

# Células estromais mesenquimais suspensas em gel de lisado de plaquetas melhoram a cicatrização de feridas em camundongos

Luciana da Rosa Zinn Sostizzo<sup>1,2</sup> , Raul Marques Rodrigues<sup>2</sup> , Tuane Nerissa Alves Garcez<sup>1</sup> ,  
Victor de Mello Palma<sup>3</sup> , Annelise Martins Pezzi da Silva<sup>1</sup> , Vanessa de Souza Valim<sup>1</sup> ,  
Ana Helena da Rosa Paz<sup>1,4</sup> , Anelise Bergmann Araújo<sup>1</sup> , Alessandra Aparecida Paz<sup>1</sup> , Lucia Silla<sup>1,2\*</sup> 

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a segurança e a eficácia do tratamento tópico de feridas com células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas e suspensas em lisado plaquetário. **Método:** Estudo prospectivo intervencionista e controlado com 42 camundongos C57BL/6 com ferida excisional induzida. Eles foram divididos em quatro grupos de tratamento: hidrogel (tratamento padrão de feridas), gel salino (controle), gel de lisado de plaquetas e gel de lisado de plaquetas contendo as células estromais mesenquimais. As análises foram feitas no dia 7 (n=5) e no dia 13 (n=7) para imuno-histoquímica, e no dia 21 (n=30) para segurança. O acompanhamento ocorreu por meio de avaliação clínica (eventos adversos, peso, dor, comportamento, redução do tamanho da ferida) e histológica (cicatrização, vascularização, colagenização). **Resultados:** Em relação à segurança, não foram identificados eventos adversos ou alterações fisiológicas relacionados ao tratamento. O grupo tratado com células apresentou melhores resultados na cicatrização através das avaliações macro e microscópicas, seguido pelo grupo gel de lisado plaquetário. **Conclusão:** A aplicação tópica de células estromais mesenquimais foi segura e mostrou resultados favoráveis.

**DESCRIPTORES:** Cicatrização de feridas. Célula estromal mesenquimal. Terapia celular. Lisado plaquetário. Estomaterapia.

## Mesenchymal stromal cells suspended in a platelet lysate gel improve wound healing in mice

## ABSTRACT

**Objective:** To assess the safety and efficacy of topical wound treatment with mesenchymal stromal cells derived from bone marrow cultured and suspended in platelet lysate. **Method:** A prospective, interventional, controlled study was conducted with 42 C57BL/6 mice with induced excisional wounds. They were divided into four treatment groups: hydrogel (standard wound treatment), saline gel (control), platelet lysate gel, and platelet lysate gel containing mesenchymal stromal cells. Immunohistochemistry analyses were performed on day 7 (n=5) and day 13 (n=7), and safety on day 21 (n=30). Follow-up was conducted through clinical (adverse events,

<sup>1</sup>Hospital de Clínicas de Porto Alegre  – Porto Alegre (RS), Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas  – Porto Alegre (RS), Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia  – Porto Alegre (RS), Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde  – Porto Alegre (RS), Brasil.

\*Autora correspondente: lsilla@hcpa.edu.br

Editor de Seção: Juliana Balbinot Reis Girondi 

Recebido: Março 25, 2025 | Aceito: Março 24, 2026

Como citar: Sostizzo LRZ, Rodrigues RM, Garcez TNA, Palma VM, Silva AMP, Valim VS, et al. Células estromais mesenquimais suspensas em gel de lisado de plaquetas melhoram a cicatrização de feridas em camundongos. ESTIMA, Braz. J. Enterostomal Ther., São Paulo, v24, e1771, 2026. [https://doi.org/10.30886/estima.v24.1771\\_PT](https://doi.org/10.30886/estima.v24.1771_PT)

weight, pain, behavior, wound size reduction) and histological (healing, vascularization, collagenization) assessments. **Results:** Regarding safety, no adverse events or physiological changes related to the treatment were identified. The group treated with cells showed better results in wound healing through macro and microscopic assessments, followed by the platelet lysate gel group. **Conclusion:** The topical application of mesenchymal stromal cells was safe and showed favorable results.

**KEYWORDS:** Wound Healing. Mesenchymal Stromal Cell. Cell Therapy. Platelet Lysate. Stomatherapy.

## Células estromales mesenquimales suspendidas en un gel de lisado plaquetario mejoran la cicatrización de heridas en ratones

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la seguridad y la eficacia del tratamiento tópico de heridas con células estromales mesenquimales derivadas de médula ósea cultivadas y suspendidas en lisado plaquetario. **Método:** Estudio prospectivo, intervencionista y controlado con 42 ratones C57BL/6 con una herida por escisión inducida. Fueron divididos en cuatro grupos de tratamiento: hidrogel (tratamiento estándar para heridas), gel salino (control), gel de lisado plaquetario y gel de lisado plaquetario que contenía células estromales mesenquimales. Los análisis se realizaron el día 7 (n=5) y el día 13 (n=7) para inmunohistoquímica, y el día 21 (n=30) para seguridad. El seguimiento se llevó a cabo mediante evaluación clínica (eventos adversos, peso, dolor, comportamiento y reducción del tamaño de la herida) e histológica (cicatrización, vascularización y colagenización). **Resultados:** En relación con la seguridad, no se identificaron eventos adversos ni alteraciones fisiológicas relacionadas con el tratamiento. El grupo tratado con células presentó mejores resultados de cicatrización en las evaluaciones macro y microscópicas, seguido por el grupo tratado con gel de lisado plaquetario. **Conclusión:** La aplicación tópica de células estromales mesenquimales fue segura y mostró resultados favorables.

**DESCRIPTORES:** Cicatrización de Heridas. Célula Estromal Mesenquimatoso. Terapia Celular. Lisado de Plaquetas. Estomaterapia.

## INTRODUÇÃO

Feridas são definidas como a ruptura de qualquer tecido ou integridade celular devido a lesões mecânicas, físicas ou metabólicas<sup>1</sup>. Várias terapias buscam otimizar o tempo de cicatrização, mas existem casos que são difíceis de curar ou que não respondem a qualquer tratamento disponível. Nesse contexto, Células Mesenquimais Estromais (CTMs) têm se mostrado candidatas potenciais para a cicatrização de feridas agudas e crônicas, independentemente da etiologia. Estudos mostraram a eficácia e segurança das CTMs para o tratamento de queimaduras<sup>2</sup>, úlceras do pé diabético<sup>3</sup> e lesão por pressão, tanto em ambientes pré-clínicos quanto clínicos<sup>4</sup>, ajudando a recuperar o microambiente tecidual<sup>5</sup>. O efeito anti-inflamatório orquestrado pelas CTMs deve-se à sua capacidade de migrar para os locais de inflamação e secretar moléculas bioativas, como citocinas e fatores de crescimento, influenciando outros tipos celulares e polarizando macrófagos para um fenótipo pró-inflamatório ou anti-inflamatório<sup>6</sup>.

As CTMs podem ser aplicadas em feridas de diferentes maneiras, como injeções intramusculares ou intradérmicas. No entanto, há relatos de complicações, uma vez que o ambiente intra e perilesional já está danificado<sup>7</sup>. As injeções sucessivas necessárias para a aplicação homogênea ao longo da área da ferida podem causar microlesões importantes em pacientes com dificuldades de cicatrização<sup>8</sup>. A melhor via de administração visando à segurança parece ser a tópica, idealmente em apresentação de gel, pois o produto permanecerá em contato com o leito da ferida, sem escorrer<sup>9</sup>.

O lisado de plaquetas é um produto biológico rico em fatores de crescimento, com um conteúdo proteico diversificado e elevado, relacionado a processos celulares essenciais como proliferação, morfogênese, diferenciação,

biossíntese, adesão e metabolismo<sup>10</sup>. Além de ser usado como substituto do soro bovino fetal, ele pode também ter algum benefício na cicatrização, o que requer investigação<sup>11</sup>. Geralmente preparado em forma líquida, se gelatinizado pode servir como um veículo para células, fornecendo uma matriz que mantém sua viabilidade<sup>12</sup>. A associação entre células-tronco e derivados de plaquetas, como o Plasma Rico em Plaquetas (PRP) ou plasma gel no cuidado de feridas, demonstrou aumentar a capacidade regenerativa das células<sup>13</sup>. Parece haver uma modulação do metabolismo energético celular, resultando em maior potencial pró-angiogênico<sup>14</sup> e maior produção de ATP (Adenosina Trifosfato) mitocondrial, acelerando, assim, o processo de fechamento da ferida e melhorando a elasticidade da pele recém-regenerada.

Este estudo pré-clínico buscou avaliar a segurança e eficácia de CTMs derivadas de medula óssea humana cultivadas em lisado plaqueta e produzidas sob condições de BPF (Boas Práticas de Fabricação) para futuros ensaios clínicos sobre cicatrização de feridas.

## OBJETIVOS

Avaliar a segurança do tratamento tópico de feridas com células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana cultivadas e suspensas em um gel de lisado plaquetário (através da avaliação de eventos adversos, aspectos comportamentais, dor e peso). Secundariamente, foram analisadas viabilidade e eficácia (aspecto da cicatrização através de escala PUSH (*Pressure Ulcer Scale for Healing*), redução do tamanho da área da ferida por meio de medição, angiogênese por imuno-histoquímica e fibras de colágeno).

## MÉTODOS

Estudo in vivo, prospectivo e controlado realizado na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da instituição (CEUA), sob o número 2023-0051, e pela Plataforma Brasil sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) número 68762923.1.0000.5327. Todos os princípios éticos na experimentação animal foram seguidos ao longo do estudo, de acordo com as leis locais (Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal – CONCEA). A diretriz CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*) foi utilizada para preparação do projeto de pesquisa.

## Amostra

Quarenta e dois camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6, machos, isogênicos, com 8 semanas de idade e um peso corporal médio de 21 gramas foram estudados. O tamanho amostral foi calculado considerando um tamanho de efeito  $f=0,57$ , com o desfecho taxa de cicatrização, de acordo com estudo semelhante, significância ( $p$ ) de 0,05 e poder estatístico de 80% (G\*Power software, v3.1.9.7)<sup>15</sup>.

Os animais foram alojados individualmente em microisoladores contendo serragem com temperatura, umidade e ciclo de claro e escuro controlados. Ração animal e água foram oferecidas livremente. Houve monitoramento quanto ao peso e aos aspectos comportamentais.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos:

Grupo 1 – Controle: hidrogel ( $n=6$ );

Grupo 2 – Tratamento: gel de lisado plaquetário ( $n=13$ );

Grupo 3 – Tratamento: gel de lisado plaquetário contendo células mesenquimais estromais ( $n=15$ );

Grupo 4 – Controle: gel salino ( $n=8$ ).

O estudo foi dividido em diferentes segmentos: até o dia 7 ( $n=5$ ) e dia 13 ( $n=7$ ) para avaliação imuno-histoquímica, e até o dia 21 para eventual ocorrência de eventos adversos e análise histológica ( $n=30$ , com 10 animais em cada grupo).

## Anestesia, fabricação da lesão e analgesia

Os animais foram submetidos a anestesia inalatória geral usando isoflurano vaporizado em 500 ml de oxigênio (5% para indução e 2–3% para manutenção), por meio de uma máscara facial. Sob anestesia, foi aplicado tramadol 20 mg.kg<sup>-1</sup> por via intraperitoneal, seguido pela antisepsia da região dorsal com uma solução de clorexidina alcoólica a 2%. Uma lesão excisional experimental foi induzida, demarcando a área da ferida com um molde circular de 6 mm na região do dorso entre as duas escápulas. A pele demarcada foi removida, e uma ferida de espessura total (epiderme, derme e hipoderme) foi obtida até a superfície externa da fáscia muscular. No período pós-operatório, durante três dias, os animais receberam cloridrato de tramadol (20 mg.kg<sup>-1</sup>) por via intraperitoneal a cada 12 horas para controle da dor. A avaliação da dor foi feita utilizando a escala Grimace<sup>16</sup>.

## Tratamento

O hidrogel é um produto produzido localmente pela farmácia industrial do HCPA, composto por 77,7% de água, 20% de propilenoglicol e 2,3% de carboximetilcelulose. O gel salino é à base de 0,9% de cloreto de sódio e utiliza o mesmo agente gelificante farmacêutico utilizado no gel de lisado de plaquetas. A fórmula exata dos produtos (gel salino e gel de lisado de plaquetas) é atualmente confidencial, conforme recomendado pelo Centro de Inovação e Transferência de Tecnologia da instituição.

O lisado plaquetário foi produzido a partir do *pool* de bolsas de plaquetas humanas descartadas de doadores do Banco de Sangue devido à data de validade vencida, e após testes sorológicos negativos para doenças infecciosas. O método de produção foi descrito anteriormente<sup>17</sup>. Em resumo, as plaquetas passaram por ciclos de congelamento e descongelamento para serem ativadas, seguidos de centrifugação e filtração, adição de heparina, e posteriormente foram transformadas em gel pela adição de um agente gelificante.

Após obtenção do consentimento livre e esclarecido por escrito, células mesenquimais estromais foram obtidas lavando bolsa e filtro, que seriam descartados após o transplante de medula óssea, de doadores saudáveis. As células foram plaqueadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) enriquecido com lisado de plaquetas até atingirem 80% de confluência e passaram por ciclos de tripsinização três vezes (P0, P1 e P2)<sup>18</sup>. Elas foram criopreservadas a -80°C enquanto testes de controle de qualidade eram realizados (citometria de fluxo, microplasma, detecção bacteriológica e de endotoxinas). São caracterizadas como >97% de CD90+, CD75+, CD105+; ≤3% de CD14+, CD34+, CD19+ e ≤3% de CD45+, CD3+, HLA-DR<sup>19</sup>. No momento de uso, foram descongeladas e ressuspensas no gel de plaquetas a uma concentração de 2x10<sup>6</sup> células/cm<sup>2</sup> da área da ferida<sup>20</sup>. Para avaliar a viabilidade das células no gel de lisado de plaquetas, dois métodos foram utilizados: Azul de Tripán e Corante Tetrazolium (MTT).

## Curativo

Após a aplicação tópica do tratamento, as feridas foram protegidas por um curativo multicamadas para respeitar os princípios de cicatrização, preservando a ferida de contaminantes e traumas. O curativo foi adaptado do modelo de Amorim<sup>21</sup>. Como cobertura primária, foi utilizada uma malha adesiva de silicone (Cuticell® Contact) medindo 1,5x2 cm, seguida por uma compressa de gaze de algodão estéril (Héríka®) do mesmo tamanho e fixada pela aplicação de dois filmes de poliuretano adesivos transparentes (Hypafix®) medindo 3x8 cm. O primeiro filme foi fixado na direção dorso-ventral e o segundo na direção oposta, dando duas voltas em torno do corpo do animal (Figura 1).

A aplicação de tratamento e as trocas de curativos foram realizadas nos dias 0, 3, 6 e 9 após a cirurgia, com os animais sob leve sedação. No dia 12, os curativos foram removidos porque as feridas haviam praticamente cicatrizado. Durante as trocas de curativo, as feridas foram limpas com uma haste flexível estéril embebida em solução salina 0,9%. Em caso de crostas, estas foram removidas delicadamente para que os tratamentos pudessem ser reaplicados diretamente na lesão.

## Avaliação clínica das feridas

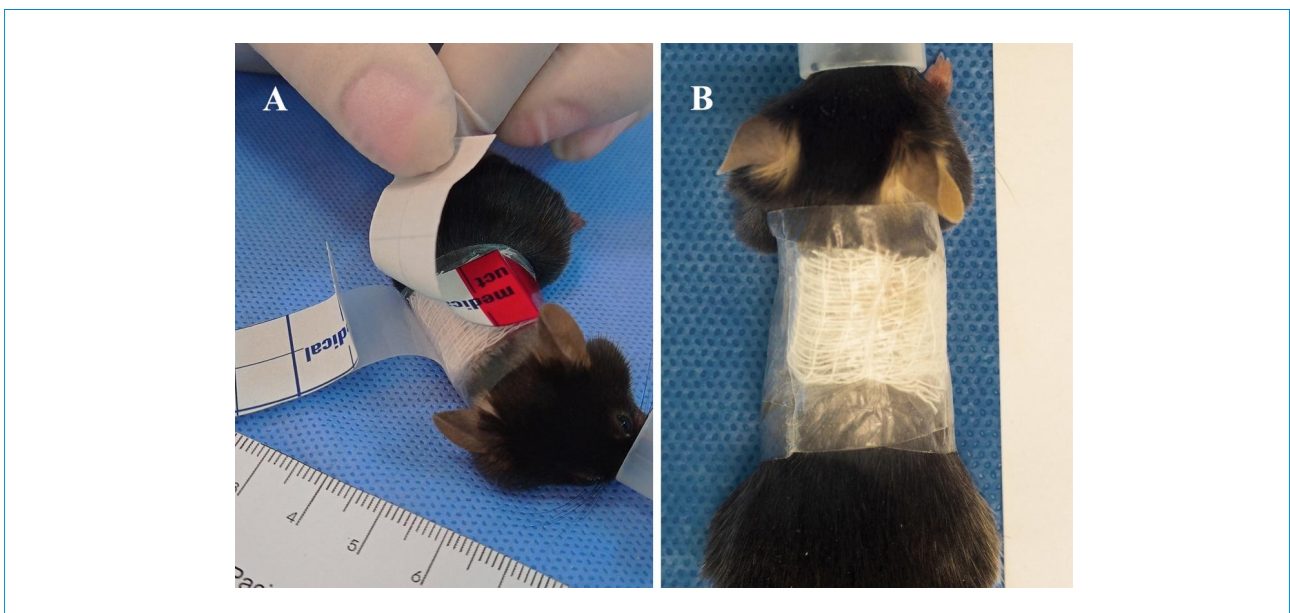
A avaliação macroscópica foi realizada nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 21 após a excisão da ferida, com os animais sob breve anestesia. Aspectos clínicos como dor, prurido, escoriação, odor, infecção, hiperemia, edema, crostas, hematoma, quantidade e aparência do exsudato (seroso, sero-hemático, sanguinolento e purulento), tipo de tecido (necrótico, esfacelo, granulação ou epiteliação) foram observados. A avaliação das feridas também foi realizada utilizando a Escala de Úlcera de Pressão para Cicatrização (PUSH Tool, U. S. National Pressure Injury Advisory Panel, Schaumburg, Illinois, EUA), validada para feridas humanas de diferentes etiologias. As feridas foram fotografadas com uma câmera digital Sony® Alpha 7 com configuração ISO 400, uma lente macro Sigma® 50 mm com abertura definida em f/8.0, apenas com luz artificial do ambiente e um suporte acrílico transparente, mantendo a mesma distância em todas as fotos. A área da ferida foi medida utilizando o software ImageJ® (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

## Coleta de amostras e eutanásia

Com os animais sob anestesia profunda por isoflurano, os fragmentos de pele foram removidos contendo a área da ferida com margem cutânea sadia. A eutanásia foi realizada por exsanguinação sob anestesia profunda e por punção intracardíaca; coração, pulmão, baço, rim e fígado foram removidos para análise futura. As amostras coletadas foram imediatamente acondicionadas em formaldeído tamponado a 10% e processadas pela técnica de inclusão de parafina rotineira local.

## Avaliação microscópica das feridas

Os aspectos microscópicos da cicatrização analisados foram: infiltração inflamatória, tipo de tecido, colagenização e vascularização. O patologista estava cego quanto aos tratamentos e utilizou o microscópio Nikon® Eclipse Si microscope, com aumento de campo de 10x. Para a avaliação histológica, as seções foram coradas com hematoxilina e eosina. A infiltração inflamatória foi avaliada quanto à sua densidade, e um valor de 0 a 3 foi atribuído: 0 para a ausência de infiltração inflamatória, 1 para leve, 2 para moderada e 3 para severa. Em relação ao tipo de tecido, foi considerado 0 quando não foi possível identificar alterações em relação ao restante da lâmina (indicando cicatrização completa), e 1 quando o tecido de granulação foi identificado.



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 1.** Curativo multicamadas. (A) Aplicação do filme transparente na direção ventro-dorsal, finalizando sobre outras camadas; (B) Resultado final do curativo fixado.

Fibras de colágeno foram avaliadas pela coloração Tricrômico de Masson (TM). Cinco imagens foram obtidas em cada lâmina, e a área foi analisada com o software ImageJ®, utilizando o plugin “deconvolução de cores”. A colagenização foi quantificada pela área média dos cinco campos. Para avaliar a angiogênese, o teste imuno-histoquímico CD31 foi utilizado, com um aumento de 20x na microscopia. Cinco imagens foram capturadas, e os vasos sanguíneos foram contados, totalizando os vasos presentes em cada amostra.

## Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS (SPSS Inc. lançado em 2009. PASW Statistics para Windows, Versão 18.0. Chicago: SPSS Inc.). A distribuição das variáveis em relação à normalidade foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk e o gráfico Q-Q. Variáveis categóricas, como células inflamatórias, tipo de tecido e edema, foram comparadas entre os grupos usando o teste exato de Fisher.

Para comparar as características ao longo do acompanhamento entre os grupos, foi utilizado o modelo de Equações de Estimção Generalizadas (EEG), com distribuição binomial e função de ligação logit para variáveis categóricas dicotômicas, como a presença de crostas. Para testes contínuos como a medição da área da ferida, grau de escoriação, pontuação na escala PUSH e tipo de exsudato, a mesma análise por Equação de Estimção Generalizadas foi utilizada, com distribuição normal e função de ligação de identidade.

O valor de  $p$  foi considerado significativo quando inferior a 0,05.

## RESULTADOS

Dois animais foram perdidos no período pós-operatório imediato (um devido a hemorragia e o outro devido a perda de peso maior que o limite final estabelecido para ética no uso de animais (<10%), os quais foram excluídos do estudo por overdose de isoflurano.

A viabilidade celular no gel de lisado plaquetário foi verificada usando MTT por reação colorimétrica e pelo método de Azul de Trypan, através de cultura em um incubador (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) por diferentes tempos. Após 24 horas, 56% das células permaneceram viáveis; após 48 horas, 26%; e após 72 horas, 11,5%. Experimentos realizados em triplicata para cada método.

Os curativos permaneceram cobrindo as feridas 97,47% do tempo; apenas 4 animais os removeram em uma única oportunidade cada. Os animais mostraram atenção constante à presença das bandagens, tentando removê-las persistentemente. Quando abrasões foram identificadas, elas foram tratadas com tintura de iodo a 2% apenas no local afetado.

Comparando os grupos, não houve diferença na perda de peso ( $p=0,118$ ), apenas variação de peso ao longo do tempo em cada grupo ( $p<0,001$ ), pois os animais recuperaram peso em dias diferentes até atingirem o peso inicial (Tabela 1). Os do grupo 3 recuperaram peso muito antes dos outros.

Os animais foram avaliados quanto a aspectos comportamentais e clínicos pelo mesmo avaliador não cego. Nenhuma alteração relacionada aos tratamentos foi observada em termos de comportamento ou indícios de dor. Não houve eventos adversos graves, como deficiência funcional ou morte. Os órgãos não apresentaram alterações macroscópicas durante a

**Tabela 1.** Peso dos animais. Comparação entre o peso médio inicial dos animais por grupo antes do experimento (d-1) e o peso após o procedimento (d+1), com as respectivas porcentagens de perda de peso e o tempo que levaram para recuperar o peso inicial.

| Grupo                                | Peso médio (d-1) | Peso médio (d+1) | Perda de peso (%) | Tempo para recuperar o peso inicial (dias) |
|--------------------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------------------------------|
| 1. Hidrogel                          | 22.45 (DP 2.57)  | 21.69 (DP 2.57)  | 3.39%             | 15                                         |
| 2. Gel de lisado de plaquetas        | 20.83 (DP 2.30)  | 19.80 (DP 1.90)  | 4.4%              | 15                                         |
| 3. Gel de lisado de plaquetas + CTMs | 20.92 (DP 2.10)  | 20.40 (DP 1.86)  | 2.49%             | 3                                          |
| 4. Gel salino                        | 19.83 (DP 1.54)  | 19.37 (DP 1.66)  | 2.32%             | 9                                          |

Peso em gramas.

d: dias; DP: desvio padrão.

Fonte: Elaborada pelo autor.

inspeção *post-mortem*. Nenhuma alteração foi encontrada nas feridas, como necrose, desprendimento, hematoma, hiperemia ou sinais infecciosos como a presença de conteúdo purulento, hiperemia ou irritações como dermatite perilesional, em nenhum dos grupos. Um leve edema nas bordas foi identificado no terceiro dia pós-operatório em todos os grupos, o qual desapareceu nos dias seguintes. O exsudato drenado não esteve presente durante a maior parte do estudo (60,5%) e esteve mais presente nos primeiros dias, diminuindo até o dia 12. O tipo mais observado foi o seroso (26,3%), seguido pelo hemático (10,5%) e sero-hemático (2,6%). A ocorrência de exsudação foi igual entre os grupos. A formação de crostas foi observada do dia 3 ao dia 15 do experimento, em 30% dos animais, em todos os grupos.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, as áreas excisadas não diferiram entre os grupos ( $p=0,508$ ). No 3º dia, houve um aumento de 6,9% na área (média de 0,31 mm) nos grupos 1, 2 e 3; e uma redução no grupo 4. Nos dias seguintes, todos os grupos tiveram o mesmo tamanho médio da ferida até o fechamento (dia 12), epitelização (dia 15) e crescimento de pelos (dia 21) (Figura 2). Houve uma diferença entre os grupos no que tange ao tamanho da ferida em relação ao dia ( $p=0,001$ ), porque o grupo 3 teve um fechamento ligeiramente mais lento do que os outros, e o grupo 4 fechou após os outros.

A escala PUSH tem como pontuação a soma de três parâmetros: área da ferida (pontuação de 0 a 10), quantidade de exsudato (de 0 a 3) e aparência do leito da ferida (de 0 a 4). A pontuação máxima alcançada foi de 6 pontos. As pontuações diminuíram ao longo do tempo em todos os grupos, indicando cicatrização. Os grupos de tratamento 2 e 3 apresentaram pontuações ligeiramente mais baixas ao longo do tempo, indicando uma tendência em direção a melhores parâmetros de cicatrização ( $p=0,027$ ).

Colagenização semelhante foi observada entre os grupos, com 196 fibras de colágeno no grupo 1 (média, DP 3,0), 191 no grupo 2 (DP 9,4), 186 no grupo 4 (DP 4,8) e 183 no grupo 3 (DP 4,8) (Figura 3).

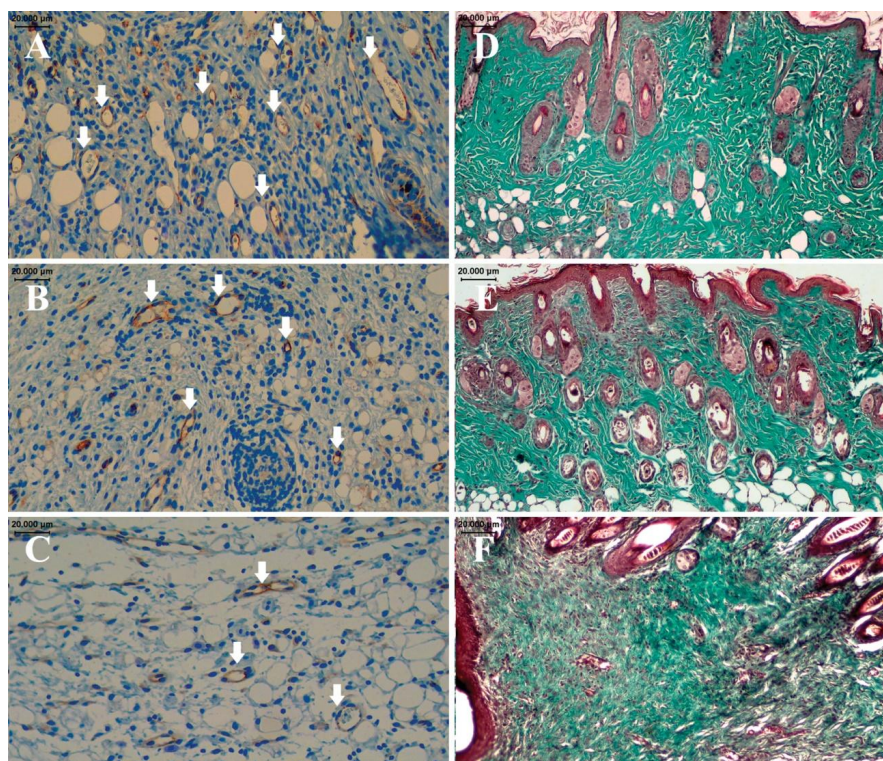
Ao avaliar a angiogênese, o grupo 3 apresentou um maior número de vasos (média de 51,6, DP 11,6), seguido pelo grupo 2 (46, DP 5,6), em relação à média dos grupos controle 1 e 4 (41,6, DP 0,7). No entanto, esse resultado não apresentou significância estatística ( $p=0,493$ ) (Figura 3).

Os Grupos 2 e 3 mostraram um padrão semelhante de infiltrado inflamatório leve, com uma média de 0,9 (DP 0,7) e 1 (DP 0,8) ponto. Os grupos de controle 1 e 4 apresentaram resultados opostos, um com uma inflamação severa no grupo 1 (3 pontos, DP 0), o mais alto entre todos os grupos ( $p<0,001$ ); e outro com a menor inflamação no grupo 4 (média 0,20, DP 0,4). O tecido de granulação esteve presente em 20,7% dos animais, com os grupos 1 e 3 mostrando 100%, diferentemente dos outros grupos ( $p<0,001$ ), e 20%, respectivamente (Figura 4).



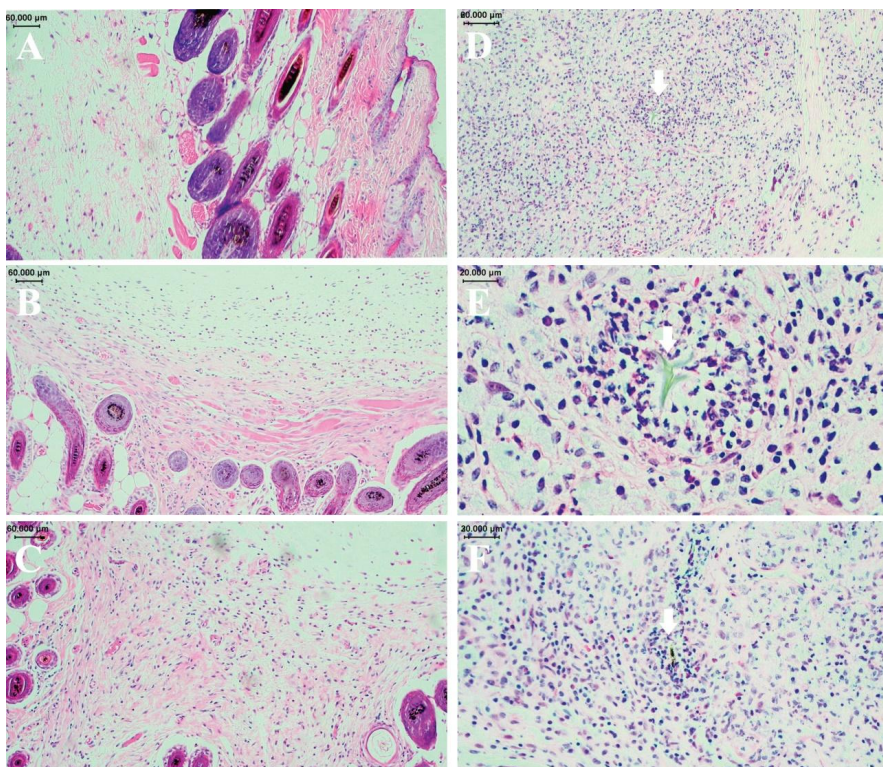
Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 2.** Cicatrização ao longo do tempo. Evolução das feridas, representativa de cada grupo ao longo do tempo (D = dias). (A) Grupo 1 – Hidrogel; (B) Grupo 2 – Gel de lisado de plaquetas; (C) Grupo 3 – Células mesenquimais estromais + gel de lisado de plaquetas; (D) gel salino.



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 3.** Avaliações microscópicas. Na primeira coluna, o teste CD31, com vasos sanguíneos identificados com setas no grupo 3 (A), grupo 2 (B) e grupo 1 (C); na segunda coluna, o colágeno é corado com TM, no grupo 3 (D), grupo 2 (E) e grupo 1 (F).



Fonte: Elaborada pelo autor.

**Figura 4.** Infiltrado inflamatório. Colorido com HE, sem infiltrado (A), infiltrado leve (B), infiltrado moderado (C), infiltrado severo (D) com tecido de granulação (seta), (E) e (F) tecido de granulação (seta).

## DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a segurança do uso tópico de células estromais mesenquimatosas suspensas em um gel de lisado plaquetário para tratar feridas em camundongos. Nenhum evento adverso relacionado ao tratamento foi identificado. Alterações fisiológicas, como a presença de edema nas bordas das feridas nos primeiros dias pós-operatórios bem como drenagem de exsudatos e a formação de crostas, ocorreram igualmente entre os grupos. Esses achados são comuns na fase inflamatória, em que o dano tecidual é o estímulo inicial para a cicatrização, colocando elementos sanguíneos em contato com colágeno e outras substâncias da matriz extracelular – o que degranula plaquetas e ativa a cascata de coagulação, liberando mediadores vasoativos (como histamina, serotonina e bradicinina) e agentes quimiotáticos. Em seguida, células inflamatórias são atraídas para a ferida, causando calor, vermelhidão e edema, este último devido ao aumento da permeabilidade capilar, ocasionando extravasamento de fluidos para o espaço extracelular.

O animal escolhido para este estudo foi o camundongo C57BL/6, o modelo mais amplamente estudado na pesquisa biomédica com células-tronco<sup>22</sup>. Essa linhagem também apresenta uniformidade genética, o que garante a mesma resposta fisiológica. Em relação ao curativo utilizado, ele permaneceu fixo, um desafio com roedores pequenos e agitados. O curativo assegurou a permanência dos tratamentos e manteve a área da ferida protegida.

O peso é um importante preditor da saúde de um animal. Todos os camundongos perderam peso de forma semelhante no pós-operatório ( $p=0,118$ ), o que era esperado. A cirurgia de formação de feridas teve um grau moderado de invasividade, causando extensa ulceração de pele exposta, manipulação constante, anestesia, dor do procedimento cirúrgico (embora medicados) e desconforto devido às trocas de curativo. O tempo para recuperar o peso inicial foi diferente entre os grupos ( $p<0,001$ ), pois o grupo tratado com células levou apenas três dias, provavelmente tendo a recuperação pós-operatória facilitada pelas CTMs devido ao menor gasto de energia, uma vez que a cicatrização de feridas é um processo de alta intensidade de taxa metabólica<sup>5</sup>.

Todos os grupos atingiram a cicatrização completa das feridas antes do final da observação (dia 21). As lesões tratadas com células apresentaram um fechamento de feridas ligeiramente mais lento, o que pode ser explicado por um aprimoramento do processo de cicatrização. Houve tempo de recuperação de peso pós-operatório mais curto, taxas de cicatrização ligeiramente melhores verificadas pela escala PUSH e índice de inflamação leve, além de tendência a ter a melhor vascularização entre os grupos. O lisado de plaquetas teve a melhor média na referida escala ao longo do tempo e um perfil inflamatório leve. O gel salino teve o menor perfil inflamatório e foi o único com redução de tamanho no dia 1 do pós-operatório, no entanto, não cicatrizou antes dos outros e apresentou a terceira média pela escala PUSH. O hidrogel mostrou o perfil inflamatório mais alto e os piores índices de cicatrização, tendendo a ter a menor vascularização e o maior tecido de granulação microscópico residual.

Embora o grupo tratado com células, seguido pelo lisado plaquetário, tenha apresentado um maior número de vasos sanguíneos na ferida, esse resultado não pôde ser confirmado estatisticamente devido ao tamanho reduzido da amostra. Este trabalho supõe que esses grupos de tratamento apresentaram mais vasos, de acordo com a literatura que atribui isso a uma maior presença de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), que induz a neoangiogênese<sup>23</sup>. A análise de segurança foi priorizada em relação à eficácia do tratamento para evitar sacrificar mais animais. Nossos resultados preliminares estão em concordância com a literatura sobre o assunto.

Microscopicamente, o tecido de granulação foi identificado nos fragmentos de tecido da ferida nos animais do grupo 1 (em 100%) e 3 (em 20%) no dia 21. A persistência do tecido de granulação no grupo 1 poderia ser explicada pelo pior desempenho de cicatrização e maior inflamação, que poderia ser observada microscopicamente como um atraso no processo de cicatrização em comparação aos outros grupos, uma vez que o tecido de granulação tende a regredir à medida que o infiltrado inflamatório é dissolvido. O grupo 3 apresentou tecido de granulação, provavelmente porque a taxa de cicatrização foi ligeiramente mais lenta que nos outros, possivelmente devido a uma cicatrização mais elaborada, que fornece um abundante tecido de granulação que ainda está sendo degradado.

O número de fibras de colágeno entre os grupos foi considerado similar, no entanto, pode haver diferenças relacionadas à qualidade das fibras, que não foram verificadas. A derme possui aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20% de colágeno

tipo III; enquanto o tecido de granulação possui até 40% de colágeno tipo III, considerado imaturo. Portanto, hipotetiza-se que os grupos com melhor cicatrização podem ter fibras de colágeno aprimoradas.

Quanto ao infiltrado inflamatório, o maior índice apresentado foi no grupo do hidrogel, enquanto os grupos de células lisado apresentaram uma inflamação leve. O menor índice foi no grupo do gel salino. A inflamação é uma parte fundamental do processo de cicatrização e pode levar a uma cicatrização incorreta ou atrasada se excessiva ou insuficiente. O baixo perfil inflamatório do gel salino não apresentou benefícios, o que reforça a ideia de que algum nível de inflamação é necessário para a cicatrização. Embora as células mesenquimatosas sejam reconhecidas principalmente como anti-inflamatórias<sup>5</sup>, elas mantêm o microambiente com baixos níveis de interleucina-1 e fator de necrose tumoral-alfa, ambos pró-inflamatórios. Portanto, elas têm capacidade imunomodulatória, aumentando a inflamação quando necessário e suprimindo-a quando exageradamente presente<sup>24</sup>.

As lesões neste estudo eram agudas, sem patofisiologia subjacente, portanto, uma resposta inflamatória controlada era esperada, e o tratamento consistia em gerenciar o ambiente e prevenir infecções. Em feridas crônicas, que podem ter uma multiplicidade de etiologias, o tratamento clínico subjacente deve sempre ser considerado além das medidas de gerenciamento local. Barreiras para a recuperação relacionadas a doenças subjacentes e/ou fatores de risco aumentados podem resultar em um curso de cicatrização imprevisível, cujo estado de inflamação persistente deve ser controlado. Os tratamentos biológicos apresentados neste artigo podem ser melhor pesquisados em feridas de difícil cicatrização.

Quanto aos tratamentos, o gel de lisado plaquetário, além de manter a viabilidade celular quando associado a células mesenquimatosas, também confirmou suas propriedades biológicas na cicatrização quando utilizado isoladamente. Ele se qualifica como uma nova possibilidade terapêutica porque oferece vesículas, fatores de crescimento, entre outras moléculas conhecidas por serem importantes para quimiotaxia<sup>10</sup>. As células estromais mesenquimatosas confirmaram suas propriedades cicatrizantes, tendendo para os melhores resultados do estudo. Todos os tratamentos foram preparados de acordo com as diretrizes de Boas Práticas de Fabricação utilizadas para produtos biológicos submetidos a manipulação, com rastreabilidade de origem e material de fonte segura, conforme exigido pela legislação nacional, estabelecida pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) número 508 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>25</sup>.

O gel de lisado plaquetário com ou sem células está de acordo com pesquisas recentes nas áreas de bioengenharia, terapia celular e cuidados com feridas, que recomendam o uso de biomateriais que servem como estruturas para células, gerando matrizes tridimensionais. É importante combinar células mesenquimais com outros tratamentos regenerativos, servindo como meio para o transporte de fatores de cicatrização solúveis, através de uma estrutura como a matriz extracelular natural com propriedades biocompatíveis, bioativas e biodegradáveis quando liberam produtos em sistemas biológicos. Portanto, os três produtos desenvolvidos para o estudo mostraram resultados terapêuticos diferentes e atingiram o objetivo pretendido. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar a aplicação tópica em feridas de células estromais mesenquimatosas da medula óssea cultivadas e suspensas em lisado plaquetário.

## Limitações do estudo

Embora o grupo de células, seguido pelo grupo de lisado de plaquetas, tenha contabilizado um número maior de vasos sanguíneos na ferida, esse resultado não pôde ser confirmado estatisticamente devido ao baixo tamanho da amostra. A amostra de CD31 não foi aumentada para evitar prejudicar mais animais em um aspecto com uma base científica estabelecida. Foi priorizada a análise de segurança (que se estendeu até o dia 21). O número de fibras de colágeno entre os grupos foi considerado similar, no entanto, pode haver diferenças relacionadas à qualidade das fibras que não puderam ser verificadas.

## Recomendações

Os resultados sugeriram que a combinação da célula mesenquimal com o gel de lisado plaquetário apresentou melhores resultados de eficácia na cicatrização de feridas, seguida do gel de lisado plaquetário isolado. Ambos devem continuar a ser estudados como alternativas terapêuticas para ajudar pacientes com feridas de difícil cicatrização.

## CONCLUSÃO

Células-tronco mesenquimatosas da medula óssea humana produzidas sob condições de GMP foram seguras quando aplicadas topicamente em feridas em camundongos, sem eventos adversos além dos efeitos secundários esperados do modelo de ferida escolhido. Os resultados sugeriram que a combinação da célula mesenquimal com o gel de lisado plaquetário apresentou melhores resultados de eficácia na cicatrização de feridas, seguida do gel de lisado plaquetário isolado. Ambos devem continuar a ser estudados como alternativas terapêuticas para ajudar pacientes com feridas de difícil cicatrização.

**Agradecimentos:** Não se aplica.

**Contribuições dos autores:** LRZS: Administração do projeto, Análise formal, Conceituação, Curadoria de dados, Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição, Investigação, Metodologia. RMR: Conceituação, Escrita – primeira redação, Escrita – revisão e edição, Investigação, Metodologia, Visualização. TNAG: Conceituação, Metodologia, Validação. VMP: Conceituação, Investigação, Metodologia, Visualização. AMPS: Conceituação, Metodologia. VSV: Metodologia. AHRP: Conceituação, Recursos. ABA: Recursos. AAP: Obtenção de financiamento, Recursos. LS: Conceituação, Escrita – revisão e edição, Obtenção de financiamento, Recursos, Supervisão.

**Disponibilidade de dados de pesquisa:** Todos os dados foram gerados ou analisados no presente estudo.

**Financiamento:** Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nº 2023-0051. Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), nº 01.08.0630.01.

**Conflito de interesse:** Vanessa de Souza Valim e Lucia Silla são as desenvolvedoras do método de produção de lisado de plaquetas utilizado neste estudo (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, BR1020130311693A8).

## REFERÊNCIAS

1. Lukomskyj AO, Rao N, Yan L, Pye JS, Li H, Wang B, et al. Stem cell-based tissue engineering for the treatment of burn wounds: a systematic review of preclinical studies. *Stem Cell Rev Rep*. 2022;18(6):1926-55. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10341-z>
2. Maranda E, Rodriguez-Menocal L, Badiavas E. Role of mesenchymal stem cells in dermal repair in burns and diabetic wounds. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2016;12(1):61-70. <https://doi.org/10.2174/1574888X11666160714115926>
3. Jin L, Wang X, Qiao Z, Deng Y. The safety and efficacy of mesenchymal stem cell therapy in diabetic lower extremity vascular disease: a meta-analysis and systematic review. *Cytotherapy*. 2022;24(3):225-34. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.08.001>
4. Torres-Guzman RA, Avila FR, Maita K, Garcia JP, De Sario GD, Borna S, et al. Mesenchymal stromal cell healing outcomes in clinical and pre-clinical models to treat pressure ulcers: a systematic review. *J Clin Med*. 2023;12(24):7545. <https://doi.org/10.3390/jcm12247545>
5. Oryan A, Alemzadeh E, Alemzadeh E, Barghi M, Zarei M, Salehiniya H. Effectiveness of the adipose stem cells in burn wound healing: literature review. *Cell Tissue Bank*. 2022;23(4):615-26. <https://doi.org/10.1007/s10561-021-09961-5>
6. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjova M, Oreshkova T, Belemezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552-70. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>
7. Zhang C, Huang L, Wang X, Zhou X, Zhang X, Li L, et al. Topical and intravenous administration of human umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with diabetic foot ulcer and peripheral arterial disease: a phase I pilot study with a 3-year follow-up. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):451. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03143-0>
8. Assis A, Camargo S, Margalit R, Mitrani E. Creation of a vascular inducing device using mesenchymal stem cells to induce angiogenesis. *J Biosci Bioeng*. 2021;132(4):408-16. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.06.012>
9. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(4):30. <https://doi.org/10.1186/scrt30>
10. Rodrigues RM, Valim VS, Berger M, Silva APM, Fachel FNS, Wilke II, et al. The proteomic and particle composition of human platelet lysate for cell therapy products. *J Cell Biochem*. 2022;123(9):1495-505. <https://doi.org/10.1002/jcb.30310>

11. Leon JM, Driver VR, Fylling CP, Carter MJ, Anderson C, Wilson J, et al. The clinical relevance of treating chronic wounds with an enhanced near-physiological concentration of platelet-rich plasma gel. *Adv Skin Wound Care*. 2011;24(8):357-68. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000403249.85131.6f>
12. Alvarez-Viejo M, Romero-Rosal L, Perez-Basterrechea M, García-Gala JM, Hernando-Rodriguez P, Marana-Gonzalez J, et al. Plasma-based scaffold containing bone-marrow mononuclear cells promotes wound healing in a mouse model of pressure injury. *Cell Transplant*. 2024;33:9636897241251619. <https://doi.org/10.1177/09636897241251619>
13. Hersant B, Sid-Ahmed M, Braud L, Jourdan M, Baba-Amer Y, Meningaud JP, et al. Platelet-rich plasma improves the wound healing potential of mesenchymal stem cells through paracrine and metabolism alterations. *Stem Cells Int*. 2019;2019:1234263. <https://doi.org/10.1155/2019/1234263>
14. Levoux J, Prola A, Lafuste P, Gervais M, Chevallier N, Koumaiha Z, et al. Platelets facilitate the wound-healing capability of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer and metabolic reprogramming. *Cell Metab*. 2021;33(2):283-99.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.006>
15. Iacono E, Merlo B, Pirrone A, Antonelli C, Brunori L, Romagnoli N, et al. Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal. *Res Vet Sci*. 2012;93(3):1439-40. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.04.008>
16. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*. 2010;7(6):447-9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455>
17. Valim V, Amorin B, Pezzi A, Silva MAL, Alegretti AP, Silla L. Optimization of the cultivation of donor mesenchymal stromal cells for clinical use in cellular therapy. *CellBio*. 2014;3:25-33. <http://dx.doi.org/10.4236/cellbio.2014.31003>
18. Silla L, Valim V, Amorin B, Alegretti AP, Oliveira FS, Silva MAL, et al. A safety and feasibility study with platelet lysate expanded bone marrow mesenchymal stromal cells for the treatment of acute graft-versus-host disease in Brazil. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(5):1203-5. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.823495>
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
20. Falanga V, Iwamoto S, Chartier M, Yufit T, Butmarc J, Kouttab N, et al. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. *Tissue Eng*. 2007;13(6):1299-312. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0278>
21. Amorim GL, Guillen MRS, Vieira PC, Barcelos LS, Borges EL. Contributions of nurses in basic research: dressing fixation model for excisional cutaneous wounds of mice. *ESTIMA Braz J Enterostomal Ther*. 2021;19:e1221. [https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038\\_IN](https://doi.org/10.30886/estima.v19.1038_IN)
22. Galiano RD, Michaels 5th VJ, Dobryansky M, Levine JP, Gurtner GC. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(4):485-92. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.12404.x>
23. Sun Y, Zhao J, Zhang L, Li Z, Lei S. Effectiveness and safety of stem cell therapy for diabetic foot: a meta-analysis update. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):416. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03110-9>
24. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):526-39. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526>
25. Silva Junior JB, Silva AAR, Melo FCC, Kumoto MC, Parca RM. Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Consensus on genetically modified cells. Special Article: Advanced therapy medicinal products in Brazil: regulatory panorama. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2021;43(Suppl 2):S68-77. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.09.010>