelo tempo e temperatura do material o qual foi exposto, seguido pela lise celular resultante da progressão isquêmica na derme e importante hiperemia com prolongada fase inflamatória<sup>4</sup>.

A inflamação é uma resposta tecidual localizada com função de proteger o tecido lesionado (Figura 7). Nesta fase, os vasos sanguíneos se contraem e o sangue extravasado coagula, devido a ação de trombócitos, plaquetas e fatores de crescimento que se combinam em uma rede de fibrina para formar uma barreira contra a invasão de microrganismos. Além disso, ocorre a organização da matriz extracelular que por sua vez restaura a função da pele como barreira protetora e possibilita a migração de células e a formação de fibroblastos na área lesionada<sup>30</sup>. As plaquetas também participam da secreção de vários mediadores ao sofrerem a degranulação plaquetária induzida pela trombina e liberam vários fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), o de crescimento epidérmico (EGF), o de crescimento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, que são importantes constituintes da matriz extracelular provisória<sup>55</sup>.

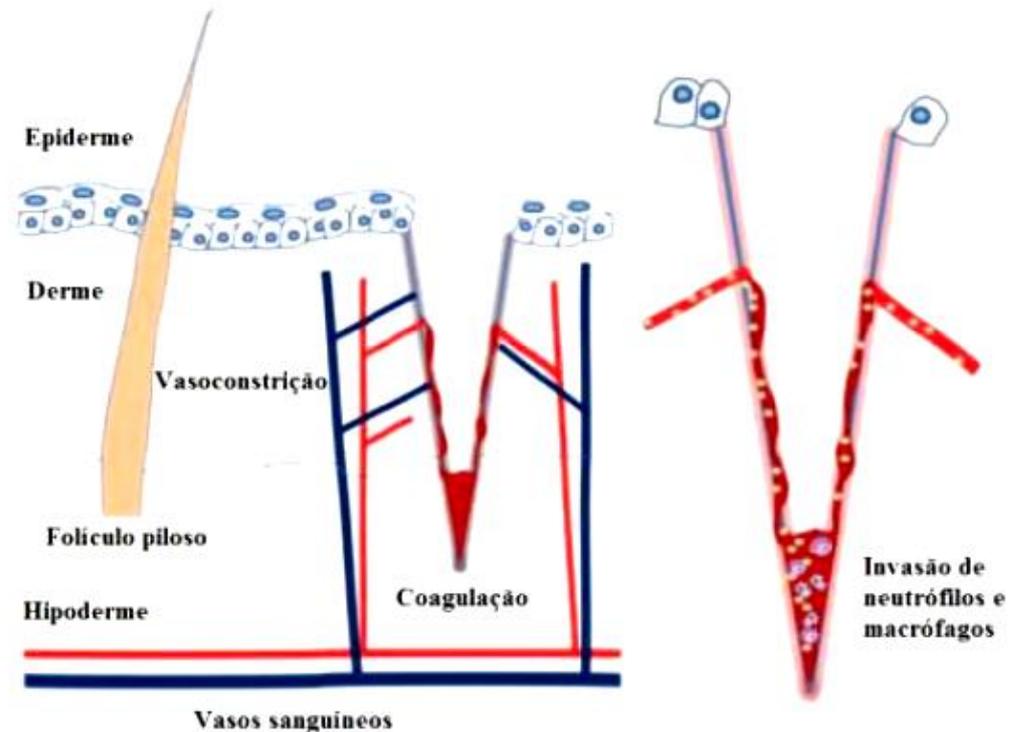


FIGURA 7 - Fase inflamatória da cicatrização. Eventos que ocorrem na fase inicial do processo de cicatrização.

Fonte: Reink S<sup>30</sup>.

Durante o período inflamatório também ocorre o recrutamento de leucócitos, que coincide com os primeiros sinais da inflamação, ambos estabelecidos nas primeiras 24 horas após a lesão, caracterizando-se por eritema e edema local. Células imunes como os mastócitos, células T gama/delta e células de Langerhans, são ativados e secretam quimiocinas e citocinas contribuindo para a liberação de enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio<sup>54</sup>. Neutrófilos e monócitos também migram para o leito da ferida, onde além da função de fagocitose de bactérias, fragmentos celulares e corpos estranhos, produzem fatores de crescimento que preparam a área de lesão para a fase proliferativa, quando fibroblastos e células endoteliais também serão recrutados<sup>53</sup> (Figura 7).

Os macrófagos são as principais células promotoras do processo de reparo tecidual, pois degradam e removem componentes do tecido conjuntivo danificado, além de secretarem fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. A liberação de fatores de crescimento por plasma, fibroblastos e macrófagos/neutrófilos ativa os queratinócitos localizados nas

margens e no interior do leito da ferida. Durante a contração da ferida e reorganização da matriz, ocorre a liberação de KGF7, um dos principais reguladores da proliferação de queratinócitos, assim como o TGF- $\beta$ , principal responsável pelo estímulo inicial da migração das células epiteliais<sup>57</sup>. Dessa forma a resolução da fase inflamatória ocorre gradualmente dentro de poucos dias após o ferimento e é acompanhada por apoptose celular<sup>4</sup>.

Concluindo a fase inflamatória, inicia-se a fase proliferativa (Figura 8) cujo objetivo é a diminuição da área lesionada por angiogênese, fibroplasia e reepitelização, que se inicia nas primeiras 48 horas após a lesão e se estende até o 14º dia<sup>30</sup>. Nesta fase, as células epidérmicas e dérmicas migrantes e os fatores de crescimento produzidos pelas células inflamatórias remanescentes atuam de maneira autócrina, parácrina e justácrina para induzir e manter a proliferação celular e a formação de tecido de granulação, ao mesmo tempo em que suportam a epitelização<sup>30</sup>. Para que a cicatrização progrida normalmente, é necessária uma resposta angiogênica satisfatória. Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), o de fibroblastos 2 (FGF-2) e PDGF, inicialmente liberados pelas plaquetas e depois pelas células residentes no leito da ferida, são os mediadores centrais da indução angiogênica<sup>31</sup>.

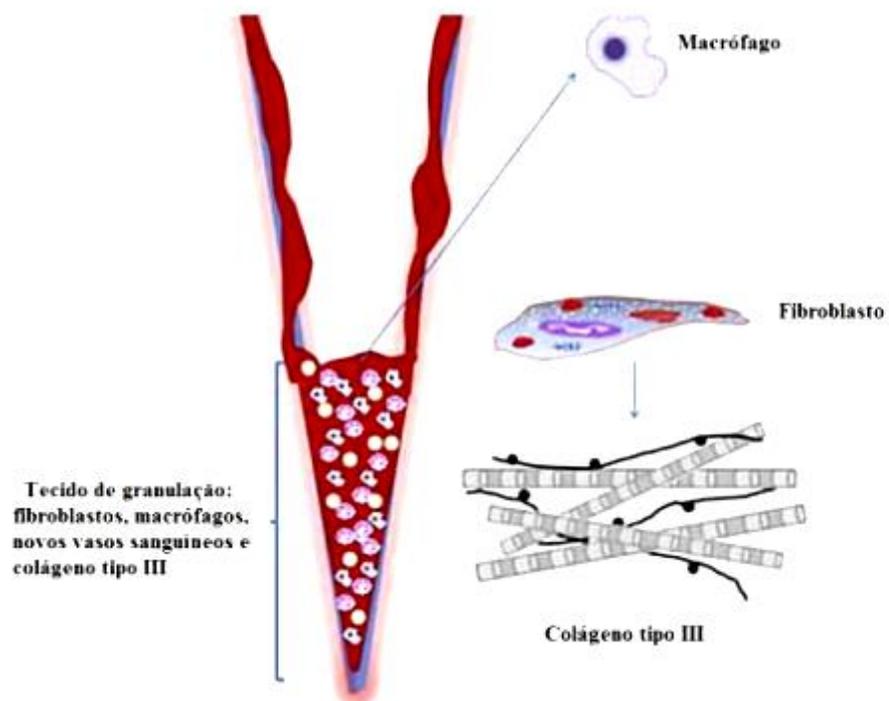


FIGURA 8 - Fase proliferativa da cicatrização.  
Fonte: Reink S<sup>30</sup>

A fibroplasia e angiogênese compõem o chamado tecido de granulação responsável por ocupar o tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos do tecido adjacente migram para o leito da ferida e produzem a nova matriz extracelular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local. Com um suprimento sanguíneo adequado ocorre a migração e proliferação de células epidérmicas e dérmicas que levam a reepitelização da ferida. Esta fase se inicia por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos produzidas pelo TGF- $\alpha$  (Fator de transformação do crescimento alfa), EGF (Fator de crescimento epidérmico) e metaloproteases<sup>57</sup>.

A terceira fase da cicatrização consiste no remodelamento (Figura 9), que se inicia duas a três semanas após o início da lesão e pode durar até mais de um ano<sup>4, 31</sup>. Essa fase é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. Ao longo do remodelamento os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil promovendo a contração da lesão e a remodelação da matriz a fim de alcançar a máxima resistência à tração<sup>30,31</sup>.

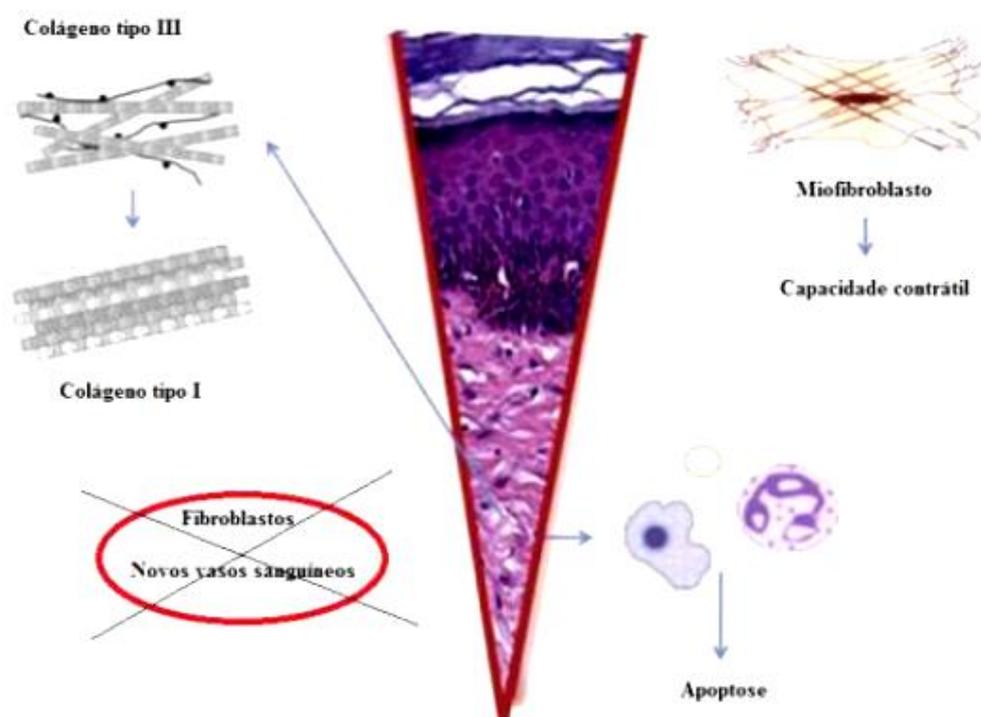


FIGURA 9 - Fase de remodelamento.  
Fonte: Fonte: Reink S<sup>30</sup>

Concomitantemente ocorre a reorganização da matriz extracelular que se transforma de provisória, composta por colágeno tipo III, fibrina, fibronectina e ácido hialurônico, em definitiva contendo principalmente colágeno tipo I. Por fim, durante o processo de maturação e remodelagem, a maioria dos vasos, fibroblastos e células inflamatórias desaparecem do local da ferida mediante processos de emigração, apoptose ou outros mecanismos de morte celular. Esses eventos são mediados, principalmente, pelas citocinas fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL-1), PDGF e TGF- $\beta$  que levam à formação de cicatriz com reduzido número de células<sup>57</sup>.

Uma evolução normal das fases de cicatrização geralmente determina uma cicatriz final com bom aspecto estético e funciona, sendo que, a intensidade fenotípica das cicatrizes é diretamente influenciada pela intensidade dos fenômenos que ocorreram, bem como o grau de equilíbrio ou desequilíbrio entre eles<sup>60</sup>. Entretanto, a hiperproliferação de fibroblastos, com conseqüente acúmulo de matriz extracelular ocasionada pela excessiva formação de colágeno, pode levar à formação de cicatrizes de má qualidade do tipo hipertrófica e/ ou quelóide<sup>61</sup>.

Em lesões provocadas por queimadura, é possível observar microscopicamente a derme papilar cicatricial com presença de miofibroblastos, o que não ocorre em cicatrizes provocadas por outro tipo de agente lesivo. Estruturas como nódulos dérmicos com alta densidade de colágeno, vasos sanguíneos proeminentes e fibras colágenas ao longo das linhas de tensão cutânea paralelas à superfície da pele também podem ser observados neste tipo de lesão<sup>32</sup>. Tais características favorecem o desenvolvimento de afecções cicatriciais do tipo hipertrófica aumentando a chance de comprometimento morfuncional de acordo com a extensão e localização da área acometida<sup>61</sup>.

Neste contexto novas metodologias terapêuticas têm sido descritas para promover uma recuperação mais morfofuncional e com melhores resultados no tratamento de tecidos danificados por queimaduras graves<sup>9</sup>. Estudos tem demonstrado que a utilização de populações celulares com características de proliferação e diferenciação, são capazes de proporcionar uma melhor cicatrização deste tipo de ferida<sup>10,11</sup>. Porém, para utilização de populações celulares capazes de otimizar o processo de reparo tecidual é importante identificar fontes abundantes de células, de fácil aquisição e alto potencial terapêutico<sup>12</sup>.

## 1.4 Células-tronco

As células-tronco (CT) possuem características moleculares de multipotência com capacidade de diferenciar-se em várias linhagens celulares sob certas condições fisiológicas e experimentais, por isso, representam uma alternativa promissora para uso na reparação e regeneração tecidual<sup>8</sup>. O potencial de autorenovação, autoproliferação e especialização apresentado por esse tipo de células permitiu o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos com perspectivas inovadoras para o tratamento de diversas doenças sistêmicas, traumatismos, fraturas, inflamações, necroses, neoplasias nos órgãos e tecidos e perdas por senilidade<sup>1</sup>.

As células-tronco podem ser agrupadas em duas categorias, as Células-tronco Adulta (CTA) e Células-tronco Embrionárias (CTE). Apesar de as CTE possuírem um maior potencial de diferenciação, sendo classificadas em totipotentes e pluripotentes, seu uso é limitado em terapia celular e pesquisas por questões de histocompatibilidade, segurança e bioética. Dessa forma, as células-tronco adultas tem sido amplamente estudada pela medicina regenerativa<sup>2,3</sup>

As CTA podem ser isoladas e caracterizadas em diferentes órgãos, como encéfalo, polpa de dente, tecido adiposo e, principalmente, na medula óssea e cordão umbilical<sup>7</sup>. Embora sejam classificadas como células multipotentes, são capazes de se diferenciarem somente em alguns tipos de tecido, em especial no qual residem, com importante função na homeostase tecidual<sup>4,5</sup>. As CTA encontradas na medula óssea, por exemplo, se distinguem em duas linhagens: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM). Esses grupos celulares são facilmente identificados e quantificados por meio da expressão de imunomarcadores de superfície. Assim, as CTH expressam o antígeno CD34 como glicoproteína de membrana, enquanto as células mesenquimais não possuem nenhum marcador<sup>1</sup>. Dessa forma, o uso das CT na terapia celular tem se destacado por serem de fácil obtenção, possuírem alta capacidade de proliferação e diferenciação, serem utilizadas de forma autóloga, de fácil manipulação laboratorial, serem pouco imunogênicas e possuírem habilidade de integração ao tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente<sup>11</sup>.

Transplantes de medula óssea têm sido realizados na medicina regenerativa há décadas como método de utilização de CT para o tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético. Com o desenvolvimento médico científico, porém, o sangue do cordão umbilical e placentário de recém-nascidos tornou-se uma

fonte alternativa para a obtenção de CT, apresentando vantagens como prescindibilidade de compatibilidade completa entre doador e receptor; menor risco de desenvolvimento da imunoincompatibilidade; e maior disponibilidade, diferentemente dos bancos de medula óssea, que possuem apenas os dados de possíveis doadores<sup>11-13</sup>.

Apesar de a medula óssea e cordão umbilical serem fontes primárias bem estabelecidas para coleta de CT, seu uso é restrito devido ao baixo número de doadores, de difícil obtenção e quantidade reduzida de células obtidas. Diante disso, estudos têm demonstrado que o tecido adiposo é uma promissora fonte de CTA para aplicações terapêuticas devido ao fácil acesso, procedimentos de isolamento simples, disponibilidade em grandes quantidades por meio da lipoaspiração e mínima morbidade ao doador<sup>34-37</sup>. Além disso, em comparação com as células mesenquimais derivadas da medula óssea, as células estromais derivadas do tecido adiposo apresentam potencial igual para se diferenciarem em células e tecidos de origem mesodérmica, como adipócitos, cartilagens, ossos e músculos esqueléticos, apresentando clara vantagem no processo de obtenção<sup>15</sup>.

O tecido adiposo se distingue em dois tipos: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM)<sup>24</sup>. Em humanos adultos, o TAM encontra-se em pequena quantidade, enquanto, o depósito do TAB se distribui no organismo como tecido adiposo subcutâneo (TAS) e tecido adiposo visceral (TAV)<sup>21</sup>. A gordura branca apresenta um papel de grande importância pois possui CT multipotentes em abundância, responsáveis pela renovação contínua do tecido<sup>25</sup>. O fracionamento do tecido adiposo por digestão enzimática e posterior centrifugação, permite a obtenção da Fração Estromal Vascular (FEV) que é composta por um *pool* de células como adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células de músculo liso vascular, células endoteliais, monócitos e macrófagos, linfócitos e células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC)<sup>23</sup>.

Por sua vez, as ADSC proveniente da FEV são encontradas em maior quantidade e com taxa de proliferação mais intensa quando comparadas com as CTA derivadas do estroma da medula óssea (CTA-MO)<sup>9,26</sup>. Segundo Torres et al.<sup>62</sup> é possível obter aproximadamente 2 a 3 x10<sup>8</sup> CT para cada 300 mL de tecido adiposo coletado, enquanto o material extraído da medula óssea, é capaz de gerar apenas uma CT para cada 10<sup>5</sup> células estromais. Ademais, as ADSC podem diferenciar-se, *in vitro*, em múltiplas linhagens, isto é, não apenas mesenquimais como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células neuronais, células endoteliais e cardiomiócitos<sup>11,16,17</sup>, mas também

em tecidos de linhagem não mesenquimal, fenômeno este definido como transdiferenciação<sup>14,11</sup>. Entretanto a proliferação e diferenciação das ADSC durante o cultivo *in vitro* pode apresentar diferença das características que estas células têm *in vivo*<sup>4,9,10</sup>.

Nesse âmbito, estudos buscam caracterizar e isolar de forma mais específica, as CTM por meio de marcadores de superfície. Porém, devido à dificuldade para definir um único antígeno específico, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs critérios mínimos como: capacidade celular de aderência ao plástico dos frascos de cultivo, com característica morfológica semelhante à fibroblastos; potencial de diferenciação multipotente para linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica; expressão de marcadores de superfície mesenquimais (CD105, CD73 e CD90) e ausência de marcadores endoteliais hematopoiéticos (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 e HLA-DR)<sup>63,64</sup>.

Os estudos de caracterização dos diferentes tipos de CT têm demonstrado que os marcadores de superfície são semelhantes entre as populações de ADSC e CTM expressos no cultivo *in vitro*<sup>62-64</sup>. Sullivan et al<sup>63</sup> observaram alta taxa de expressão para os biomarcadores CD90+, CD44+ e CD45- em células coletadas do tecido adiposo de cães, apesar de serem marcadores característicos de CT derivadas da medula óssea. Riccobono et al.<sup>64</sup>, também, encontraram expressão positiva para os marcadores CD90+, CD44+ e negativas para CD45 em células derivadas do tecido adiposo de suínos. Shawn et al.<sup>65</sup> isolaram células do tecido adiposo da região inguinal de camundongos e caracterizaram a população homogênea, após três passagens em cultivo, pela expressão de 97% dos marcadores CD105+, CD90+ e CD45-. Em tecido humano foi possível identificar, também, o mesmo padrão de expressão, com os biomarcadores CD29, CD90 e CD105 positivos<sup>42</sup>. Entretanto, alguns pesquisadores concluíram que é possível identificar algumas diferenças na expressão de marcadores entre as CTM e ADSC<sup>39,40,45</sup>.

John K. Fraser et al<sup>66</sup> demonstraram, por análise de citometria de fluxo que, em cultivo, as ADSC expressam marcadores de superfície celular semelhantes aos expressos por CTM, incluindo CD105, SH3, Stro-1, CD90 e CD44, contudo eles não expressam o marcador hematopoiético CD45 nem o marcador endotelial CD31. Além disso, foi observado que as ADSC expressam CD49d enquanto as CTM expressam CD106, sendo, portanto, uma característica que permite separar essas duas populações<sup>64-67</sup> (Tabela 1). Assim, é possível caracterizar as ADSC de acordo com o

seguinte padrão de expressão para alguns marcadores, tais como CD105, CD90, CD13, CD29, CD54, CD73, MHC I, CD207, CD49d CD166 (Tabela 1). Entretanto, as células dificilmente expressam todos os marcadores de superfície com mais de 90% de pureza, isto é, as ADSC não formam populações completamente homogêneas<sup>67-69</sup>.

TABELA 1 – Imunomarcadores expressos na superfície de células-tronco mesenquimais e derivadas do tecido adiposo.

<i>Marcadores positivo e negativo para caracterizar isolamento</i>			
<i>CTM</i>		<i>ADSC</i>	
Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
CD105	CD45	CD105	CD45
CD73	CD34	CD73	CD34
CD90	CD14 ou CD11b	CD90	CD14 ou CD11b
<b>CD106</b>	CD79 $\alpha$ ou CD19	CD36	CD79 $\alpha$ ou CD19
	HLA-DR	CD29	HLA-DR
	CD38	CD44	CD38
	CD19	<b>CD49d</b>	CD31
	CD31	CD151	CD45
	CD45	CD13	<b>CD106</b>
	<b>CD49d</b>	MHC I	CD19
		CD207	
		CD166	
		CD13	

Fonte: adaptado de Alonso-Goulart et al<sup>23</sup>.

A proteína de superfície CD49, é caracterizada como uma molécula de adesão celular pertencente à subfamília  $\alpha$  (alfa) 4 das integrinas, as quais são expressas em leucócitos e parecem estar envolvidas na adesão leucocitária ao endotélio durante o processo de transmigração do vaso ao tecido em processo inflamatório<sup>70</sup>.

Estudos de imunofenotipagem das ADSC mostraram que a expressão dos biomarcadores de superfície pode mudar durante a expansão de cultivo da célula, provavelmente influenciado pela aderência plástica ao frasco e proliferação em meio com concentrações elevadas de soro fetal bovino (SFB) tornando o cultivo menos homogêneo<sup>69</sup>. Dessa forma, um método mais adequado de isolamento das ADSC,

diretamente após a obtenção do FEV ou sua expansão *in vitro*, permitiria o emprego dessas células em diferentes patologias, ou seja, a utilização de marcadores de identificação pré-cultivo garantiria um grau de pureza mais elevado do que o obtido com uma seleção baseada apenas na aderência ao plástico<sup>68,71</sup>.

### **1.5 Cicatrização cutânea e células-tronco derivadas do tecido adiposo**

No âmbito das novas perspectivas terapêuticas que se desenvolveram nas últimas décadas, a terapia celular é vista como uma abordagem promissora para a reconstrução morfológica e restauração funcional de lesões cutâneas por queimaduras. A aplicação efetiva de populações celulares capazes de otimizar os processos de reparo e regeneração tecidual em diferentes condições clínicas depende de vários fatores, dentre eles o reconhecimento de fontes abundantes de células com grande potencial terapêutico<sup>29</sup>.

O potencial terapêutico das ADSCs expandidas por cultivo, a partir do isolamento da FEV, foi analisado em diversos modelos pré-clínicos e clínicos e, assim, parecem estar associados com um importante papel imunomodulatório sistêmico no tratamento de indivíduos portadores de esclerose múltipla e reparo de fístulas de Crohn<sup>4,30</sup>. Neste contexto, Karimi et al.<sup>10</sup> mostraram que a aplicação de ADSCs isoladas do tecido adiposo acelerou o processo de reepitalização e o aumento da deposição de tecido de granulação em modelos de ferida cutânea em ratos. Em cultivos organotípicas equivalente à pele humana, a adição de ADSCs foi capaz de promover aceleração do reparo de feridas induzidas por laser de alta potência apresentando recuperação completa em dois dias após a indução, exibindo tecido cutâneo reconstituído em múltiplas camadas<sup>32</sup>.

Estudo com lesões por queimadura de espessura parcialmente superficial e profunda em ratos, também, demonstrou que a aplicação de células derivadas do tecido adiposo promoveu reparo tecidual precoce devido ao aumento da proliferação celular, neovascularização, redução da inflamação e aumento da atividade de fibroblastos<sup>33</sup>. Resultados semelhantes foram observados também em lesões por queimadura de espessura total em camundongos tratados com ADSCs. Neste estudo verificou-se aumento da síntese de colágeno, do número de macrófagos e linfócitos e redução da área de superfície da ferida<sup>34</sup>. Yoo e Lim (2010)<sup>72</sup> também mostraram que a aplicação de ADSCs em modelos de ferida cutânea experimental em ratos foi capaz de acelerar o

fechamento da ferida, promover reepitelização parcial e aumento da deposição de tecido de granulação.

Dessa maneira, o potencial regenerativo das ADSCs está associado à produção de diversos fatores de crescimento e citocinas sinalizadoras da proliferação e diferenciação celular, como VEGF, FGF e o Fator de Crescimento de Queratinócito (KGF) expressas por essas células no local da lesão<sup>35</sup>. Assim, a síntese e liberação destas moléculas bioativas regenerativas correspondem ao eixo central de comando dos complexos eventos que caracterizam a cicatrização<sup>36</sup>. Nesse âmbito, o aumento dos níveis locais e sistêmicos de fatores de crescimento como TGF- $\beta$ , FGF, PDGF e fator de crescimento epidermal (EGF) tem sido utilizado em modelos de ferida cutânea apresentando resultados satisfatórios<sup>37</sup>. Entretanto, as dificuldades técnicas na administração contínua desses fatores associados ao alto custo dessas substâncias tornam tais intervenções extremamente limitadas como estratégia terapêutica<sup>36</sup>.

Além disso, a aplicação de agentes bioestimuladores associados à terapia celular tem sido evidenciada como um bom incremento ao aumento da viabilidade, do potencial proliferativo, da diferenciação e organização morfofuncional das células ADSC<sup>14,15</sup>. Dentre estes agentes, o laser de baixa potência (LBP) está associado a eficácia progressão dos processos regenerativos pois parece exercer efeitos modulatórios da resposta inflamatória importantes nas fases iniciais do reparo tecidual<sup>1</sup>.

## **1.6 Laser de baixa potência**

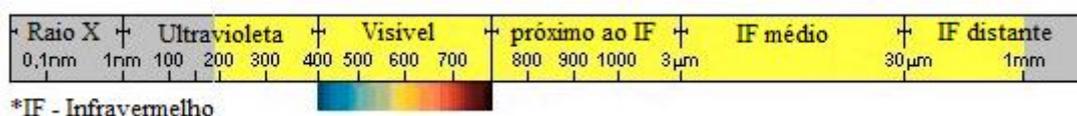
A palavra “laser” é um acrônimo, que em língua inglesa significa: “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” (amplificação de luz por emissão estimulada de radiação), e pode ser definida como uma radiação eletromagnética não ionizante, monocromática, coerente e colimada, produzida por emissão espontânea<sup>75-78</sup>. Essas propriedades diferem o laser de demais radiações eletromagnéticas não ionizantes, pois as cristas das ondas encontram-se pareadas e unidirecionais e o foco da luz pode ser mantido mesmo com o aumento da distância focal<sup>76</sup>.

No contexto histórico, o primeiro laser foi construído em 1960 por Theodore Mainan, o qual utilizou um cristal de rubi. Em 1962, Leon Goldman foi o primeiro a usar o laser de alta potência, que ficou conhecido como laser cirúrgico por apresentar potência acima de 1W e algumas características específicas como precisão de corte e a ablação de pedra dentro do organismo de forma menos invasiva<sup>77</sup>. O laser de

baixa potência só surgiu na década de 1970, com o médico e professor húngaro Endre Mester, sendo utilizado na cicatrização de feridas e úlceras abertas inicialmente, com a finalidade de estimular a cicatrização tecidual<sup>77</sup>. Atualmente o LBP é estudado mundialmente e é amplamente utilizado na rotina clínica em vários países, em especial pelo custo relativamente baixo do equipamento<sup>78-82</sup>.

A maioria dos equipamentos que utilizam laser é composta pelos seguintes elementos segundo Damante et al.<sup>20</sup>: ressonador, que é um tubo ou cavidade óptica com disposição de espelhos; um meio ativo, como o neodímio, érbio ou semicondutores de arseneto de gálio e alumínio (GaAsAl) e arsenito de gálio (GaAs), que determinam o comprimento de onda emitido e, pelo mecanismo de excitação ou bombeamento por meio de uma fonte de energia externa, excitam os elétrons do meio ativo. Os tipos de laser diferem em relação a suas propriedades, que são determinadas pelo comprimento de onda e invariabilidade, podendo ser divididos em laser de baixa potência (LBP), que agem por meio da bioestimulação, e de alta potência, que atuam através da produção de calor. O laser de alta potência ou cirúrgico é indicado para procedimentos cirúrgicos como cortes, coagulação e cauterização. Já o laser de baixa potência é usado para fins terapêuticos e bioestimulantes, atuando como acelerador da cicatrização<sup>78</sup>. O LBP opera na faixa entre 50 a 300mW e por isso não produz aquecimento nos tecidos vivos superior a 1°C. Logo, o laser de baixa potência se difere do laser de alta potência por não produzir nenhum efeito térmico considerável e suas reações são limitadas a fotobioestimulação celular<sup>25</sup>.

A luz pode ser identificada como uma emissão eletromagnética e é classificada de acordo com o "espectro de radiações eletromagnéticas", no qual ela é dividida em radiações, como infravermelhas, visíveis, ultravioletas, raio-X entre outras, sendo o critério usado para estabelecer esses parâmetros o comprimento de onda de cada uma. Os lasers utilizados na saúde emitem radiações, principalmente, na faixa de luz visível e infravermelha, sendo possível observar essa faixa de atuação (Figura 5) observando o comprimento de onda da luz usada<sup>79</sup>.



\*IF - Infravermelho

FIGURA 10 - Intervalo do Espectro Eletromagnético onde o Laser de baixa potência atua terapêuticamente (Faixa amarela).

Fonte: Tarasov<sup>80</sup>.

O laser possui parâmetros de modulação ou irradiação, como comprimento de onda e dose, que quando alterados podem modificar os efeitos desejados durante a aplicação do LBP<sup>80</sup>. A emissão de energia que dá origem ao feixe luminoso dos lasers ocorre quando um átomo, já excitado, é golpeado por uma onda magnética emitida por outro átomo de mesma característica física. Entretanto, a onda magnética primária emitida para excitar o átomo não é absorvida por ele, mas, sim, serve como um gatilho que o impulsiona e o excita a emitir um fóton e, posteriormente, a retornar ao seu estado não excitado<sup>81</sup>.

Alguns fatores influenciam no sucesso das terapias com o LBP como características individuais, condição clínica, características do tecido alvo e a dosimetria da luz empregada<sup>82</sup>. Fisiologicamente, a aplicação do LBP age em nível celular provocando o aumento de produção de colágeno através da proliferação de fibroblastos, aumento da síntese de ATP, angiogênese e potencialização do sistema imune<sup>83</sup>. Os efeitos terapêuticos do LBP são atribuídos à capacidade da luz, principalmente nos comprimentos de onda próximos ao vermelho ou infravermelho, de modificar o metabolismo celular em consequência da absorção desta por fotorreceptores existentes nas células<sup>84</sup>. O alvo dessa laserterapia é um tecido onde a radiação tende a estabelecer uma homeostasia energética acarretando em uma maior ativação das células, com objetivo de estimular sua proliferação, diferenciação e secreção de citocinas. Outro efeito observado nessa terapia é uma modulação do processo inflamatório, com consequente diminuição do tempo necessário no processo de cicatrização<sup>85-87</sup>. O efeito fotoquímico ocorre devido à presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda que, quando estimuladas, podem alterar suas atividades, gerando alteração de atividades enzimáticas e reações fotoquímicas. Já a fotorregulação, ocorre por meio de alterações nos receptores que geram mudanças na atividade funcional e metabólica da célula<sup>88</sup>.

Nesse contexto, o uso terapêutico do LBP tem sido amplamente descrito, apresentando eficácia em diversas aplicações, como: doenças inflamatórias crônicas, disfunções articulares, aceleração do reparo tecidual de feridas cutâneas, redução de fadiga e dano muscular após exercício, neuropatias periféricas, patologias bucais e dor crônica<sup>83,84</sup>. Em estudo de lesões cutâneas tem se observado importantes contribuições terapêuticas do LBP com grande potencial no processo de cicatrização de feridas graves<sup>88-91</sup>.

## 1.7 Laser de baixa potência na cicatrização cutânea

O efeito biomodulatório do LBP pode ser observado principalmente na fase inflamatória, porém também exerce efeito positivo na fase tardia, acelerando o processo de cicatrização em lesões cutâneas. Diversos estudos demonstram que a radiação laser reduz a proliferação de linfócitos, diminui a quantidade de mastócitos, aumenta a angiogênese, facilita a diferenciação de miofibroblastos, aumenta a proliferação de células epiteliais e a síntese do colágeno, acelerando, conseqüentemente, o processo cicatricial<sup>67,68,69 e 70</sup>.

De modo geral, os mecanismos de ação da luz no tecido são classificados em primários e secundários. Acredita-se que primariamente a luz gera um efeito sobre as moléculas fotorreceptoras da cadeia respiratória celular por meio do componente citocromo C oxidase, tornando-o eletronicamente excitado o que altera seu estado redox e promove aceleração na transferência de elétrons na cadeia respiratória<sup>85</sup>. Além disso, na presença de óxido nítrico (NO) a absorção da luz pode reverter a inibição do citocromo C oxidase pelo NO e aumentar a taxa respiratória com conseqüente aumento da produção de ânions superóxidos<sup>87-91</sup>.

Em relação aos mecanismos secundários das reações fotobiológicas, estes são responsáveis por conectar a resposta à ação da luz pelos fotorreceptores localizados na mitocôndria aos mecanismos de síntese de DNA e RNA localizados no núcleo. Uma série de eventos moleculares de sinalização, transdução e amplificação do sinal promovem alterações na homeostasia celular, no ATP, na síntese de DNA e RNA, na permeabilidade e despolarização de membrana e na alcalinização do citoplasma<sup>83,84</sup>.

A interação entre a radiação laser e o tecido biológico depende do comprimento de onda da luz e das propriedades ópticas, pois certos elementos teciduais como células, mitocôndrias e vasos podem provocar dispersão da luz<sup>89</sup>. Ao incidir sobre os tecidos, parte da luz sofre desvios, de forma que apenas uma pequena quantidade é absorvida e transmitida, interagindo com moléculas fotorreceptoras especializadas, denominadas de cromóforos, produzindo então uma reação fotobiológica<sup>90</sup>. Este fenômeno estabelece um estado molecular eletronicamente excitado que resulta em modulação da atividade celular<sup>87</sup>.

Além disso, é importante salientar que, o estado geral redox e o pH da célula influenciam a resposta celular à luz. Em situações patológicas, o laser influencia no

processo de troca iônica e potencializa o incremento de ATP, apresentando efeitos mais expressivos do que nas células em estado de homeostasia, onde os efeitos são quase nulos<sup>92-93</sup>.

Os modos de ação da fotoestimulação gerada pelo LBP demonstram que a luz coerente é capaz de promover a ativação de complexos eventos na membrana plasmática, mitocôndrias e núcleo celular<sup>63</sup>. O efeito fotoelétrico, do laser contribui com a normalização da mobilidade iônica nas células e, indiretamente, estimula o aumento de ATP favorecendo o reestabelecimento do equilíbrio e da vitalidade celular, bem como a reorganização de suas funções, devido à reposição de energia orgânica perdida<sup>25</sup>. O LBP possui ainda como característica, a capacidade de bloquear a transmissão do estímulo doloroso entre as fibras nervosas, bem como a atividade cicatrizante, devido ao aumento da angiogênese e diminuição do infiltrado de polimorfonucleares e hemorragia<sup>89-92</sup>.

Outra propriedade terapêutica da laserterapia está relacionada com sua capacidade anti-inflamatória, relacionada com as prostaglandinas (PG) capazes de alterar a pressão hidrostática intracapilar, melhorando assim a absorção de líquidos intersticiais, com redução de aproximadamente 50% de volume do edema<sup>93</sup>. Além disso, o LBP gera um aumento da vasodilatação o que facilita a migração de neutrófilos e monócitos, promovendo a reabsorção do exsudato fibrinoso produzido pela epitelização basal e consequente aumento do ritmo de divisão celular<sup>95</sup>.

Neste contexto, foi observado em alguns estudos que ao fazer irradiação com LBP, ocorre aumento da proliferação e viabilidade celular, a partir da estimulação da atividade mitocondrial. Foi demonstrado que a irradiação laser foi capaz de aumentar a produção de ATP; aumentar a síntese de DNA e de RNA; ativar cascatas da sinalização celular; promover a liberação de NO e ativação do citocromo C oxidase; modificara atividade da membrana de organelas intracelulares; alterar o fluxo de cálcio e gerar mudanças na expressão de proteínas relacionadas ao estresse<sup>94</sup>.

Em estudo com células tronco derivadas da medula óssea irradiada com LBP, Giannelli et al.<sup>96</sup> avaliaram o efeito positivo na proliferação celular devido à ativação de canais de K<sup>+</sup> (Kir) específicos, sugerindo um papel fundamental dessas estruturas na coordenação do ciclo celular. Silveira et al.<sup>97</sup>, também demonstraram uma melhora na cicatrização de ferida cutânea em ratos, quando tratada com irradiação por laser de arsenieto de gálio (GaAs) e hélio-néon (HeNe) em dose variando de 1 a 3 J/cm<sup>2</sup>. Foi observado um aumento da síntese de colágeno e redução de alguns parâmetros, como:

tamanho da ferida, níveis de lípidos, oxidação de proteínas (grupos carbonilo) e atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), comprovando que a fotomodulação é capaz de reduzir a fase inflamatória e estimular um processo de cicatrização mais organizado, que influencia até mesmo no aspecto morfofuncional da cicatriz <sup>66</sup>.

Os efeitos benéficos do laser de baixa potência na cicatrização de feridas podem ser explicados por meio dos mecanismos biológicos básicos de indução da expressão de citocinas e fatores de crescimento responsáveis por muitas fases da cicatrização<sup>100</sup>. O laser He-Ne (632,8 nm), por exemplo, é capaz de estimular a síntese de proteínas e aumentar os níveis de mRNA e de interleucinas (IL) 1 e 8 nos queratinócitos responsáveis pela fase inflamatória inicial do processo de cicatrização<sup>99</sup>. Além disso, o LBP também regula citocinas responsáveis por estimular a proliferação e migração de fibroblastos, promove aumento de fatores de crescimento como VEGF e TGF- $\beta$ , responsáveis por induzir neovascularização e síntese de colágeno<sup>98</sup>.

De acordo com o estudo realizado por Carvalho et al.<sup>102</sup> envolvendo aplicação de laser HeNe, o efeito mais importante do LBP sobre o processo de cicatrização de feridas foi o aumento da síntese de colágeno por fibroblastos recrutados para a região em reparo tecidual. Ainda, segundo o estudo, esse recrutamento se deu principalmente por fatores liberados por plaquetas ativadas no processo inflamatório decorrente da lesão e resulta em grande produção de colágeno nos dias 3 e 7 pós cirúrgico. Outro estudo, realizado por Pugliese et al.<sup>103</sup>, atribuiu ao laser um aumento expressivo de deposição de colágeno consequente de indução da proliferação celular e/ou ainda por aumento no processo de síntese e secreção proteica. Uma explicação para isso seria por ação fotobiomoduladora que estimule a neovascularização, favorecendo assim a fibroplasia e até a conversão precoce de fibroblastos em miofibroblastos<sup>88-92</sup>.

Assim, uma pesquisa conduzida por Busnardo & Biondo-Simões<sup>104</sup> verificou o incremento da densidade de colágeno tipo III no 3º dia pós-operatório, aumento no percentual total de colágeno, diminuição do infiltrado inflamatório e precoce resolução da fase inflamatória nas feridas irradiadas resultantes da aplicação de laser HeNe em feridas induzidas em modelos animais. Por fim, um estudo realizado por Reis et al.<sup>105</sup>, utilizando laser GaAlAs notou, além do aumento da densidade de colágeno, melhor arranjo da matriz extracelular, processo este dependente de metaloproteinasas, enzimas remodeladoras de matriz extracelular que possui sua produção aumentado por ação de LBP. Nesse sentido, a soma dos estudos aponta para a contribuição do LBP

para a cicatrização não só na sua fase inflamatória, mas também nas fases proliferativa e de remodelamento.

### **1.8 Fotobiomodulação das células-tronco derivadas do tecido adiposo**

A medicina regenerativa tem buscado unir terapias na tentativa de obter melhores resultados, como na utilização de ADSCs associadas à estimulação por LBP, que tem proporcionado o surgimento de uma terapia promissora, capaz de melhorar a qualidade de cicatrização das lesões e proporcionar a diminuição dos custos, devido à redução no tempo de tratamento e menor risco de contaminação secundária<sup>15</sup>. Isso ocorre devido às propriedades terapêuticas do LBP como agente bioestimulador de CT, acarretando em uma alta capacidade de proliferação e diferenciação celular que, conseqüentemente, acelera o processo de recuperação do tecido.<sup>5</sup>

A irradiação com o LBP em cultivos de CT mostrou ser capaz de promover o aumento da migração, proliferação e viabilidade celular, ativando a produção de proteínas e induzindo a diferenciação em células progenitoras variadas<sup>71</sup>. Além disso, a aplicação do LBP associada à implantação local de CTA-MO em modelos de fratura e osteogênese imperfeita promoveu aceleração do reparo ósseo por meio do aumento da proliferação e diferenciação celular no local da lesão<sup>83</sup>.

Em estudo de lesões cutâneas em ratos atímicos, utilizando ADSC associada ou não com o LBP, foi observado que a associação entre ambas as terapias é capaz de potencializar o processo de cicatrização em consequência do aumento da neovascularização, da melhor regeneração dos anexos dérmicos, da redução do número de apoptoses no leito da ferida e do aumento da produção de fatores de crescimento<sup>72</sup>. Em outro estudo elaborado com CTM irradiadas com LBP, previamente ao seu implante no coração de ratos infartados, observou-se que o laser é capaz de aumentar a taxa de sobrevivência e proliferação celular, diminuindo a formação de tecido cicatricial e promovendo aumento da angiogênese no tecido cardíaco infartado<sup>84</sup>.

No entanto, poucos estudos desenvolvidos avaliam a associação entre o uso de ADSC e a aplicação de LBP no tratamento de feridas cutâneas em modelos *in vivo*. Kim et al. (2012)<sup>106</sup>, porém, implantaram ADSC caninas em modelos de lesão cutânea em ratos atímicos e irradiaram as lesões com LBP. Os resultados mostraram que o grupo tratado com ADSC e o grupo tratado com ADSC e LBP apresentaram aceleração do reparo tecidual. Além disso, o grupo no qual foi realizada a associação entre ADSC e

LBP apresentou resultados superiores quanto a neovascularização, regeneração de anexos dérmicos, redução de apoptose das ADSC no leito da ferida e aumento da produção de fatores de crescimento, quando comparado ao grupo tratado com ADSC<sup>79</sup>.

Embora a associação entre ADSC e LBP apresenta-se como promissora, muitas questões ainda precisam ser elucidadas para que seu uso clínico seja efetivado de forma segura e eficaz. Em relação ao aspecto bioestimulatório promovido pelo LBP, a determinação dos parâmetros de irradiação mais eficazes assume importância capital para o sucesso da terapia<sup>64</sup>.

Portanto, são necessárias investigações para a determinação do possível papel destas intervenções no tratamento de feridas por queimadura, de forma a endereçar os benefícios e riscos da terapêutica por ADSC isolada ou em associação ao LBP, em comparação as terapias convencionais, tendo em vista os potenciais benefícios que esses tratamentos apresentam.

## **1.9 Modelo experimental de queimaduras**

O desenvolvimento de novos tratamentos clínicos para queimadura tem diminuído a taxa de mortalidade nos últimos anos. No entanto, as alterações morfofuncionais envolvidas são uma questão de saúde pública<sup>2</sup>, representando uma forma grave de trauma<sup>49</sup>. Para aprimorar o conhecimento da fisiopatologia da queimadura e estudar possíveis agentes terapêuticos, diversos modelos experimentais podem ser utilizados: a) pesquisa em cultivo de células e tecidos para avaliar o potencial de agentes terapêuticos e substitutos de tecido queimado; b) estudos em animais sobre diferentes tamanhos, formas e massa corporal, a fim de os fenômenos biológicos in vivo - e, após essas etapas, a realização de estudos clínicos em humanos - com aspectos de segurança verificados em experimentos pré-clínicos em animais<sup>107</sup>.

Os processos críticos relacionados à cicatrização de feridas foram descritos, inicialmente, usando modelos animais<sup>108</sup>. Dentre eles, os ratos e humanos apresentam características fisiológicas e patológicas comuns em vários sistemas orgânicos bem estabelecidos na literatura. Em relação ao epitélio, seres humanos e ratos compartilham das principais camadas (epiderme, derme), no entanto, a pele do rato não imita perfeitamente a arquitetura da pele humana devido à sua morfologia de pele única e principalmente, devido à elasticidade e à falta de uma forte adesão às estruturas subjacentes<sup>109</sup>.

Os ratos são classificados como "animais de pele solta", e essa característica desempenha um papel significativo na cicatrização de feridas nesses animais que ocorre por meio da contração da ferida, em oposição à reepitelização observada em humanos<sup>107</sup>. Os ratos possuem um músculo denominado *panniculus carnosus* localizado no subcutâneo que facilita a cicatrização da pele, tanto pela contração da ferida quanto pela formação de colágeno<sup>110</sup>. Dessa forma, a contração da ferida é rápida, o tempo total de cicatrização dos ratos é substancialmente reduzido o que os torna menos propensos a sepse sistêmica e imunossupressão permitindo que os pesquisadores estudem rapidamente a mecânica da cicatrização de feridas<sup>109</sup>.

As diferenças entre a pele humana e de rato também podem ser observadas molecularmente, pois os ratos possuem a enzima L-gluconolactona que converte L-glucono gamma-lactona em vitamina C, enquanto os humanos não possuem essa enzima<sup>108</sup>. Durante o processo de cicatrização essa característica pode influenciar diretamente nas avaliações, pois a vitamina C desempenha uma importante função na síntese de colágeno<sup>107</sup>.

Embora os ratos não desenvolvam feridas de uma maneira que se assemelhe às que surgem em humanos, o processo natural de cicatrização de feridas em mamíferos adultos, progride em quatro fases comuns que se sobrepõem no tempo: coagulação, inflamação, proliferação da migração (incluindo deposição da matriz) e remodelação<sup>110</sup>. Além disso, vários fatores devem ser considerados ao escolher uma espécie animal para experimentos de feridas. Isso inclui custo, disponibilidade, facilidade de manuseio, familiaridade do investigador e semelhança morfofuncional com os seres humanos. Ademais, um modelo animal reprodutível e de fácil manuseio facilita a triagem de tratamentos, permite o estudo preciso de cada fase do processo de cicatrização e diminui o tempo e o custo de manutenção, visto que, ratos são menos propensos à sepse sistêmica e à imunossupressão quando comparados a animais maiores, além de precisarem de um tempo reduzido para cicatrização, permitindo o estudo mais rápido da mecânica da regeneração de feridas<sup>108</sup>.

Vários modelos de feridas usam ratos devido ao seu tamanho, ampla disponibilidade e natureza tratável. O rato wistar (*rattus norvegicus*) é um dos modelos animais mais utilizados em estudos envolvendo lesões cutâneas, principalmente por queimaduras, pois nestes casos ocorre a perda da função contrátil do *panniculus carnosus*, uma camada muscular fina no subcutâneo, capaz de aproximar as bordas da lesão e diminuir a área cicatricial. A função inibida desse músculo no rato, diminui suas

vantagens regenerativas em relação ao homem, deixando sua evolução cicatricial mais semelhante à da pele humana, sugerindo assim, um modelo confiável para estudo da remodelação dérmica a longo prazo<sup>111</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Mola, Rachel et al. Características E Complicações Associadas Às Queimaduras De Pacientes Em Unidade De Queimados. *Rev Bras Queimaduras*, 2018; 17(1):8-13.
2. Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria De Atenção À Saúde. Departamento De Atenção Especializada. Cartilha Para Tratamento De Emergência Das Queimaduras / Ministério Da Saúde, Secretaria De Atenção À Saúde, Departamento De Atenção Especializada. – Brasília: Editora Do Ministério Da Saúde, 2012.
3. Dreifke, Michael B.; Jayasuriya, Amil A.; Jayasuriya, Ambalangodage C. Current Wound Healing Procedures and Potential Care. *Materials Science and Engineering: C*. 2015; 48:651-662.
4. Loder, Shawn et al. Wound Healing After Thermal Injury Is Improved by Fat and Adipose-Derived Stem Cell Isografts. *Journal of Burn Care & Research*, 2015; 36(1):70-76.
5. Broughton G, Janis Je, Attinger Ce. The Basic Science of Wound Healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117(7):12s-34s.
6. Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. *Ann Plast Surg.* 2007;59(1):109-15
7. Wolf Se, Tompkins Rg E Herndon Dn. On the Horizon: Research Priorities In Burns For The Next Decade. *Surg Clin North Am.* 2014;94(4):917-30.
8. Van Der Veer Wm, Bloemen Mct, Ulrich Mmw, Molema G, Van Zuijlen Pp, Middelkoop E, Niessen Fb. Potential Cellular and Molecular Causes Of Hypertrophic Scar Formation. *Burns.* 2009;35(1):15-29.
9. Lee Sh, Lee Jh E Cho Kh. Effects of Human Adipose-Derived Stem Cells On Cutaneous Wound Healing In Nude Mice. *Ann Dermatol.* 2011;23(2):150-5.
10. Karimi H, Soudmand A, Orouji Z, Taghiabadi E, Mousavi Sj. Burn Wound Healing With Injection Of Adipose-Derived Stem Cells: A Mouse Model Study. *Ann Burns Fire Disasters.* 2014;27(1):44–9.
11. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal Vascular Fraction Improves Deep Partial Thickness Burn Wound Healing. *Burns.* 2014;40(7):1375-83.
12. Gimble JM Guilak F, Bunnell BA. Clinical and Preclinical Translation of Cell-Based Therapies Using Adipose Tissue-Derived Cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):19.
13. Krause Ds, Theise Nd, Collector Mi, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis Sj. Multi-Organ, Multi-Lineage Engraftment by A Single Bone Marrow-Derived Stem Cell. *Cell* 2001; 105:369-377.

14. Gentile P, Orlandi A, Scioli Mg, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise Review: Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma: Basic And Clinical Implications For Tissue Engineering Therapies In Regenerative Surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):230-6.
15. Tabit Cj. Et Al. Fat Grafting Versus Adipose-Derived Stem Cell Therapy: Distinguishing Indications, Techniques, And Outcomes. *Aesthetic Plastic Surgery.* 2012; 36:704–713.
16. Lee Sh, Lee Jh E Cho Kh. Effects of Human Adipose-Derived Stem Cells On Cutaneous Wound Healing In Nude Mice. *Ann Dermatol.* 2011;23(2):150-5.
17. Lim SJ e Yoo G. Effects of Adipose Derived Stromal Cells And Of Their Extract On Wound Healing In A Mouse Model. *J Korean Med Sci.* 2010; 25(5):746-51.
18. Rocha Jr AM, Oliveira RG, Farias RE et al. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Na Brás Dermatol,* 2006.
19. Bjordal JM, Johnson MI, Iversen V, Aimbire F, Lopes-Martins RVB. Low-level laser therapy in acute pain: A systematic review of possible mechanisms of action and clinical effects in randomized placebo-controlled trials. *Photomedicine and Laser Surgery,* 2006; 24(2):158-168.
20. Damante CA, Marques MM, de Micheli G. Terapia com laser em baixa intensidade na cicatrização de feridas: revisão de literatura. *Revista da Faculdade de Odontologia Universidade de passo Fundo.* 2008; 13(3):88-93.
21. Tunér J e Hode L. Laser therapy in dentistry and medicine. Edsbruk, Prima Books, 1996, 236p.
22. Peplow PV, Chung T, Baxter D. Laser photobioestimulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomedicine and Laser Surgery,* 2010; 28(3):291-325.
23. Silva JP, Silva MA, Almeida APF, Júnior IL, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomedicine and Laser Surgery,* 2010; 28(1):17-21.
24. Walgrave S, Zelickson B, Childs J, Altshuler G, Erofeev A, Yaroslavsky I, Kist D, Counters J. Pilot investigation of the correlation between histological and clinical effects of infrared fractional resurfacing lasers. *Dermatol Surg.* 2008;34(11):1443-53.
25. AGNE JE. (2015). Eletromorfoterapia. SANTA MARIA.

26. Ebrahimi T, Moslemi N, Rokn A, Heidari M, Nokhbatolfoghahaie H, Fekrazad R. The Influence of Low Intensity Laser Therapy On Bone Healing. *J Dent (Tehran)*. 2012;9(4):238-48
27. IEC - International Electrotechnical Commission. Safety of Lasers Products. Parte 1: Equipment Classification and Recommendations. 2 Ed. 2007. Disponível Em: <ww.iec.ch>. Acessado Em 08 De Dezembro De 2015.
28. Barbosa FS. Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2011. Disponível em: <[http://www.peb.ufrj.br/teses/Tese0140\\_2011\\_06\\_29.pdf](http://www.peb.ufrj.br/teses/Tese0140_2011_06_29.pdf)> Acesso em Março de 2020.
29. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 12a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
30. Reinke JM e Sorg H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 2012. 49:35-43.
31. Alves MSI. O cuidado diferenciado da enfermagem com a pele do neonato na unidade de terapia intensiva. *Rev. eletrônica atualiza saúde*. Salvador, v3, n.3, p.92- 100, jan. /jun.2016.
32. Azulay RD, Aazulay DR. A pele: embriologia, estrutura e fisiologia. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 1-10p.
33. Guirro E, Guirro R. Fisioterapia Dermato-Funcional: Fundamentos, Recursos e Patologia. 3a ed. Barueri: Manole, 2004.
34. Fortes TML, Suffredini IB. Avaliação de pele em idoso: revisão da literatura. *J Health Sci Inst*. 2014; 32(1): 94-101p.
35. Goldman L, Bennett JC. Cecil: tratado de medicina interna. 21a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
36. Cucé LC, Neto, CF. Manual de dermatologia. 2a ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
37. Obagi ZE. Restauração e Rejuvenecimento da pele: incluindo classificação básica dos tipos de pele. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.
38. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins e Cotran – Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
39. Mitchell RN, Cotran RS. 2003b, — Cell Injury, Cell Death and Adaptations. In: Kumar, V., Cotran, R. S., Robbins, S. L. (eds), *Robbins Basic Pathology*, 7 ed., chapter 1, Philadelphia, W. B. Saunders.
40. Metsavaht LD. Queimaduras e suas cicatrizes. *Surg Cosmet Dermatol* 2017;9(4):281-4.

41. Azevedo LCP, Taniguchi LU, Ladeira JP. Medicina Intensiva: Abordagem prática. 2ª Edição. São Paulo: Manole, 2015.
42. Leão CES, Andrade ES, Fabrini DS, Oliveira RA, Machado GLB, Gontijo LC. Epidemiology of Burns In Minas Gerais. Rev Bras Cir Plast. 2011; 26(4):573-7.
43. Hermans, Michel H. E. MD. An Introduction to Burn Care. Advances in Skin & Wound Care. 2019.32(1):9-18
44. Montgomery, K. Et Al. The Importance of Mindfulness In Psychosocial Distress And Quality Of Life In Dermatology Patients. British Journal of Dermatology, V. 175, N. 5, P. 930-936, 2016.
45. Lafaiete C. Queimaduras: um problema atemporal e persistente. 2019. Disponível em: <<https://pebmed.com.br>>. Acessado em: 01 de junho 2020.
46. Garcia P et al. Análise do método clínico no diagnóstico diferencial entre queimaduras de espessura parcial e total. Rev Bras Queimaduras. 2011;10(2):42-49.
47. Vale ECS do. Inicial Management of Burns: Approach By Dermatologists. Anais Brasileiros De Dermatologia, 2005; 80(1):9–19.
48. Atiyeh BS, Dibo SA. Non surgical non ablative treatmento faging skin: radiofrequency technologie sbetween aggressive marketing and evidence based efficacy. Aesthetic Plastic Surgery, New York, 2009; 33(3):283-294.
49. Sociedade Brasileira de Queimaduras. Disponível em: <http://www.sbqueimaduras.com.br>. Acesso em 28/01/2020
50. Paggiaro AO e Bertolli E. Queimaduras in Manual de queimaduras – Medcel (Cirurgia Geral). Universidade Católica de Salvador. 2018. 14p.
51. Saldaña LS et al. Insuficiencia Cutânea Aguda. Dermatología Peruana - Revista oficial de la sociedad Peruana de dermatologia. 2002. 12(3).
52. Robbins SL e Contran RS. Fundamentos de Patologia. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 58p.
53. PESSOA AFM. A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos. Tese de doutorado do Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2014.
54. Mandeubalm SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources – Part I. Anais Brasileiro de Dermatologia, Rio de Janeiro, 2003. 78(4):393-410.

55. Ribeiro MAG, Júnior RLCA, Ramalho LMP, Pinheiro ALB, Bomjardim LR, Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2009. 27(1):49-55.
56. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2009. 84(3):257-262.
57. Melo VA, Anjos DCS, Júnior RA, Melo DB, Carvalho FUS. Effect of low level laser on sutured wound healing in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2011. 26(2):129-134.
58. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *Arq Bras Cir Dig*. 2007;20(1):51-8
59. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, Park JS. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2007;48(1):15-24.
60. van der Veen VC, Vlig M, van Milligen FJ, de Vries SI, Middelkoop E, Ulrich MMW. Stem Cells in Burn Eschar. *Cell Transplant*. 2012.21(5):933
61. Ferreira CM et al. Cicatrizes hipertróficas e quelóides. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást*. 2006; 21(1): 40-8
62. Torres FC et al. Stem Cells from the Fat Tissue of Rabbits: An Easy-To-Find Experimental Source. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2007;31:574-578.
63. Sullivan MO. et al. Comparison of mesenchymal stem cell surface markers from bone marrow aspirates and adipose stromal vascular fraction sites. *Frontiers in Veterinary Science*. 2016, 82(2).
64. Riccobono, D., Agay, D., Scherthan, H., Forcheron, F., Vivier, M., Ballester Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics*. 2012;103(2):120-6
65. Shawn Loder BA. Fat and Adipose Derived Stem Cell Isografts. *J Burn Care Res*. 2015; 36(1): 70–76.
66. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
67. Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyc C, Brehm W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J*. 2013;195:98-106
68. Inácio JC. Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Médica da Universidade Estadual Paulista. 2011

69. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, *et al*: Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng.* 2007; 13: 111-121.
70. Pacheco Ka, Tarkowski M, Klemm J, Rosenwasser Lj. Cd49d Expression And Function On Allergen-Stimulated T Cells From Blood And Airway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998 Feb;18(2):286-93.
71. Mitterberger Mc. Et Al. Dlk1(Pref1) Is A Negative Regulator of Adipogenesis In Cd105 +/Cd90 +/Cd34 +/Cd31 -/Fabp4 - Adipose-Derived Stromal Cells from Subcutaneous Abdominal Fat Pats Of Adult Women. *Stem Cell Research.* 2012;9: 35–48.
72. Yoo G E Lim Sj. Effects on Adipose Derived Stromal Cells and of Their Extract In Wound Healing Mouse Model. *J Korean Med Sci.* 2010;25(5):746-51.
73. Higuchi A. Et Al. A Hybrid-Membrane Migration Method to Isolate High-Purity Adipose-Derived Stem Cells from Fat Tissues. *Scientific Reports,* 2015; 5.
74. Álvarez-Viejo, M.; Menéndez-Menéndez, Y.; Otero-Hernández, J. Cd271 As A Marker to Identify Mesenchymal Stem Cells from Diverse Sources Before Culture. *World J Stem Cells.* V.7, N.2, P.470-476, 2015
75. Cavalcanti Mfxb, Et Al. Evaluation of The Proliferative Effects Induced by Low-Level Laser Therapy in Bone Marrow Stem Cell Culture. *Photomedicine And Laser Surgery,* 2015; 33(12).
76. Bjordal Jm, Couppé C, Chow Rt, Tunér J, Ljunggren Ea. A Systematic Review Of Low Level Laser Therapy With Location-Specific Doses For Pain From Chronic Joint Disorders. *Australian Journal Of Physiotherapy.* 2003;49(2):107-16.
77. Oliveira RA, Matos AF, Barros NRB, Fernandes GA, Lima ACG, Nicolau RA. Low-intensity laser therapy and led (light emitting diode) therapy in mechanical resistance of *Rattus norvegicus* chest incision with implant of steel wire for sternal suture. *Brazilian Journal of Biomedical Engineering.* 2013; 29(2):166-174.
78. Cavalcanti TM, Almeida-Barros RQ, Catão MHCV, Feitosa APA, Lins RDAU. Conhecimento das propriedades físicas e da interação do laser com os tecidos biológicos na odontologia. *Anais Brasileiro de Dermatologia.* 2011. 86(5):955-960.
79. Almeida-Lopes L, Massini RJ. *Laserterapia - Conceitos e Aplicações.* CD room. São Carlos: NUPEN/DMC, 2002.
80. Tarasov,L. *Laser Physics and Applications.* English Translation, MIR Publishers, 1986.

81. Fukuda TY, Jesus JF, Santos MG, Junior CC, Tanji MM, Plapler H. Aferição dos equipamentos de laser de baixa intensidade. *Revista Brasileira de Fisioterapia*,2010.14(4):303-308.
82. Ferraresi C, dos Santos R, Marques G et Al. Light Emitting Diode Therapy (Ledt) Before Matches Prevents Increase In Creatine Kinase With A Light Dose Response In Volleyball Players. *Lasers In Medical Science*. 2015; 30(4):1281-1287.
83. Lopes JC, Pereira LP, Bacelar IA. laser de baixa potência na estética-revisão de literatura. *Revista saúde em Foco*. 2018. 10:429-37
84. Santuzzi Ch, Buss Hf, Pedrosa Df, Freire Movm, Nogueira Bv, Gonçalves Wls. Uso Combinado Da Laserterapia De Baixa Potência E Dainibição Da Ciclooxygenase-2 Na Reepitelização De Ferida Incisional Em Pele De Camundongos: Um Estudo Pré-Clínico. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):278-83.
85. Andrade Fssd, Clark Rmo, Ferreira Ml. Efeitos Da Laserterapia De Baixa Potência Na Cicatrização De Feridas Cutâneas. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2014; 41(2):129-133.
86. Freitas Acc Et Al. Chemotherapy-Induced Oral Mucositis: Effect Of Led And Laser Phototherapy Treatment Protocols. *Photomedicine And Laser Surgery*. 2014;32(2).
87. Pinheiro ALB, Brugnera Júnior A, Zanin FAA. *Aplicação Do Laser Na Odontologia*. São Paulo: Santos Editora Ltda., 2010.
88. Pereira MCMC, Pinho CB, Medrado ARP, Andrade ZA, Reis SRA. Influence of 670 nm low-level laser therapy on mast cells and vascular response of cutaneous injuries. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2010. 98:188–192.
89. Gupta A Et Al. Superpulsed (Ga-As, 904 Nm) Low-Level Laser Therapy (Lllt) Attenuates Inflammatory Response And Enhances Healing Of Burn Wounds. *Journal Of Biophotonics, J Biophotonics*. 2015;8(6):489-501.
90. Catarino Hr Et Al. Ingap 670-Nm Laser Therapy Combined With A Hydroalcoholic Extract Of *Solidago Chilensis* Meyen In Burn Injuries. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(3):1069-79.
91. Trajano Et Et Al. Low-Level Red Laser Improves Healing Of Second-Degree Burn When Applied During Proliferative Phase. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(4):1297-304.
92. Brassolatti P et al. Comparative Effects of Two Different Doses of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing Third-Degree Burns in Rats. *Microscopy Research and Technique*. 2016. 79:313–320.

93. Ribeiro G, Silva MAG, Borges VP, Lacerda Neto JC. Associação fitoterápica no tratamento de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2013.65(5):1427-1433.
94. Meyer PF, Araújo HG, Carvalho MGF et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. *Fisioterapia Brasil*. 2010. 11(6):428-432.
95. Busnardo VL, Biondo-Simoes MLP. Os efeitos do laser hélio-neônio de baixa intensidade na cicatrização de lesões cutâneas induzidas em ratos. *Rev. bras. fisioter.*, São Carlos. 2010. 14(1):45-51.
96. Abrahamse H. Regenerative Medicine, Stemcells, And Low-Level Laser Therapy: Future Directives. *Photomedicine And Laser Surgery*. 2012; 30(12):681-682.
97. Giannelli M. et al. Photoactivation Of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells With Diode Laser: Effects And Mechanisms Of Action. *Journal Of Cell Physiology*. 2013; 228:172-181.
98. Silveira PC et al. Effects Of Low-Power Laser Irradiation (Lpli) At Different Wavelengths And Doses On Oxidative Stress And Fibrogenesis Parameters In An Animal Model Of Wound Healing. 2011; 26(1):125-31.
99. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*, 2017. (4):337-361.
100. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2019.194:174-182.
101. Mosca RC, Ong AA, Albasha O, Bass K, Arany P. Photobiomodulation therapy for wound care: a potent, noninvasive, photoceutical approach. *Advances in Skin & Wound Care*. 2019. (32):157-167.
102. Garcez AS, Ribeiro MS, Nunez SC. *Laserterapia de baixa Potência: princípios básicos e aplicações clínicas em odontologia*. São Paulo: Elsevier, 2012.
103. Carvalho PTC, Mazzer N, Siqueira JF, Ferreira VJ, Slva IS. Análise de fibras colágenas através da morfometria computadorizada em feridas cutâneas de ratos submetidos à irradiação do laser HeNe. *Fisoter Bras*. 2003;4(4):253-8
104. Pugliese LS, Medrado AP, Reis SR, Andrade ZA. The influence of low-level laser therapy on biomodulation of collagen and elastic fibers. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17(4):307-13.
105. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017.(4): 337-361.

106. Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):307-13
107. Kim Ws, Park Bs, Sung Jh, Yang Jm, Park Sb, Kwak Sj, Park Js. Wound Healing Effect of Adipose-Derived Stem Cells: A Critical Role Of Secretory Factors On Human Dermal Fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24.
108. De Villiers J; Houred Nn; Abrahamse H. Influence Of Low Intensity Laser Irradiation On Isolated Human Adipose Derived Stem Cells Over 72 Hours And Their Differentiation Potential Into Smooth Muscle Cells Using Re-Tinoic Acid. *Stem Cell Revision.* 2011; 7:869–882.
109. 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, 2014.
110. Arda, Mehmet Surhan Et Al. A New Apparatus For Standardization Of Experimental Burn Models. *Burns*, V. 43, N. 6, P. 1322-1329, 2017.
111. Wen, Jie et Al. An Advanced Mouse Model For Human Skin Wound Healing. *Experimental Dermatology*, V. 26, N. 5, P. 433-435, 2017.
112. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR., 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295 (3) L379-L399.

1 **CAPÍTULO 2 – ARTIGO 1 - EVALUATION OF THE EFFECTS OF**  
2 **PHOTOBIMODULATION OF LOW-LEVEL LASER ON TOTAL THICKNESS**  
3 **BURN INDUCED IN ANIMAL MODEL**

4

5 **Title: Evaluation of the Effects of Photobiomodulation of Low-Level Laser on Total**  
6 **Thickness Burn Induced in Animal Model**

7

8 **Authors:**

9 Maisa Ribeiro<sup>1</sup>

10 Mathias Rezende Macedo<sup>2</sup>

11 Gustavo Albertini de Souza<sup>2</sup>

12 Francisco Inácio de Assis Neto<sup>2</sup>

13 Kamylla Caroline Santos<sup>3</sup>

14 Marcelo Monteiro de Castro Almeida<sup>4</sup>

15 Gustavo Henrique Marques Araujo<sup>5</sup>

16 Júlia de Miranda Moraes<sup>6</sup>

17 Valcinir Aloísio Scalla Vulcani<sup>5</sup>

18

19 Correspondence author:

20 Maisa Ribeiro

21 Email address: [maisaribeiro22@outlook.com](mailto:maisaribeiro22@outlook.com)

22 Phone: +55 64 99988-5208

23 School of Veterinary and Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás,  
24 Brazil.

25

26 **Declaration of conflicting interests:**

27 M.R. has received research grants through National Council for Scientific and Technological  
28 Development (CNPq) scholarship from Brazil.

1. PhD student in Animal Science, School of Veterinary and Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.
2. Medical Student, Health Sciences Academic Unit, Federal University of Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.
3. Master student in Animal Bioscience, Federal University of Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.
4. Medical Student, Health Sciences Academic Unit, University Center of Mineiros, Mineiros, Goiás, Brazil.
5. Adjunct Professor, Veterinary Medicine Course, Agricultivol Sciences Academic Unit, Federal University of Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.
6. Adjunct Professor, Medical Course, Health Sciences Academic Unit, Federal University of Jataí, Jataí, Goiás, Brazil.

29 **Précis:**

30 Low-level laser photobiomodulation in the skin burn healing reduced the time of wound  
31 repair, increased angiogenesis, deposition, and maturation of collagen, besides promoting  
32 better remodeling of the extracellular matrix.

33 **Abstract**

34 INTRODUCTION: Burns is a significant cause of morbidity and mortality. These lesions  
35 repair process can be accelerated and amplified by mechanisms such as low-level laser  
36 photobiomodulation (LLL). This work's objective was to evaluate the possible advantages of  
37 LLL in burns induced in animal model. MATERIALS AND METHODS: 40 Wistar rats were  
38 used, divided into a control group (GC=20) and a laser-treated group (LLL=20). Burns was  
39 induced on the back of each animal, with subsequent surgical debridement. The LLL group  
40 was treated with a laser at a wavelength of 660 nm, 27 mW power, and an average irradiance  
41 of 0.954 W/cm<sup>2</sup> in five points of the wound, under total fluency of 350 Joules/cm<sup>2</sup> and total  
42 application of 5 Joules. Macroscopic and histopathological analyses were performed  
43 according to biopsies collected on days 3, 7, 15, and 21 post-lesion, processed and stained by  
44 Hematoxylin and Eosin (HE), Gomori's trichrome (TG) and Picrosirius red techniques.  
45 Statistical analysis was performed using Tukey's Test and Analysis of Variance (ANOVA),  
46 Kruskal-Wallis Test (non-parametric) and T-Paired Test. For all analyses, a significance level  
47 of 5% (p<0.05) was used. RESULTS: There was a relative statistical difference in  
48 morphometry between the GC and LLL groups. Histopathological analysis showed  
49 improvement in the occurrence of inflammatory infiltration, angiogenesis, granulation tissue,  
50 and collagen deposition, presence of fibroblasts, matrix organization, and reepithelialization.  
51 CONCLUSION: Low-level laser photobiomodulation is a mechanism that can make the  
52 wound repair process more efficient.

53

54 **Keywords:** healing; photobiomodulation; laser therapy; regenerative medicine.

55

## 56 **1 Introduction**

57           The lesions caused by a total thickness burn are considered a severe form of damage to  
58 biological tissue that can destroy various structures and layers of the skin and may affect  
59 adjacent tissues, causing local and systemic damage to the organism<sup>1</sup>. According to an  
60 estimate made by the Brazilian Society of Burns, millions of burns occur annually in the  
61 country, with about 40.000 of those requiring hospitalization.<sup>2-5</sup>

62           These wounds healing process has complex physiological mechanisms and involves  
63 the inflammation, proliferation, and cell maturation phases. Each stage has specific  
64 characteristics that are fundamental to the tissue repair process's progress and allows  
65 differentiating them<sup>6</sup>. However, these mechanisms can suffer deregulation that results in  
66 sequels, resulting in a high prevalence of morbidity after injury, functional disability and  
67 esthetic damage in patients with severe burns.<sup>1,3,5,7</sup>

68           Conventional treatment for third-degree burn wounds only aims to prevent infectious  
69 processes and remove necrotic tissues. However, to accelerate the tissue repair process,  
70 increase its effectiveness and avoid possible sequel, several strategies are being developed, as,  
71 for example, photobiomodulation with low level laser (LLL)<sup>5,8,9</sup>.

72           The biomodulatory effect of LLL can be observed mainly in the inflammatory phase.  
73 Still, it also positively impacts the late phase, accelerating the healing process in skin lesions.  
74 Several studies show that laser radiation reduces the proliferation of lymphocytes, decreases  
75 the number of mast cells, increases angiogenesis, facilitates the differentiation of  
76 myofibroblasts, and increases the proliferation of epithelial cells and the collagen synthesis,  
77 accelerating the healing process<sup>10-13</sup>. The photostimulation action mechanisms caused by LLL  
78 occur through the activation of complex events in the plasma membrane, mitochondria, and  
79 cell nucleus<sup>14</sup>. The LLL's consistent light promotes action on prostaglandins (PG) by  
80 changing the intracapillary hydrostatic pressure and thus improving the absorption of  
81 interstitial fluids with a 54% reduction in edema volume increase<sup>15</sup>. Besides, LLL generates  
82 an increase in vasodilation, which facilitates the migration of neutrophils and monocytes,  
83 generating reabsorption of fibrinous exudate produced by basal epithelialization, increasing  
84 cell rate division<sup>16</sup>.

85           The photoelectric effect of the laser also contributes to the normalization of ion  
86 mobility in cells. It indirectly stimulates the increase in the synthesis of adenosine  
87 triphosphate (ATP), favoring the reestablishment of cell balance and vitality and the  
88 reorganization of its functions, due to the replacement of lost organic energy<sup>17</sup>. The  
89 increments of mitochondrial ATP produced after irradiation promotes many events that

90 interfere with cell metabolism<sup>18</sup>. Furthermore, LLL blocks the transmission of the painful  
91 stimulus between the nerve fibers and the healing activity, increasing angiogenesis,  
92 decreasing the polymorphonuclear infiltrate, and bleeding.<sup>19,20</sup>.

93 In this sense, the present study aimed to evaluate low-level laser interference in the  
94 inflammatory phases, proliferation, and collagen synthesis during the healing of skin wounds  
95 by the full-thickness burn in rats.

96

## 97 **2 Materials and methods**

98

### 99 **2.1 Animals and experiment location**

100 The experiment was conducted at the Morphofunctional Laboratory of the Medical  
101 Course at the Federal University of Jataí and at the Vivarium of the University Center of  
102 Mineiros (UNIFIMES, Mineiros-GO). The project was submitted to the Ethics Committee on  
103 the use of animals at the Federal University of Goiás (CEUA-UFG), approved by protocol  
104 087/2016. Forty healthy female Wistar rats (*Ratus norvegicus albinus*), weighing between  
105 300 and 350 grams, with three animals per cage, fed with food and water *ad libitum* was used.  
106 Bed changes were made two or three times a week, using autoclaved shavings.

107 The experimental design was completely randomized, with two groups, four biopsy  
108 moments (3, 7, 14, and 21 days post-lesion) and five repetitions, being: control group (CG -  
109 n=20) and low-level laser group (LLL - n=20), with the application of LLL in lesions.

110

### 111 **2.2 Animal handling and induction of lesions**

112 Pre-anesthetic agent Diazepam at a dose of 2.5 to 5 mg/kg intraperitoneally was used  
113 to reduce stress due to animal containment and handling according to Kawano et al.<sup>21</sup> Then,  
114 the skin wounds were induced by the process of the third-degree thermal lesion by immersing  
115 the dorsal region in the water at 95°C for 14 seconds. For this purpose, two 5ml syringes were  
116 used transversely coupled by a two-outlet tap forming, with the tube of one of the syringes,  
117 the opening with 1cm<sup>2</sup> at one end, the other end is used to inject hot water. After the  
118 procedures, Tramadol (0.3 mg/kg) was used subcutaneously as an analgesic agent, every 12  
119 hours, for three days, being replaced by Tramadol (1-2 mg/mL) in the water of the animals for  
120 four more days. The animals were handled in a room separate from the place where they were  
121 kept to avoid fear or anxiety, and during all procedures, saline solution was applied, and the  
122 eyeball was occluded with moistened cotton to prevent dry eyes. The day after the induction  
123 of lesions, surgical debridement was performed in all animals, removing necrotic tissue in the

124 entire area of the lesion. At the end of this procedure, an occlusive adhesive dressing  
125 (Tegaderm™) was used on the wound.

126

## 127 **2.2 Low-level laser application**

128 For LLL applications, a Photon Laser III laser device (DMC Equipamentos) was used,  
129 with a wavelength of 660 nm, with 27 mW of useful optical power and an average irradiance  
130 of 0.954 W/cm<sup>2</sup>. The applications were punctually applied in four equidistant points of 1 cm  
131 on the edge of the lesions and an application in the central bed of the wound. The LLL  
132 fluency at the edges was 70 Joules/cm<sup>2</sup> (per point), and the LLL fluency at the wound bed was  
133 35 Joules/cm<sup>2</sup>. With the standardization of these parameters, the time of application of LLL in  
134 the bed of each wound was 10 seconds; the time of application of LLL at each point of the  
135 wound edge was 10 seconds; the energy deposited on the bed and at each point on the edge of  
136 each wound was 1 Joule; the total energy deposited in each wound was 5 Joules, and the total  
137 fluency deposited by the wound was 350 Joules/cm<sup>2</sup>. LLL applications were performed daily,  
138 starting 24 hours after lesion induction until the period defined by the biopsy time of 3, 7, 14,  
139 and 21 days post-lesion.

140

## 141 **2.3 Macroscopic analysis of lesions**

142 On the same days of LLL applications, the lesions were assessed macroscopically for  
143 inflammation, necrosis, granulation tissue formation, degree of epithelium formation and scar  
144 evolution and recorded on a digital machine attached to support positioned 20 cm away from  
145 the lesion, according to Lamaro et al. (2019)<sup>1</sup>. Macroscopic images to measure wound area  
146 were analyzed with the semi-automatic software Image Processing and Analysis in Java,  
147 version 1.44 (Image J, NIH, USA).

148

## 149 **2.4 Biopsies and microscopic Analysis**

150 The groups were submitted to four biopsy moments: 3, 7, 15, and 21 days after lesion  
151 induction. After this period, the animal was anesthetized with a 0.01 mL/g solution of 10%  
152 ketamine and 2% xylazine, applied intraperitoneally, and trichotomy of an area of 3 cm<sup>2</sup> was  
153 performed on the dorsal region, and the tissue was removed from the lesion place. The  
154 collected fragments were processed and stained using Hematoxylin and Eosin (HE), Gomori's  
155 Trichrome (TG) and Picrosirius red techniques. The slides stained with HE were evaluated for  
156 the intensity of vascular and fibroblast proliferation, degree of tissue necrosis, the formation  
157 of crust, edema, type and intensity of cell infiltrate (polymorphonuclear or mononuclear), the

158 formation of epithelium (evaluated for the extent and thickness of the epithelial layer and  
159 keratinization), the formation of granulation tissue with the reorganization of the extracellular  
160 matrix of the dermis and the presence of hair follicles and sebaceous glands. The slides  
161 submitted to TG staining were analyzed under optical microscopy for the presence and/or  
162 absence of collagen in blue staining, with the formation of granulation tissue and the  
163 reorganization of the extracellular matrix of the dermis, differentiation of the superficial  
164 dermis (loose connective tissue with light blue color) and deep (dense connective tissue not  
165 modeled with dark blue color) and the presence of hair follicles and sebaceous glands. For the  
166 microscopic parameters of HE and TG, scores from zero to four were established, being:  
167 score 0 (absent); score 1 (up to 25% of the fragment); score 2 (between 25 and 50% of the  
168 fragment); score 3 (between 50% and 75% of the fragment); and score 4 (from 75% to 100%  
169 of the fragment). The results of the measurements were expressed in numerical values for  
170 statistical analysis of the data.

171 The slides submitted to picosirius red staining were analyzed and photomicrographed  
172 under polarized light microscopy in an objective of 20X, as to the density of collagen stained  
173 by the area marked in green (type III collagen) or reddish-yellow (type I collagen). The  
174 photomicrographs obtained were analyzed by optical color density and converted into pixels,  
175 using the semi-automatic software Image J, version 1.44 (NIH, EUA).

176

## 177 **2.5 Statistical analysis**

178 Tukey's test and analysis of variance (ANOVA) were used to analyze the  
179 morphometry of the lesions. For the analysis of HE histopathological variables, the Kruskal-  
180 Wallis test (non-parametric) was used. The histopathological variables of TG and picosirius  
181 red were analyzed together, using the Tukey-Anova Test and the T-Paired Test. For all  
182 analyzes, a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was used with the Sigma Stat 2.3 software  
183 Statistic.

184

## 185 **3 Results**

186 Regarding the morphometric analyses of the lesions (Table 1), in the control group,  
187 the statistical analyses showed an important reduction ( $p < 0.001$ ) in the size of the wounds after  
188 15 days. In the LLL, this reduction can already be seen in seven days. When the two groups  
189 were compared, an important difference was observed at seven days. This difference can be  
190 demonstrated by the analysis of macroscopic photos (Figure 1). This demonstrates a marked

191 reduction, in a shorter period, of the size of the wounds in the treated group compared to the  
192 control.

193 Through histopathological analysis with HE (Table 2), it was possible to observe  
194 significant differences regarding the evolution of the healing process. Regarding necrosis,  
195 there was no difference between groups. Both showed a significant reduction in the necrotic  
196 process up to 7 days, and absent at 15 days. Similar results were found in the evaluation of  
197 hemorrhage and edema. However, it is highlighted that the average scores for edema were  
198 higher in the GC than in the LLL, although the statistical analysis did not show significant  
199 differences. The evaluation of the crust did not result in a significant difference between the  
200 groups, despite the formation and permanence of crusts in the GC compared to the LLL.

201 Regarding mononuclear and polymorphonuclear inflammatory infiltrates, no  
202 significant difference was found between the groups. In the polymorphonuclear infiltrate, a  
203 progressive reduction in the number of cells was observed in all groups. It is noteworthy that  
204 the reduction in the treated group was more pronounced, although there was no significant  
205 difference. With the mononuclear infiltrate, it was observed maintenance of the cellular  
206 quantity up to 15 days, with reduction at 21 days for the GC, and reduction from 15 days for  
207 the LLL

208 As for the assessment of angiogenesis, there was an increase in the formation of new  
209 vessels until the 7th day, more evident in the LLL group and a decrease after the 15th day.  
210 There was a progressive increase in granulation tissue in both groups; however, it is observed  
211 that the formation of this tissue was accelerated in the treated group. It is noteworthy in this  
212 respect that a score of 4 was assigned to the LLL at 15 days, while for the GC; a score of 2.4  
213 was assigned at 15 days and 3.25 at 21 days.

214 Similarly, the pattern of occurrence of fibroblasts in the lesions was observed, with a  
215 greater number of cells after the 7th day of the lesion and a greater amount in the LLL group.  
216 Next, the formation of epithelium was observed from the 7th day in both groups, however,  
217 with greater layer thickness and extension of the epithelium in the LLL groups compared to  
218 the controls, significance was observed in the groups of 3 days compared to the groups of 15  
219 and 21 days of the treated group.

220 Figure 2 shows histological photomicrographs of both groups that can be observed in  
221 3 and 7 days. In them, an important difference can be observed between the two groups at 7  
222 days. In E and F, the group treated with laser is observed at 7 days, and in D, the control  
223 group is observed at 7 days. The application of therapy promoted greater angiogenesis, greater  
224 infiltration of mononuclear cells, and fibroblasts, in addition to promoting greater deposition

225 of the extracellular matrix. These results show that laser-treated wounds are at a more  
226 advanced stage of the tissue repair process, compared to the control group.

227 In Figure 3, A and B are photomicrographs of the lesions in the control group at 15  
228 days, while C and D are in the treated group at 15 days. Comparing the images, a greater  
229 organization of the dermis is observed in the treated group, with the beginning of the  
230 separation of the superficial and deep dermis indicated by the asterisk. The results at 21 days,  
231 indicated by the control group in E and treated in F, also corroborate the previous results. The  
232 treated group has greater tissue organization, in addition to a greater amount of hair follicles  
233 than the control group, showing that the repair process was faster and more efficient with the  
234 intervention.

235 Regarding the analysis of slides submitted to the Gomori Trichrome staining  
236 technique, there were differences between the Laser Group (LLL) and the Control Group  
237 (GC). Samples from the 3rd day after lesion induction showed improvement in the tissue  
238 repair process in the LLL group compared to the GC, with a slight increase in collagen  
239 deposition and a greater presence of fibroblasts (Figure 4). There was no difference between  
240 the averages of the 5 samples of each group regarding the microscopic parameters of  
241 granulation tissue and organization of the extracellular matrix, both as a result of score 1,  
242 however, the analysis of fibroblasts showed an increase from 1.2 in GC to 2.2 in the LLL as  
243 shown in Table 3 and Figure 5.

244 As for the 7th day after the lesion (Table 3), there was an increase in the average of the  
245 5 samples, with a score 2 in GC to 2.8 in LLL in the formation of granulation tissue, an  
246 increase from 1 in GC to 1.2 in LLL in the organization of the extracellular matrix and  
247 increase from 1.8 in GC to 3.2 in LLL in the presence of fibroblasts. It is possible to observe a  
248 better organization of the connective tissue of the dermis (Figure 6). There was no significant  
249 difference ( $p > 0.05$ ) in the statistical analysis between the groups on days 3 and 7 of the  
250 Tukey-Anova Test and the T-Paired Test.

251 Regarding the 15th day after the lesion, still, from the perspective of Gomori's  
252 Trichrome stain, it was possible to observe (Table 3 and Figure 5) that there was a difference  
253 in the formation of granulation tissue, with a moderate formation in the GC (2.4) and the LLL  
254 group a diffuse formation (4). Regarding the matrix organization, a great difference was noted  
255 between the groups, with a mild/moderate organization in the GC (1.6) and in the LLL group  
256 a marked organization (3.4) resembling more the normal superficial and deep dermis. The  
257 presence of fibroblasts between the groups was not so discrepant, with an important presence  
258 of such cells both in the GC (3) and in the LLL group (3.4), but with greater intensity in the

259 LLL group. However, despite the histological difference, there was no statistical difference  
260 ( $p>0.05$ ) when comparing data between groups and days.

261       Regarding the 21 days, it was observed (Table 3 and Figure 5) the intense formation of  
262 granulation tissue in the GC (3.25) with the maintenance of the diffuse form of the LLL group  
263 (4). The matrix organization was assessed as intense in the GC (3) and intense/diffuse in the  
264 LLL group (3.6), as well as the presence of fibroblasts in the GC (3) and the LLL group (3.6).  
265 However, despite the histological difference, there was no statistical difference ( $p>0.05$ ) when  
266 comparing data between groups and days using the Tukey-Anova Test and the T-Paired Test.  
267 Histopathological images referring to these groups can be seen in Figures 7 and 8.

268       From the perspective of microscopic analysis of polarized light from samples  
269 submitted to Picrosirius red staining, a quantitative measurement of the amount of collagen in  
270 pixels was performed, as seen in Table 4 and Figure 9. There was a decrease in the means  
271 between the five samples from 235.73 pixels in GC to 155.746 in LLL on the 3rd day after the  
272 lesion. On the 7th day, there was a smaller decrease from 157.44 in GC to 154.39 pixels in  
273 LLL, showing less presence of type III collagen and greater maturation of the matrix with  
274 more type I collagen. There was no significant difference ( $p>0.05$ ) in the statistical analysis  
275 between the groups on days 3 and 7 in the Tukey-Anova Test and the T-Paired Test. By  
276 analyzing samples from the 15th day, it was possible to observe in the GC an average of  
277 178.018 pixels and in the LLL group an average of 213.154. On the 21st day, an average of  
278 145.484 pixels was noted in the GC and the LLL group, an average of 153.207 pixels.  
279 However, there was no statistical difference when comparing data between groups and days.

280

#### 281 **4 Discussion**

282       The mechanisms involved in the photobiomodulatory effects are still being studied.  
283 The absorption of wavelengths by mitochondrial enzymes, such as cytochrome C oxidase  
284 (CCO), is one of the best-described mechanisms. The CCO stimulus increases the production  
285 of ATP and reactive oxygen species (ROS) in cells. With this, there is cell signaling for  
286 activation of different biochemical pathways, which stimulate protein synthesis, enzymatic  
287 activation, and cell proliferation<sup>20</sup>.

288       Some studies show that the photobiomodulatory effects also regulate cell membrane  
289 ion channels and stimulate the synthesis of cytokines, such as TGF- $\beta$ <sup>20</sup>. The activation of  
290 these diverse mechanisms promotes cell proliferation, endothelial migration, which results in  
291 greater angiogenesis, immunomodulation, increases matrix deposition by fibroblasts, and  
292 accelerates the contraction of wounds<sup>20</sup>.

293 In the morphometric analysis of this study, it is observed, especially when observed on  
294 the 7th day, a more accelerated contraction of the wounds in the treated group when compared  
295 to the control group. When looking at Figure 1, there is an important difference in the sizes of  
296 the lesions on the 7th day. While in the GC, there was little reduction in the wound compared  
297 to the 3-day group, in the LLL, there is a marked contraction of the wound size. Gupta et al<sup>22</sup>  
298 found similar results, reporting a 50% difference in lesion contraction.

299 Both groups were histologically evaluated by three slide staining methods,  
300 Hematoxylin and Eosin (HE), Gomori's Trichrome and Picrosirius red. The latter two better  
301 observe the deposition and maturation of collagen and organization of the extracellular  
302 matrix. One of the first aspects evaluated was necrosis, which shows that cell death occurred  
303 after the burns. No statistically significant difference was observed between the two groups at  
304 any time during the study. This allows us to conclude that the therapy, despite not reducing  
305 tissue necrosis, but did not aggravate it. With the evolution of the process of repair and  
306 formation of granulation tissue, there was a reduction of dead cells and replacement with new  
307 ones.

308 The formation of crust and edema is influenced by exudative cellular processes.  
309 Histologically, a greater formation of crust and edema was observed in the control group.  
310 They are indicating that the LLL reduces the exudative cellular processes. Greater  
311 angiogenesis was also observed in the treated group, which allows greater tissue drainage and,  
312 consequently, greater reduction of edema.

313 A greater polymorphonuclear infiltrate was observed in the treated group in the three-  
314 day analysis. This indicates a more severe inflammatory phase. The inflammatory phase is  
315 important for tissue cleaning, phagocytosing dead cells, damaged matrix and pathogens, and  
316 foreign bodies that contaminate the wound. Thus, a greater polymorphonuclear infiltrate in  
317 the treated group allows the creation of a microenvironment that promotes the proliferative  
318 phase more quickly.<sup>7</sup>

319 So, a marked reduction in polymorphonuclear cells early in the treated group is  
320 normal, as well as the presence of mononuclear infiltrate earlier when compared to the control  
321 groups. This fact shows that the immunomodulatory effects allow accelerating the tissue  
322 repair process, promoting a more intense initial inflammatory phase and the late inflammatory  
323 phase and the repair phase before expected.

324 These results were also described by Gupta et al<sup>22</sup> and Jin et al<sup>23</sup>, in their works, after  
325 the application of LLL, there was a reduction in the local inflammatory process. Several

326 authors point to the reduction of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-8, as a  
327 possible mechanism for a more favorable inflammatory profile for tissue repair.<sup>1,9,22,23</sup>

328 The presence of more growth factors and cytokines, such as VEGF, induced by  
329 therapy, would also justify the occurrence of a more intense and faster reepithelization in the  
330 treated group.<sup>1,9,24</sup> Greater proliferation of fibroblasts and angiogenesis was also observed in  
331 groups receiving laser therapy. One with greater angiogenesis allows better nutrition and  
332 oxygenation to the tissue, in addition to allowing more cells to be recruited to the place. A  
333 greater number of cells, especially macrophages and fibroblasts, which act directly in the  
334 production and remodeling of the extracellular matrix, accelerate the wound closure and  
335 ensures better organization of tissue architecture.<sup>1,5,7</sup>

336 The treated group showed a higher collagen deposition rate on days 3 and 7. As also  
337 reported by Fiório et al<sup>25</sup>. There was less deposition of type III collagen and a greater presence  
338 of type I collagen in the treated group, which shows an earlier tissue maturation process in  
339 this group.

340 Through Gomori's trichrome staining, a greater formation of granulation tissue and  
341 extracellular matrix organization was observed histologically at 15 days after induction of  
342 burns in the treated groups, compared to the control groups. This histological description  
343 shows that the tissue organization happened more quickly due to the therapy. Besides, by  
344 staining with Picrosirius red, it was possible to observe collagen maturation in both groups. It  
345 was observed over time that in the treated group, there was a much more accelerated  
346 maturation for type I collagen than in the control group.

347 In a systematic review of 17 studies, Ocon et al<sup>5</sup> evaluated the effects of  
348 photobiomodulation on third-degree burns in animal models. In this review, the authors  
349 concluded that there is a beneficial effect of photobiomodulation on burns. However, they  
350 point out that there are divergences in the results. This can occur due to methodological  
351 impasses, such as ideal laser power and wavelength, application regime, and the types of  
352 analysis performed.

353 As noted, the use of LLL promotes benefits for the wound healing process, speeding it  
354 up, reducing complications, and making it more efficient. Clinically, these benefits can reduce  
355 time and costs with the treatment of these lesions, in addition to ensuring a better quality of  
356 life for patients. Also, likely, this therapy will not have systemic repercussions because its  
357 effects are specific to the place of use. Thus, there is a reduction in contraindications to  
358 therapy and a greater possibility of patients accessing the LLL. It is necessary to conduct  
359 clinical trials that prove and standardize the use of low-level laser in humans.

360 As limitations of the study, the authors recognize that impasses regarding the best  
361 wavelength, laser power, and physical properties still require further studies for  
362 standardization. In this way, it will be possible to understand which modulation of the  
363 characteristics of the light will be more efficient for the objective. In addition, the form of  
364 statistical analysis of biopsies may have contributed to a little statistically significant  
365 difference between groups.

366

## 367 **5 Conclusion**

368 This study concluded that the use of low-level laser photobiomodulation in the main  
369 phases of the skin burn healing process reduced the time of wound repair, increased  
370 angiogenesis, deposition, and maturation of collagen, besides promoting better remodeling of  
371 the extracellular matrix. In this way, the low-level laser improved the macro and microscopic  
372 aspects of the lesions. Further studies are needed to standardize the technique with different  
373 protocols and their effects.

### Bibliographic references

1. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM, et al. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2019;194:174-182.  
doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.04.003
2. Andrade AG, De Lima CF, Karlla A, De Albuquerque B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica Effects of the therapeutic laser on the wound healing of burns: a bibliographic re. *Rev Bras Queimaduras.* 2010;9(1):21-30.
3. Alsharnoubi J, Shoukry KES, Fawzy MW, Mohamed O. Evaluation of scars in children after treatment with low-level laser. *Lasers Med Sci.* 2018;33(9):1991-1995.  
doi:10.1007/s10103-018-2572-z.
4. Oliveira RA, Boson LLB, Portela SMM, Filho ALMM, de Oliveira Santiago D. Low-intensity LED therapy (658 nm) on burn healing: a series of cases. *Lasers Med Sci.* 2018;33(4):729-735. doi:10.1007/s10103-017-2399-z.
5. Ocon CA, dos Santos SA, Caires JR, et al. Effects and parameters of the photobiomodulation in experimental models of third-degree burn: systematic review. *Lasers Med Sci.* 2019;34(3):637-648. doi:10.1007/s10103-018-2633-3.
6. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(7 SUPPL.). doi:10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2
7. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. Vol 37.; 2009.

8. Fu X, Dong J, Wang S, Yan M, Yao M. Advances in the treatment of traumatic scars with laser, intense pulsed light, radiofrequency, and ultrasound. *Burn Trauma*. 2019;7. doi:10.1186/s41038-018-0141-0
9. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation. *AIMS Biophys*. 2017;4(3):337-361. doi:10.3934/biophy.2017.3.337
10. Bjordal Jm, Couppé C, Chow Rt, Tunér J, Ljunggren Ea. A Systematic Review Of Low Level Laser Therapy With Location-Specific Doses For Pain From Chronic Joint Disorders. *Australian Journal Of Physiotherapy*. 2003;49(2):107-16.
11. Ferraresi C, Dos Santos R, Marques G Et Al. Light Emitting Diode Therapy (Ledt) Before Matches Prevents Increase In Creatine Kinase With A Light Dose Response In Volleyball Players. *Lasers In Medical Science*. 2015; 30(4):1281-1287.
12. Santuzzi Ch, Buss Hf, Pedrosa Df, Freire Movm, Nogueira Bv, Gonçalves Wls. Uso Combinado Da Laserterapia De Baixa Potência E Dainibição Da Ciclooxygenase-2 Na Reepitelização De Ferida Incisional Em Pele De Camundongos: Um Estudo Pré-Clínico. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):278-83.
13. Andrade Fssd, Clark Rmo, Ferreira Mi. Efeitos Da Laserterapia De Baixa Potência Na Cicatrização De Feridas Cutâneas. *Rev. Col. Bras. Cir*. 2014; 41(2):129-133.
14. Higuchi A. Et Al. A Hybrid-Membrane Migration Method to Isolate High-Purity Adipose-Derived Stem Cells from Fat Tissues. *Scientific Reports*, 2015; 5.

15. Ferreira DF, Zângaro RA, Villa-Verde AB, Cury Y, Frigo-Piccolo G, Longo I, Barbosa DG. Analgesic Effect of He-Ne 632.8 Low level laser Therapy on Acute Inflammatory Pain. *Photomedicine and Laser Surgery*, v 23 N 2, p177-181 2005.
16. Koo, YM, Yong, MS. Na SS. The effect off low-intensity laser theraphy (LILT) on cutaneous wound healing and pain relief in rats. *J Phys Ther Sci*, 27(11): 3421-3423, 2015.
17. Agne JE. *Eletrotermofototerapia: teoria e prática*. Santa Maria: Pallotti, 2004.
18. Koo, YM, Yong, MS. Na SS. The effect off low-intensity laser theraphy (LILT) on cutaneous wound healing and pain relief in rats. *J Phys Ther Sci*, 27(11): 3421-3423, 2016.
19. Tacon KCB, Santos OC, Parente LML, Cunha CL, Souza Júnior L, Rotta R.F.R., Tacon ASF, Amaral NW. Atividade cicatrizante do laser AlGaInP (660nm) em ratos. *Acta Cir Bras*, 26(5)373-380, 2011.
20. Mosca RC, Ong AA, Albasha O, Bass K, Arany P. Photobiomodulation Therapy for Wound Care: A Potent, Noninvasive, Photoceutical Approach. *Adv Ski Wound Care*. 2019;32(4):157-167. doi:10.1097/01.ASW.0000553600.97572.d2
21. Kawano T, Takahashi T, Kaminaga S, et al. A comparison of midazolam and dexmedetomidine for the recovery of serotonin syndrome in rats. *J Anesth*. 2015;29(4):631-634. doi:10.1007/s00540-014-1973-9.

22. Gupta A, Keshri GK, Yadav A, et al. Superpulsed (Ga-As, 904 nm) low-level laser therapy (LLLT) attenuates inflammatory response and enhances healing of burn wounds. *J Biophotonics*. 2015;8(6):489-501. doi:10.1002/jbio.201400058.
23. Jin J, Zheng X, He F, et al. Therapeutic efficacy of early photobiomodulation therapy on the zones of stasis in burns: An experimental rat model study. *Wound Repair Regen*. 2018;26(6):426-436. doi:10.1111/wrr.12661.
24. Brassolatti P, Bossini PS, Kido HW, et al. Photobiomodulation and bacterial cellulose membrane in the treatment of third-degree burns in rats. *J Tissue Viability*. 2018;27(4):249-256. doi:10.1016/j.jtv.2018.10.001.
25. Fiório FB, Albertini R, Leal-Junior ECP, De Carvalho PDTC. Effect of low-level laser therapy on types I and III collagen and inflammatory cells in rats with induced third-degree burns. *Lasers Med Sci*. 2014;29(1):313-319. doi:10.1007/s10103-013-1341-2

**Table 1:** Average in cm<sup>2</sup> of the morphometric measurements of the wounds, in the control and LLL groups, at 3, 7, 15, and 21 days after the burn lesions in rats.

<b>ANALYZED GROUPS</b>	<b>3 DAYS</b>	<b>7 DAYS</b>	<b>15 DAYS</b>	<b>21 DAYS</b>
<b>CONTROL GROUP</b>	1.296 <sup>Aa</sup>	1.668 <sup>ACc</sup>	0.193 <sup>BDb</sup>	0.246 <sup>BDb</sup>
<b>LLL</b>	1.696 <sup>Aa</sup>	0.63 <sup>Bb</sup>	0.348 <sup>Bb</sup>	0.238 <sup>Bb</sup>

*Note.* Images analyzed with Image J software version 1.3.1, to measure the wound area. Different lower case letters in the same column indicate the existence of a significant difference between groups by the Tukey and ANOVA tests ( $p < 0.05$ ). Different capital letters on the same line indicate the existence of a significant difference between the days in the group by the Tukey and ANOVA tests ( $p < 0.05$ ).

**Table 2:** Average values of the scores (0 to 4) of histopathological evaluations by HE staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.

PARAMETERS		A 3	A 7	A 15	A 21
		DAYS	DAYS	DAYS	DAYS
<b>Necrosis</b>	GC	2.8 <sup>Aa</sup>	0.4 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
	LLL	2.4 <sup>Aa</sup>	0.8 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
<b>Bleeding</b>	GC	2 <sup>Aa</sup>	1 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
	LLL	2.2 <sup>Aa</sup>	1.2 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
<b>Edema</b>	GC	3.4 <sup>Aa</sup>	1.4 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
	LLL	2.2 <sup>Aa</sup>	0.6 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>
<b>Polymorphonuclear Infiltrate</b>	GC	2.8 <sup>Aa</sup>	2.2 <sup>Aa</sup>	0.4 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>
	LLL	3.2 <sup>Aa</sup>	1.2 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Ba</sup>	0 <sup>Ba</sup>
<b>Mononuclear Infiltrate</b>	GC	3.2 <sup>Aa</sup>	3 <sup>Aa</sup>	3.2 <sup>Aa</sup>	1 <sup>Aa</sup>
	LLL	3.2 <sup>Aa</sup>	3.8 <sup>Aa</sup>	2.2 <sup>Aa</sup>	2.4 <sup>Aa</sup>
<b>Angiogenesis</b>	GC	1 <sup>Aa</sup>	2 <sup>Aa</sup>	1.6 <sup>Aa</sup>	1 <sup>Aa</sup>
	LLL	1.8 <sup>Aa</sup>	3 <sup>ABa</sup>	1 <sup>ACa</sup>	0.8 <sup>ACa</sup>
<b>Crust</b>	GC	0.8 <sup>Aa</sup>	2.4 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>
	LLL	0.8 <sup>Aa</sup>	0.6 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>	0 <sup>Aa</sup>
<b>Granulation Tissue</b>	GC	1 <sup>Aa</sup>	2 <sup>Aa</sup>	2.4 <sup>Aa</sup>	3.25 <sup>Aa</sup>
	LLL	1 <sup>Aa</sup>	2.8 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Ba</sup>
<b>Fibroblasts</b>	GC	1.2 <sup>ACa</sup>	1.8 <sup>ACa</sup>	3 <sup>ACa</sup>	3 <sup>BDA</sup>
	LLL	2.2 <sup>Aa</sup>	3.2 <sup>Aa</sup>	3.4 <sup>Aa</sup>	3.6 <sup>Aa</sup>
<b>Reepithelization</b>	GC	0 <sup>Aa</sup>	0.6 <sup>Aa</sup>	3.6 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Ba</sup>
	LLL	0 <sup>Aa</sup>	2.2 <sup>Aa</sup>	3.8 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Ba</sup>

*Note.* Scores from 0 to 4, being: score 0: absent; score 1: up to 25%; score 2: between 25 and 50%; score 3: between 51% and 75%; and score 4: from 76% to 100%. Different lower case letters in the same column for the same parameter, indicate the existence of a significant difference between groups by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). Different capital letters on the same line indicate the existence of a significant difference between the days in the group by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ).

**Table 3:** Average values of the scores (0 to 4) of histopathological evaluations by Gomori's trichrome staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.

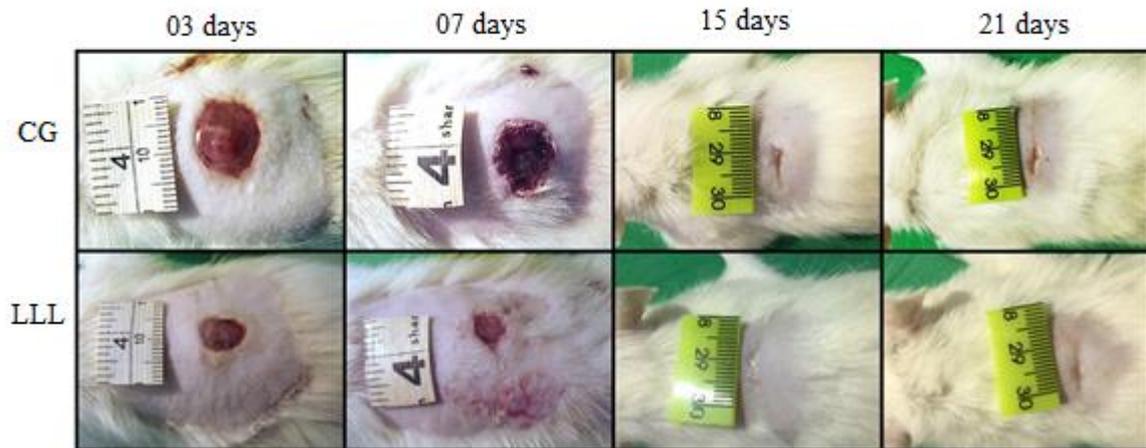
PARAMETERS		03 days	07 days	15 days	21 days
Granulation Tissue	GC	1 <sup>Aa</sup>	2 <sup>ACa</sup>	2.4 <sup>ACa</sup>	3.25 <sup>BCa</sup>
	LLL	1 <sup>Aa</sup>	2.8 <sup>ACa</sup>	4 <sup>BCa</sup>	4 <sup>BCa</sup>
Matrix Organization	GC	1 <sup>Aa</sup>	1 <sup>ACa</sup>	1.6 <sup>ACa</sup>	3 <sup>BDa</sup>
	LLL	1 <sup>Aa</sup>	1.2 <sup>ACa</sup>	3.4 <sup>BCa</sup>	3.6 <sup>BDa</sup>
Fibroblast	GC	1.2 <sup>Aa</sup>	1.8 <sup>Aa</sup>	3 <sup>Aa</sup>	3 <sup>Aa</sup>
	LLL	2.2 <sup>Aa</sup>	3.2 <sup>Aa</sup>	3.4 <sup>Aa</sup>	3.6 <sup>Aa</sup>

*Note.* Scores from 0 to 4, being: score 0: absent; score 1: up to 25%; score 2: between 25 and 50%; score 3: between 51% and 75%; and score 4: from 76% to 100%. Different lower case letters in the same column for the same parameter, indicate the existence of a significant difference between groups by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). Different capital letters on the same line indicate the existence of a significant difference between the days in the group by the Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ).

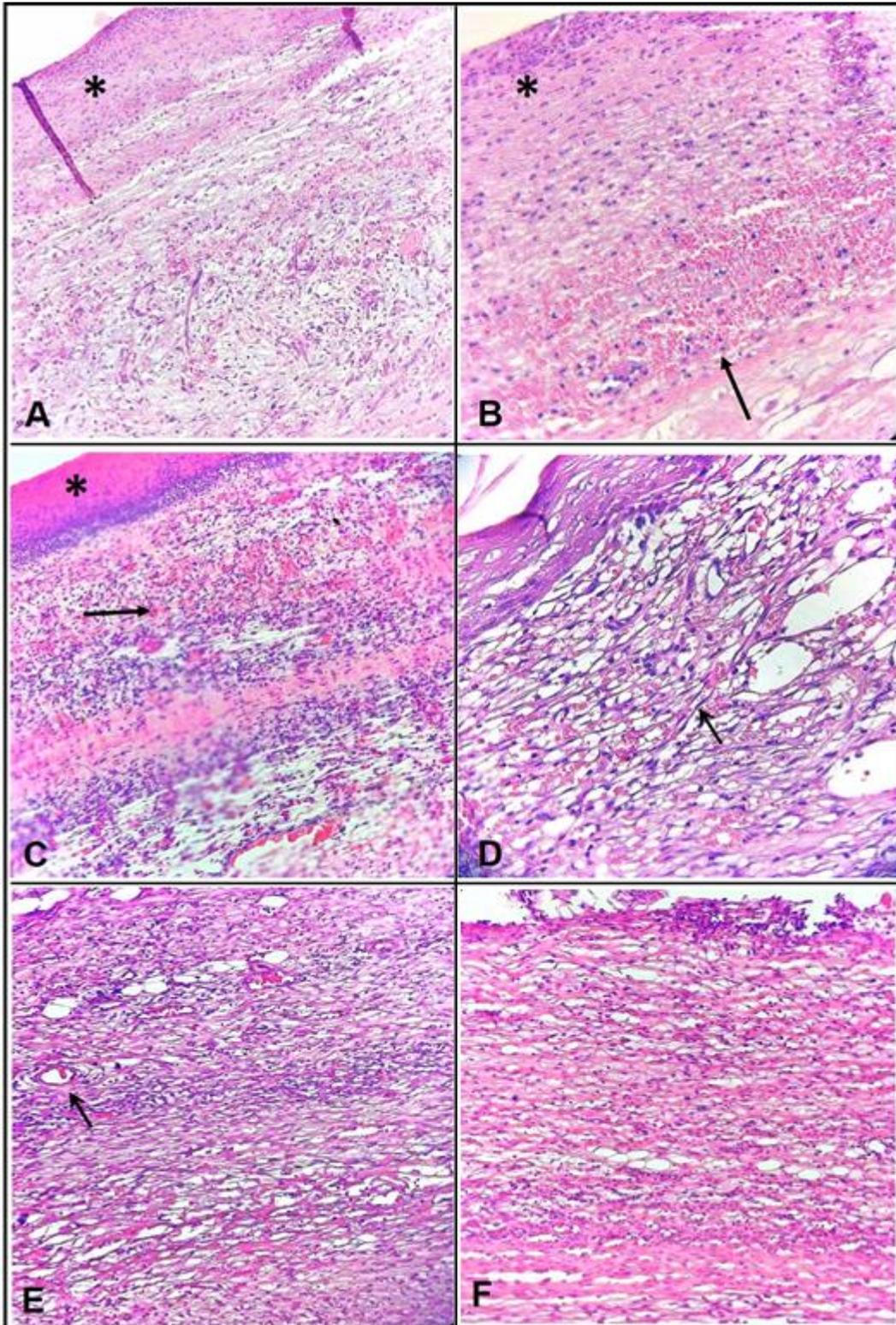
**Table 4:** Average values of collagen quantification, in pixels, by histopathological evaluations by Picrosirius red staining of the control and LLL groups on days 3, 7, 15, and 21 after the burn lesion in rats.

	CONTROL GROUP	LLL GROUP
<b>3 days</b>	235.73 pixels <sup>Aa</sup>	155.746 pixels <sup>Aa</sup>
<b>7 days</b>	157.44 pixels <sup>Aa</sup>	154.39 pixels <sup>Aa</sup>
<b>15 days</b>	178.018 pixels <sup>Aa</sup>	213.154 pixels <sup>Aa</sup>
<b>21 days</b>	145.484 pixels <sup>Aa</sup>	153.207 pixels <sup>Aa</sup>

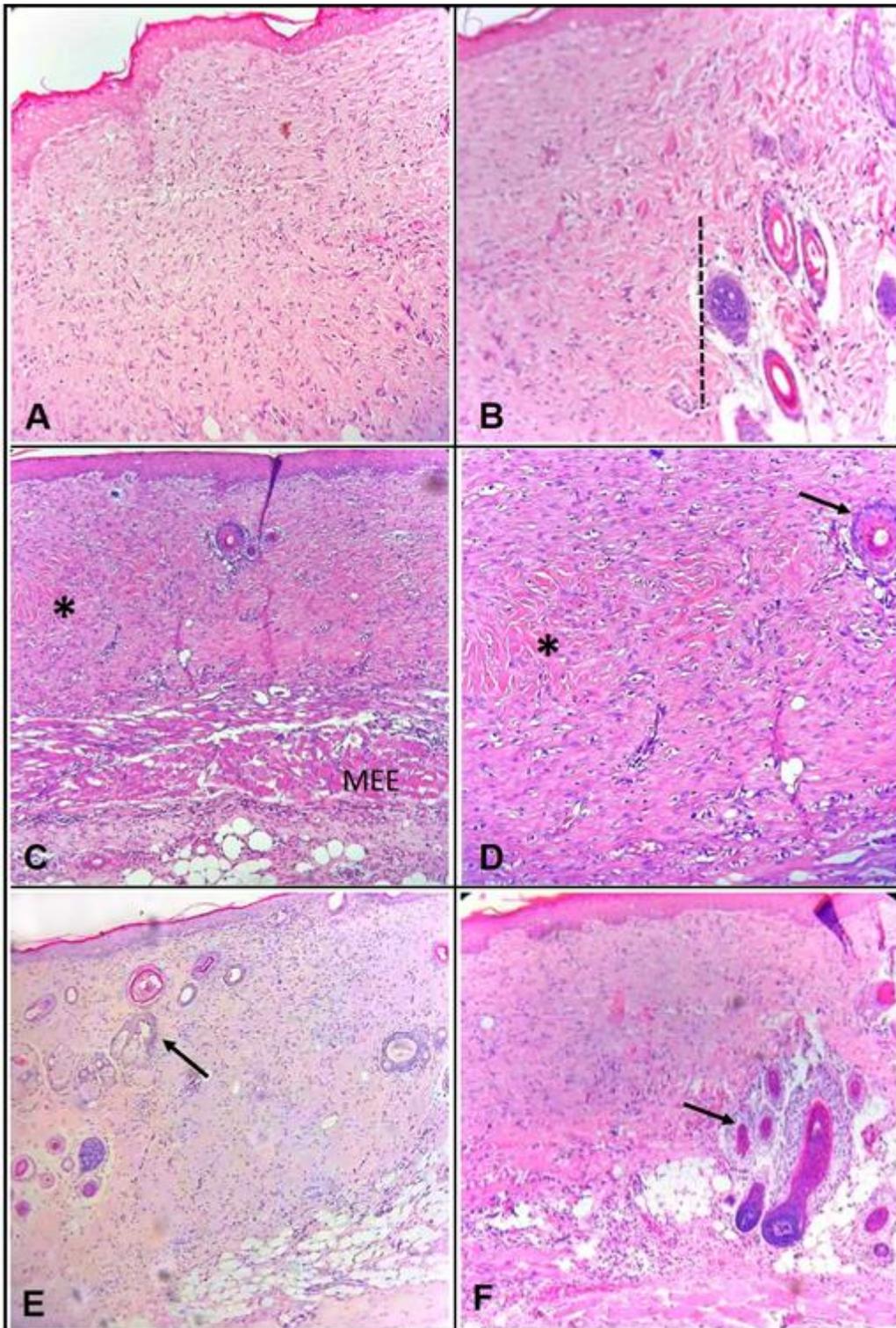
*Note.* Different lower case letters in the same column indicate the existence of a significant difference between groups by T-paired test ( $p < 0.05$ ). Different capital letters on the same line indicate the existence of a significant difference between the days in the group by Tukey test ( $p < 0.05$ ).



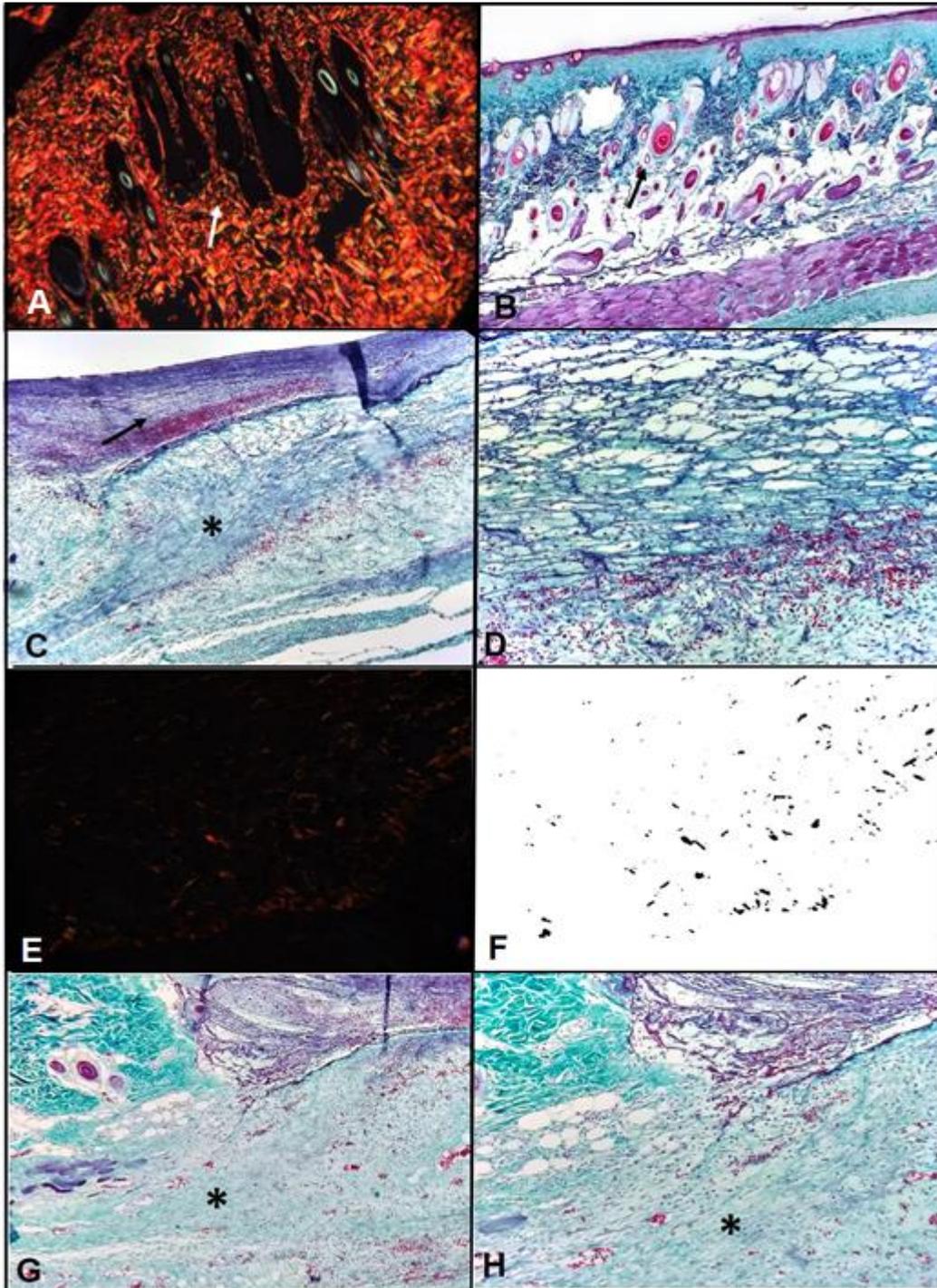
**Figure 1.** Photos of the third degree burn lesions on the biopsy day of each group. CG = control group; LLL = group treated with low level laser.



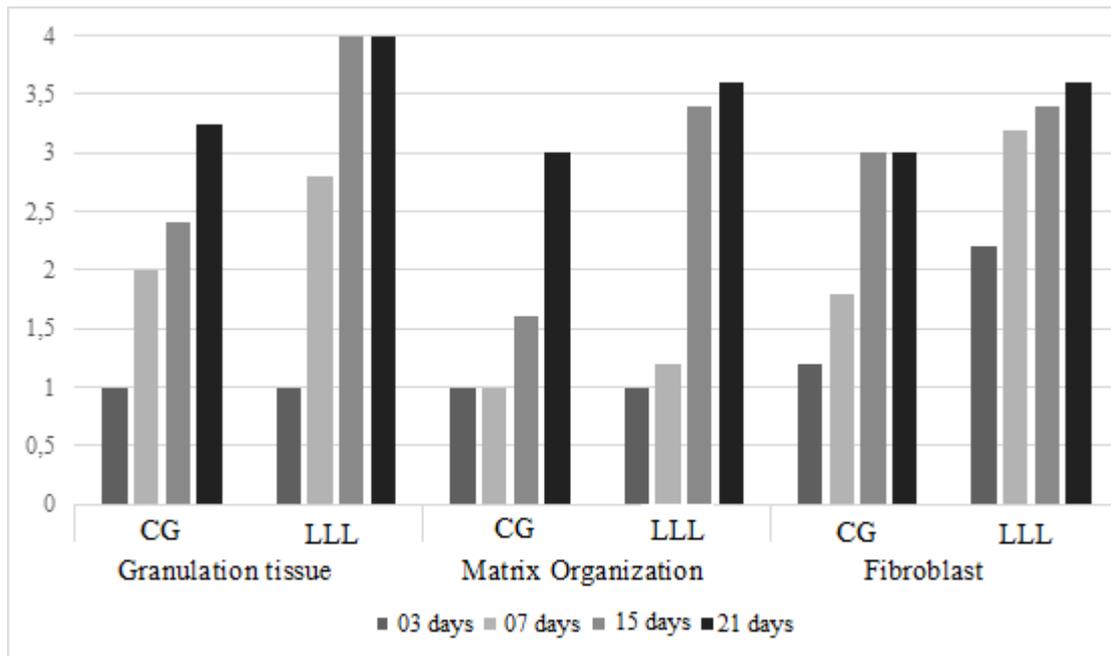
**Figure 2.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by HE staining. A: CG 3 days, intense crust (asterisk) and great tissue disorganization, 10x; B:GC 3 days, intense crust (asterisk) and large bleeding area (black arrow), 20x; C: LLL group 3 days, intense crust (asterisk) and large bleeding area (black arrow), 20x; D: CG 7 days, an area with angiogenesis (black arrow), 20x; E and F: LLL group 7 days, there is an area with angiogenesis (black arrow), mononuclear and fibroblast cell infiltrate and greater extracellular matrix deposition, 20x.



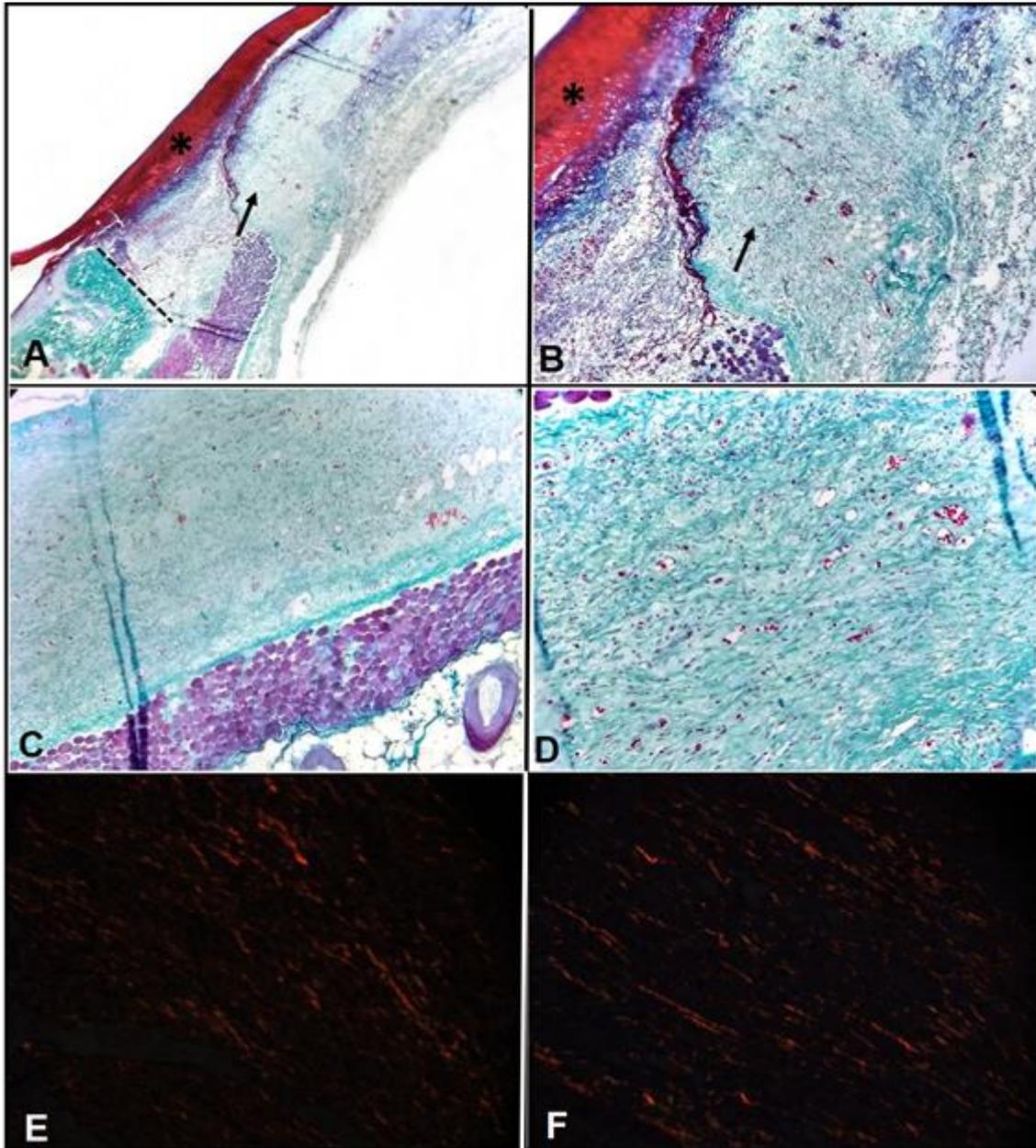
**Figure 3.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by HE staining (continuation). A and B: CG 15 days, complete epithelialization with loose connective tissue and local outside the lesion with normal skin (dotted line), 20x; C and D: LLL group 15 days, complete epithelialization is observed with loose connective tissue, onset of formation of dense non-modeled connective tissue (asterisk) and hair follicle (black arrow), 20x; E: CG 21 days, formation of hair follicles and sebaceous glands (black arrow) 20x; F: LLL group 21 days, formation of hair follicles and sebaceous glands (black arrow) and greater dermis organization, 20x.



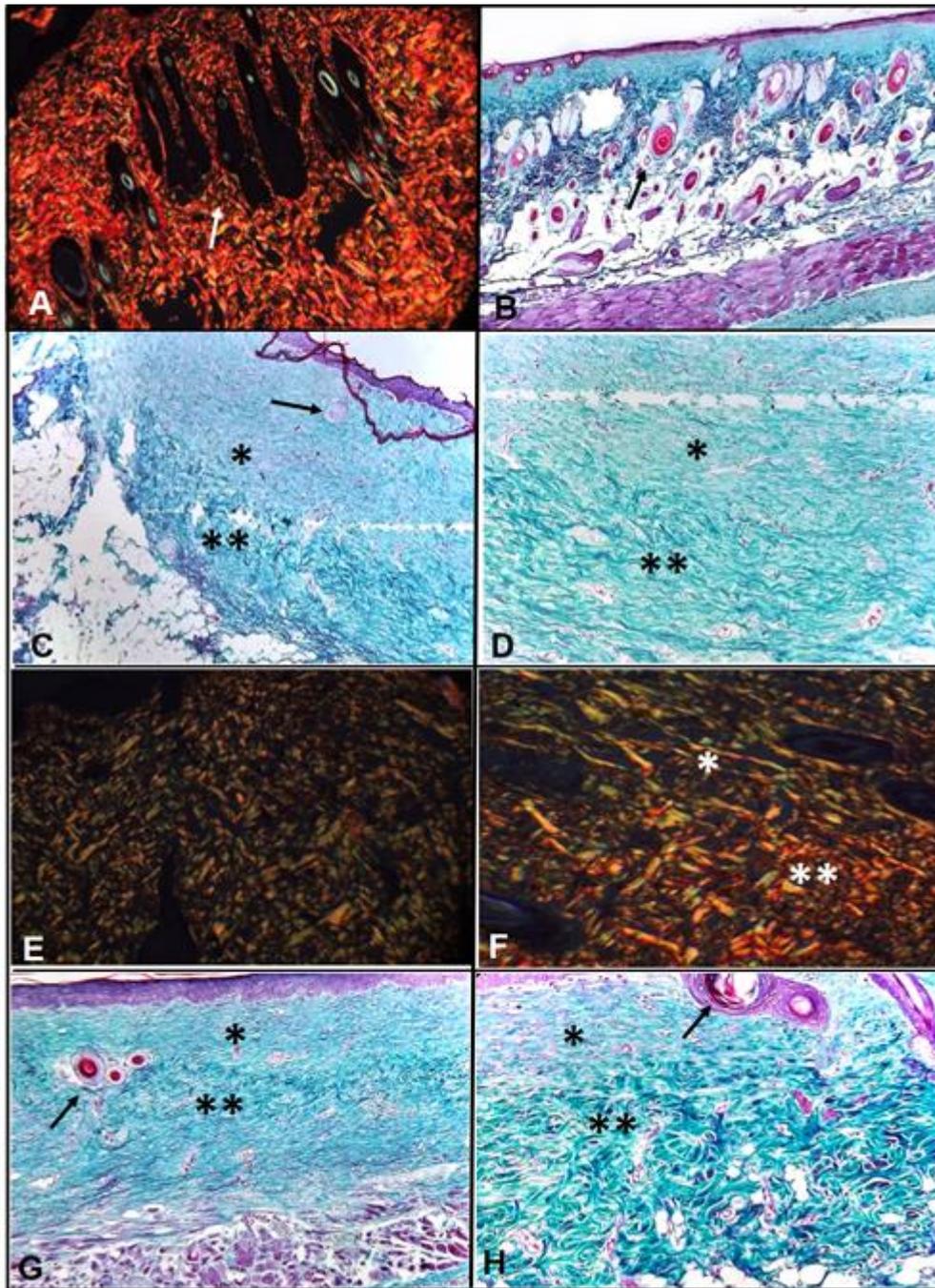
**Figure 4.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picosírius red and Gomori staining. A: Normal skin stained with Picosírius red, type I collagen marked in yellow and red and hair follicles in the white arrow, 20x; B: Normal skin stained with Gomori, connective tissue stained in shades of light blue and dark in the superficial and deep dermis, and hair follicles in the black arrow; C: CG 3 days, there is an area with inflammatory infiltrate and bleeding (black arrow) and an area of edema with tissue disorganization and little evident collagen, 10x; D: C; E: CG 3 days, little type I collagen marked in red with Picosirius red, 20x; F: CG 3 days, conversion of the mark in E to pixels in the Image J program; G: LLL 3 days, there is an area with inflammatory infiltrate and bleeding (black arrow) and an area of edema with tissue disorganization and little evident collagen (asterisk), 10x; H: area described in G with a 20x objective.



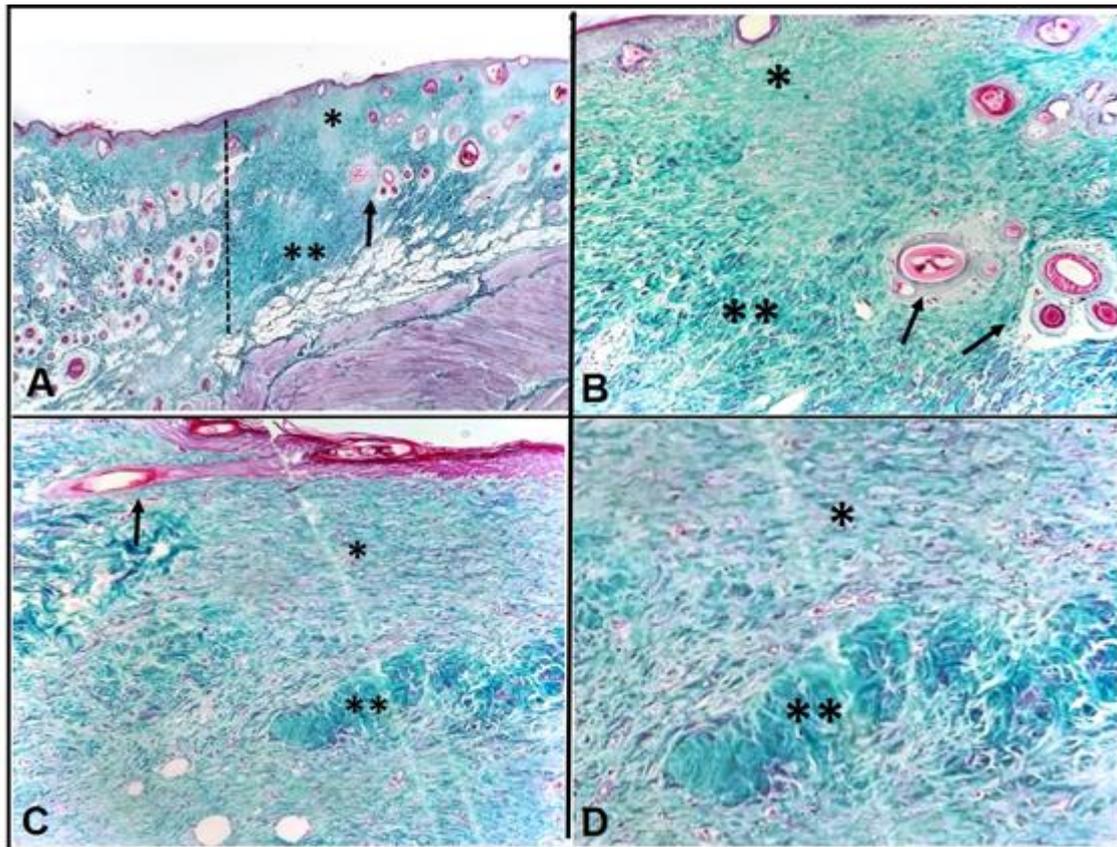
**Figure 5.** Histological scores assessed by Gomori's trichrome staining in third-degree burn lesions in rats. Scores from 0 to 4, being: score 0: absent; score 1: up to 25%; score 2: between 25 and 50%; score 3: between 51% and 75%; and score 4: from 76% to 100%. CG: Control Group and LLL: group treated with Low Level Laser.



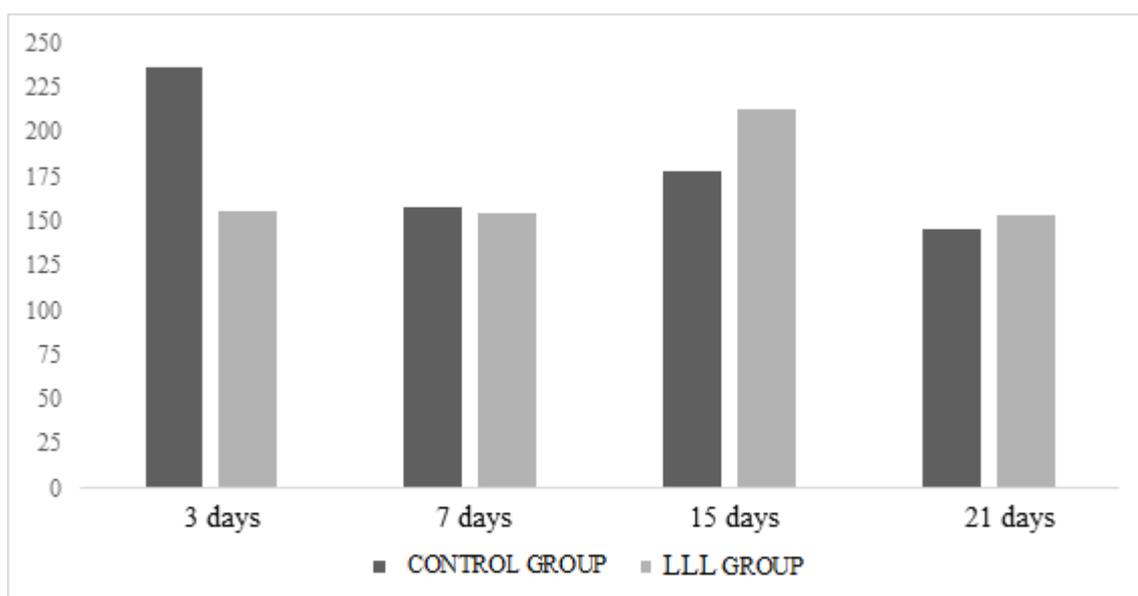
**Figure 6.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosirius red and Gomori staining (continuation). A: CG 7 days, area with crust (asterisk) and area with beginning of tissue organization with loose connective tissue stained in light blue (black arrow) - (dotted line limit for the area without lesion), 10x; B: area described in A with a 20x objective. C: LLL 7 days, there is an area with loose connective tissue more organized stained in light blue and angiogenesis, 10x; D: area described in C with a 20x objective; E: CG 7 days, little type I collagen marked in red with Picrosirius red, 20x; F: LLL 7 days, little type I collagen marked in red with Picrosirius red, 20x.



**Figure 7.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picosírius red and Gomori staining (continuation 1). A: Normal skin stained with Picosírius red, type I collagen marked in yellow and red and hair follicles in the white arrow; B: Normal skin stained with Gomori, connective tissue stained in shades of light blue and dark in the superficial and deep dermis, and hair follicles in the black arrow; C: CG 15 days, superficial dermis (\*) and deep dermis (\*\*) with hair follicle formation (black arrow), 10x; D: area described in C with a 20x objective; E: GC 15 days, little type I collagen marked in red and more type III collagen marked in green with Picosírius red, 20x; F: LLL 15 days, little type I collagen marked in red and more type III collagen marked in green, and beginning of demarcation of superficial dermis (\*) and deep dermis (\*\*), with Picosírius red, 20x; G: LLL 15 days, there is an area of superficial dermis (\*) and deep dermis (\*\*) more organized with the formation of hair follicles with keratin (black arrow), 10x; H: area described in G with a 20x objective.



**Figure 8.** Photomicrograph of third-degree burn lesions in rats, by Picrosírius red and Gomori staining (continuation 2). A: CG 21 days, there is an area of superficial dermis (\*) and deep dermis (\*\*) with the formation of hair follicles (black arrow), (dotted line limit for the area without lesion, 10x; B: area described in A in 20x objective; C: LLL 21 days, there is an area of superficial dermis (\*) and deep dermis (\*\*) with greater density and formation of hair follicles (black arrow); D: area described in C with a 20x objective.



**Figure 9.** Quantification of collagen in pixels assessed by Picrosirius red staining in third-degree burn lesions in rats.

## CAPÍTULO 3 – ARTIGO 2 - ISOLAMENTO MAGNÉTICO E DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

MAGNETIC INSOLATION AND IN VITRO DIFFERENTIATION OF STEM CELLS DERIVED FROM ADIPOSE TISSUE

### Resumo

**Introdução:** As células-tronco mostraram-se promissoras no que diz respeito ao processo de cicatrização em queimaduras de espessura total. No entanto, métodos de isolamento e tecido de origem obtenção dessas células ainda estão sob investigação. As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) expressam CD49d, o que não ocorre com as demais células tronco mesenquimais, enquanto estas expressam CD106. O presente estudo teve como objetivo investigar a viabilidade do isolamento de ADSCs, por meio da separação magnética utilizando microbeads marcadas com receptor de superfície CD49d. **Material e métodos:** Células primárias derivadas de tecido adiposo foram isoladas por meio de imunomarcção do antígeno de superfície CD49d ligado a microbeads magnéticas (MACS). O crescimento celular e a formação de colônias foram determinados pela contagem e microscopia de luz, respectivamente. As células também foram submetidas a diferenciação celular e analisadas por RT-PCR para determinar seu potencial condrogênico, adipogênico, osteogênico e perfil de expressão para os marcadores de células-tronco. **Resultados:** Observou-se uma proliferação celular aumentada e formação de colônias em células CD49d positivas em comparação com as células CD49d negativas na primeira passagem. Após a indução de diferenciação, expressão do colágeno, depósitos de cálcio e gotículas lipídicas foram detectados. A expressão de mRNA para identificação das células-tronco confirmou que o isolamento de CD49d + por MACS é viável. **Conclusão:** Assim, o CD49d pode ser usado como um marcador relativamente específico para a seleção de ADSCs. Estudos adicionais são necessários para definir este método de seleção como o mais adequado para o isolamento e expansão *in vitro* dessas células.

**Palavras-chave:** CD49d. ADSC. Imunomarcção magnética.

**Abstract**

**Introduction:** Stem cells have shown promise with regard to the healing process in full-thickness burns. However, methods of isolation and tissue originating from obtaining these cells are still under investigation. Stem cells derived from adipose tissue (ADSC) express CD49d, which does not occur with other mesenchymal stem cells, while these express CD106. The present study aimed to investigate the viability of the isolation of ADSCs, by means of magnetic separation using microbeads marked with a CD49d surface receptor. **Material and methods:** Primary cells derived from adipose tissue were isolated by immunostaining the CD49d surface antigen bound to magnetic microbeads (MACS). Cell growth and colony formation were determined by counting and light microscopy, respectively. The cells were also subjected to cell differentiation and analyzed by RT-PCR to determine their chondrogenic, adipogenic, osteogenic potential and expression profile for stem cell markers. **Results:** Increased cell proliferation and colony formation was observed on CD49d positive cells compared to CD49d negative cells on the first pass. After differentiation induction, collagen expression, calcium deposits and lipid droplets were detected. The expression of mRNA to identify stem cells confirmed that isolation of CD49d + by MACS is viable. **Conclusion:** Thus, CD49d can be used as a relatively specific marker for the selection of ADSCs. Additional studies are needed to define this selection method as the most suitable for the isolation and in vitro expansion of these cells.

**Keywords:** CD49d. ADSC. magnetic immunostaining

**Introdução:**

A cicatrização de lesões cutâneas extensas tem sido uma grande problemática na população devido ao comprometimento funcional e estético que podem resultar em níveis de incapacidade equivalentes aos de doenças crônicas, afetando a capacidade de relacionamento, o trabalho e a autoestima, seguindo para o sofrimento psicossocial com altos índices de depressão, ansiedade e pensamentos suicida<sup>1</sup>. Embora existam diversos métodos terapêuticos ainda se observa muitas pessoas que apresentam graves alterações morfofuncionais como consequência do processo de cicatrização insatisfatório das lesões<sup>1</sup>.

O desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, tem demonstrado que a terapia celular é uma abordagem bastante promissora para o processo de reconstrução tecidual<sup>2</sup>. As células-tronco tem sido amplamente explorada na medicina regenerativa por se tratar de um tipo celular com características moleculares de multipotência e capacidade de diferenciar-se em várias linhagens celulares, alta capacidade de proliferação e diferenciação<sup>3</sup>.

As CTA encontradas na medula óssea podem ser distinguidas em duas linhagens distintas: as hematopoiéticas e as células progenitoras ou mesenquimais. As células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) são um tipo de células-tronco mesenquimal (CTM) de fácil obtenção e por isso se tornaram-se um importante modelo de pesquisa para a medicina regenerativa, devido ao seu alto potencial proliferativo, de diferenciação e transdiferenciação. Além da obtenção, também possuem facilidade de cultivo, quando comparada às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CT-MO)<sup>3-6</sup>.

As CTM são definidas por meio da expressão positiva de algumas proteínas de superfície da linhagem mesenquimal como a CD105, CD73 e CD90, e sem a expressão de marcadores endoteliais hematopoiéticos (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 e HLA-DR)<sup>7</sup>. Porém, de acordo com o tecido de origem das células, existem algumas diferenças na expressão de certos marcadores entre as CTMs<sup>4,8,9</sup>, como exemplo as ADSC que expressam a CD49d, enquanto as CT-MO, expressam a CD106<sup>4,8,10</sup>.

Tradicionalmente, a metodologia utilizada para o isolamento de ADSC constitui em digestão celular com centrifugação seguida de cultivo celular com a adesão das células ao plástico dos frascos de cultivo. No entanto, esses métodos não são completamente específicos, pois as células oriundas das primeiras etapas do cultivo

celular apresentam apenas cerca de 60 a 80% de marcadores de ADSC, indicando que não são populações completamente homogêneas<sup>11</sup>.

Para a utilização dessas populações celulares em engenharia de tecidos, o ideal é que se obtenha uma população celular bem padronizada, com suas características funcionais bem estabelecidas<sup>9</sup>. Nesse sentido, a seleção de células por meio de proteínas específicas de superfície (CD), pode permitir o isolamento e expansão *in vitro* dessas células com um grau de especificidade mais elevado do que o obtido apenas pela seleção baseada na aderência celular ao plástico<sup>11</sup>. Uma alternativa de isolamento inclui a separação das células usando antígenos específicos com esferas imunomagnéticas ou citometria de fluxo, que requerem um curto período experimental e garantem maior especificidade nos cultivos de células-tronco<sup>12</sup>.

Neste sentido, a proteína CD49d, um antígeno específico para ADSC, é um bom marcador para a separação celular magnética das populações celulares presentes no tecido adiposo, pois permite o isolamento das ADSC evitando a contaminação do cultivo por fibroblastos e células-tronco mesenquimais oriundas de outros tecidos como endotélio.

### **Objetivo:**

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) por meio da separação magnética com *microbeads* marcadas com anticorpo anti proteína de superfície CD49d em relação a homogeneidade das populações celulares selecionadas.

### **Materiais e métodos**

O experimento foi conduzido em duas etapas: a etapa de extração das células e o isolamento magnético foi realizada no Laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás (UFG); o estabelecimento e análise do cultivo celular foi realizado no Laboratório Multiusuário da Universidade Federal de Jataí (UFJ). A pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG) e aprovada sob o Protocolo 015/2019 (Anexo 1).

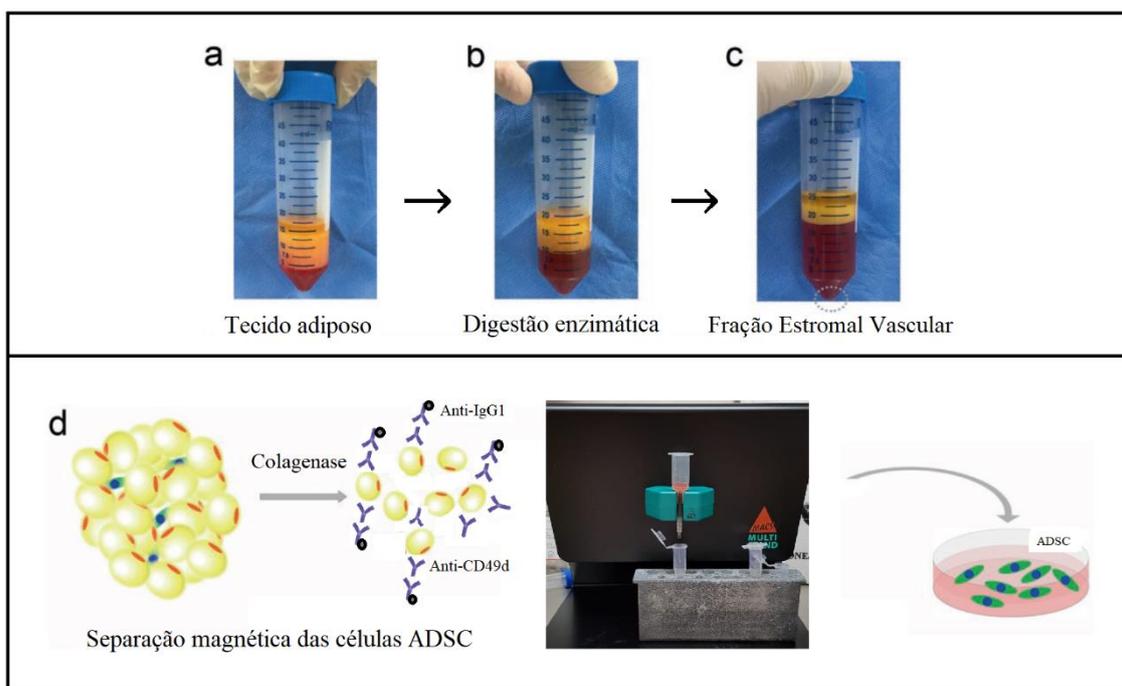
### **Isolamento da fração estromal vascular (FEV)**

A extração das células tronco mesenquimais de tecido adiposo foi adaptada conforme (Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E., Secco M., Strauss B.E. & Zatz M. 2010. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.* 19:279-289). A FEV foi obtida por meio da digestão enzimática do tecido adiposo de ratos, para posterior isolamento das ADSC (Figura 1). Para tal, foram utilizadas duas ratas fêmeas, da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*), saudáveis, com peso médio de 250 gramas. Após a eutanásia dos animais com sobredose de anestésico seguida por deslocamento cervical, foi realizada a tricotomia e a retirada do tecido adiposo da região inguinal, seguindo de lavagem e imersão do tecido em tampão fosfato salino (PBS). Em seguida, este foi submetido a digestão enzimática com colagenase tipo I por 30 minutos a 37°C (Figura 1a, b, c). Após esse período, fez-se a neutralização da colagenase com a imersão do conteúdo em meio de cultivo DMEM alta glicose com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) e seguiu-se de centrifugação celular por 10 minutos a 3.500 rpm, conforme Lamaro-Cardoso et al.<sup>14</sup> (2019), obtendo-se ao final um pellet celular referente à FEV.

### **Separação magnética e cultivo das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC)**

O pellet celular da FEV foi então submetido à duas lavagens com PBS, e em seguida foi incubado com anticorpo primário Rat CD49d (ITGA4 Monoclonal Antibody – ThermoFisher®) por 20 minutos a 4°C. Em seguida as células foram novamente lavadas com solução tampão e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em solução tampão MACS® (2mM EDTA [ácido etilenodiamino tetraacético] e 0,5% BSA [Albumina de Soro Bovino] em 500mL de PBS [Tampão fosfato-salino]) e prosseguiu a incubação com anticorpo secundário acoplado a *microbeads* magnéticas (Anti-Mouse IgG1 MicroBeads - MACS®, Miltenyi Biotech), conforme instruções do fabricante (Figura 1d). Por fim, as células consideradas CD49d positivas (+) e CD49d (-) negativas, foram transferidas para dois diferentes frascos de cultivo de 25cm<sup>2</sup> contendo meio de cultivo celular (DMEM alta glicose com 10% SFB, 1% de antibiótico e antimicótico) e mantidas em estufa úmida a 5% de CO<sup>2</sup> a 37°C, por aproximadamente 10 dias até atingir o período de confluência celular. Ao atingir a

confluência celular de 80% as células foram retiradas dos frascos com tripsina (TrypLE™ Express, Invitrogen, Carlsbad, USA) a 37°C e submetidas à quantificação e avaliação da viabilidade celular, utilizando-se o corante Azul de Trypan, em câmara de Neubauer. As células foram então depositadas em frascos de cultivo celular de 25cm<sup>2</sup> em quantidade de 5x10<sup>4</sup> células por frasco e mantidas sob cultivo até 5ª passagem celular.



**FIGURA 1.** Isolamento e separação das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC). Separação magnética ADSC por meio de separação com *microbeads* magnéticas. A, B e C: o tecido adiposo é submetido à digestão enzimática para obtenção da FEV. D: a FEV é incubada com anticorpo anti-CD49d acoplado à *microbeads* e isoladas por meio de coluna magnética, e separadas as populações celulares positivas e negativas. Fonte: Adaptado de Guangpeng Liu and Xi Chen, 2018<sup>36</sup>.

### **Análise do potencial de diferenciação celular das ADSC CD49d positivas e negativas**

Na primeira passagem, após atingir confluência de 80% as células CD49d positivas e negativas foram removidas dos frascos de cultivo utilizando tripsina (TrypLE™ Express, Invitrogen, Carlsbad, USA) a 37°C, centrifugadas com o meio de cultivo celular para obtenção do pellet celular, e então submetidas à quantificação e avaliação da viabilidade celular, utilizando-se o corante Azul de Trypan, em câmara de Neubauer. Em seguida, transferiu-se 5x10<sup>3</sup> células para cada poço de uma placa de

cultivo com 24 poços contendo 500µl de meio de cultivo DMEM, distribuídas em duas colunas com três fileiras contendo células CD49 positivas e três fileiras contendo células CD49d negativas, de forma que a última fileira de células foi considerado o controle negativo.

Após 72h, já com confluência de aproximadamente 60%, o meio de cultivo de cada poço foi substituído pelos respectivos meios de indução de diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco, USA), exceto as células de controle negativo, que receberam meio DMEM. O cultivo e as avaliações das diferenciações foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. A capacidade de diferenciação das células ADSC em cartilagem, osso e tecido adiposo foram avaliadas aos 14 e 21 dias de cultivo utilizando-: I) a coloração de *Alcian Blue* 1% nos poços que receberam estímulo condrogênico; II) a coloração de *Alizarin Red* nos poços que receberam estímulo osteogênico; III) a coloração de *Oil Red* nos poços que receberam estímulo adipogênico.

### **Análise da expressão gênica dos antígenos de superfície das ADSC e células-tronco mesenquimais (CTM)**

A análise da expressão gênica dos marcadores de superfície das células ADSC e CTM foi feita por meio técnica de reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR). Para isso, as células mantidas em cultivo foram removidas sob ação da tripsina (TrypLE<sup>TM</sup> Express, Invitrogen, Carisbad, USA), lavadas com PBS e centrifugadas para obtenção do pellet celular. O RNA total foi extraído das células após duas passagens usando Trizol (Invitrogen, CA). O cDNA foi obtido conforme Planat-Benard et al. (2004)<sup>27</sup>. A RT-PCR foi realizada com diferentes primers, específico para CTM e ADSC. A expressão de mRNA de CD49d foi analisado para células ADSC e de CD106 para células CTM. A expressão de mRNA para Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi quantificada como um controle interno positivo. As sequências de primers para cada gene analisado estão listadas na Tabela 1.

**TABELA 1 - Primers da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) para as células ADSC e CTM.**

Gene	Senso	Antisenso
CD49d	5' CGTGACACCAACAGCAGTCT - 3'	5'-GATGCCATGATATGGAAGGG - 3'
CD106	5' - TACATGTCATGGGACTGTTCCG -3'	5' - CCACAAACCAAGCTATGCATTC -3'
GAPDH	5' - AGCCAAAAGGGTCATCATCT -3'	5'- GGGGCCATCCACAGTCTTCT -3'

### **Análise estatística**

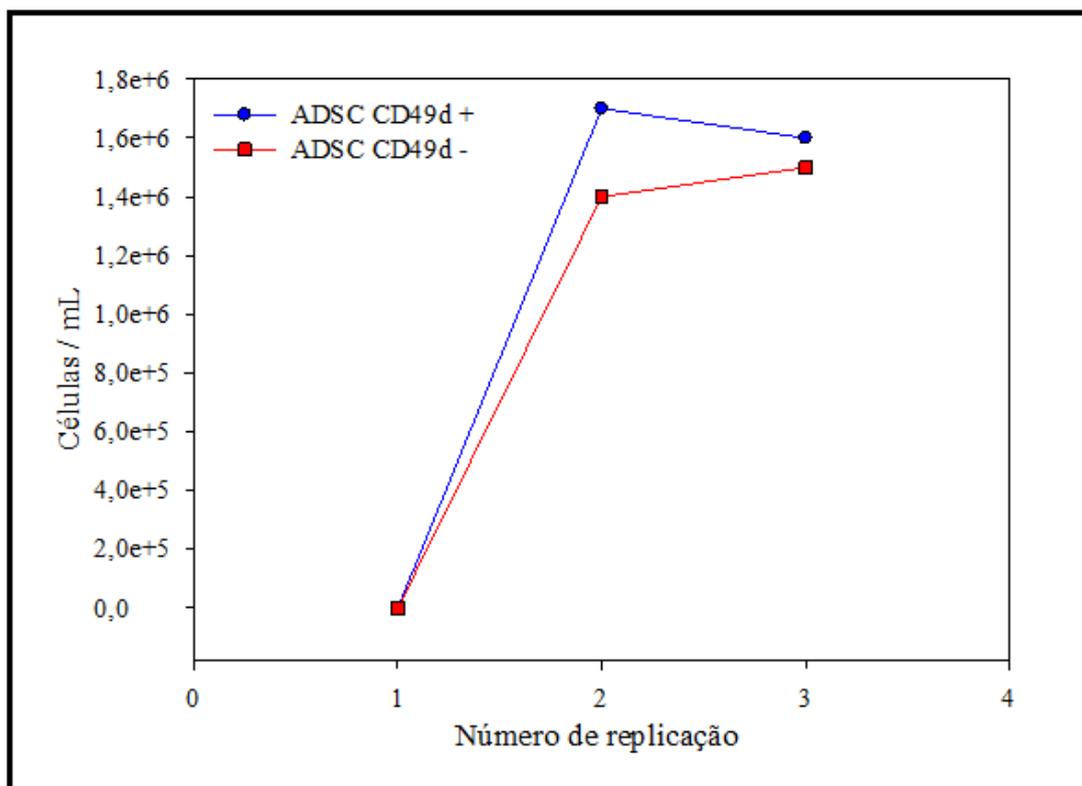
O número médio de células ao longo do tempo foi comparado pelo teste ANOVA para Medidas Repetidas (RM-ANOVA) e apresentado pela média e erro padrão da média. Para comparar as diferenças de proliferação entre ADSC CD49d+ e ADSC CD49d- foi realizado Teste t de duas amostras. Para as avaliações estatísticas,  $P < 0,05$  foi considerado significativo. As análises foram realizadas no software estatístico SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

### **Resultados**

#### **Crescimento celular e morfologia das ADSC CD49d+ e ADSC CD49d-**

Após a separação magnética, as células se aderiram ao plástico do frasco apresentando morfologia semelhante a fibroblastos. Inicialmente, o crescimento das duas populações celulares foi lento, atingindo aproximadamente 80% de confluência após 10 dias de cultivo. A população de ADSC CD49d+ apresentou, inicialmente, crescimento significativo ( $P < 0,05$ ) na taxa de proliferação celular até primeira passagem ( $7,6 \times 10^3 \pm 0,188$  células/mL) em relação à população de CD49d- ( $2,6 \times 10^3 \pm 0,299$  células/mL).

Após 3 a 4 dias do primeiro repique, observou-se um aumento concomitante da taxa de proliferação celular nas duas populações celulares. Após segunda passagem o crescimento de CD49d+ ( $1,7 \times 10^6$  células/mL  $\pm 0,107$ ) foi maior em relação ao cultivo CD49d- ( $1,4 \times 10^6$  células/mL). Em seguida ambas se mantiveram mais estacionárias até a terceira passagem (Figura 2). Nos dois cultivos foi possível observar células alongadas e fusiformes com morfologia semelhante a fibroblastos, ricas em prolongamentos citoplasmáticos.

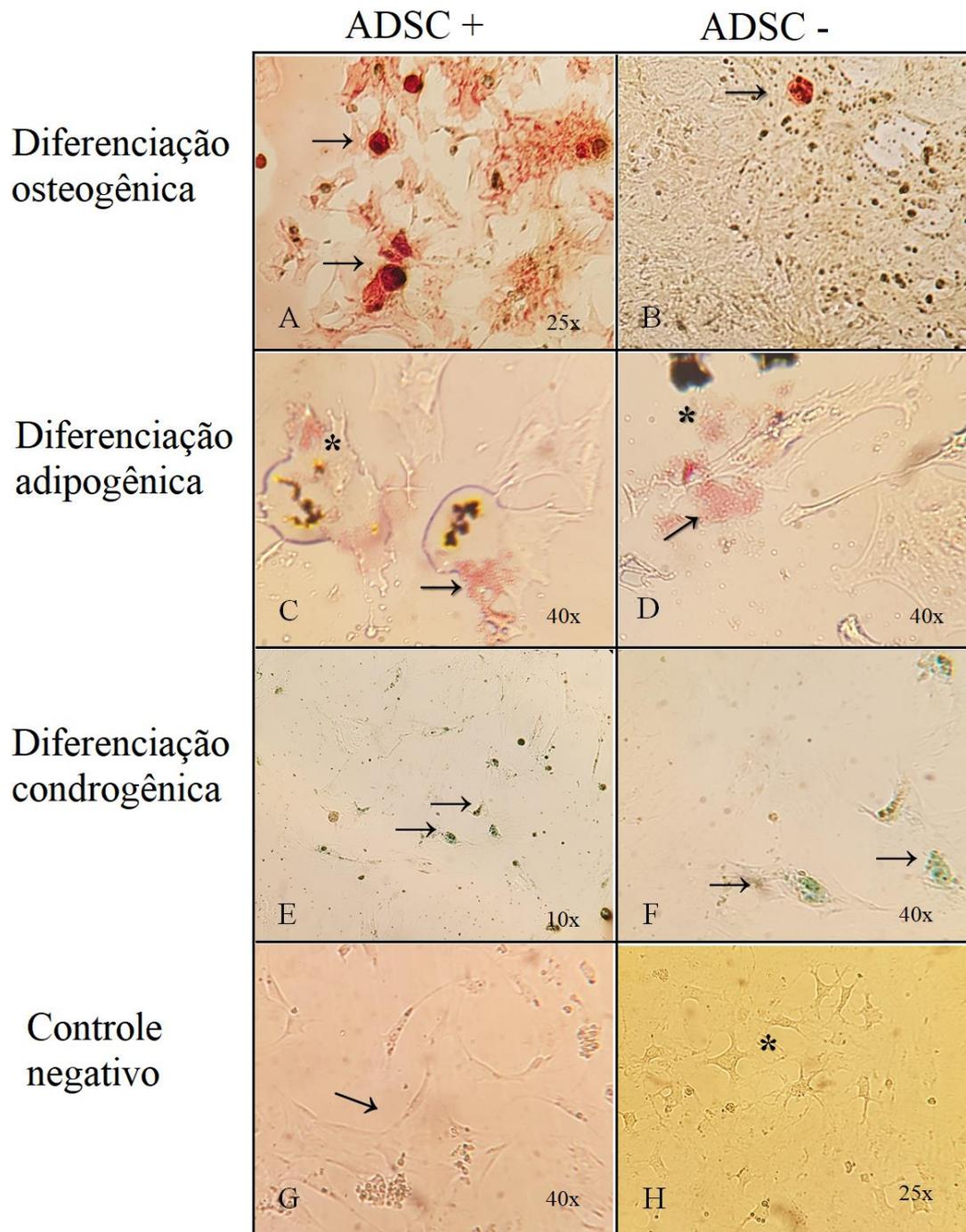


**FIGURA 2.** Proliferação celular de cultivos ADSC CD49d+ e CD49d-. A) Em primeira e segunda passagem, o cultivo ADSC CD49d+ apresentou taxa de proliferação significativamente maior representada por média  $\pm$  desvio padrão e comparada usando o teste t das amostras, \*  $P < 0,05$ . B) O crescimento de CD49d- foi contínuo após a segunda passagem.

### Potenciais de diferenciação celular das ADSC CD49d + e ADSC CD49d -

Aos 14 dias após a indução condrogênica por meio de cultivo diferencial, observou-se mudança morfológica no cultivo que passou a apresentar-se com coloração esbranquiçada, formato arredondado e consistência elástica. No décimo quarto dia após indução osteogênica, as células começaram a sofrer uma mudança na morfologia que passou da forma de fuso para uma aparência mais poligonal. Neste período observou-se alguns depósitos de coloração marrom nos cultivos ADSC CD49d positivos e negativos com aspecto de mineralização nodular corados com Alizarin Red nos grupos induzidos, e que não foram encontrados no controle negativo (Figuras 3A e 3B). Com relação à indução adipogênica, inicialmente os cultivos apresentaram redução na proliferação celular e alteração na morfologia das células, sendo possível visualizar pequenas gotículas lipídicas no citoplasma. Aos 14 dias, adipócitos maduros puderam ser observados e a coloração Oil Red revelou citoplasmas contendo lipídios (Figuras 3C e

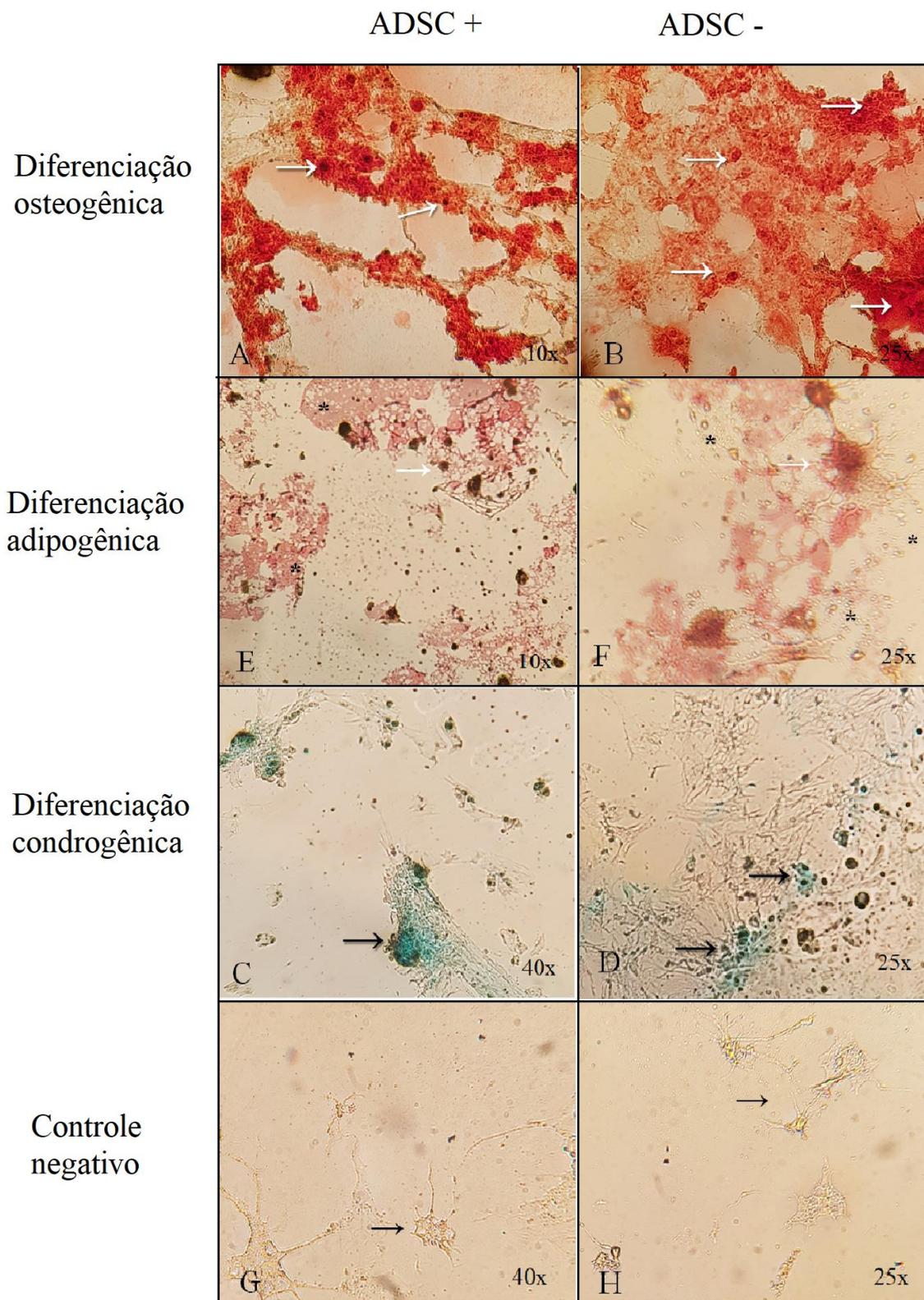
3D). A coloração por *Alcian blue* 1% revelou a expressão de colágeno citoplasmático de coloração azul em ambos os grupos de ADSC induzidos (Figuras 3E e 3F). O número de adipócitos e gotículas lipídicas foi maior no grupo CD49d+ do que no grupo CD49d-. Não foram observadas alterações evidentes nos grupos não induzidos (Figura 3G e 3H).



**FIGURA 3.** Potencial de diferenciação celular com 14 dias de indução. A e B: Aspectos microscópicos da diferenciação celular de cultivos ADSC CD49d+ e CD49d- em linhagem osteogênica coradas por corada por Alizarin Red mostrando a deposição nodular de cálcio (setas). C e D: Diferenciação celular de cultivos ADSC CD49+ e CD49d- em linhagem adipogênica corada por Oil Red

apontando as gotículas de lipídios (seta) no citoplasma (asterisco) celular. E e F: Diferenciação celular de cultivos ADSC CD49<sup>+</sup> e CD49<sup>-</sup> em linhagem condrogênica com síntese de colágeno (setas) coradas por Alcian Blue 1%. G e H: Células CD49<sup>+</sup> (seta) e CD49<sup>-</sup> (asterisco) sem indução de diferenciação – controle negativo mostrando morfologia fusiforme característica de células-tronco.

Nos grupos induzidos por 21 dias, foi possível observar maior grau de diferenciação celular com os três meios de indução, com maior presença de colágeno no meio condrogênico, grande quantidade de depósitos marrons no cultivo induzido por meio osteogênico e intensa quantidade de lipídios corados nas células adipogênicas (Figura 4).

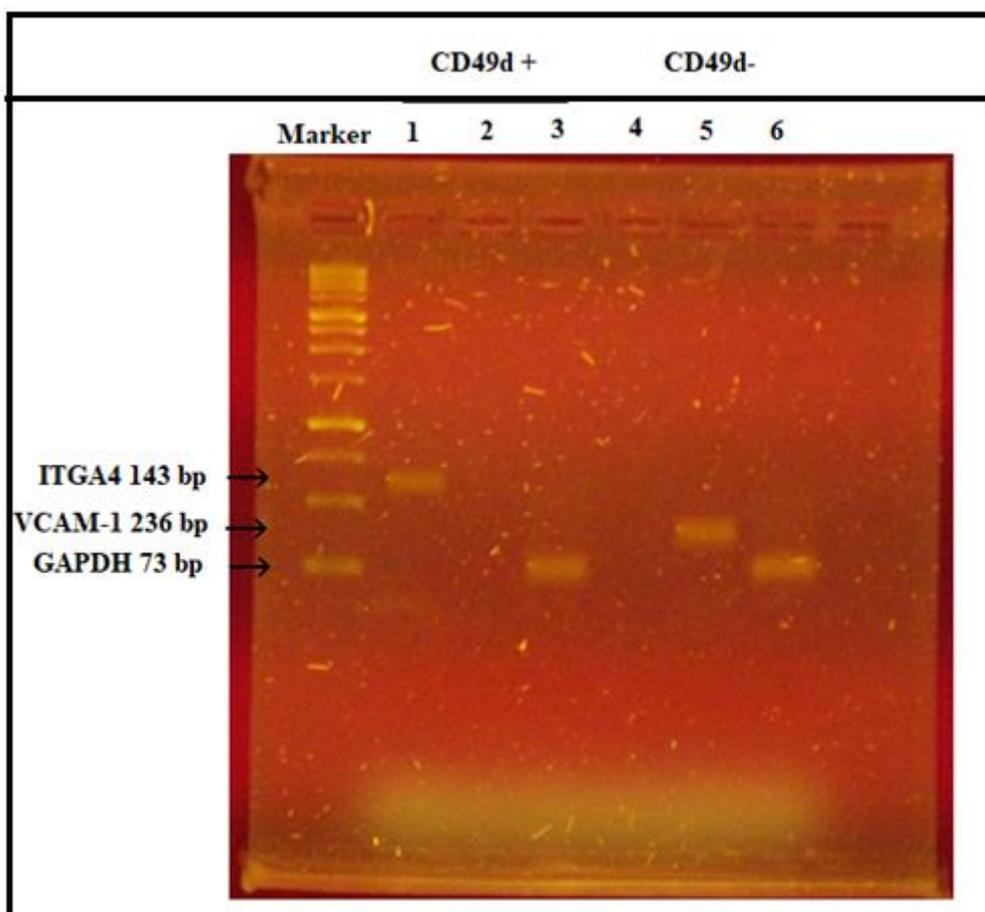


**FIGURA 4.** Potencial de diferenciação celular com 21 dias de indução. A e B: Aspectos microscópicos da diferenciação celular de cultivos ADSC CD49d+ e CD49d- em linhagem osteogênica coradas por corada por Alizarin Red mostrando intensa mineralização da matriz extracelular (setas). C e D: Diferenciação celular de cultivos ADSC CD49+ e CD49d- em linhagem adipogênica corada por Oil Red apresentando refringência na imagem devido a presença de lipídios no meio bem como morfologia arredondada das células adipogênicas (setas) ou as gotículas de lipídios (seta) no

citoplasma (asterisco) celular. E e F: Diferenciação celular de cultivos ADSC CD49+ e CD49d- em linhagem condrogênica com intensa deposição de colágeno (setas) coradas por Alcian Blue 1%. G e H: Células CD49d+ e CD49d-, respectivamente, sem indução de diferenciação – controle negativo mostrando morfologia fusiforme e aderente característica de células-tronco.

### Expressão gênica dos antígenos de superfície

A expressão dos antígenos de superfície das células ADSC foram avaliadas utilizando PCR dos marcadores para os genes *ITGA4* (CD49d) e *VCAM-1* (CD106). Foi possível observar a expressão do gene *ITGA4* nos cultivos de células denominadas CD49d+ e ausência de expressão na população CD49d-. O gene *VCAM-1* por sua vez foi expresso apenas nos cultivos considerados CD49d-, sugerindo a presença de células tronco mesenquimais (Figura 5). O gene constitutivo *GAPDH* foi expresso em ambos os cultivos de células.



**FIGURA 5.** Expressão dos genes *ITGA4* (CD49d) e *VCAM-1* (CD106) em cultivos ADSC CD49d+ e CD49d-. Cultivo ADSC CD49+ apresentou expressão para o gene *ITGA4*, enquanto cultivo ADSC CD49d- apresentou expressão para *VCAM-1*, conforme demonstrados pelos traços mais claros nas colunas 1 e 5 respectivamente. Colunas 3 e 6 apresentam a expressão do gene constitutivo *GAPDH* usado como controle positivo da técnica.

**Discussão:**

Os métodos de isolamento de ADSC são baseados na sua capacidade de aderência ao plástico. Por isso, o método de cultivo *in vitro* em frascos plásticos acrescidos de meio de cultivo e SFB é o mais utilizado para isolar e enriquecer as ADSC a partir da extração da FEV do tecido adiposo<sup>14</sup>. Alguns estudos demonstraram que a proliferação e diferenciação dessas células podem ser modificadas durante a cultivo *in vitro*<sup>15,16</sup>. Dessa forma a separação das células de interesse por meio de imunomarcadores tem se tornado um método importante para adquirir população de células bem definidas, com funções bem caracterizadas<sup>16</sup>.

Estudos de caracterização dos diferentes tipos de células tronco tem demonstrado semelhança entre os biomarcadores de superfície das células ADSC e CTM. Ambas parecem expressar as proteínas CD90+ e CD44+, mas não expressam CD45-<sup>17,18</sup>. Shawn et al.<sup>20</sup>, ao isolar células do tecido adiposo da região inguinal de camundongos, caracterizaram a população homogênea, após três passagens em cultivo, pela expressão de 97% dos marcadores CD105+, CD90+ e CD45-. O mesmo foi observado em tecido adiposo humano, com expressão dos biomarcadores CD29, CD90 e CD105 positivos<sup>21</sup>. Dessa forma, as células ADSC podem ser diferenciadas das CTMs pela expressão da proteína CD49d e não expressão do marcador edotelial CD106<sup>15,16,22,23</sup> o que possibilita um isolamento mais puro dessa população celular.

A expressão gênica das ADSCs CD49d positivas e negativas foram analisadas e demonstraram expressar os antígenos CD49d no grupo considerado positivo e CD106 no grupo considerado negativo. O mesmo foi observado por Fraser et al<sup>24</sup>, que ao realizar análise comparativa por citometria de fluxo de células ADSC e CTM cultivadas, relatou que as ADSC expressam CD49d e não CD106, enquanto CTMs expressam CD106, mas não CD49d.

Mitchell et al<sup>31</sup> investigaram similarmente os marcadores de superfície em células obtidas de aspirados de gordura; os marcadores de superfície nessas células incluíam CD13, CD29, CD44, CD63, CD73, CD90, CD105 e CD166, que eram semelhantes aos observados nas células-tronco derivadas da medula óssea (CTM-MO). A expressão desses marcadores, incluindo CD49d, CD44, CD90, CD105, CD13 e CD71, ficou estável por até 7 passagens e 3 meses em cultivo<sup>31</sup>. Izadpanah et al (2006)<sup>32</sup> propuseram que ADSC e CTM-MO eram positivos para os antígenos de células-tronco

embrionárias, Oct-4, Rex-1 e Sox-2. No presente estudo, as ADSC foram positivas para o antígeno de superfície CD49d, mas não para CD106 relacionado à CTM. Esses achados sugerem que a separação magnética de células ADSC é capaz de eliminar as CTM, além de células contaminantes e possivelmente outras não CTM.

A homogeneidade da cultivo de células-tronco tem se mostrado importante, uma vez que a expressão dos biomarcadores de superfície das ADSCs pode mudar durante a expansão de cultivo devido as condições do microambiente como aderência plástica ao frasco e concentrações elevadas de soro fetal bovino, influenciando na proliferação e diferenciação celular<sup>33</sup>. Assim, o isolamento das células-tronco imediatamente após a obtenção do tecido adiposo diminui contaminantes do cultivo, como fibroblastos, angioblastos que poderiam influenciar na síntese de fatores importantes para o desenvolvimento das ADSCs.

Neste estudo foi realizado o isolamento de células ADSC a partir da FEV obtida de tecido adiposo de rato. As ADSC foram separadas com base na expressão do marcador de superfície CD49d. As ADSC CD49+ apresentaram aumento da proliferação celular em comparação com as células CD49d-. No teste de indução a diferenciação, as ADSCs CD49d+ apresentaram maior capacidade de se diferenciar em condrócitos, osteócitos e adipócitos do que o observado para ADSC CD49d-, embora ambas tenham apresentado capacidade de diferenciação, o que também foi observado em outros estudos que avaliaram sua capacidade de se diferenciar em condrócitos<sup>24</sup>, osteoblastos<sup>25</sup>, células endoteliais<sup>26</sup>, células musculares<sup>27,28</sup> e até hepatócitos<sup>29</sup>.

Ao realizar a dissociação imunomagnética das células-tronco a partir do tecido adiposo é possível garantir uma maior homogeneidade dessa população celular evitando a contaminação do cultivo por outras células como fibroblastos, angioblastos, células endoteliais, linfócitos, mielócitos, pericítos e pré-adipócitos presentes na fração estromal vascular<sup>34</sup>. Dessa forma, o potencial proliferativo e de diferenciação associado as ADSC pode ser mais evidenciado pelo grupo CD49d positivo, visto que o grupo CD49d negativo possivelmente é composto por células de diferentes linhagens bem como fibroblastos. Corroborativamente, Fuoco et al<sup>35</sup> demonstraram que a separação mecânica das células ADSC apresentou inicialmente maior curva de crescimento e menor tempo de proliferação comparado ao método convencional de isolamento por digestão com colagenase e aderência ao plástico, sugerindo que o método tradicional pode comprometer o potencial proliferativo das células-tronco.

Para demonstrar a necessidade de um método simples de obter e purificar ADSC a partir de uma população mista como a FEV, neste estudo foi realizado um ensaio imunomagnético de esferas com *microbeads* semelhante a Jiang et al<sup>36</sup> e Xiao-Jie et al<sup>13</sup>. De modo semelhante, Griesche et al<sup>37</sup> compararam vários métodos de obtenção de populações homogêneas de células tronco a partir do tecido adiposo, relatando uma pequena vantagem do uso de isolamento imunomagnético com a desvantagem do baixo rendimento. Assim, a separação de ADSC utilizando o ensaio imunomagnético de esferas pode atingir uma população de células alvo de alta pureza.

Para determinar se as células separadas tinham as características das células-tronco, foram avaliadas sua morfologia, capacidade de auto-renovação e multipotencialidade. Ambos os cultivos de células-tronco, tanto CD49d positivas quanto negativas apresentaram morfologia fusiforme e alongada semelhante a fibroblastos. Ao observar o tamanho das colônias formadas as células ADSC CD49d positivas apresentaram maior tamanho (> 0,5 cm) em relação as ADSCs CD49d negativas após 3 semanas de cultivo. Entretanto, em estudo semelhante, Jiang et al<sup>36</sup>, ao separar as ADSCs utilizando o marcador CD105 por citometria de fluxo, não encontraram diferenças na proliferação ou formação de colônias. Isso pode ser causado por diferenças na fonte de tecido, condição de cultivo e, mais importante, nos métodos de separação.

Ao avaliar o potencial de diferenciação das células ADSC CD49d positivas e negativas para o CD49d, ambas não apresentaram diferença nos potenciais condrogenéticos e osteogênicos, o que é semelhante ao observado por Jiang et al. (2010)<sup>36</sup>. As estruturas semelhantes a lacunas ósseas e a presença de colágeno foram pouco observadas nos cultivos de ADSC CD49d-, quando comparada com as células CD49d+. As diferenças no potencial adipogênico foram relativamente pequenas entre as duas populações celulares, o que pode ser atribuído à presença de células precursoras de gordura em ambos os cultivos.

Esses resultados sugerem que, embora em menor grau, as células CTM possuem capacidade de diferenciação celular, e que a presença de células precursoras de gordura, de condroblastos e de osteoblastos no cultivo CD49d- não pode ser descartada, evidenciando que a população celular oriunda do tecido adiposo de ratos corresponde a uma população de células estromais mesenquimais multipotentes.

Resumidamente, a principal vantagem de utilização da separação imunomagnética em relação à digestão enzimática das células ADSC refere-se ao

tempo de proliferação celular. Como se observa na Figura 2, a taxa de proliferação das células obtida por dissociação imunomagnética apresentam um crescimento inicial muito maior relativamente para a digestão enzimática. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas. Tal observação confere a este estudo um aspecto original e altamente relevante, uma vez que a metodologia apresentada mostra a viabilidade e eficiência de um novo método para isolamento e cultivo de ADSC.

**Conclusão:**

Conclui-se que a imonumarcção para proteína CD49d seguida de separação magnética permitiu o isolamento de células com maior capacidade proliferativa e potencial de diferenciação em relação as células CD49d negativas. Assim, em função dos resultados encontrados, propõe-se que a dissociação imunomagnética das células ADSC apresenta-se como uma alternativa viável e promissora em comparação a técnica convencional com utilização de colagenase para isolamento e cultivo de células provenientes do tecido adiposo, particularmente quando se tem por finalidade o emprego de ADSC em protocolos clínicos de terapia celular em pacientes humanos.

**REFERÊNCIAS**

1. Yoo G e Lim SJ. Effects on adipose derived stromal cells and of their extract in wound healing mouse model. *J Korean Med Sci.* 2010;25(5):746-51.
2. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):19
3. Morais JM, Mendonça DEdeO, Moura VB, Oliveira MA, Afonso CL, Vinaud MC, Bachion MM, Lino Jr RdeS . Anti-inflamatóry effect of low intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. *Lasers Med Sci.* 2012;28(4):1169-76.
4. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117(7):12S-34S.
5. Wolf SE, Tompkins RG e Herndon DN. On the horizon: Research priorities in burns for the next decade. *Surg Clin North Am.* 2014;94(4):917-30.
6. Van der Veer WM, Bloemen MCT, Ulrich MMW, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, Niessen FB. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns.* 2009;35(1):15-29.
7. Lee SH, Lee JH e Cho KH. Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. *Ann Dermatol.* 2011;23(2):150-5.
8. Karimi H, Soudmand A, Orouji Z, Taghiabadi E, Mousavi SJ. Burn wound healing with injection of adipose-derived stem cells : a mouse model study. *Ann Burns Fire Disasters.* 2014;27(1):44–9.
9. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns.* 2014;40(7):1375-83.
10. Lim SJ e Gyeol Y. Effects of Adipose derived Stromal Cells and of their extract on wound healing in a mouse model. *J Korean Med Sci.* 2010; 25(5):746-51.
11. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):230-6.
12. Higuchi A. et al. A hybrid-membrane migration method to isolate high-purity adipose-derived stem cells from fat tissues. *Scientific Reports,* 2015; 5.
13. Xiao-Jie LV et al. ADSC isolation using anti-cd105 magnetic beads. *International Journal of Molecular Medicine.* 2012; 30: 826-834.

14. Martins PDE, Uebel CO, Machado DC, da Silva JB. Uso de células-tronco adultas de tecido adiposo na cicatrização da pele: estudo controlado, randomizado. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2011;26(3):394-401.
15. Gimble JM, Nuttall ME. Adipose-derived stromal/stem cells (ASC) in regenerative medicine: pharmaceutical applications. *Current pharmaceutical design.* 2011; 17:332–339.
16. Cignarelli A, et al. Human adipose tissue stem cells: relevance in the pathophysiology of obesity and metabolic diseases and therapeutic applications. *Expert Rev. Mol. Med.* 2012; 14(19).
17. Busser H, et al. Isolation and characterization of human mesenchymal stromal cell subpopulations: comparison of bone marrow and adipose tissue. *Stem Cells and Development*, 2015; 24(18).
18. Sullivan MO. et al. Comparison of mesenchymal stem cell surface markers from bone marrow aspirates and adipose stromal vascular fraction sites. *Frontiers in Veterinary Science.* 2016, 82(2).
19. Riccobono, D., Agay, D., Scherthan, H., Forcheron, F., Vivier, M., Ballester Application of Adipocyte-Derived Stem Cells in Treatment of Cutaneous Radiation Syndrome. *Health Physics.* 2012;103(2):120-6
20. Shawn Loder BA. Fat and Adipose Derived Stem Cell Isografts. *J Burn Care Res.* 2015; 36(1): 70–76.
21. Park I-S, Chung P-S, Ahn JC. Enhancement of ischemic wound healing by spheroid grafting of human adipose-derived stem cells treated with low-level light irradiation. *PLoS ONE.* 2015. 2015; 10(6).
22. Bassi G. et al. Adipose-derived stromal cells (ASCs). *Transfusion and Apheresis Science*, 2012; 47:193–198.
23. Inácio JC. Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra antígenos de células-tronco adulta de origem humana e de coelho. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Médica da Universidade Estadual Paulista. 2011.
24. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-4.
25. Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW and Lee EH: A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng.* 2007;13: 659-666.
26. Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, *et al*: Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells

- before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Eng.* 2007; 13: 111-121.
27. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, *et al*: Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 2004, 109: 656-663.
  28. Van Dijk A, Niessen HW, Zandieh Doulabi B, Visser FC and van Milligen FJ: Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res.* 2008; 334: 457-467.
  29. Zhu Y, Liu T, Song K, Ning R, Ma X and Cui Z: ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. *Mol Cell Biochem.* 2009; 324: 117-129.
  30. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, *et al*: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007; 46: 219-228.
  31. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, *et al*: Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006; 24: 376-385.
  32. Folgiero V, Migliano E, Tedesco M, *et al*: Purification and characterization of adipose-derived stem cells from patients with lipoaspirate transplant. *Cell Transplant* 19: 1225-1235, 2010.
  33. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM and Bunnell BA: Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99: 1285-1297, 2006.
  34. Lamaro-Cardoso A, Bachion MM, Morais JM, *et al*. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. *J Photochem Photobiol B Biol.*194:174-182, 2019.
  35. Fuoco LN, Marcelino MY, Stessuk T, *et al*. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais.* 8:7-14, 2016.
  36. Jiang T, Liu W, Lv W, *et al*: Potent in vitro chondrogenesis of CD105 enriched human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 31: 3564-3571, 2010.
  37. Griesche N, Luttmann W, Luttmann A, Stammermann T, Geiger H and Baer PC: A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs* 192: 106-115, 2010.
  38. Liu G, Chen X. Isolating and Characterizing Adipose-Derived Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2018; 1842:193-201.

## CAPÍTULO 4 – ARTIGO 3 – TRATAMENTO DE QUEIMADURAS DE ESPESSURA TOTAL COM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE ASSOCIADO COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA EM MODELO PRÉ-CLÍNICO

TREATMENT OF TOTAL THICKNESS BURNS WITH STEM CELLS DERIVED FROM THE ADIPOSE TISSUE ASSOCIATED WITH LOW-LEVEL LASER IN PRE-CLINICAL MODEL

### Resumo

**Introdução:** A queimadura pode ser definida como uma lesão traumática geralmente de origem térmica que acomete o tecido epitelial e adjacentes podendo ser classificada de acordo com a profundidade atingida. A complexidade do reparo tecidual envolvido nesse tipo de lesão é um desafio para os métodos tanto pela sua gravidade, como pela multiplicidade de complicações. A medicina regenerativa tem apostado na utilização da terapia por fotobiomodulação por laser de baixa potência (LBP) e células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC), especialmente em fases iniciais do processo, para promover uma melhor cicatrização e menor tempo de reparo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação do LBP (660nm) e ADSC no processo de reparo do tecido cutâneo queimado; e investigar a associação das técnicas (LBP e ADSC) no tratamento de queimadura de espessura total. **Materiais e métodos:** Para isso foi realizado estudo *in vivo* utilizando 96 ratos (Wister) e modelo de queimadura por escaldadura com água em temperatura de 95°C e exposição do dorso do animal por 14 segundos. Os animais foram aleatorizados em sete grupos e três momentos de biópsia, cinco, 14 e 21 dias: GC: Grupo controle. ADSC-: Grupo tratado com células CD49d negativa. ADSC+: Grupo tratado com células CD49d positiva. CULT: Grupo tratado com células de isolamento convencional. LBP: Grupo tratado apenas com Laser de Baixa Potência LBP. ADSC-LBP: Grupo tratado com células CD49d negativa associada ao LBP. ADSC+LBP: Grupo tratado com células CD49d positiva associada ao LBP. Os grupos tratados com LBP (660nm; 5J/cm<sup>2</sup>) receberam as irradiações três vezes por semana, em dias alternados durante cinco, 14 e 21 dias, de acordo com o momento de biópsia. Os grupos tratados com ADSC receberam de uma a três aplicações das células em volume total de 1000µL com início logo após o debridamento cirúrgico da queimadura. Foi realizado o monitoramento fotográfico nos períodos de 5, 14 e 21 dias após o início do experimento para avaliar o grau de contração da lesão. Foram realizadas análises macroscópicas, morfométricas e histopatológicas. **Resultados:** Os resultados apontaram reepitelização significativa bem como melhora no processo de cicatrização dos grupos ADSC+, LBP e ADSC+LBP. Foi possível observar efeitos na redução da fase inflamatória, aumento da agiogênese, diminuição do edema, maior deposição de colágeno, melhor organização de matriz extracelular comparado aos demais tratamentos. Além disso, a separação imunomagnética das células ADSC por meio da expressão da proteína CD49d mostrou-se uma forma viável para obtenção de uma população mais homogênea de células com papel fundamental na regeneração tecidual comparada aos grupos ADSC- e CULT. **Conclusão:** O estudo concluiu que a associação das ADSC+ com LBP foi eficaz para acelerar o processo de reparo de

queimaduras, de forma a estimular a proliferação celular e auxiliar a formação de um tecido cutâneo de qualidade e formar um tecido cutâneo de qualidade.

**Palavras-chave:** Queimadura. Fotobiomodulação. Laserterapia. Células-tronco.

## Abstract

**Introduction:** Burns can be defined as a traumatic injury usually of thermal origin that affects the epithelial and adjacent tissues and can be classified according to the depth reached. The complexity of tissue repair involved in this type of injury is a challenge for the methods both because of its severity and the multiplicity of complications. Regenerative medicine has invested in the use of low power laser photobiomodulation (LBP) therapy and stem cells derived from adipose tissue (ADSC), especially in the early stages of the process, to promote better healing and less repair time. Thus, the objective of this study was to evaluate the action of LBP (660nm) and ADSC in the process of repairing burnt skin tissue; and to investigate the association of techniques (LBP and ADSC) in the treatment of full-thickness burns. **Materials and methods:** For this, an in vivo study was carried out using 96 rats (Wister) and scalding scald model with water at a temperature of 95°C and exposure of the animal's back for 14 seconds. The animals were randomized into seven groups and three biopsy moments, five, 14 and 21 days: CG: Control group. ADSC-: Group treated with CD49d negative cells. ADSC +: Group treated with CD49d positive cells. CULT: Group treated with conventional isolation cells. LBP: Group treated only with LBP Low Power Laser. ADSC-LBP: Group treated with CD49d negative cells associated with LBP. ADSC + LBP: Group treated with CD49d positive cells associated with LBP. The groups treated with LBP (660nm; 5J / cm<sup>2</sup>) received irradiations three times a week, on alternate days for five, 14 and 21 days, according to the time of biopsy. The groups treated with ADSC received from one to three applications of the cells in a total volume of 1000µL, beginning shortly after the surgical debridement of the burn. Photographic monitoring was performed in the periods of 5, 14 and 21 days after the beginning of the experiment to assess the degree of contraction of the lesion. Macroscopic, morphometric and histopathological analyzes were performed. **Results:** The results showed significant reepithelialization as well as improvement in the healing process of the ADSC +, LBP and ADSC + LBP groups. It was possible to observe effects in reducing the inflammatory phase, increasing angiogenesis, decreasing edema, greater collagen deposition, better organization of extracellular matrix compared to other treatments. In addition, the immunomagnetic separation of ADSC cells through the expression of the CD49d protein proved to be a viable way to obtain a more homogeneous population of cells with a fundamental role in tissue regeneration compared to the ADSC- and CULT groups. **Conclusion:** The study concluded that the association of ADSC + with LBP was effective to accelerate the burn repair process, in order to stimulate cell proliferation and assist in the formation of a quality skin tissue and form a quality skin tissue.

**Keywords:** Burn. Photobiomodulation. Lasertherapy. Stem cells.

## **Introdução:**

As lesões provocadas por queimaduras de espessura total consideradas como forma severa de dano ao tecido biológico, sendo capaz de destruir diversas estruturas e camadas da pele e tecidos adjacentes, provocando prejuízo local e sistêmico para o organismo<sup>1</sup>.

O tratamento convencional para ferida por queimadura de espessura total tem como objetivo prevenir processos infecciosos e remover tecidos necróticos<sup>3</sup>. Embora este tipo de tratamento tenha se mostrado eficiente, há também um aumento do número de indivíduos que passam a apresentar graves disfunções motoras e problemas de ordem psico-emocional e social em consequência às contraturas cicatriciais e deformidades estéticas resultantes<sup>4</sup>. Assim, novos métodos terapêuticos vêm sendo estudados para promover uma recuperação mais adequada e com melhores resultados no tratamento de tecidos danificados por queimaduras<sup>5</sup>.

Atualmente, o tecido adiposo, tem sido utilizado em enxertos autólogos no tratamento de lesões traumáticas, por apresentar atividade endócrina e imunoregulatória<sup>6</sup>. O fracionamento dos componentes celulares do tecido adiposo por digestão enzimática e posterior centrifugação do material levantou novas possibilidades de utilização deste tecido em terapia regenerativa e permitiu o avanço no uso das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) para a obtenção de melhores resultados na reparação de tecidos lesionados<sup>7-10</sup>.

No entanto os métodos tradicionais de isolamento são inespecíficos tornando o cultivo com 40 a 20% de heterogeneidade o que pode comprometer seu potencial de proliferação e diferenciação<sup>9</sup>. Uma vez que para a utilização dessas populações celulares em engenharia de tecidos, o ideal é que se obtenha uma população celular bem padronizada, a seleção de células por meio de proteínas específicas de superfície pode permitir o isolamento e expansão *in vitro* com um grau de especificidade mais elevado<sup>6,7</sup>. Neste sentido estudos tem caracterizado a população de ADSC de acordo com seu padrão de expressão de moléculas de adesão, de forma que a proteína CD49d é um marcador capaz de diferenciar as ADSC das células-tronco derivadas da medula óssea (CT-MO)<sup>11-13</sup>.

Além disso, a aplicação de agentes bioestimuladores junto à terapia celular tem mostrado ser uma alternativa promissora e de baixo custo no aumento da viabilidade, potencial proliferativo, de diferenciação e organização morfofuncional das células

ADSC<sup>14,15</sup>. Dentre estes agentes, o laser de baixa potência (LBP), tem sido associado a eficácia progressão dos processos regenerativos, pois parece exercer importantes efeitos modulatórios na resposta inflamatória nas fases iniciais do reparo tecidual<sup>1</sup>.

A utilização do LBP, como agente bioestimulador em associação com células-tronco mesenquimal (CTM) parece proporcionar melhores resultados na cicatrização de tecidos lesionados, pois apresentam alta capacidade de indução da proliferação e diferenciação celular<sup>5</sup>. Assim o desenvolvimento da medicina regenerativa, com a utilização das ADSC associadas à estimulação por LBP tem demonstrado ser uma terapia promissora, capaz de melhorar a qualidade de cicatrização das lesões extensas e com a diminuição do custo, pela redução do tempo de tratamento e menor risco de contaminação secundária<sup>15</sup>. Desta forma, frente aos benefícios que essas terapias podem proporcionar para o processo de reparo tecidual, há a necessidade de realização de mais estudos para melhor elucidação os riscos e benefícios da terapia por ADSC isoladas e associadas ao LBP no tratamento de feridas por queimaduras.

### **Objetivos:**

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos da utilização do cultivo de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) obtida por método tradicional e separadas imunomagneticamente pela expressão da proteína CD49d, quando aplicadas de forma isoladas ou associadas ao laser de baixa potência (LBP) no processo de cicatrização em modelos de ferida por queimadura de espessura total em ratos.

### **Metodologia:**

#### **Delineamento do estudo**

Foi realizado um estudo prospectivo, quali/quantitativo e descritivo conduzido no Laboratório Multiusuário do Curso de Biomedicina, Laboratório de Morfofisiologia do Curso de Medicina e Biotério de Experimentação Animal da Universidade Federal de Jataí (UFJ), Jataí-GO. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da UFG aprovado sob protocolo 087/2016 (Anexo 1) e 015/2019 (Anexo 2).

## **Grupo amostral**

No experimento foram utilizados 105 ratos da linhagem Wistar (*Ratus norvegicus albinus*) do Biotério Central da UFG, Goiânia/GO, fêmeas, hípidas com peso entre 250 a 300 gramas, mantidos em três animais por gaiola, com alimentação à base de ração e água *ad libitum*. As trocas das camas foram realizadas duas a três vezes por semana, utilizando-se maravalha autoclavada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com sete grupos, composto por cinco repetições cada, em que foram coletados material para análise microscópica em três momentos de biopsia: 5, 14 e 21 dias após indução da lesão. Os grupos foram organizados da seguinte forma: 1. GC: grupo controle; 2. ADSC+: grupo tratado com injeção de células-tronco derivadas do tecido adiposo CD49d positivas nas lesões; 3. ADSC-: grupo tratado com injeção de ADSC CD49d negativas nas lesões. 4. ADSC+LBP: grupo tratado com injeção de ADSC CD49+ e irradiação de LBP nas lesões; 5. ADSC-LBP: grupo tratado com injeção de ADSC CD49- e irradiação de LBP nas lesões; 6. LBP: grupo tratado com irradiação de LBP nas lesões. 7. CULT: grupo tratado com ADSC isoladas por cultivo convencional.

## **Manuseio e condições experimentais com os animais**

Os animais receberam pré-anestésico Diazepam na dose de 2,5 a 5 mg/Kg via intraperitoneal para reduzir o estresse por contenção e manuseio seguido de solução anestésica (0,01 mL/g de ketamina a 10% e xylazina a 2%) aplicada intraperitonealmente), conforme descrito por Kawano et al.<sup>21</sup>. Após anestesiados, realizou-se a tricotomia de 3cm<sup>2</sup> do dorso dos animais, seguida pela indução da lesão térmica através do contato da região epilada com água a 95°C por 14 segundos. Para tal, foram utilizadas duas seringas unidas por uma torneira de duas saídas formando ângulo de 90°, em que uma das extremidades abertas do embolo com área de 1cm<sup>2</sup> continha água quente. Por fim, foram utilizados como agente analgésico o Tramadol (0,3 mg/Kg) via subcutânea, a cada 12h, por três dias, sendo substituído pelo uso do Tramadol (1-2 mg/mL) na água dos animais, por mais quatro dias.

Durante os procedimentos experimentais o ressecamento ocular foi evitado através da aplicação de solução fisiológica e oclusão com algodão umedecido. Os animais foram manuseados em sala distinta do local em que foram mantidos para evitar

medo ou ansiedade. Após 24 horas de indução das lesões, foi realizado o desbridamento cirúrgico retirando-se o tecido necrótico na área da lesão de todos os animais.

### **Coleta, isolamento e cultivo das células ADSC**

Para a coleta do tecido adiposo foram utilizados seis ratos que não fizeram parte dos grupos citados acima. Após a eutanásia dos ratos, com sobredose de Tiopental (100mg/Kg), foi retirado o tecido adiposo da região de flanco ventral. A obtenção da fração estromal vascular (FEV) foi realizada por meio de digestão enzimática do tecido adiposo com colagenase tipo I e centrifugação celular, conforme Martins et al.<sup>11</sup> (2011). Uma parte do pellet celular obtido foi utilizado para separação celular por meio de imunomarcagem com *microbeads* magnéticas CD49d positivas, que permite isolar por coluna magnética somente as células ADSC, e outra parte foi cultivada em frasco de cultivo para separação das células-tronco por meio de suas propriedades adesivas ao plástico, conforme Atalay et al. (2014).

As células imunomarcadas com CD49d foram separadas utilizando *microbeads* magnéticas inicialmente marcadas pelo anticorpo primário Rat CD49d (ITGA4 Monoclonal Antibody – ThermoFisher) e Anti-Mouse IgG1 MicroBeads (MACS®, Miltenyi Biotech) como anticorpo secundário seguindo-se as recomendações do fabricante.

As células positivas e negativas, bem como a população celular que não recebeu imunomarcagem, foram cultivadas e expandidas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> com meio de cultivo celular (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% de Soro fetal bovino e 2% solução de antibiótico e antimicótico [10,000 IU/ mL penicilina, 10,000 µg/mL streptomicina, 25 µg/mL amfotericina]) e estufa úmida a 5% de CO<sup>2</sup> a 37°C, até atingir o período de confluência celular de 75%. Após esse período, as células foram removidas com tripsina 0,25% e adicionadas às novas garrafas de cultivo (repiques/passagens). As células foram mantidas em cultivo por um período máximo de cinco passagens, sendo em seguida retiradas para aplicação nas feridas.

Uma alíquota de  $1 \times 10^6$  células de cada garrafa foi destinada ao cultivo para diferenciação celular nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica para confirmação da linhagem de células-tronco mesenquimais. A concentração celular preconizada para as injeções de células foi de  $5 \times 10^6$  células, em cada lesão de todos os grupos.

## **Aplicação das células-tronco e laser de baixa potência**

Logo após o debridamento cirúrgico foi iniciado a aplicação dos tratamentos de forma específica para cada grupo. As células-tronco, em concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL e diluídas em PBS (tampão fosfato-salino), foram injetadas intradérmicas ao em quatro pontos equidistantes ao redor das lesões e diretamente sobre o leito da ferida (0,2 mL por ponto).

Para as aplicações do LBP foi utilizado aparelho de laser Physiolum Dual P. 5040 (comprimento de onda 660 nm, 30 mW de potência, BIOSET Equipamentos). As aplicações do LBP tiveram início 24 horas após a indução das lesões e foram realizadas diariamente, de forma pontual em quatro aplicações equidistantes de 1 cm nas bordas da ferida e uma aplicação no leito central da ferida, sendo 1 Joule/cm<sup>2</sup> em cada ponto, cujo tempo de aplicação foi de aproximadamente 3 segundos por ponto. Dessa forma, a energia depositada no leito e em cada ponto da borda da ferida foi de 1 Joule totalizando 5 Joules de energia com fluência de 450 Joules/cm<sup>2</sup> total depositada na lesão.

## **Avaliações macroscópicas das lesões**

Nos mesmos dias das aplicações de LBP as lesões foram avaliadas macroscopicamente quanto a: inflamação, necrose, formação do tecido de granulação, grau de formação de epitélio e evolução cicatricial; e analisadas em scores de 0 a 3 (0- ausente, 1- discreto; 2- moderado; 3- acentuado), conforme Lamaro et al. (2019). Concomitantemente, as lesões foram registradas em máquina digital acoplada a um suporte posicionado a 20 cm de distância da lesão. Para mensuração da área das feridas, as imagens macroscópicas das lesões foram analisadas com o software o software semi-automático *Image Processing and Analysis in Java*, versão 1.44 (Image J, NIH, EUA).

## **Biópsias e análises microscópicas**

Para as avaliações microscópicas, os grupos foram submetidos a quatro momentos de biópsia: 5, 14, e 21 dias após indução da lesão. Após esse período os animais foram submetidos à eutanásia e foram coletados fragmentos de pele e fixados por 24 horas em formol tamponado a 10% seguido de processamento histológico. O

material foi cortado a 4  $\mu\text{m}$  e corado pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricômico de Gomori (TG). Por meio de microscopia óptica, as laminas coradas com HE foram avaliadas quanto à intensidade de proliferação vascular e fibroblástica, grau de necrose tecidual, formação de crosta, edema, tipo e intensidade do infiltrado celular (polimorfonuclear ou mononuclear), formação de epitélio (avaliado quanto à extensão, espessura da camada epitelial e queratinização), formação do tecido de granulação com a reorganização da matriz extracelular da derme e a presença de folículos pilosos e glândulas sebáceas.

As lâminas submetidas à coloração de TG, foram avaliadas quanto à presença e/ou ausência de colágeno, formação do tecido de granulação, reorganização da matriz extracelular da derme com diferenciação em superficial (tecido conjuntivo frouxo com coloração azul claro) e profunda (tecido conjuntivo denso não modelado com coloração azul escuro) e a presença de folículos pilosos e glândulas sebáceas. Para os parâmetros microscópicos de HE e TG, foram estabelecidos escores de zero a quatro, sendo: escore 0 (ausente); escore 1 (até 25% do fragmento); escore 2 (entre 25 e 50% do fragmento); escore 3 (entre 50% e 75% do fragmento); e escore 4 (de 75% até 100% do fragmento), conforme Lamaro et al. (2019).

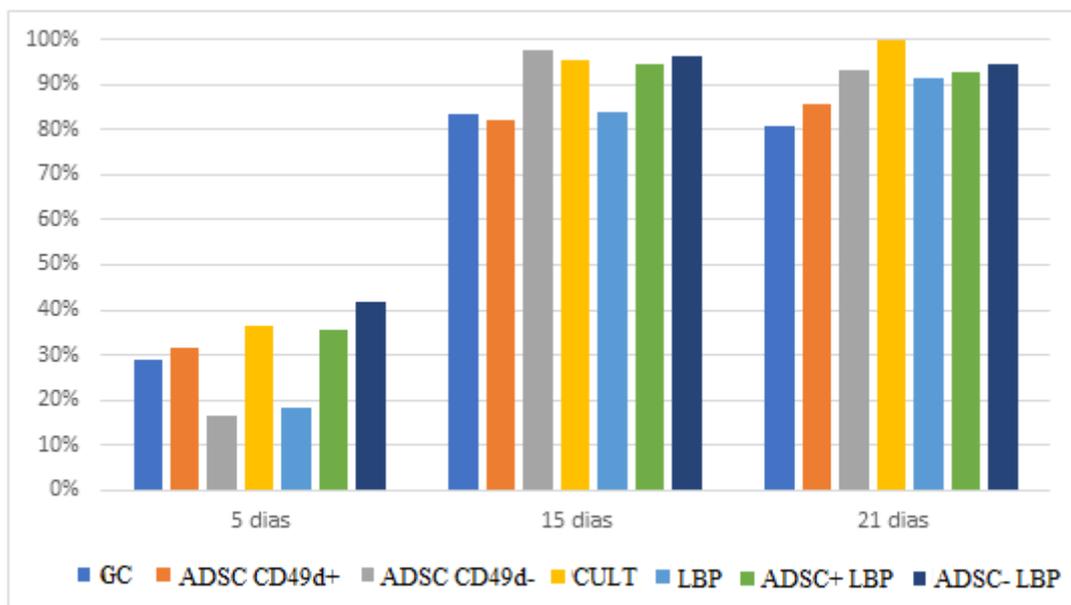
### **Análise estatística**

Os resultados das mensurações em escores foram expressos em valores numéricos que permitiram posterior análise estatística dos dados. Os dados morfométricos foram submetidos aos Teste de Tukey e Análise de variância (ANOVA). Histopatologicamente as variáveis em HE foram analisadas utilizando Teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico). As variáveis histopatológicas do TG foram analisadas por meio do Teste de Tukey-Anova e Teste de T-Pareado. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando-se o software Sigma Stat 2.3. *Statistic*.

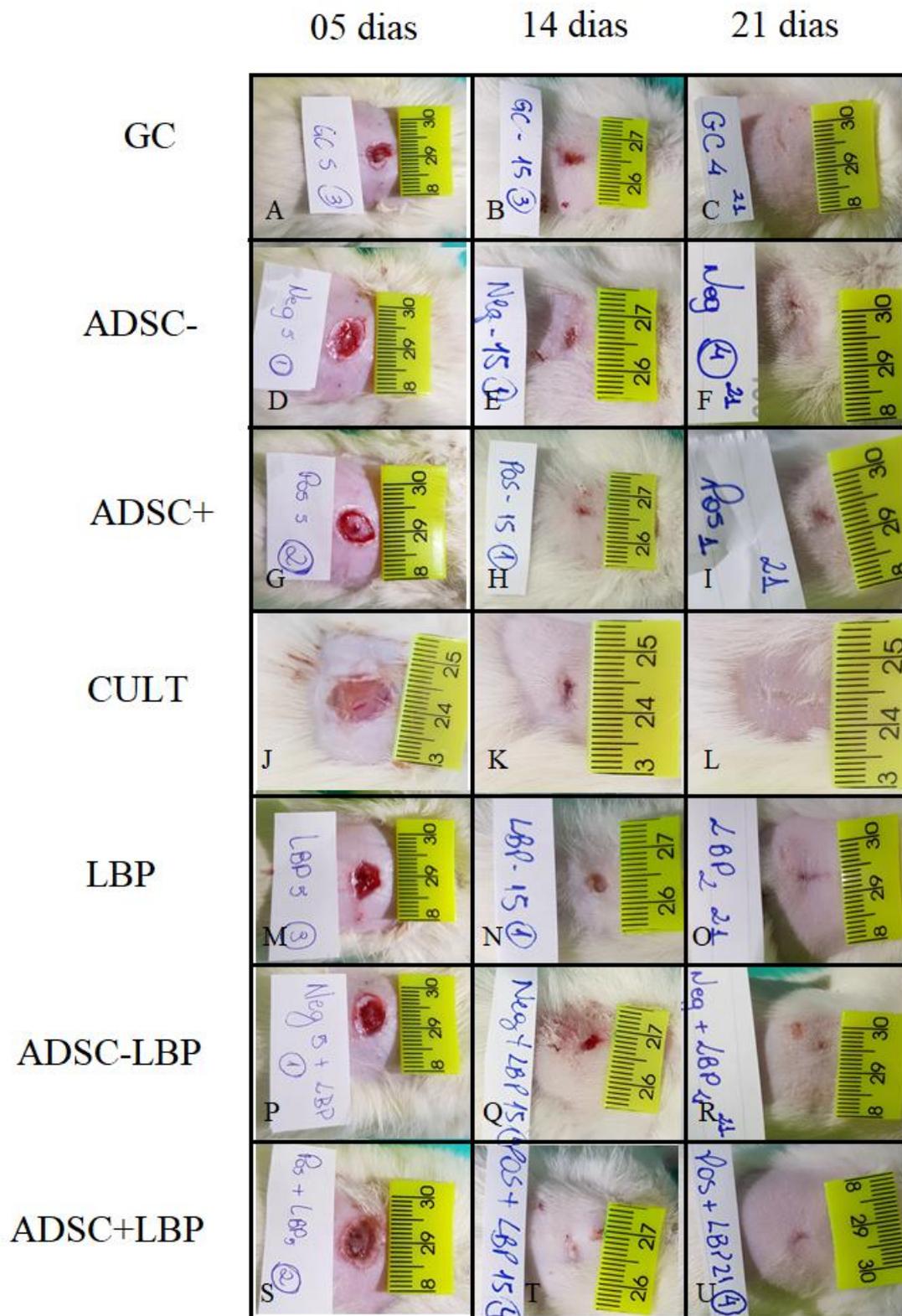
### **Resultados:**

As avaliações macroscópicas das lesões (Tabela 1) mostraram que nos tratamentos com LBP, ADSC CD49d+, ADSC CD49d- e CULT houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da área das feridas principalmente no grupo ADSC CD49d+ aos

15 dias após a indução da lesão (98%). Entretanto, ao longo do processo de remodelamento, observou-se no tempo de biópsia de 21 dias, que o grupo CULT (100%) apresentou significativamente ( $p=0,017$ ) menor área de lesão, demonstrando uma redução acentuada do tamanho das feridas deste grupo em relação aos outros tratamentos (Figura 1). Esses resultados foram seguidos pelos grupos que receberam aplicação do LBP associado as ADSC CD49d positiva e negativa, bem como somente a aplicação do LBP (Figura 1). Essa diferença pode ser demonstrada pelas análises macroscópicas das lesões (Figura 2).



**FIGURA 1.** Porcentagem de diminuição do tamanho da área das lesões por queimadura de espessura total em ratos nas diferentes fases do processo de cicatrização (5, 15 e 21 dias). ADSC-: Grupo de células CD49d Negativo; ADSC+: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

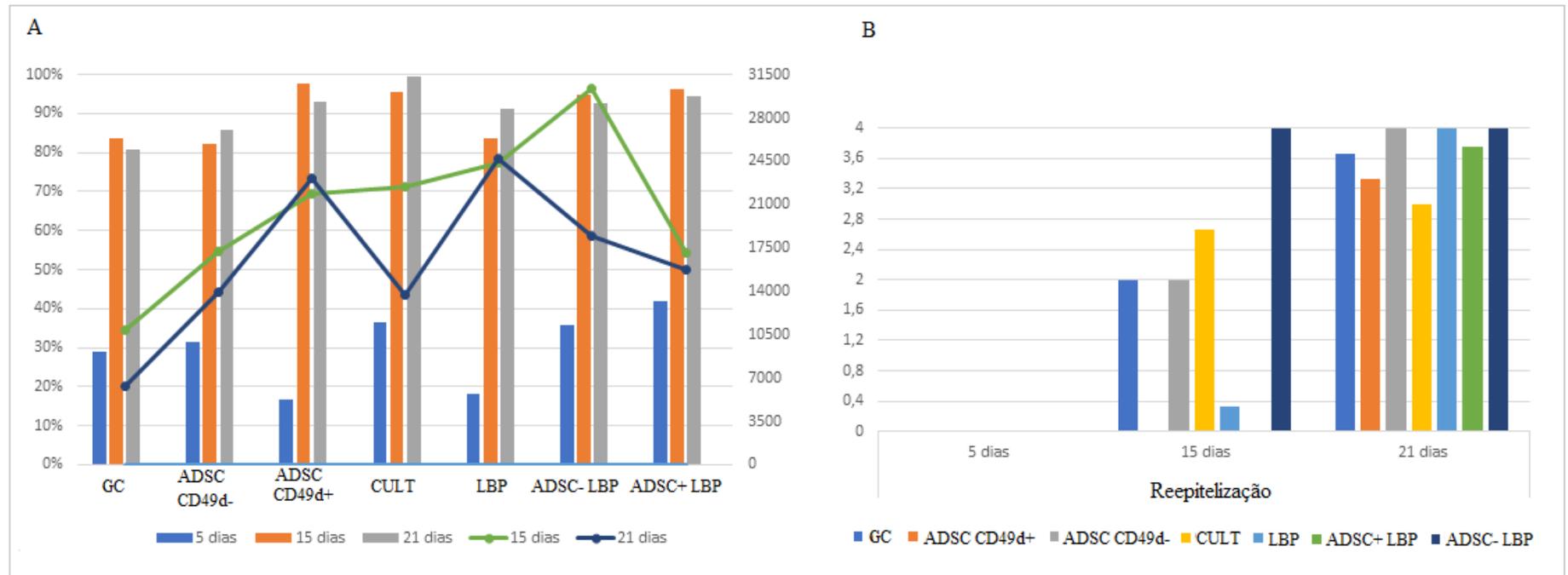


**FIGURA 2.** Fotos das lesões por queimadura de espessura total no dia da biópsia de cada grupo. A, B e C) Grupo controle momento de biópsia 05, 14 e 21 dias após a lesão. D, E e F) Grupo tratado com células CD49d negativa nos dias de indução da lesão, momento de biópsia 05, 14 e dias após a lesão. G, H e I) Grupo tratado com células CD49d positiva nos dias de indução da lesão, momento de biópsia 05, 14 e dias após a lesão. J, K e L) Grupo tratado com células de isolamento convencional nos dias de indução da lesão, momento de

biópsia 05, 14 e dias após a lesão. M, N e O) Grupo tratado apenas com Laser de Baixa Potência (LBP) nos dias de indução da lesão, momento de biópsia 05, 14 e dias após a lesão. P, Q e R) Grupo tratado com células CD49d negativa associada ao LBP nos dias de indução da lesão, momento de biópsia 05, 14 e dias após a lesão. S, T e U) Grupo tratado com células CD49d positiva associada ao LBP nos dias de indução da lesão, momento de biópsia 05, 14 e dias após a lesão.

Quando confrontados os dados de retração de ferida e formação epitelial notou-se que aos 15 dias após a indução da lesão, o grupo tratado com ADSC CD49d- associado com LBP apresentaram, de forma significativa ( $p < 0,01$ ), maior espessamento epitelial (Figura 3A). Aos 21 dias, embora o grupo tratado com células-tronco isoladas pelo método convencional tenham apresentado menor área da lesão, o grau de reepitelização foi significativamente ( $p < 0,01$ ) menor em relação aos demais grupos. Neste mesmo período o grupo com maior formação de epitélio foram tratados somente com LBP (Figura 3A).

A formação de epitélio foi observada a partir do 14º dia na maioria dos tratamentos, exceto nos grupos ADSC-LBP e ADSC-, estatisticamente diferente do grupo ADSC+LBP em que se observou o maior índice de reepitelização neste período. Na fase de remodelamento os grupos com maior formação significativa de epitélio foram LBP, ADSC+LBP e ADSC+ apresentando ainda maior espessura de camada e extensão do epitélio em relação aos demais (Figura 3B).



**FIGURA 3.** Retração da ferida e reepitelização. A) Porcentagem de diminuição do tamanho da área das lesões por queimadura de terceiro grau em ratos nas diferentes fases do processo de cicatrização (5, 15 e 21 dias) e o Grau de reepitelização em relação a espessura do epitélio formado aos 15 e 21 dias após a lesão. B) Média dos escores histológicos de reepitelização avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de terceiro grau em ratos. Escores de 0 a 4 sendo: escore 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Grupo Controle; NEG: Grupo de células CD49d Negativo; POS: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

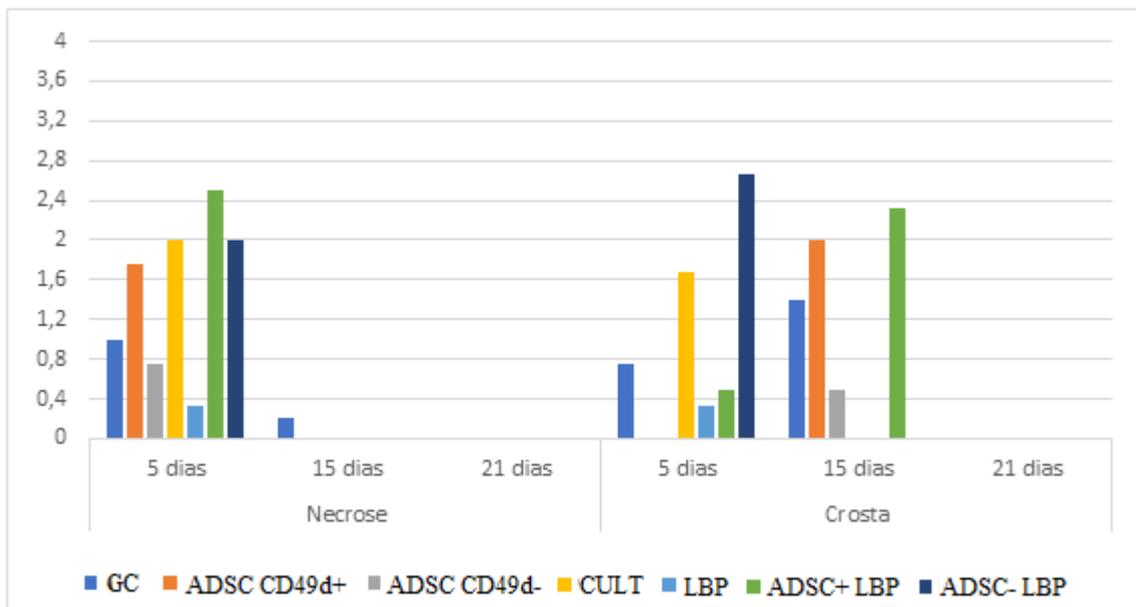
Histopatologicamente (HE), foi possível observar diferenças significativas quanto a evolução do processo cicatricial (Tabela 1). Com relação a necrose, houve redução significativa, ao longo do processo de cicatrização, nos grupos GC ( $p=0,040$ ), ADSC+ LBP ( $p=0,040$ ) e ADSC- ( $p=0,024$ ). Ao verificar a formação de crosta nas feridas os resultados não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos e dias (Figura 4).

TABELA 1 - Valores da moda, mediana e erro padrão da média dos escores (0 a 4) das avaliações histopatológicas pela coloração de HE dos grupos controle e tratados nos dias 5, 14 e 21 dias após a lesão por queimadura em ratos.

		CONTROLE	LBP	ADSC+LBP	ADSC-LBP	ADSC-	ADSC+	CULT	<i>p</i>
<b>NECROSE</b>	5 dias	1,0±0 (1) <sup>a</sup>	0,33±0,33 (0)	2±0,58(0) <sup>a</sup>	2,5±0,50 (2)	1,75±0,25 (2,5) <sup>a</sup>	0,75±0,75 (0)	2,0±0,99 (1)	0,113
	15 dias	0,2±0,20 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,757
	21 dias	0±0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	1,000
	<i>p</i>	<b>0,040*</b>	0,791	<b>0,040*</b>	0,0137	<b>0,024*</b>	0,848	0,071	
<b>CROSTA</b>	5 dias	0,75±0,75 (0)	0,33±0,33(0)	2,37±1,33(4)	0,5±0,50 (0,5)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	1,67±1,2 (1)	0,231
	15 dias	1,4±0,68 (1)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	2,33±1,2 (3)	2,0±2,0 (2)	0,5±0,5 (0,5)	0,0±0,0 (0)	0,204
	21 dias	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	1,000
	<i>p</i>	0,390	0,791	0,281	0,294	0,627	0,651	0,361	
<b>EDEMA</b>	5 dias	3,0±0,0 (3) <sup>Aba</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	2,0±0,58 (2) <sup>Aba</sup>	1,0±1,0 (1) <sup>AB</sup>	3,0±0,58 (3) <sup>Aba</sup>	1,5±0,5 (1) <sup>AB</sup>	3,33±0,33 <sup>B</sup>	<b>0,022*</b>
	15 dias	1,4±0,51 (1) <sup>ABb</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>AB</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>Ab</sup>	1,67±0,33 (2) <sup>B</sup>	1,5±0,5 (1) <sup>ABb</sup>	1±0,0 (1) <sup>AB</sup>	0,33±0,33 <sup>AB</sup>	<b>0,026*</b>
	21 dias	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,25±0,25 (0)	0,33±0,33	0,479
	<i>p</i>	<b>0,007**</b>	1,000	<b>0,040*</b>	0,105	<b>0,011*</b>	0,125	0,071	
<b>HEMORRAGIA</b>	5 dias	3,25±0,25 (3) <sup>a</sup>	2,33±0,67 (3) <sup>a</sup>	1,67±1,20 (1)	1,5±0,5 (1,5)	1,75±0,75 (2)	1,75±0,48 (1,5) <sup>a</sup>	1,33±0,33 (1)	0,373
	15 dias	0,2±0,2(0) <sup>b</sup>	0,33±0,33 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	1,0±0,0 (1)	0,5±0,5 (0,5)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,33±0,33 (0)	0,152
	21 dias	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	1±0,0 (1)	0,67±0,33 (1)	0,0±0,0 (0) <sup>b</sup>	0,67±0,33 (1)	0,099
	<i>p</i>	<b>0,009**</b>	<b>0,007**</b>	0,281	0,457	0,384	<b>0,020*</b>	0,178	
<b>INFILTRADO PMN</b>	5 dias	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>AB</sup>	0,33±0,33 (0) <sup>AB</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	0,25±0,25 (0) <sup>AB</sup>	1,5±0,29 (1,5) <sup>Ba</sup>	1,33±0,33 (1) <sup>B</sup>	<b>0,010*</b>
	15 dias	0,4±0,24 (0) <sup>AB</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	0,67±0,33 (1) <sup>AB</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>AB</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>ABb</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>B</sup>	<b>0,047*</b>
	21 dias	1±0,0 (1)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>Ab</sup>	0,33±0,33 (0)	<b>0,004*</b>
	<i>p</i>	0,091	0,050	0,742	0,346	0,844	<b>0,020*</b>	0,254	
<b>INFILTRADO MN</b>	5 dias	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	3,75±0,25 (4) <sup>a</sup>	3,75±0,25 (4) <sup>a</sup>	4,0±0,0 (4)	0,686
	15 dias	3,0±0,0 (3) <sup>ab</sup>	2,67±0,33 (3) <sup>ab</sup>	1,5±0,29 (1,5) <sup>ab</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>ab</sup>	2,5±0,5 (2,5) <sup>ab</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>a</sup>	2,33±0,88 (2)	0,093
	21 dias	2,0±0,0 (2) <sup>ABb</sup>	2,0±0,41 (2) <sup>ABb</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>Ab</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>Ab</sup>	2,33±0,33 (0,88) <sup>Bb</sup>	1,5±0,29 (1,5) <sup>ABb</sup>	2,67±0,67 (2)	<b>0,013*</b>
	<i>p</i>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,018*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,033*</b>	<b>0,001*</b>	0,228	
<b>FIBROBLASTO</b>	5 dias	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,0±0,58 (1)	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	0,5±0,29 (0,5) <sup>a</sup>	1,0±0,41 <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,074
	15 dias	1,6±0,24 (2) <sup>ABab</sup>	2,67±0,33 (3) <sup>ABab</sup>	2,75±0,75 (3) <sup>Bb</sup>	2,68±0,35 (3) <sup>Bab</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>Aa</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>Bab</sup>	2,68±0,88 (3) <sup>Bb</sup>	<b>0,047*</b>
	21 dias	2,67±0,33 (3) <sup>Ab</sup>	3,75±0,25 (4) <sup>b</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>B</sup>	3,5±0,29 (3,5) <sup>ABb</sup>	3,68±0,33 (4) <sup>ABb</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	2,33±0,33 (2) <sup>Ab</sup>	<b>0,013*</b>

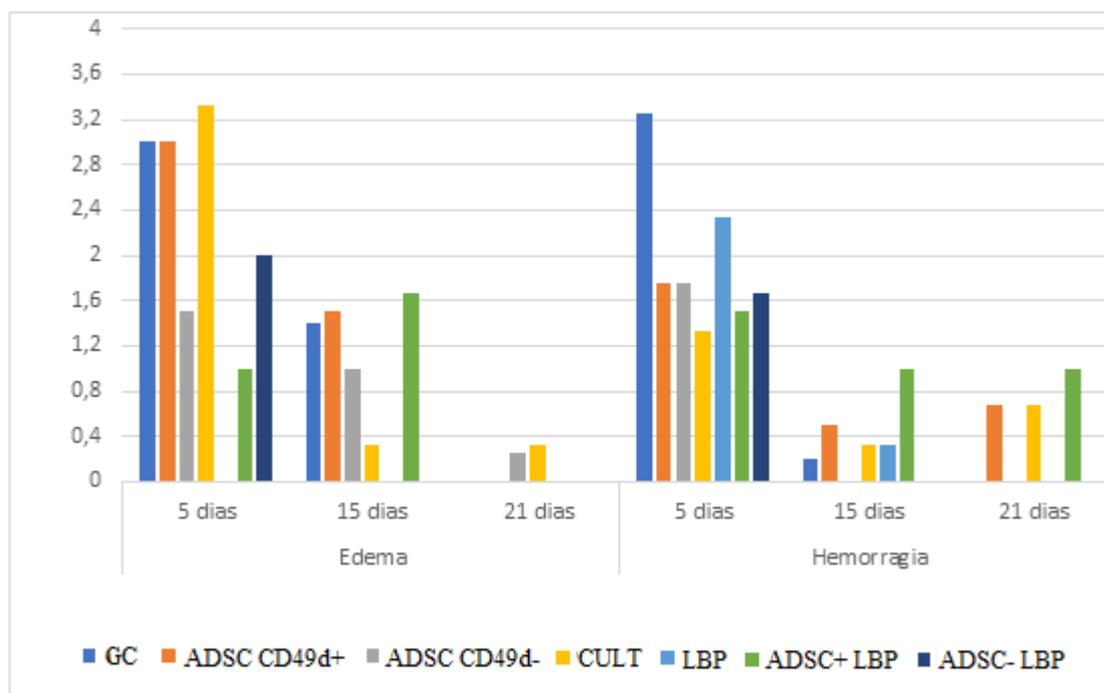
	<i>p</i>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,004*</b>	0,061	<b>0,046*</b>	<b>0,030*</b>	<b>0,002*</b>	<b>0,026*</b>	
<b>TECIDO DE GRANULAÇÃO</b>	5 dias	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0)	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0)	1,000
	15 dias	1,8±0,58 (2) <sup>ABab</sup>	0,33±0,33 (0) <sup>Aa</sup>	3,25±0,48 (3) <sup>Bb</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>Aa</sup>	0,5±0,5 (0,5) <sup>A</sup>	2,0±1,0 (2) <sup>ABab</sup>	1,0±0,58 (1) <sup>AB</sup>	<b>0,008*</b>
	21 dias	3,67±0,33 (4) <sup>ABb</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	3,5±0,29 (3,5) <sup>ABb</sup>	2,0±0,71 (1,5) <sup>ABb</sup>	2,0±1,15 (2) <sup>AB</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	0,33±0,33 (0) <sup>A</sup>	<b>0,019*</b>
	<i>p</i>	0,060	<b>0,013*</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,024</b>	0,294	<b>0,002*</b>	0,127	
<b>ANGIOGÊNESE</b>	5 dias	3,25±0,75 (4)	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	2,68±0,88 (3)	4,0±0,0 (4) <sup>a</sup>	3,25±0,75 (4)	3,5±0,29 (3,5) <sup>a</sup>	0,33±0,33 (0)	0,074
	15 dias	3,2±0,58 (4) <sup>B</sup>	2,33±0,33 (2) <sup>ABb</sup>	0,75±0,25 (1) <sup>A</sup>	2,0±0,58 (2) <sup>ABb</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>B</sup>	1,5±0,5 (1) <sup>ABb</sup>	1,33±0,33 (0) <sup>AB</sup>	<b>0,049*</b>
	21 dias	0,67±0,33 (1)	1,0±0,0 (1) <sup>b</sup>	0,5±0,29 (0,5)	0,75±0,25 (1) <sup>b</sup>	0,67±0,33 (1)	0,75±0,48 (0,5) <sup>b</sup>	0,0±0,0 (0)	0,365
	<i>p</i>	0,099	<b>0,001*</b>	0,135	<b>0,004*</b>	0,086	<b>0,004*</b>	0,100	
<b>REEPITELIZAÇÃO</b>	5 dias	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>a</sup>	0,0±0,0 (0)	1,000
	15 dias	2,0±0,63 (3) <sup>ABab</sup>	0,33±0,33 (0) <sup>Aab</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>Aa</sup>	0,0±0,0 (0) <sup>A</sup>	2,0±2,0 (2) <sup>ABab</sup>	2,67±1,33 (4) <sup>AB</sup>	<b>0,042*</b>
	21 dias	3,67±0,33 (4) <sup>ABb</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	3,75±0,25 (4) <sup>ABb</sup>	3,33±0,33 (3) <sup>AB</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>A</sup>	<b>0,025*</b>
	<i>p</i>	<b>0,007*</b>	<b>0,013*</b>	<b>0,040*</b>	<b>0,024*</b>	0,051	0,046	0,168	

*Nota.* Escores de 0 a 4 sendo: 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. PNM: Polimorfonuclear; MN: Mononuclear. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para o mesmo parâmetro, indicam a existência de diferença significativa entre grupos pelo teste de Kruskal-wallis ( $p<0,05$ )\*. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam a existência de diferença significativa entre os dias no grupo, pelo teste de Kruskal-wallis ( $p<0,05$ ).



**FIGURA 4.** Média dos escores histológicos de necrose e crosta avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos. Escores de 0 a 4 sendo: escore 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Grupo Controle; NEG: Grupo de células CD49d Negativo; POS: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

Em relação ao edema observa-se que aos 5 dias após a lesão o grupo com aplicação de LBP isolado apresentou diminuição significativa ( $p=0,022$ ) em relação aos demais grupos. Enquanto isso, na fase seguinte, os grupos com significativamente ( $p=0,026$ ) resolução do edema foram os animais com aplicação de LBP, ADSC+LBP e CULT. Aos 21 dias após a lesão somente os grupos com ADSC+ e CULT ainda apresentaram algum edema (Figura 5).

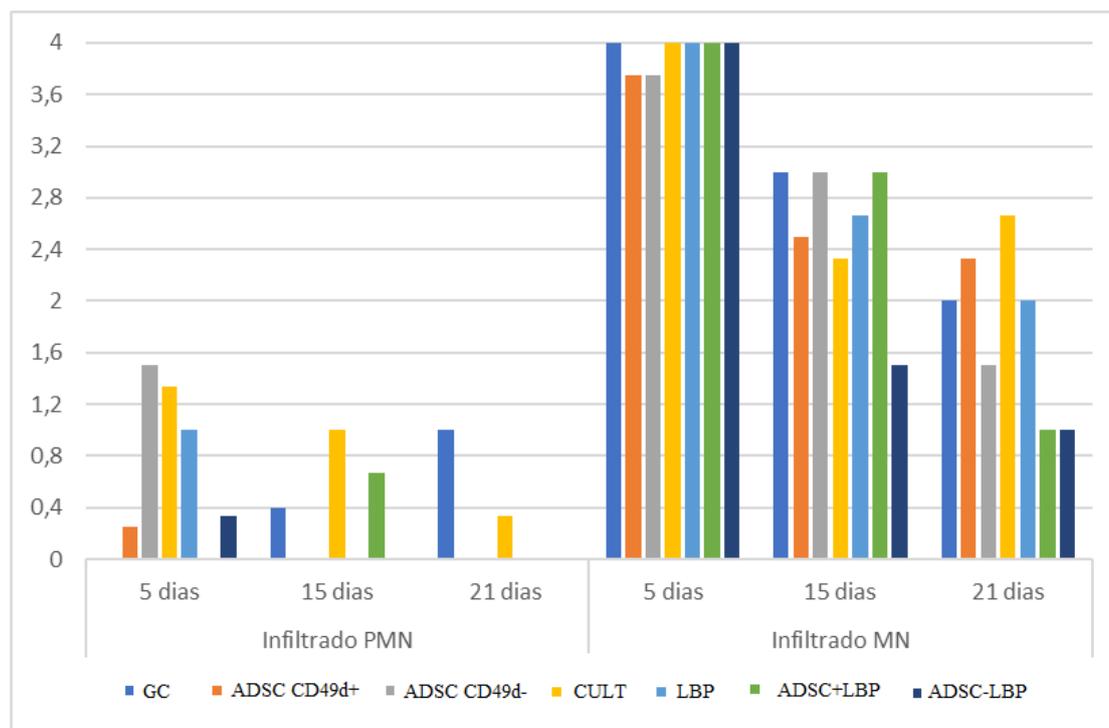


**FIGURA 5.** Média dos escores histológicos de edema e hemorragia avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos. Escores de 0 a 4 sendo: escore 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Grupo Controle; NEG: Grupo de células CD49d Negativo; POS: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

A avaliação da hemorragia não resultou em diferença significativa entre os grupos, apesar de ter sido observado que mesmo aos 21 dias os grupos ADSC-LBP, ADSC- e CULT ainda apresentavam manifestações hemorrágicas. Enquanto isso, os grupos GC, LBP e ADSC+ apresentaram redução significativa desses eventos aos 15 dias após a lesão (Figura 5).

Em relação aos infiltrados inflamatórios polimorfonuclear (PMN) e mononuclear (MN) foram encontradas diferenças significativas entre os grupos e ao longo do processo de cicatrização. No infiltrado PMN, observou-se redução progressiva da quantidade de células na maioria dos grupos (5 dias:  $p=0,010$ ; 15 dias:  $p=0,047$ ; 21 dias:  $p=0,004$ ). Aos 5 dias após a lesão o grupo ADSC-LBP, assim como o GC, não apresentaram praticamente nenhum infiltrado desse tipo, enquanto o grupo tratado com células ADSC+ continha intensa quantidade de PMN. Durante a fase proliferativa, aos 15 dias, houve uma redução significativa ( $p=0,020$ ) desse infiltrado inflamatório no grupo ADSC+ enquanto o GC apresentou aumento progressivo no número de polimorfonucleares até a fase de remodelamento da ferida, sugerindo uma possível

modulação de PNM pelos diferentes tratamentos. Já no infiltrado MN, foi observado redução significativamente progressiva da quantidade celular em todos os grupos ao longo da evolução cicatricial, entretanto destaca-se, aos 21 dias, uma diminuição significativa ( $p=0,004$ ) nos grupos ADSC+LBP e ADSC-LBP (Figura 6).



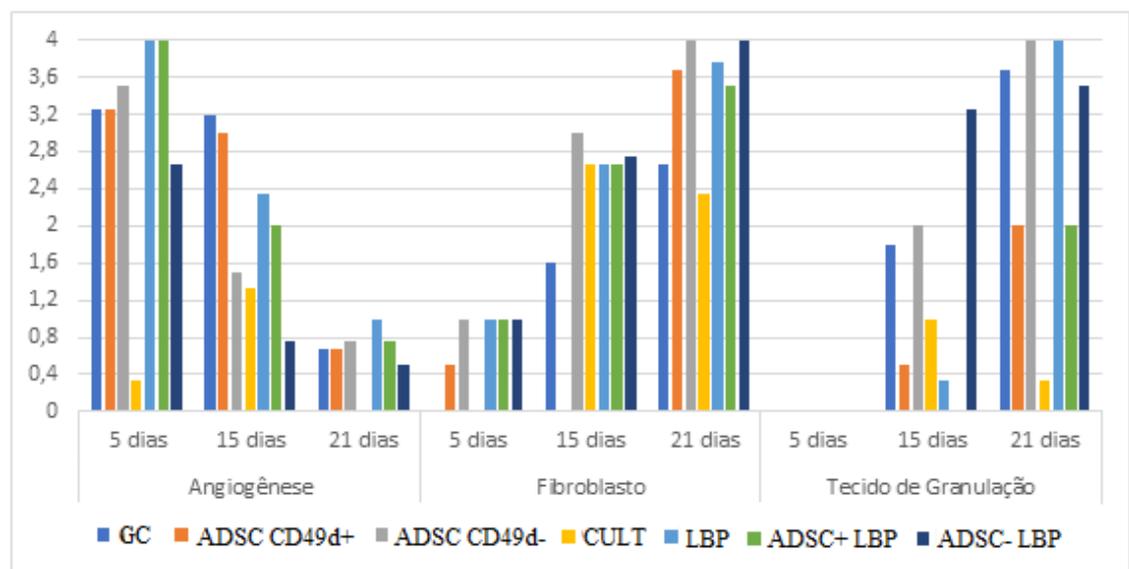
**FIGURA 6.** Média dos escores histológicos de infiltrados polimorfonucleares (PNM) e mononucleares (MN) avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos. Escores de 0 a 4 sendo: escore 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Grupo Controle; NEG: Grupo de células CD49d Negativo; POS: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

De maneira semelhante, foi observado em todos os grupos o padrão de ocorrência de fibroblastos nas lesões, com aumento significativo do número de células após o quinto dia de lesão, exceto para o grupo ADSC-. No 14º dia houve uma diferença significativa entre os grupos, com maior número de fibroblastos nos grupos tratados com células CD49+ (ADSC+ e ADSC+LBP). De maneira progressiva, aos 21 dias os dois grupos mantiveram aumento no número de fibroblastos, enquanto houve redução deste número no grupo CULT (Figura 7).

Quanto à avaliação do tecido de granulação, houve aumento progressivo e significativo na maioria dos grupos, exceto nos GC e CULT, visto que no segundo

houve redução do 14º para o 21º dia. Aos 15 dias após a indução da lesão o tecido de granulação apresentou-se significativamente mais desenvolvido nos grupos ADSC+LBP e ADSC+, enquanto aos 21 dias o grupo LBP apresentou-se mais expressivo (Figura 7).

Em relação a angiogênese, ocorreu o aumento da formação de novos vasos até o quinto dia principalmente nos grupos LBP, ADSC-LBP e ADSC+ com diminuição significativa nestes grupos após esse período. No 14º dia após a lesão, o GC ainda apresentou uma expressiva quantidade de vasos neoformados (Figura 7).



**FIGURA 7.** Média dos escores histológicos de angiogênese, fibroblastos e tecido de granulação avaliados pela coloração de HE em lesões por queimadura de espessura total em ratos. Escores de 0 a 4 sendo: escore 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Grupo Controle; NEG: Grupo de células CD49d Negativo; POS: Grupo de células CD49d Positivo; CULT: Grupo de células sem isolamento imunomagnético; LBP: grupo tratado com Laser de Baixa Potência.

As imagens fotomicrografias histológicas em coloração de HE evidenciam importante diferença entre os grupos aos 5, 14 e 21 dias (Figura 8 e 9). Os grupos que receberam irradiação laser apresentaram maior angiogênese, diminuição do edema, maior infiltrado de células mononucleares e aumento no número de fibroblastos no início do reparo tecidual, além do tecido conjuntivo aparentar melhor organização e formação de anexos epiteliais aos 21 dias após a lesão (Figura 9 - G a I).

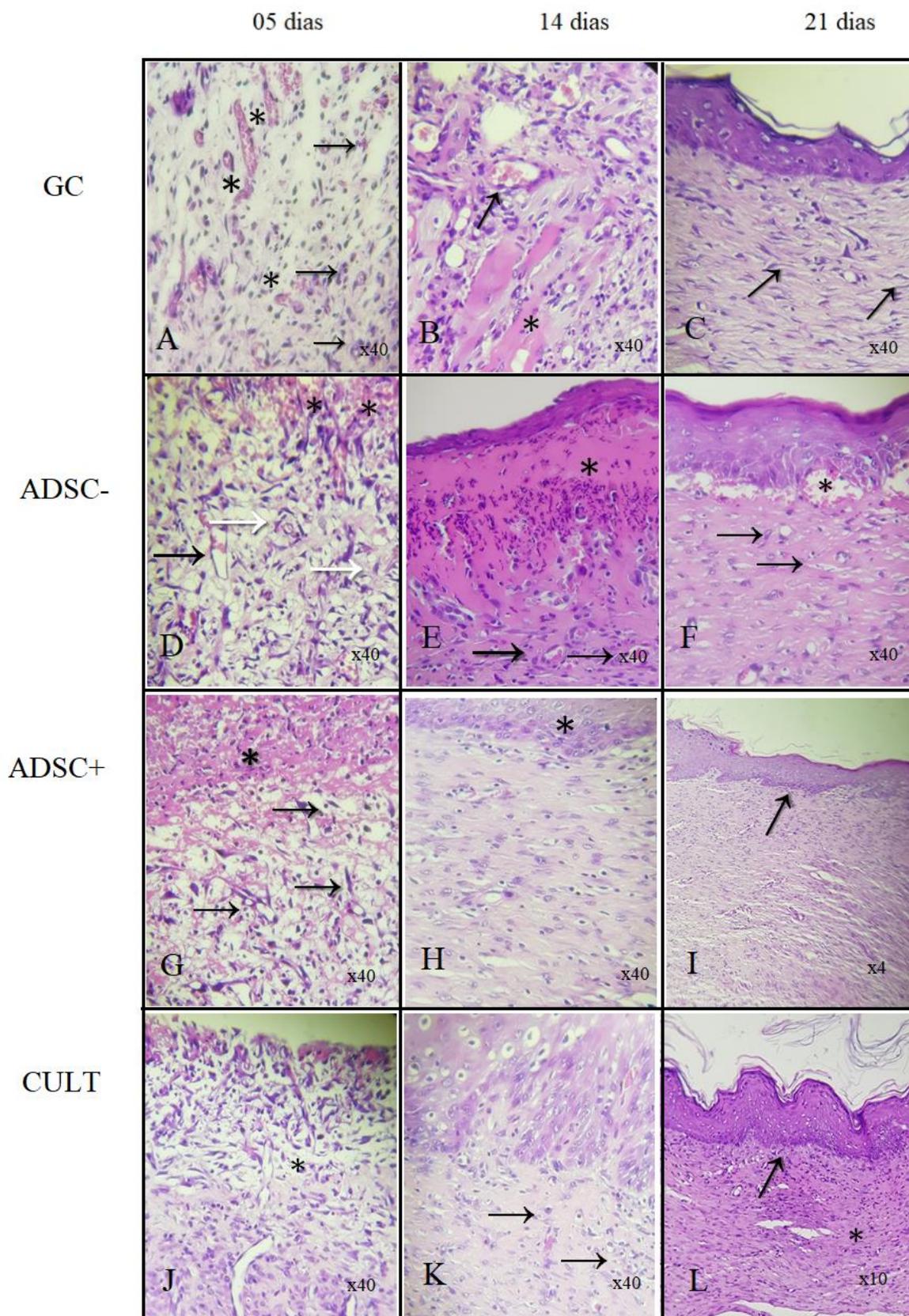


FIGURA 8. Fotomicrografia das lesões por queimadura de espessura total em ratos, pela coloração de HE. A: GC 5 dias, observa-se presença de neovasos (asterisco) e infiltrado inflamatório (setas), 40x; B:GC 14 dias, presença de vasos sanguíneos (seta) e área de necrose (asterisco), 40x; C: GC 21 dias, presença de fibroblastos (seta), 40x; D:

ADSC- 5 dias, observa-se área com hemorragia (asterisco), presença de angiogênese (setas preta) e infiltrado inflamatório intenso (setas brancas), 40x; E:ADSC- 14 dias, presença de crosta (asterisco) e intensa quantidade de células inflamatórias (setas), 40x; F: grupo ADSC- 21 dias, observa-se ainda presença de angiogênese (asterisco) e intenso infiltrado (setas), 40x; G: ADSC+ 5 dias, observa-se células com aspecto fusiforme (setas) e quantidade moderada de infiltrado inflamatório (asterisco), 40x; H e I: ADSC+ 14 e 21 dias com reepitelização completa (setas), 40x e 4x respectivamente. J e K: CULT 5 e 14 dias, observa-se moderada presença de PMN e MN (asterisco e setas), 40x; L: CULT 21 dias, reepitelização (seta), 10x.

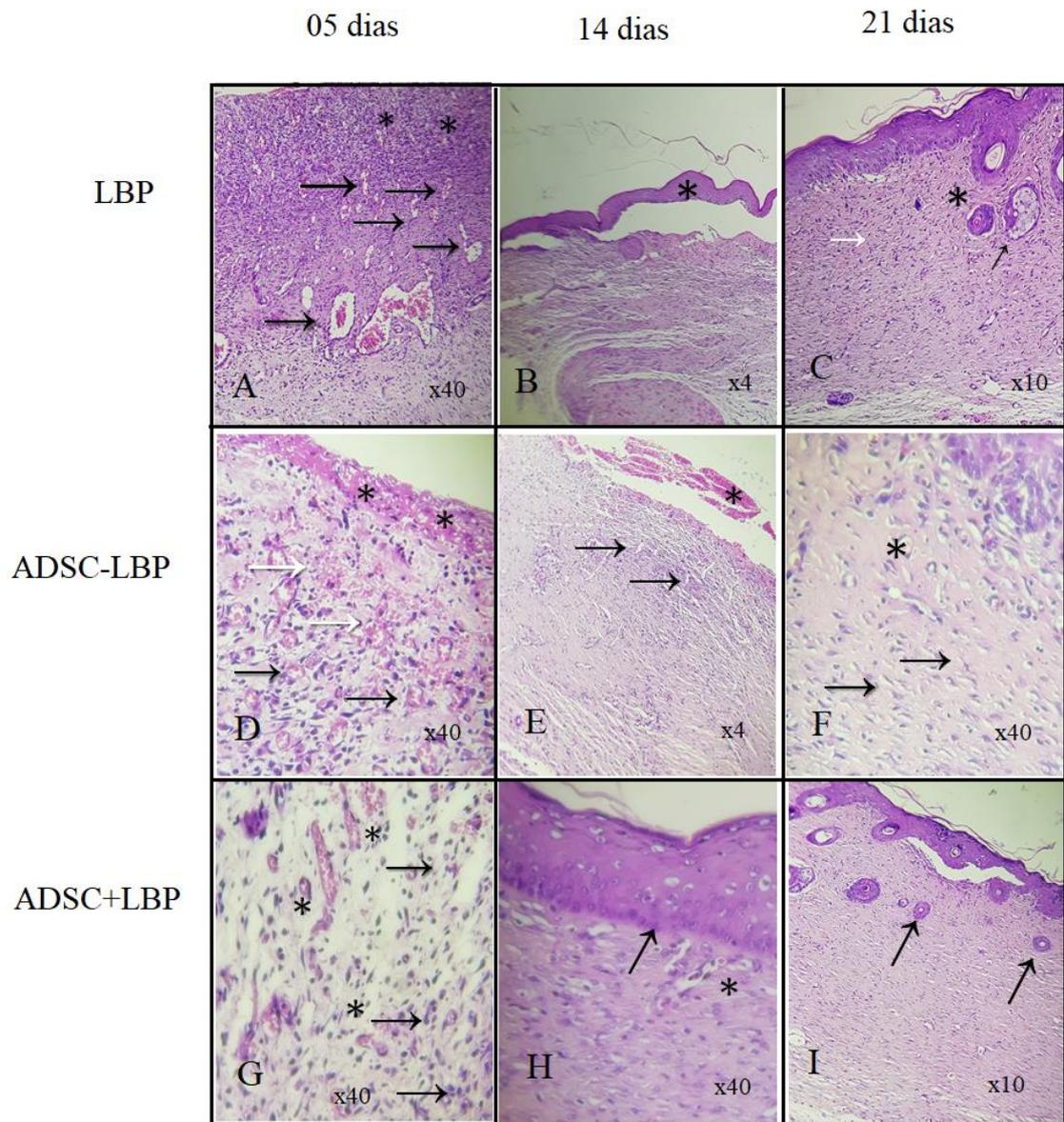


FIGURA 9. Fotomicrografia das lesões por queimadura de espessura total em ratos, pela coloração de HE (continuação). A: LBP 5 dias, observa-se presença de neovasos (setas) e infiltrado inflamatório intenso (asterisco), 40x; B: LBP 14 dias, reepitelização completa (asterisco), 4x; C: LBP 21 dias, presença de anexos epiteliais (seta preta), boa organização da matriz extracelular (asterisco) e presença intensa de fibroblastos (seta branca), 40x; D: ADSC-LBP 5 dias, observa-se área com hemorragia (setas brancas), crosta (asterisco) e presença de angiogênese (setas preta), 40x; E:ADSC-LBP 14 dias, presença

de crosta (asterisco) e edema (setas), 4x; F: grupo ADSC-LBP 21 dias, observa-se presença moderada de fibroblastos (setas) organização moderada do tecido conjuntivo (asterisco), 40x; G: ADSC+LBP 5 dias, observa-se intensa angiogênese (asteriscos) e quantidade moderada de infiltrado inflamatório (setas), 40x; H: ADSC+LBP 14 dias com reepitelização completa (seta) e presença de neovasos (asterisco), 40x; I: ADSC+LBP 21 dias, observa-se presença de anexos epiteliais, 10x.

Ao comparar os grupos ADSC+ e ADSC- (Figura 8 – D a I) com ADSC+LBP e ADSC-LBP (Figura 9 – D a I), observa-se que os dois primeiros apresentaram processo de cicatrização mais lento, de forma que, aos 21 dias ainda foi possível observar tecido de granulação, bem como infiltrado inflamatório MN. Além disso, os grupos tratados com células ADSC+ e ADSC- que receberam irradiação de LBP demonstram aumento importante na angiogênese e células MN durante a fase inflamatória (Figura 8 – D a I).

De forma semelhante, o grupo CULT apresentou um reparo eficiente da ferida com alto índice de angiogênese e reepitelização desde os 14 dias após a indução da lesão (Figura 8 - J, K, L).

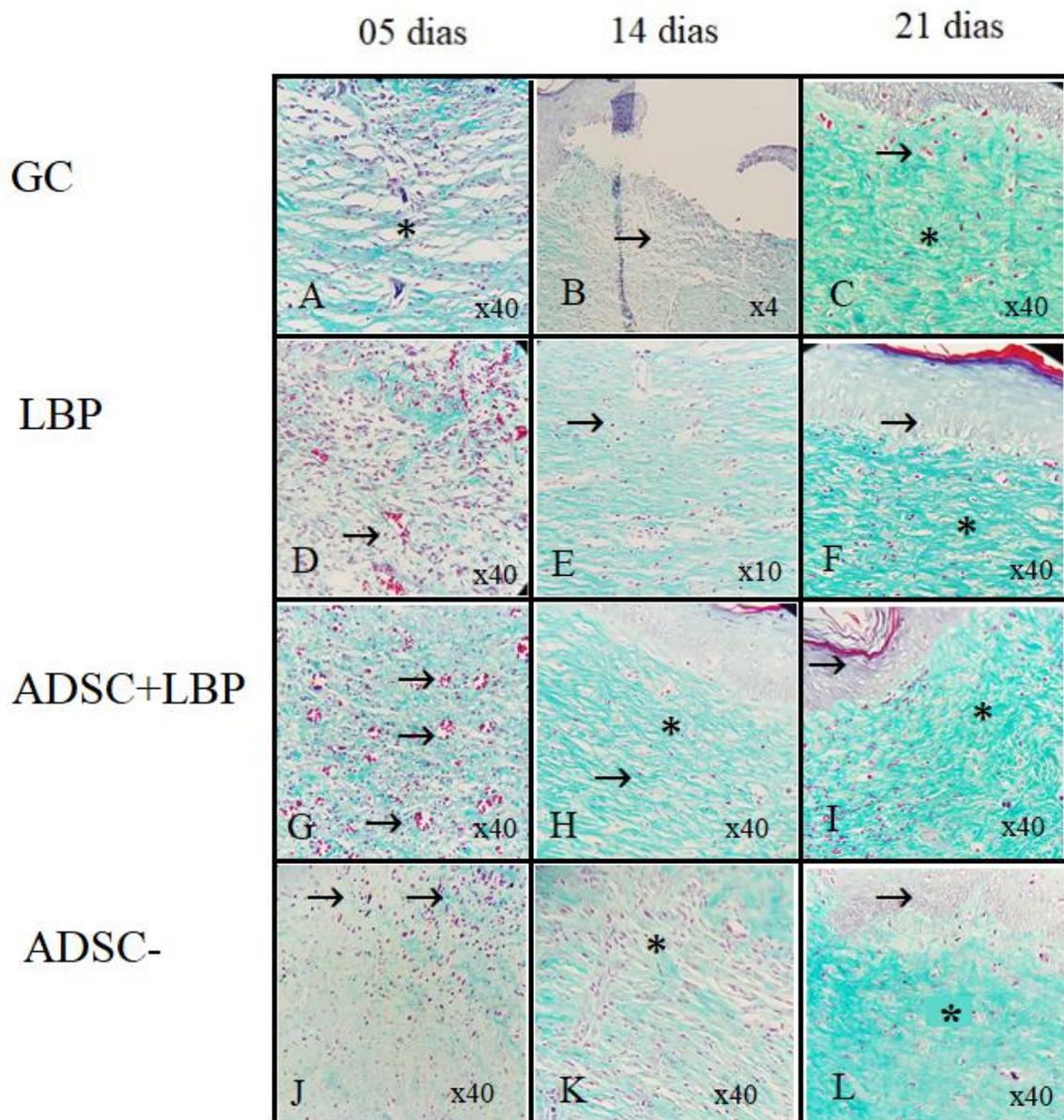
Além disso, a análise das lâminas submetidas à técnica de coloração de Tricrômico de Gomori (TG), demonstrou diferenças entre os grupos tratados e controle (Tabela 2). Embora não houve diferença estatística entre os grupos em relação a quantidade de fibroblastos no início do processo de cicatrização, aos 5 dias após a lesão é possível observar aumento dessas células nos grupos LBP e ADSC- seguido de diminuição significativamente ( $p < 0,05$ ) progressiva do número de fibroblastos em todos os grupos ao longo das fases. Já em relação ao tecido de granulação, observou-se, inicialmente, uma expressão significativa ( $p < 0,001$ ) nos grupos LBP e ADSC-LBP, porém com diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na maioria dos tratamentos aos 15 e 21 dias. Da mesma forma, uma melhor organização de matriz foi apresentada aos 5 dias após indução da lesão, pelos grupos LBP, ADSC+LBP e ADSC+ ( $p = 0,010$ ). Este resultado se manteve estatisticamente significativo aos 21 dias, embora houvesse melhora progressiva da organização de matriz em todos os grupos, após indução da lesão, esses resultados foram mais evidentes de forma significativa nos grupos LBP, ADSC+LBP e ADSC+ (Tabela 2).

TABELA 2: Valores de mediana, erro padrão e moda dos escores (0 a 4) das avaliações histopatológicas pela coloração de Tricrômio de Gomori dos grupos controle e LBP nos dias 3, 7, 15 e 21 após a lesão por queimadura em ratos.

	GC	LBP	ADSC+LBP	ADSC-LBP	ADSC-	ADSC+	CULT	<i>p</i>	
<b>Fibroblastos</b>	5 dias	3,5±0,5 (4) <sup>b</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>b</sup>	3,33±0,68 (4) <sup>b</sup>	2,0±0,0 (2) <sup>ab</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>b</sup>	3,5±0,029 <sup>b</sup>	2,0±0,0 (2)	0,058
	15 dias	2,4±0,24 (2) <sup>ab</sup>	2,0±0,0 (2) <sup>ab</sup>	2,33±0,33 (2) <sup>ab</sup>	2,67±0,33 (3) <sup>b</sup>	2,5±0,5 (2,5) <sup>ab</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	2,0±0,0 (2)	0,109
	21 dias	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,25±0,25 (1) <sup>a</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>a</sup>	1,33±0,33 (1)	0,552
	<i>p</i>	<b>0,021*</b>	<b>0,011*</b>	<b>0,003*</b>	<b>0,017*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,020*</b>	0,361	
<b>Tecido de Granulação</b>	5 dias	2,5±0,64 (2,5) <sup>AB</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Ba</sup>	3,68±0,33 (4) <sup>Ba</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>B</sup>	3,5±0,29 (3,5) <sup>Ba</sup>	3,5±0,29 (3,5) <sup>Ba</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>A</sup>	<b>&lt;0,001*</b>
	15 dias	2,2±0,20 (2)	2,33±0,33 (2) <sup>ab</sup>	2,68±0,33 (3) <sup>ab</sup>	1,68±0,33 (2)	2,0±0,0 (2) <sup>ab</sup>	2,5±0,5 (2,5) <sup>ab</sup>	1,33±0,33 (1)	0,141
	21 dias	1,0±0,0 (1)	1,25±0,25 (1) <sup>b</sup>	1,8±0,2 (2) <sup>b</sup>	1,25±0,63 (1)	1,0±0,58 (1) <sup>b</sup>	0,5±0,29 (2) <sup>b</sup>	2,0±0,58 (2)	0,227
	<i>p</i>	0,180	<b>0,004*</b>	<b>0,012*</b>	<b>0,064*</b>	<b>0,008*</b>	<b>0,004*</b>	0,252	
<b>Organização da Matriz</b>	5 dias	1,0±0,0 (1) <sup>ABa</sup>	2,33±0,33 (2) <sup>Ba</sup>	2,0±0,58 (2) <sup>Ba</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>Aba</sup>	0,5±0,29 (0,5) <sup>Aa</sup>	2,0±0,0 (2) <sup>Ba</sup>	1,0±0,0 (1) <sup>Aba</sup>	<b>0,010*</b>
	15 dias	2,8±0,2 (3) <sup>b</sup>	3,67±0,33 (4) <sup>b</sup>	3,33±0,33 (3) <sup>ab</sup>	2,67±0,33 (3) <sup>ab</sup>	2,0±0,0 (2) <sup>ab</sup>	3,0±0,0 (3) <sup>ab</sup>	2,33±0,33 (2) <sup>b</sup>	0,066
	21 dias	2,5±0,5 (2,5) <sup>Aab</sup>	4,0±0,0 (4) <sup>Bb</sup>	3,8±0,20 (4) <sup>Bb</sup>	3,25±0,25 (3) <sup>ABb</sup>	3,33±0,33 (3) <sup>ABb</sup>	3,75±0,25 (4) <sup>Bb</sup>	2,0±0,0 (2) <sup>Aab</sup>	<b>&lt;0,001*</b>
	<i>p</i>	<b>0,009*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,017*</b>	<b>0,013*</b>	<b>0,005*</b>	<b>0,004*</b>	<b>0,049*</b>	

*Nota.* Escores de 0 a 4 sendo: 0: ausente; escore 1: até 25%; escore 2: entre 25 e 50%; escore 3: entre 51% e 75%; e escore 4: de 76% até 100%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, para o mesmo parâmetro, indicam a existência de diferença significativa entre grupos pelo teste de Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ )\*. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam a existência de diferença significativa entre os dias no grupo, pelo teste de Kruskal-wallis ( $p < 0,05$ )\*

Ainda nas análises histopatológicas coradas por TG foi possível observar a organização da matriz extracelular bem como a formação e maturação do colágeno (Figura 10 e 11). Dessa forma, observou-se no grupo controle (GC) aos 5 dias após indução da lesão (Figura 10 A) intenso edema com matriz extracelular desorganizada e grande quantidade de infiltrado. Neste mesmo grupo, aos 14 dias houve pouca evolução no processo de cicatrização, em que o epitélio não se apresentou íntegro, bem como o edema e tecido de granulações mantiveram-se de forma intensa (Figura 10 B). Já após 21 dias da lesão, foi possível observar completa reepitelização da ferida (Figura 10 C). Entretanto, a deposição de fibras colágenas apresentou-se ainda de forma imatura e tecido de granulação pouco evidente (Figura 10 C).



**FIGURA 10.** Fotomicrografia histopatológica das lesões por queimadura de espessura total em ratos, Coloração: Tricrômio de Gomori. A e B: GC 5 e 14 dias, observa-se presença intensa de edema (asterisco e seta, respectivamente), 40x e 4x; C: GC 21 dias, presença de células inflamatórias (seta) e deposição desorganizada de colágeno (asterisco), 40x; D: LBP 5 dias, observa-se intensa área com angiogênese (seta), 40x; E: LBP 14 dias, pouca presença de células inflamatórias (seta), 40x; F: grupo LBP 21 dias, observa-se reepitelização completa (seta) e matriz extracelular com fibras organizadas (asterisco), 40x; G: ADSC+LBP 5 dias, observa-se angiogênese intensa (setas), 40x; H: ADSC+LBP 14 dias apresenta intensa quantidade de fibras colágenas (asterisco) e quantidade moderada de fibroblastos (seta), 40x; I: ADSC+LBP 21 dias com reepitelização completa e presença de queratina (seta) e fibras colágenas madura com início da diferenciação de derme superficial e profunda (asterisco), 40x. J e K: ADSC- 5 e 14 dias, observa-se moderada presença de PMN e MN (seta) com pouca deposição de colágeno e matriz extracelular desorganizada

(asterisco), 40x; L: ADSC- 21 dias, reepitelização completa (seta) com matriz extracelular desorganizada, 10x.

Os grupos ADSC- e CULT, por sua vez, apresentaram evolução semelhante nas análises por TG (Figura 10 – J, K, L e 11 – D,E,F). Aos 5 dias após indução da lesão foi possível observar grande quantidade de células mononucleares, matriz extracelular desorganizada, pouco tecido de granulação e angiogênese (Figura 10 - J e 11 - D). Durante a fase de proliferação, aos 14 dias, embora tenha ocorrido completa reepitelização da ferida o número de infiltrado inflamatório permaneceu aumentado e a deposição de colágeno deficiente em ambos os grupos (Figura 10 - K e 11 - E). Aos 21 dias do processo de cicatrização houve formação incompleta do tecido epitelial, com reepitelização parcial da ferida, porém sem formação de anexos, pouca organização da matriz extracelular, pouca formação de tecido conjuntivo denso não modelado na derme papilar com presença moderada de PMN e MN (Figura 10 - L e 11 - F).

Os animais que receberam irradiação laser, independente de tratamento adicional, apresentaram intensa angiogênese na fase inicial do processo de cicatrização (Figura 10 - D a I e 11 – A,B,C), similar ao grupo ADSC+ (Figura 11 G,H,I). Além disso, no 14º dia de cicatrização observou-se intensa quantidade de tecido de granulação com baixa quantidade de PMN e MN, reepitelização parcial da ferida e matriz extracelular mais organizada dos grupos tratados com LBP em relação ao grupo controle (Figura 10 – D a I), exceto para o grupo ADSC-LBP (Figura 11 - B). Na fase de remodelamento, os grupos ADSC+, LBP e ADSC+LBP demonstraram completa reepitelização, deposição de fibras colágenas densas e finas, além de uma melhor organização da matriz extracelular (Figura 11 – I; 10 – F e I, respectivamente), embora no grupo ADSC+LBP tenha sido observado discreto grau de hemorragia (Figura 10 - I). Já no grupo ADSC-LBP foi possível observar infiltrado inflamatório MN ainda aos 21 dias após indução da lesão e deposição frouxa de fibras colágenas (Figura 11 - C).

Comparando as imagens, observa-se maior organização da derme nos grupos ADSC+, LBP e ADSC+LBP, com o início de separação de derme superficial e profunda (Figura 11 – I; 10 – F e I, respectivamente). Esses grupos tratados apresentaram maior organização de matriz extracelular, com maior deposição de tecido conjuntivo denso não modelado, de coloração mais azul escuro, além de maior quantidade de folículos pilosos do que o grupo controle, mostrando que o processo de reparo foi mais rápido e eficiente.

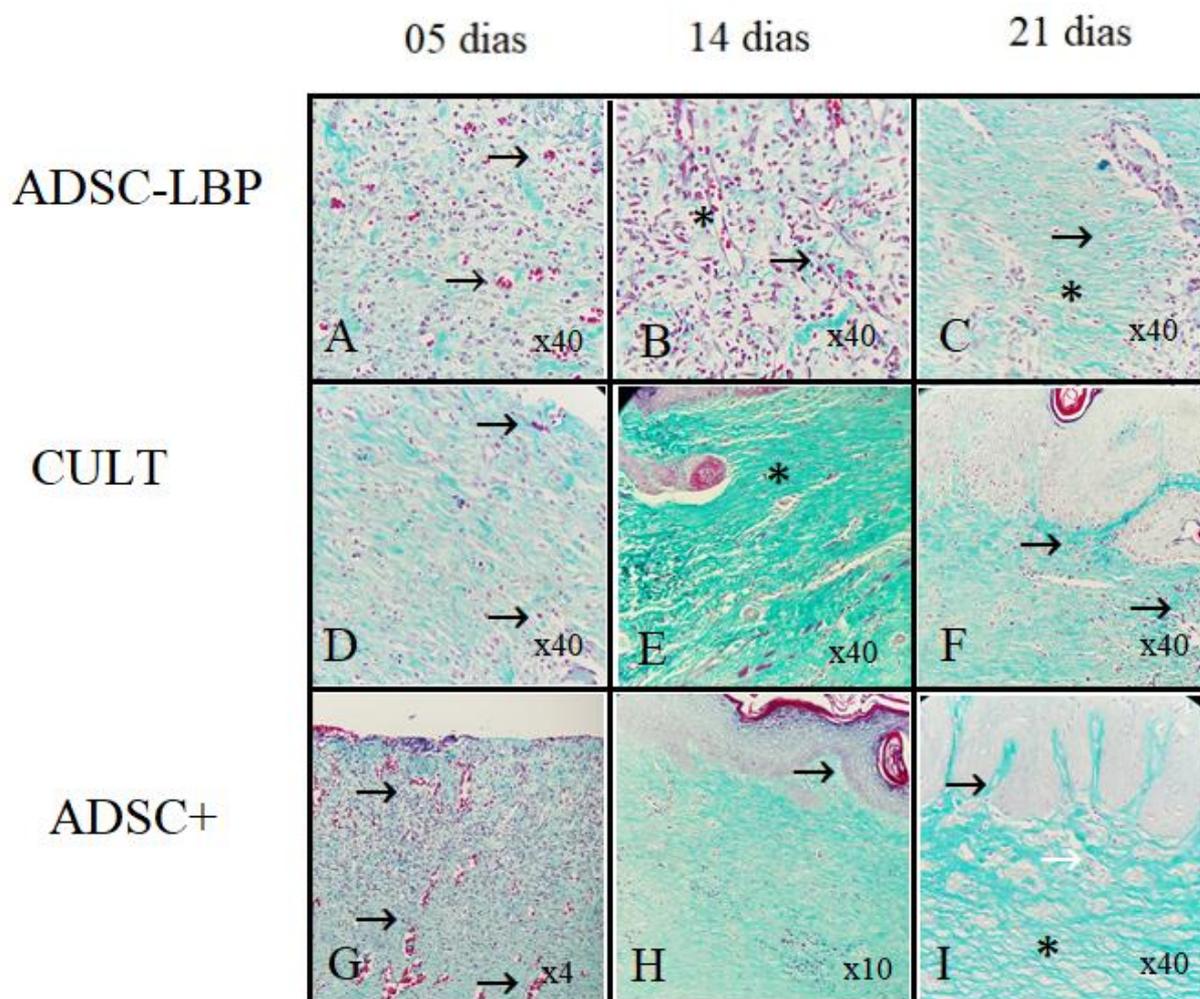


FIGURA 11. Fotomicrografia histopatológica das lesões por queimadura de espessura total em ratos. Coloração: Tricrômio de Gomori (continuação). A: ADSC-LBP 5 dias, observa-se presença de neovasos (setas), 40x; B: LBP 14 dias, angiogênese (asterisco) e infiltrado inflamatório intenso (seta), 40x; C: ADSC-LBP 21 dias, presença fibras colágenas moderadamente organizadas (asterisco) e presença de células inflamatórias (seta), 40x; D: CULT 5 dias, observa-se presença moderada de PMN e MN (setas), 40x; E: CULT 14 dias, demonstra intensa deposição desorganizadas fibras colágeno (asterisco), 40x; F: grupo CULT 21 dias, observa-se intensa presença de células inflamatórias (setas), 40x; G: ADSC+ 5 dias, observa-se intensa angiogênese (setas), 4x; H: ADSC+ 14 dias com reepitelização completa (seta), 10x; I: ADSC+ 21 dias, observa-se presença de papilas na epiderme e matriz extracelular com fibras densas de colágeno (asterisco), 40x.

### Discussão:

A utilização do LBP como método terapêutico tem sido associado à eficácia na progressão dos processos regenerativos, pois exerce efeitos fotobiomodulatórios na resposta inflamatória durante as fases iniciais do reparo tecidual<sup>16</sup>. Diversos estudos demonstram

que a fotobiomodulação a laser é capaz de alterar o metabolismo celular, estimular a proliferação celular tornando o processo de cicatrização muito mais eficiente<sup>12,13,17</sup>.

No presente estudo foi possível observar que os grupos tratados com irradiação LBP de forma isolada apresentaram melhor cicatrização da lesão por queimadura de espessura total. Os resultados apontam aumento da angiogênese e infiltrado inflamatório PMN, bem como diminuição do edema, durante a fase inicial do processo de reparo comparado ao grupo controle que 14º dia após a lesão ainda apresentou uma expressiva quantidade de vasos neoformados, sugerindo um atraso no processo de cicatrização nestes animais. De forma semelhante, os autores Dadpay et al<sup>18</sup> e Novaes et al<sup>19</sup> demonstraram que a laserterapia é capaz de acelerar a fase inicial da cicatrização promovendo o aumento da neovascularização no tecido lesionado e de células inflamatórias necessária para liberação de fatores de crescimento e fagocitose dos detritos celulares.

Ao verificar a formação de crosta nas feridas os resultados não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos e dias, provavelmente devido a utilização do curativo Tegaderm™, que impediu o ressecamento e formação de crosta na ferida durante a cicatrização. Além disso, como a formação de crosta e do edema é influenciada pelos processos exsudativos celulares, histologicamente foi observado maior formação destes eventos nos grupos que não receberam indução a laser. Esse resultado pode indicar que o LBP reduz os processos exsudativos celulares, favorecendo a redução do edema, aliado ao fato de maior angiogênese local.

O aumento da angiogênese, além de antecipar as etapas da fase inicial da inflamação, possibilita maior drenagem tecidual e, conseqüentemente, maior redução do edema bem como contribui para nutrição e oxigenação local, favorecendo a proliferação celular. De forma corroborativa, Brassolatti et al<sup>12</sup>, ao avaliar os efeitos do LBP (660 nm) em fluências de 12,5 J/cm<sup>2</sup> e 25 J/cm<sup>2</sup> (por ponto de aplicação) em queimaduras de espessura total em ratos, relataram que o laser foi capaz de reduzir a fase inflamatória e estimular a angiogênese, restaurando assim a microcirculação local, essencial para a migração e proliferação celular.

Além disso, durante a fase proliferativa, foi observado maior quantidade de tecido de granulação seguido de reepitelização mais eficaz nos grupos tratados com LBP. Alguns autores sugerem que a energia do laser de um determinado comprimento de onda é absorvida pelos componentes da cadeia respiratória mitocondrial, levando a aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e níveis de ATP. Isso

aumenta a expressão de fatores de crescimento e citocinas, levando à proliferação celular e consequentemente maior formação do tecido de granulação<sup>20-22</sup>.

Dentre as citocinas liberadas pode-se citar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator básico de crescimento fibroblástico (FGF), que estimulam a proliferação e diferenciação celular<sup>16</sup>. Dessa forma, estudos demonstram que o tecido adiposo tem sido utilizado no tratamento de lesões traumáticas, por apresentar atividade das células-tronco presentes junto à síntese de fatores de crescimento e citocinas<sup>5,10,11</sup>. O mecanismo de ação pelo qual as ADSC modulam a proliferação parece estar relacionado com a sinalização parácrina, principalmente do VEGF que é o principal mediador da angiogênese e contribui muito para o reparo tecidual<sup>23</sup>.

Lim e Yoo<sup>15</sup>, por exemplo, mostraram que a aplicação de células-tronco derivadas do tecido adiposo em modelos de ferida cutânea experimental em ratos é capaz de acelerar o fechamento da ferida, promover reepitelização parcial e aumento da deposição de tecido de granulação. De forma semelhante, Martins et al<sup>14</sup> também demonstraram que as ADSC apresentam o potencial de reparo tecidual equivalente a capacidade regenerativa dos fibroblastos dermais no tratamento de feridas cutâneas em ratos<sup>11</sup>.

Neste estudo, as análises histopatológicas, demonstraram que houve redução significativa dos scores de necrose até 5 dias após a lesão, enquanto as avaliações morfométricas e macroscópicas apontam contração mais acelerada das feridas no grupo tratado com ADSC cultivadas de forma convencional (CULT) quando se observa a Figura 1. Esses dados corroboram com Singer et al<sup>24</sup>, que ao utilizar células-tronco no tratamento de lesões por queimadura de espessura total em ratos, observaram uma redução significativa da área de necrose nos interespaços não queimados em um modelo de pente.

Além da atividade sinalizadora das ADSC estudos apontam que a associação com LBP para cicatrização de lesões cutâneas em ratos atímicos é capaz de potencializar o processo de cicatrização, aumentar a neovascularização, melhorar a regeneração dos anexos dérmicos, reduzir o número de apoptose no leito da ferida e aumentar a produção de fatores de crescimento<sup>19,25</sup>. revisaram a literatura sobre o efeito do LBP em várias linhagens celulares cultivadas, incluindo as ADSC e relataram que a irradiação laser é capaz de promover um aumento da proliferação celular, segundo a maioria dos estudos.

De forma semelhante, neste estudo, os grupos tratados com LBP associado a ADSC+ e ADSC- apresentaram parâmetros satisfatórios de cicatrização. Ao comparar os grupos ADSC+ e ADSC- com ADSC+LBP e ADSC-LBP, observa-se que os dois primeiros apresentaram processo de cicatrização mais lento, de forma que, aos 21 dias ainda foi possível observar tecido de granulação, bem como infiltrado inflamatório MN. Além disso, os grupos tratados com células ADSC+ e ADSC- que receberam irradiação de LBP demonstram aumento importante na angiogênese e células MN durante a fase inflamatória. Esses achados mostram que as feridas tratadas com laser estavam em um estágio mais avançado do processo de reparo tecidual, em relação ao GC e demais tratamentos.

Morfométricamente foi possível observar redução significativa na área da lesão nos grupos tratados com LBP e ADSC bem como maior grau de reepitelização tanto em 14 quanto em 21 dias após indução da lesão. Outrossim, as análises microscópicas mostraram que os grupos LBP e ADSC+LBP apresentaram maior angiogênese, infiltrados inflamatórios PNM e MN e número de fibroblastos no início do processo de cicatrização evoluindo com aumento da quantidade no tecido de granulação aos 14 dias em relação aos demais tratamentos. Neste norte, foi observado redução significativamente progressiva da quantidade de células inflamatórias em todos os grupos ao longo da evolução cicatricial, entretanto destaca-se, aos 21 dias, uma diminuição significativa nos grupos LBP, ADSC+LBP e ADSC-LBP, apontando o favorecimento da interação entre o LBP e ADSC na diminuição do processo inflamatório.

A fase inflamatória favorece a fagocitose do detritos celulares e liberação de fatores importantes para a progressão do processo de cicatrização. Dessa forma, o maior infiltrado inflamatório bem como angiogênese para mobilidade celular e aporte nutricional favorecem ao microambiente para que este progrida à fase de proliferação mais rapidamente<sup>26</sup>. Corroborativamente, diversos autores apontam uma fotobiomodulação do LBP no processo inflamatório de lesões cutâneas por queimadura em ratos<sup>14,27</sup>, diminuindo o número de infiltrado, contribuindo com proliferação celular, deposição de colágeno, diminuição de mastócitos nas fases tardias e acelerando o período de inflamação.

Ademais, foi observado nos grupos LBP, ADSC+ e ADSC+LBP, maior proliferação de fibroblastos e maior angiogênese o que contribuiu para melhor organização da matriz extracelular com maior deposição de colágeno nesses animais

durante a fase de remodelamento, como observado também pela coloração de tricrômio de Gomori. Estudo sugere que o laser de baixa potência induz a atividade mitótica dos fibroblastos, a partir da estimulação na síntese do fator de crescimento fibroblasto básico (FGFb), um polipeptídeo multifuncional com capacidade para induzir a proliferação e diferenciação fibroblástica, afetando as células secretoras de citocinas e outros fatores regulatórios do crescimento para fibroblastos<sup>28</sup>. Tal fato pode explicar os melhores resultados encontrados nos grupos com interação do LBP e ADSC+.

Em síntese, os tratamentos com ADSC+ e LBP demonstraram influenciar de forma significativa no processo de cicatrização, de forma que a aplicação do LBP associado as ADSC+ parece ter promovido maior angiogênese, diminuição do edema, um maior infiltrado de células mononucleares e aumento no número de fibroblastos no início do reparo tecidual, além de promover reepitelização de forma mais organizada e com formação de anexos epiteliais aos 21 dias após a lesão.

Esses resultados permitem demonstrar que a utilização de uma população mais homogênea de células comprovadamente ADSC, por meio da expressão da proteína CD49d e imunoseparação magnética, apresentou papel fundamental na regeneração tecidual comparada ao grupo ADSC- e CULT. Esse fato pode estar relacionado à função das integrinas que permitem diferenciar as células ADSC das demais CTM, principalmente derivadas da medula óssea<sup>11</sup>.

A proteína CD49d expressa pelas células ADSC, é definida como alfa 4 integrina que forma um heterodímero com CD29 para criar um antígeno de ativação tardia (VLA-4) e atua na mediação de interações célula a célula<sup>29</sup>. Dessa forma, a adesão das ADSC à proteína fibronectina presente na matriz extracelular parece ser facilitada permitindo a instalação dessas células no microambiente lesionado e favorecendo a cicatrização através da liberação de fatores de crescimento e citocinas. Vários estudos mostram um papel central das integrinas  $\beta 1$  antígeno 4 muito tardias ([VLA-4] CD29 / CD49d) e VLA-5 (CD29 / CD49e) na adesão de células progenitoras hematopoiéticas a componentes do estroma da medula óssea<sup>30,31</sup>. Além disso, o VLA-4 é expresso na maioria das células hematopoiéticas mononucleares e liga-se à molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1), bem como à proteína-fibronectina da matriz extracelular<sup>32</sup>.

**Conclusão:**

Dessa forma, podemos concluir que a utilização do LBP, como agente bioestimulador para ADSC+ isoladas imunomagneticamente parece proporcionar melhores resultados no reparo de tecidos lesionados, pois possui alta capacidade de indução da angiogênese, proliferação e diferenciação celular.

**REFERÊNCIAS**

1. Morais JM, Mendonça DEdeO, Moura VB, Oliveira MA, Afonso CL, Vinaud MC, Bachion MM, Lino Jr RdeS . Anti-inflamatóry effect of low intensity laser on the healing of third-degree burn wounds in rats. *Lasers Med Sci.* 2012;28(4):1169-76.
2. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117(7):12S-34S.
3. Wolf SE, Tompkins RG e Herndon DN. On the horizon: Research priorities in burns for the next decade. *Surg Clin North Am.* 2014;94(4):917-30.
4. Van der Veer WM, Bloemen MCT, Ulrich MMW, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, Niessen FB. Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation. *Burns.* 2009;35(1):15-29.
5. Lee SH, Lee JH e Cho KH. Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. *Ann Dermatol.* 2011;23(2):150-5.
6. Karimi H, Soudmand A, Orouji Z, Taghiabadi E, Mousavi SJ. Burn wound healing with injection of adipose-derived stem cells : a mouse model study. *Ann Burns Fire Disasters.* 2014;27(1):44–9.
7. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns.* 2014;40(7):1375-83.
8. Gimble JM, Guilak F, Bunnell BA. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(2):19.
9. Gentile P, Orlandi A, Scioli MG, Di Pasquali C, Bocchini I, Cervelli V. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(3):230-6.
10. Yoo G e Lim SJ. Effects on adipose derived stromal cells and of their extract in wound healing mouse model. *J Korean Med Sci.* 2010;25(5):746-51.
11. De Ugarte DA et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters.* 2003. 89(2-3):267-70.
12. Brassolatti P et al. Comparative Effects of Two Different Doses of Low-Level Laser Therapy on Wound Healing Third-Degree Burns in Rats. *Microscopy Research and Technique.* 2016. 79:313–320.

13. Trajano Et Et Al. Low-Level Red Laser Improves Healing Of Second-Degree Burn When Applied During Proliferative Phase. *Lasers Med Sci.* 2015; 30(4):1297-304.
14. Martins PDE, Uebel CO, Machado DC, da Silva JB. Uso de células-tronco adultas de tecido adiposo na cicatrização da pele: estudo controlado, randomizado. *Rev. Bras. Cir. Plást.* 2011;26(3):394-401.
15. Lim SJ e Yoo G. Effects of Adipose derived Stromal Cells and of their extract on wound healing in a mouse model. *J Korean Med Sci.* 2010; 25(5):746-51.
16. Reis SR, Medrado AP, Marchionni AM, Figueira C, Fracassi LD, Knop LA. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):307-13.
17. Gupta A Et Al. Superpulsed (Ga-As, 904 Nm) Low-Level Laser Therapy (LLt) Attenuates Inflammatory Response and Enhances Healing Of Burn Wounds. *Journal of Biophotonics, J Biophotonics.* 2015;8(6):489-501.
18. Bayat M, Azari A, Golmohammadi MG. Effects of 780-nm low-level laser therapy with a pulsed gallium aluminum arsenide laser on the healing of a surgically induced open skin wound of rat. *Photomedicine and Laser Surgery.* 2010. 28(4):465-70.
19. Novaes RD, Gonçalves RV, Cupertino MC et al. The energy density of laser light differentially modulates the skin morphological reorganization in a murine model of healing by secondary intention. *Int. J. Exp. Path.* 2014.95:138–46.
20. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.* 2008. 184:1091–109928.
21. Lavi R, Shainberg A, Friedmann H et al. Low-energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem.* 2003. 278:40917–4092229.
22. Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CCE, Chen GS, Yu HS. Helium-Neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J Investigat Dermatol.* 2007. 127:2048–2057
23. Behr B, Tang C, Germann G et al. Locally Applied Vascular Endothelial Growth Factor A Increases the Osteogenic Healing Capacity of Human Adipose-Derived Stem Cells by Promoting Osteogenic and Endothelial Differentiation Stem Cells. 2011;29:286–296.
24. Singer DD, Singer AJ, Gordon C, Brink P. The effects of rat mesenchymal stem cells on injury progression in a rat model. *Academic Emergency Medicine.* 2013; 20:398–402.

25. Peplow PV, Chung T, Baxter D. Laser photobioestimulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2010; 28(3):291-325.
26. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The Wound Healing Process: An Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *The Journal of International Medical Research*. 2009; 37:1528.
27. Catarino Hr Et Al. Ingap 670-Nm Laser Therapy Combined With A Hydroalcoholic Extract Of Solidago Chilensis Meyen In Burn Injuries. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(3):1069-79.
28. Amaro FAB. Efeito do laser de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas induzidas: Estudo experimental em ratos privados de sono. [tese]. Brasília. Universidade de Brasília; 2018.
29. Krononwett R, Martin S, Haas R. The Role of Cytokines and Adhesion Molecules for Mobilization of Peripheral Blood Stem Cells. *Stem Cells* 2000;18:320-330.
30. Yanai N, Sekine C, Yagita H et al. Roles for integrin very late activation antigen-4 in stroma-dependent erythropoiesis. *Blood* 1994;83:2844-2850.
31. Hamamura K, Matsuda H, Takeuchi Y et al. A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. *Blood* 1996;87:2513-2517.
32. Bellucci R, De Propris MS, Buccisano F et al. Modulation of VLA-4 and L-selectin expression on normal CD34+ cells during mobilization with G-CSF. *Bone Marrow Transplant*.1999;23:1-8.

## CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu avaliar os efeitos das células-tronco derivadas do tecido adiposo e laser de baixa potência no tratamento de feridas por queimadura de espessura total em um modelo animal de rato. Os resultados apresentados demonstram que o LBP é capaz de fotobiomodular principalmente a fase inflamatória do processo de cicatrização por meio do estímulo à angiogênese, diminuição do edema e infiltrado de PMN e MN, favorecimento da fase proliferativa e diferenciação celular, aumento da deposição de colágeno e contração do tecido cutâneo.

Além disso, foi possível verificar a viabilidade do isolamento de células ADSC a partir do tecido adiposo por meio de imunomarcação magnética pela proteína específica CD49d com intuito de garantir uma população celular mais homogênea. Neste sentido, ao comparar com o isolamento convencional de aderência ao plástico e ADSC-, observou-se que os grupos tratados com ADSC+ apresentaram maior deposição de colágeno, melhor organização da matriz extracelular e reepitelização mais eficiente com presença de anexos epiteliais.

Ao associar o LBP com as células ADSC os resultados foram muito mais expressivos no grupo ADSC+LBP sugerindo que o laser é capaz de fotobioestimular as células-tronco a sintetizar ainda mais fatores de crescimento e citocinas que favorecem o processo de reepitelização e remodelamento da matriz extracelular em lesões por queimadura de espessura total.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram-se interessantes para uma terapia eficaz na aceleração da cicatrização de ferida por queimadura de espessura total, entretanto estudos complementares são necessários para mensurar os efeitos do LBP e a atividade das ADSCs no reparo do tecido cutâneo.

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 087/2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 14 de março de 2017.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO Nº. 087/16

**I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado**

#### **II IDENTIFICAÇÃO:**

1. **Título do projeto:** Associação das células-tronco e fração tronco adiposa com laser de baixa potência no processo de cicatrização cutânea
2. **Pesquisador Responsável/ Unidade:** Valcimir Aloísio Scala Vulcani
3. **Pesquisadores Participantes:** Maisa Ribeiro; Júlia de Miranda Moraes
4. **Médico Veterinário/CRMV:** Daniel Cortês Beretta / 05457/ GO
5. **Unidade onde será realizado:** EVZ/UFG
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 30/10/2016
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 01/02/2017

#### **III - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

#### **Informamos aos pesquisadores:**

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de dezembro de 2018**.

**IV - Data da reunião: 14/03/2017.**

**Dra. Marina Pacheco Miguel**  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

## ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 015/2019



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Jataí, 19 de novembro de 2019.

### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 015/19

#### I - Finalidade do projeto de pesquisa (pesquisa/aula prática): pesquisa

- II - Identificação:
- Data de apresentação a CEUA: 05/09/2019
- Título do projeto: Associação das células-tronco derivadas do tecido adiposo CD49d positivas com laser de baixa potencia no processo de cicatrização cutânea.
- Pesquisador Responsável/ Unidade: Valcinir Aloísio Scala Vulcani/CIAGRA
- Pesquisadores Participantes: Maisa Ribeiro, Julia de Miranda Moraes
- Médico Veterinário/CRMV: Ygor Roberto de Carvalho
- Unidade onde será realizado: Laboratório de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPSTP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia-GO, no Laboratório de Morfofisiologia da Faculdade de Biologia da Regional Jataí/UFG e no Biotério e Laboratório de imunistoquímica do Centro Universitário de Mineiros (UNIFIMES, Mineiros-GO).

#### III - Objetivos e justificativa do projeto:

O objetivo desse projeto é analisar os efeitos da utilização da cultura de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) isoladas ou associadas com o laser de baixa potência (LBP) no processo de cicatrização, em modelos de ferida por queimadura de terceiro grau em ratos.

A utilização do Laser de Baixa Potência, como agente bioestimulador, e células-tronco parece proporcionar melhores resultados no reparo de tecidos lesionados, pois possuem alta capacidade de indução da proliferação e diferenciação celular<sup>5</sup>. Assim o desenvolvimento da medicina regenerativa, com a utilização de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) associadas a estimulação por Laser de baixa potência (LBP) tem proporcionado o surgimento de uma terapia promissora, capaz de melhorar a qualidade de cicatrização das lesões e proporcionar a diminuição do custo, devido à redução do tempo de tratamento e menor risco de contaminação secundária<sup>15</sup>. Devido ao progresso destes procedimentos no tratamento das queimaduras, o percentual de pacientes que sobrevivem a tais lesões aumentou significativamente, além de se obter melhor restauração morfológica e funcional do tecido lesionado<sup>4,10,18</sup>. Porém, investigações que permitam elucidar os riscos e benefícios da terapia por ADSC isoladas ou associadas ao LBP, sendo a elucidação de aspectos dosimétricos, necessárias para a determinação do possível papel destas terapias no tratamento de feridas por queimaduras.

#### IV - Sumário do projeto:

*Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATAÍ*  
Bloco 5 – sala 25 B, Campus Jataí, Br 364 Km 192, nº. 3.800  
Parque Industrial, Jataí (GO) – 75801-615  
Telefone: 64 3606 8336  
Email: ceujatai@gmail.com



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
Coordenação de Pesquisa e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-Jataí



- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais: Não prevê métodos alternativos, utilizando o N mínimo de animais por repetição (5).
- Prevê Projeto Piloto: Não
- Espécie animal utilizada/ número total de animais/ Número de animais por tratamento ou grupo experimental: Wistar/96 animais/30 animais por tratamento.
- Descrição do animal utilizado (Explicitar: espécie/ linhagem/ sexo (informar número por sexo)/ peso e/ou idade etc): Ratos wistar machos/ 300 g.
- Fonte de obtenção do animal: Biotério central UFG
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação: Biotério de Experimentação Animal da Universidade Federal de Jataí (Câmpus Jatobá - Cidade Universitária BR 364, km 195, no 3800. CEP 75801-615). Os animais serão provenientes do Biotério Central da UFG, onde são mantidos no Laboratório de manutenção em condições ambientais adequados, em gaiolas adequadas, com maravalha, água e ração, observando a densidade adequada de 3 animais na gaiola. Por fim, os animais irão passar pelo período de adaptação e aclimatação ao novo ambiente antes de iniciar qualquer. Temperatura ambiente entre 19° a 23°C; Umidade relativa do ar de 65%. A ventilação é controlada por exaustor e ar condicionado. O biotério encontra-se em isolamento total em relação à luz natural com luminosidade controlada de 200 Lux e períodos alternados e regulares de luz e escuridão de 12h. Os animais serão acondicionados em caixas de policarbonato medindo 30 cm de largura, 35 cm de comprimento e 20 cm de profundidade. Os animais serão alojados em laboratório de manutenção, localizado em área com reduzida movimentação de pessoas e veículos, e distante de áreas contaminadas ou com ruídos. As caixas contendo os animais serão acondicionadas em estante fixa com controle de ventilação e exaustão do ar. Com densidade de 2 animais/gaiola.
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:

Risco de mordedura dos animais. Para evitar risos os pesquisadores e alunos serão treinados e irão manusear os animais de maneira adequada paramentado com equipamento de proteção individual.

Serão realizadas queimaduras de terceiro grau nos animais, sendo observados riscos de dor ou inflamação nos animais.

- Procedimentos experimentais do projeto de pesquisa:

Queimadura: Para reduzir o estresse por contenção e manuseio dos animais será feito uso do agente pré-anestésico Diazepam na dose de 2,5 a 5 mg/Kg via intraperitoneal de acordo com Kawano et al.21. Em seguida cada animal será anestesiado (com solução de 0,01 mL/g de ketamina a 10% e xylazina a 2% aplicada intraperitonealmente) e será feita uma lesão térmica de terceiro grau por imersão da região dorsal

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATAÍ  
Bloco 5 – sala 23 B, Câmpus Jatobá, Br 364 Km 192, nº. 3.800  
Parque Industrial, Jataí (GO) – 75801-615  
Telefone: 64 3606 8336  
Email: ceujatai@gmail.com



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
Coordenação de Pesquisa e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-Jatá



em água a 95°C por 14 segundos. O animal será colocado em cilindro plástico (PVC) com aberturas de 2x2 cm e selado nas extremidades, segundo Morais et al. Durante os procedimentos experimentais o ressecamento ocular será evitado através da aplicação de solução fisiológica e oclusão com algodão umedecido. Logo após os procedimentos serão utilizados os seguintes agentes analgésicos, Buprenorfina (0,02-0,5 mg/Kg) via subcutânea, a cada 12h, por três dias e Acataminofeno (Paracetamol) (1-2 mg/mL) na água, por sete dias. Os animais serão manuseados em sala distinta do local em que serão mantidos para evitar medo ou ansiedade.

**Coleta de células tronco:** Para a coleta do tecido adiposo serão utilizados seis ratos que não farão parte dos grupos citados acima. Após a eutanásia dos ratos, com sobredose de Tiopental (100mg/Kg), será retirado o tecido adiposo da região de flanco ventral. A obtenção da fração tronco adiposa (FTA) será feita apenas com a digestão enzimática do tecido adiposo com collagenase tipo I e centrifugação celular, conforme Martins et al.11 (2011), e o pellet celular obtido será utilizado para o cultivo das ADSC conforme Bravo et al.19

- Métodos utilizados para minimizar o sofrimento e aumentar o bem-estar dos animais antes, durante e após a pesquisa. Pontos Finais Humanitários:

Para reduzir o estresse por contenção e manuseio dos animais será feito uso do agente pré- anestésico Diazepam na dose de 2,5 a 5 mg/Kg via intraperitoneal de acordo com Kawano et al. (2015). Em seguida cada animal será anestesiado (com solução de 0.01 l/g de ketamina a 10% e xylazina a 2% aplicada intraperitonealmente) para indução da lesão térmica de terceiro grau. Durante os procedimentos experimentais o ressecamento ocular será evitado através da aplicação de solução fisiológica e oclusão com algodão umedecido. Logo após os procedimentos, serão utilizados os seguintes agentes analgésicos, Buprenorfina (0,02-0,5 mg/Kg) via subcutânea, a cada 12h, por três dias e Dipirona (150- 600 mg/Kg) via oral, a cada 8h por sete dias. Além disso, os animais serão manuseados em sala distinta do local em que serão mantidos para evitar medo ou ansiedade. Os animais serão eutanasiados logo após o momento das biopsias, com sobredose de Tiopental (100mg/Kg).

- Grau de invasividade: G3 (o pesquisador indicou G2)  
 Material utilizado em outros projetos: Não se aplica  
 Método de eutanásia: Sobredose de tiopental (100mg/kg intraperitoneal)  
 Destino do animal:

As carcaças são acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em freezers do biotério central.

#### V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFG: todos os documentos estão de acordo com o exigido.  
 Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATÁ*  
 Bloco 5 – sala 23 B, Campus Jatobá, Br 364 Km 192, nº. 3.800  
 Parque Industrial, Jatá (GO) – 75801-615  
 Telefone: 64 3606 8336  
 Email: ceujatai@gmail.com



Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás  
Coordenação de Pesquisa e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA-Jataí



Todas as pendências foram corrigidas.

**VI - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto aprovado, smj desta Comissão.

Solicitamos aos pesquisadores:

**Informação aos pesquisadores:**

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-Jataí o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 30 de novembro de 2020.

**VII - Data da reunião: 01/11/19**

**Dra. Mirian Machado Mendes**  
Coordenadora da CEUA-Jataí