



Células-tronco mesenquimais de origem adiposa na fase de proliferação do processo de cicatrização de queimaduras frias

[*Adipose-derived stem cells in the proliferation phase of the healing process in cold burns*]

F.S. Valente¹, N. Franco², M.P. Rosa², E. Degregori², C.L. Lhamas³,
A.O. Andrades⁴, S.B. Vidor⁵, A. Santos⁶, G.D. Kommers¹, D.L. Graça¹,
D.C.M. Müller¹, E.A. Contesini⁷

¹Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS

²Aluno de pós-graduação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS

³Médica veterinária autônoma – Bragança Paulista, SP

⁴Médica veterinária autônoma – Santa Maria, RS

⁵Médica veterinária autônoma – Porto Alegre, RS

⁶Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS

⁷Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS

RESUMO

A criocirurgia tem sido utilizada no tratamento de diferentes enfermidades de sistemas e órgãos. Contudo, são relatados efeitos adversos, como cicatrização lenta, cicatrizes extensas, disfunção estética e funcional. As lesões que ocorrem naturalmente pela exposição ao frio extremo, comumente, resultam em gangrena. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência das células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSCs) na fase de proliferação da cicatrização de feridas cutâneas. Por meio da aplicação do nitrogênio líquido pela técnica do *spray* aberto, realizou-se a indução de uma ferida, de aproximadamente 15mm de diâmetro, na região dorsal de cada rato. A ferida recebeu o tratamento de acordo com o grupo ao qual pertencia: 1) aplicação das ADSCs no 15º dia (grupo tratado); 2) aplicação da solução cloreto de sódio 0,9% no 15º dia (grupo *sham*); 3) nenhuma intervenção até o momento da eutanásia (grupo controle). O grupo tratado com as ADSCs apresentou as maiores taxas de contração média das feridas e obteve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *sham* quanto à neovascularização. A terapia com as ADSCs proporcionou uma relevante evolução clínica das feridas, podendo ser constatada ao final do período de avaliação por cicatrizes mais estreitas e compridas.

Palavras-chave: cicatrização, lesão causada por congelamento, criocirurgia, célula-tronco mesenquimal

ABSTRACT

Cryosurgery has been used to treat different diseases of systems and organs, although adverse effects have been reported such as delayed wound healing, large scars, esthetical deformation and functional impairment. Injuries caused naturally by the exposure to extreme cold weather conditions mostly result in gangrene. This study aims to evaluate the influence of adipose-derived stem cells (ADSCs) in the proliferation phase on cutaneous wound healing. Through the application of liquid nitrogen by the spraying technique, a 15 millimeter diameter lesion was produced in the dorsal region of each rat. The wound received treatment according to the group it belonged: 1) ADSCs application on the 15th day (treated group); 2) application of 0.9% sodium chloride solution on the 15th day (sham group); 3) no intervention until euthanasia (control group). The group treated with ADSCs showed the highest wound average contraction rate; this group got a significant statistical difference in relation to the sham group when it refers to neovascularization. The ADSCs therapy provides an important clinical evolution of wounds. This was verified at the end of the evaluation period through narrower and longer scars.

Keywords: healing process, frostbite, cryosurgery, stem cell

Recebido em 3 de junho de 2018

Aceito em 15 de abril de 2019

E-mail: fernanda.valente5@gmail.com

F.S. Valente
<https://orcid.org/0000-0001-9317-4605>
N. Franco
<https://orcid.org/0000-0002-2624-587X>
M.P. Rosa
<https://orcid.org/0000-0001-5226-8488>
E. Degregori
<https://orcid.org/0000-0002-0547-2504>
C.L. Lhamas
<https://orcid.org/0000-0002-0245-7907>
A.O. Andrades
<https://orcid.org/0000-0002-5886-4763>
S.B. Vidor
<https://orcid.org/0000-0002-1698-4265>
A. Santos
<https://orcid.org/0000-0003-0344-8604>
G.D. Kommers
<https://orcid.org/0000-0002-2255-3015>
D.L. Graça
<https://orcid.org/0000-0003-1790-4009>
D.C.M. Müller
<https://orcid.org/0000-0002-7225-6027>
E.A. Contesini
<https://orcid.org/0000-0002-3574-7927>

INTRODUÇÃO

As queimaduras frias, também conhecidas como lesões causadas pelo congelamento ou *frostbites*, constituem a condição médica em que o dano é causado à pele e a outros tecidos como resultado do congelamento do tecido (Hassi e Mäkinen, 2000; Ikäheimo e Hassi, 2011). As partes do corpo mais expostas e com uma fina cobertura de pele e tecidos moles, como os dedos das mãos e dos pés, as orelhas e o nariz estão particularmente sob risco aumentado de desenvolver *frostbites* (Hallam *et al.*, 2010; Sachs *et al.*, 2015).

Antigamente, as *frostbites* eram uma condição que atingia, principalmente, trabalhadores expostos a temperaturas extremas em frigoríficos e regiões portuárias. Porém, a frequência de exposição da população em geral ao frio extremo aumentou nas últimas décadas, devido ao crescente interesse pelo turismo em regiões mais frias e a atividades praticadas ao ar livre e na neve (esqui, patinação, montanhismo e alpinismo), ocasionando maior incidência dessas lesões (Haik *et al.*, 2016).

Por outro lado, a utilização do frio pela medicina é uma técnica muito antiga. A criocirurgia, também denominada de crioblação, crioterapia ou cirurgia por congelamento, é uma modalidade terapêutica em que as baixas temperaturas são utilizadas para destruir tecidos comprometidos. Na medicina, o procedimento criocirúrgico é indicado para o tratamento de mais de 60 tipos de lesões dermatológicas inflamatórias ou neoplásicas, além de mais de 15 tipos de neoplasias malignas (Castro *et al.*, 2013). Contudo, as complicações dermatológicas permanentes (sequelas), como a presença de cicatriz extensa, perda tecidual significativa, leucodermia, leucotriquia e alopecia, além da cicatrização lenta, ainda se apresentam como fatores limitantes para a escolha e utilização da técnica (Lucas e Larsson, 2007).

A cicatrização de feridas é um evento complexo e multifatorial que envolve a interação dos processos de inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação e reepitelização (Balbino *et al.*, 2005). As ADSCs apresentam efeitos benéficos nas três fases da cicatrização cutânea: inflamatória, de proliferação e de remodelamento. Por meio da sinalização

parácrina, elas atuam reduzindo a inflamação, promovendo a angiogênese e induzindo a migração e a proliferação celular (Maxson *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2014). A diferenciação das ADSCs em ceratinócitos e em células endoteliais acelera a neovascularização e a reepitelização de feridas (Uysal *et al.*, 2014).

No entanto, mesmo com todas as indicações para o tratamento criocirúrgico e o aumento da incidência de lesões causadas naturalmente pela exposição ao frio extremo, desconhece-se a interferência que as ADSCs poderiam ter em relação à cicatrização de lesões cutâneas causadas pelo frio. Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das ADSCs na fase de proliferação e cicatrização cutânea de feridas padronizadas e induzidas pelo nitrogênio líquido em ratos Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 31 ratos Wistar, linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, machos, hígdos, com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Os animais foram mantidos e manipulados segundo a Lei Federal 11.794 (Diário Oficial da União – 08/10/2008) e as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSM, onde se encontra registrado sob o protocolo número 3468300117.

As ADSCs foram isoladas da gordura intra-abdominal perigonadal de um rato Wistar macho, hígdio, com 60 dias, após a eutanásia por sobredose anestésica de isoflurano. O processamento e o cultivo das ADSCs ocorreram conforme protocolo já estabelecido (Sprada *et al.*, 2015). As células foram diferenciadas na terceira passagem (P3) em adipócitos e osteócitos, de acordo com o protocolo de Deus *et al.* (2012). As ADSCs foram imunofenotipadas por citometria de fluxo na quarta passagem (P4).

Os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória com isoflurano, vaporizado em oxigênio 100%, ao efeito e administrado por meio de máscara facial. A analgesia foi iniciada previamente à indução das lesões com cloridrato de tramadol (10mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal

(IP). A lesão foi induzida pela aplicação de nitrogênio líquido, com auxílio do aparelho de criocirurgia Package Cryogun[®], e a área da ferida foi delimitada por meio de um Cryocone[®] de 15mm de diâmetro. Utilizou-se a técnica do *spray* aberto, durante um minuto, em jato contínuo (15 segundos), até a formação do halo de gelo do diâmetro desejado e, depois, jatos

intermitentes a cada cinco segundos (totalizando 45 segundos), para a manutenção do congelamento e a não extensão do halo de gelo (Fig. 1). Os animais receberam no pós-operatório cloridrato de tramadol, IP, a cada 12 horas, durante dois dias, e as lesões permaneceram abertas.

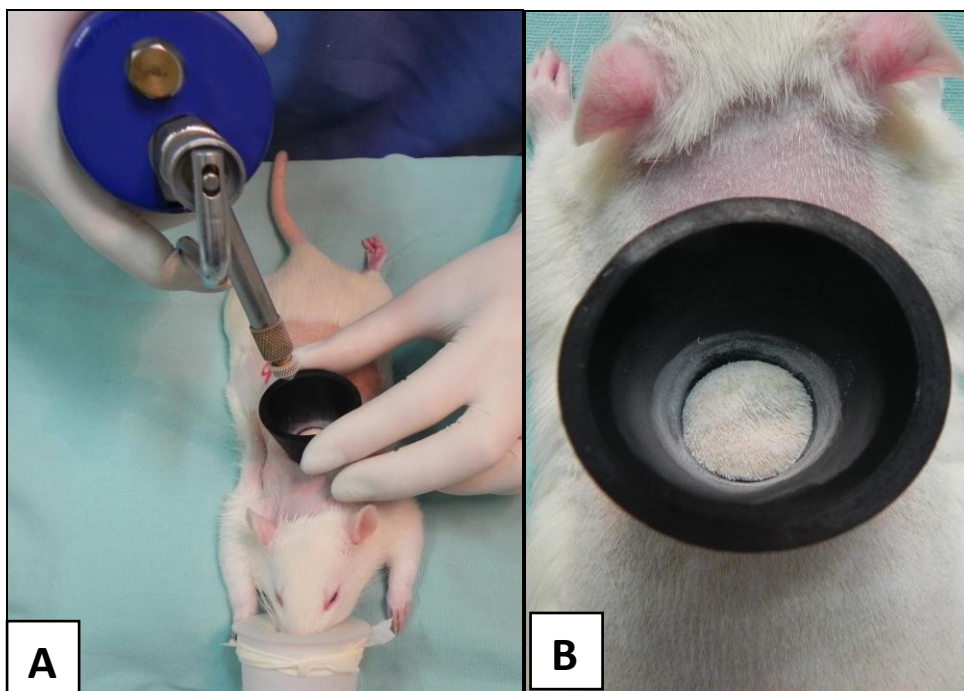


Figura 1. (A) Indução da lesão, no dorso do rato Wistar, pelo nitrogênio líquido, com auxílio do aparelho de criocirurgia e delimitação do jato de *spray* por meio de um cone de neoprene. (B) Halo de gelo formado e delimitado pelo cone de neoprene de 15mm.

Os animais foram divididos em três grupos (n=10). Decorridos 15 dias da indução da lesão por criocirurgia, eles foram anestesiados e submetidos ao mesmo protocolo analgésico, conforme descrito, para receber o tratamento com as ADSCs (grupo T) ou apenas o veículo (NaCl 0,9%) utilizado na ressuspensão delas (*sham* – grupo S). O grupo controle (grupo C) não recebeu tratamento algum após a indução da lesão. As ADSCs foram utilizadas na terceira passagem, na concentração de 1×10^6 , diluídas em 400 μ L de NaCl 0,9% e aplicadas por via subcutânea, em quatro pontos equidistantes ao redor da ferida.

Para a avaliação morfométrica, as feridas foram mensuradas em duas direções, o maior comprimento (c=crânio-caudal) pela maior

largura (l=látero-lateral), com o auxílio de um paquímetro digital no dia zero (indução da lesão) e, depois, a cada cinco dias, até a eutanásia. Com base nesses dados, foi possível calcular a área da lesão em cada avaliação ($A = c \times l$). A área de contração da ferida (C) foi calculada subtraindo-se da área inicial (A_0), determinada no dia zero, a medida da área da lesão obtida nos dias subsequentes de avaliação (A_1), de forma que: $C = A_0 - A_1$. A taxa de contração cicatricial (TC) foi avaliada com base nos resultados prévios, em que: $TC = C \times 100/A_0$, e sua média, para cada dia de avaliação, foi obtida somando-se as TC de todos os animais do grupo e dividindo-se pelo n de 10.

Ao término do período de avaliação (45 dias), os animais foram submetidos à eutanásia por

exsanguinação, sob anestesia profunda, conforme recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA 2018. Após a confirmação da morte, foi realizada a remoção da área total da cicatriz, e os fragmentos de pele foram fixados em formol tamponado a 10%, para posterior coloração por técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas.

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas por meio de um microscópio de luz (Binocular Optical Microscope ZEISS, Axio Lab.A1, Alemanha), as imagens foram capturadas por uma câmera (AxioCam, ERc 5S, Alemanha) com monitor acoplado e, para as leituras, foi utilizado um *software* (ZEN 2011 edição azul, 1.0 Carl Zeiss MicroImaging GmbH). A contagem dos novos vasos sanguíneos foi feita pela técnica do VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Para isso, procedeu-se à captura aleatória de cinco campos da derme, seguindo da esquerda para a direita e englobando toda a extensão da área cicatricial, de cada lâmina, em um aumento de 40x (Pessoa *et al.*, 2012). Efetuou-se a contagem dos vasos neoformados e, em seguida, foi realizada a média dos cinco valores obtidos para cada amostra.

Para a análise estatística das avaliações macroscópicas (morfométrica), utilizou-se o método de Equações de Estimativas Generalizadas (GEE). As comparações foram obtidas pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, e os resultados foram expressos em média e erro padrão. Para as avaliações microscópicas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis para variáveis independentes não paramétricas, com teste *Post Hoc* de Dunn, utilizando-se o teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos em mediana. O nível de significância adotado nas análises foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A coleta do tecido adiposo de um rato doador foi suficiente para o isolamento e a expansão das 10×10^6 ADSCs utilizadas durante o estudo *in vivo*, 1×10^6 ADSCs para o ensaio de imunofenotipagem e 4×10^4 ADSCs para o ensaio de diferenciação *in vitro*. As células apresentaram confluência de 80 a 90%, aderência ao plástico de cultivo (garrafas de cultura) e morfologia semelhante à de fibroblastos. O ensaio de diferenciação foi realizado com as ADSCs na P3, e elas foram capazes de diferenciar-se nas linhagens adipogênica e osteogênica (Fig. 2).

No ensaio por citometria de fluxo, ocorreu a expressão apenas do marcador de superfície celular CD44, e não houve expressão para os demais marcadores testados: CD45, CD106, CD31 e MHC classe II (Fig. 3).

Ao término do período experimental (45 dias), as lesões dos três grupos estavam cicatrizadas, porém as cicatrizes do grupo tratado com as ADSCs apresentavam área cicatricial inferior em relação às que não receberam a terapia celular (controle e *sham*) (Fig. 4).

A avaliação morfométrica demonstrou interação entre grupo e tempo com $p < 0,001$. O grupo T apresentou diferença estatisticamente significativa com os grupos S ($p=0,010$) e C ($p=0,000$) (Fig. 5A). O grupo T apresentou as taxas mais altas após a aplicação das ADSCs no 15º dia (terceira avaliação), começando a decair apenas após a sexta avaliação (30º dia pós-cirúrgico) (Fig. 5B).

Na avaliação do VEGF, houve diferença estatística significativa com $p=0,027$. O grupo T (4,40 [3,00-7,20]) apresentou maior mediana que o grupo S (2,40 [1,20-3,20], $p=0,003$) (Fig. 6).

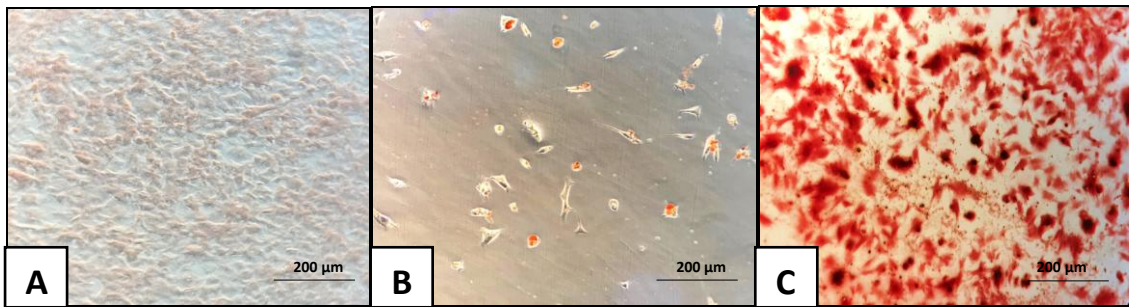


Figura 2. Ensaio de diferenciação *in vitro* das ADSCs utilizadas na cicatrização cutânea de ratos Wistar. Fotomicroscopia das ADSCs no estágio de indiferenciação (A) e submetidas à diferenciação adipogênica (B) e osteogênica (C). No 16º dia, coloração com *Oil Red O*, evidenciando os vacúolos de gordura corados de vermelho na diferenciação adipogênica (B). No 18º dia, coloração com *Alizarin Red O*, demonstrando o depósito de cálcio corado de vermelho na matriz extracelular da diferenciação osteogênica (C) e sem marcação nas ADSCs não diferenciadas do controle (A).

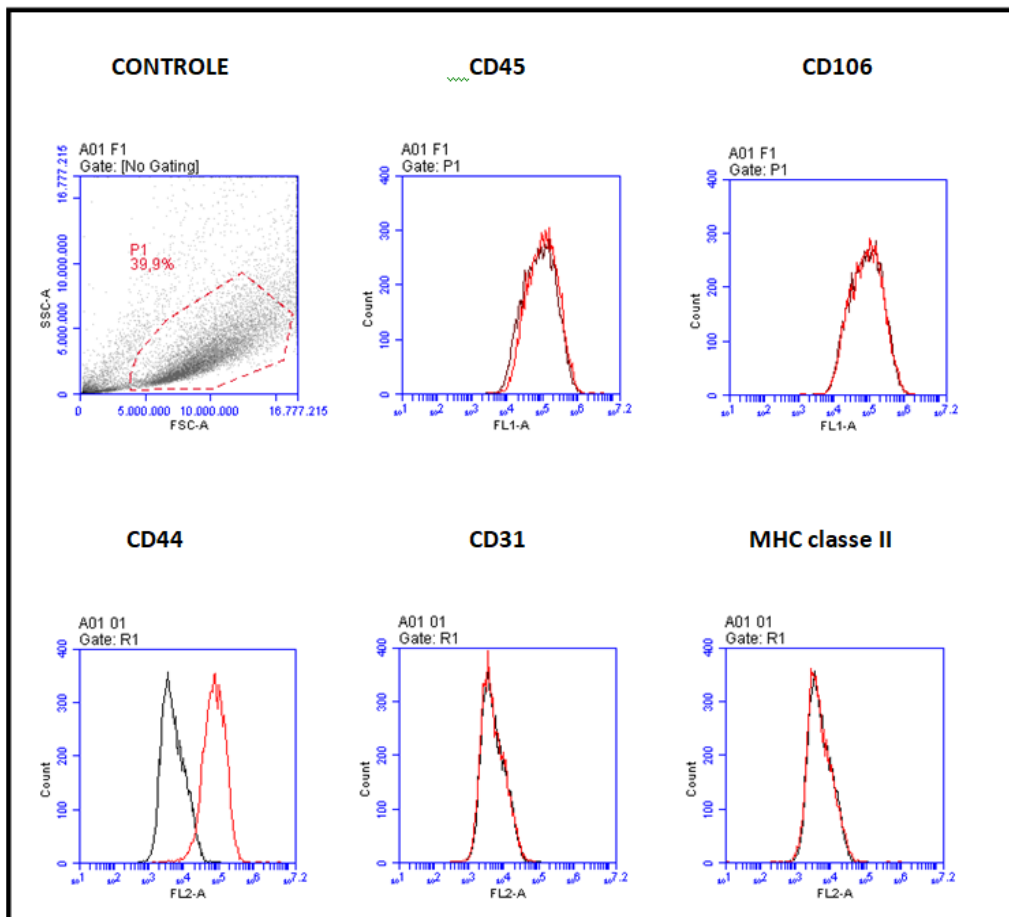


Figura 3. Demonstração gráfica dos marcadores de superfície celular durante ensaio de citometria de fluxo. O gráfico 1 (controle) tem complexidade das células no eixo Y e tamanho no eixo X, mostrando a população de células total e o *gate* estabelecido, a partir do qual foram coletados 10.000 eventos. Os demais gráficos, um para cada anticorpo, mostram o controle negativo, em preto (células não marcadas), e a marcação com cada anticorpo em vermelho. Nota-se que apenas a população marcada com o CD44 teve resultado positivo e, para as demais populações, não houve marcação.



Figura 4. Avaliações clínicas. Aspecto das lesões no dia da indução (d0), aos cinco, 15, 30, 35 e 45 dias de pós-operatório. C = Controle, S = Sham e T = Tratamento.

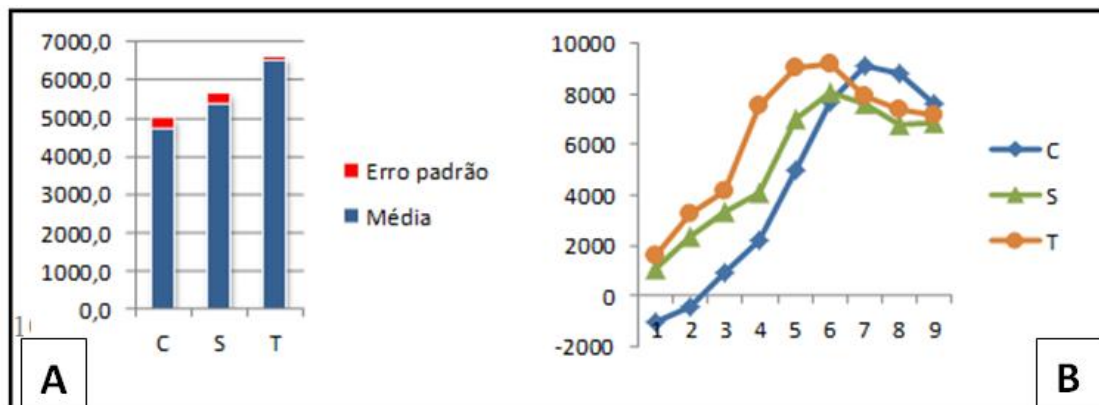


Figura 5. (A) Demonstração gráfica das médias das taxas de cicatrização com o erro padrão em cada grupo. O eixo X representa os grupos, e o eixo Y representa as médias das taxas de cicatrização das feridas. (B) Demonstração gráfica da evolução da taxa de cicatrização média de cada grupo em relação aos dias de avaliações. O eixo X representa as avaliações pós-cirúrgicas, a cada cinco dias, e o eixo Y representa os valores médios das taxas de cicatrização das feridas. C = Controle, S = Sham, T = Tratamento.

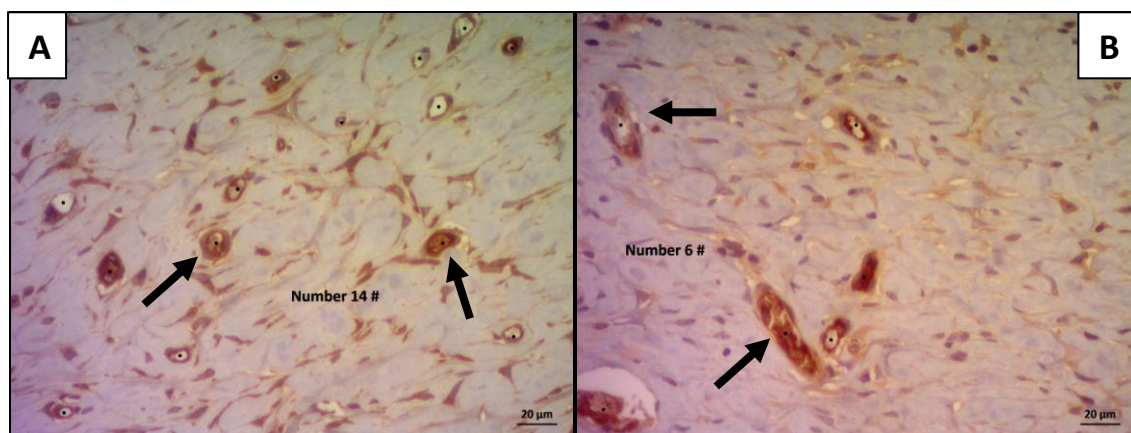


Figura 6. Marcação dos vasos neoformados na derme pelo anticorpo anti-VEGF (→). (A) Derme de um animal do grupo T apresentando 14 vasos neoformados. (B) Derme de um animal do grupo S apresentando seis vasos neoformados. IHQ, Contra coloração: Hematoxilina de Harris, Obj. 40.

DISCUSSÃO

Neste trabalho foram induzidas queimaduras graves pelo congelamento, as quais produziram destruição completa dos elementos regenerativos da pele. As lesões causadas pela criocirurgia cicatrizam por segunda intenção e apresentam uma cicatrização mais lenta quando comparadas a outras feridas limpas (Zimmerman e Crawford, 2012), enquadrando-se ainda na fase de proliferação, mesmo após 15 dias da injúria tecidual, o que pode ser observado clinicamente pelo exuberante tecido de granulação existente próximo a esse dia (Balbino *et al.*, 2005). As ADSCs estimulam o processo de cicatrização de

feridas por meio de diversos fatores de crescimento (efeito parácrino), dentre esses: VEGF, KGF, FGF2, PDGF, HGF, TGF- β , fibronectina e colágeno I95 (Hassan *et al.*, 2014). Os eventos de neovascularização e reepitelização iniciam na fase de proliferação, e essas são as principais razões para o uso das células-tronco mesenquimais nessa fase, com o intuito de melhorar a cicatrização de feridas (Jackson *et al.*, 2012).

O grupo tratado com as ADSCs obteve a maior taxa de cicatrização média ao final do experimento. Quando as ADSCs são aplicadas diretamente na lesão ou na sua periferia, elas se

enxertam ali e se diferenciam em vários tipos de células cutâneas (ceratinócitos, células endoteliais e pericitos), incrementando o processo de cicatrização (Brower *et al.*, 2011). Dessa forma, observa-se um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de cicatrização, além da conformação de uma cicatriz menos evidente (Jackson *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2014).

A análise macroscópica e o acompanhamento da evolução das lesões evidenciaram um resultado clinicamente relevante quanto ao tamanho e ao formato das cicatrizes. O grupo que recebeu as ADSCs apresentou, ao final do estudo, cicatrizes mais estreitas e compridas com as medidas da área final inferiores às cicatrizes dos grupos controle e *sham*, que se mostraram mais largas e evidentes, corroborando outros estudos que demonstraram que a aplicação de MSCs proporciona a formação de cicatrizes cosmeticamente mais aceitáveis (Klinger *et al.*, 2008; Ghieh *et al.*, 2015). Com esses resultados, foi possível inferir que a utilização das ADSCs nas lesões causadas por criocirurgia minimizam a disfunção estética relevante mencionada por Marciani e Trodahl (1975). Isso ocorre porque as células-tronco mesenquimais têm a capacidade de agir no remodelamento e melhorar a qualidade da cicatriz (Uysal *et al.*, 2014).

Outro dado interessante neste estudo foi a detecção das diferenciações osteogênica (no 18º dia) e adipogênica (no 16º dia) em um período inferior ao mencionado na literatura, que geralmente varia de 21 a 30 dias (Deus *et al.*, 2012; Terraciano *et al.*, 2014; Carelli *et al.*, 2018; Jauregui *et al.*, 2018; Kanazawa *et al.*, 2018; Vidor *et al.*, 2018). A imunofenotipagem mostrou que, na quarta passagem, as células eram positivas para o marcador de superfície celular CD44 e negativas para os marcadores CD45, CD31, CD106 e MHC classe II, corroborando o descrito por outros autores (Dominici *et al.*, 2006; Deus *et al.*, 2012; Gebler *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013).

As ADSCs, embora não conhecidas por formar novos vasos sanguíneos na cicatrização normal de feridas, são células-tronco multipotentes capazes de se diferenciar em células endoteliais e promover a angiogênese, facilitando esse processo em feridas mais profundas (Altman *et al.*, 2008). A maior quantidade de neovasos no

grupo tratado ocorreu, possivelmente, por dois mecanismos: pela diferenciação das ADSCs em células endoteliais e pelo aumento da secreção de fatores angiogênicos (VEGF, HGF, PDGF) e angiopoietinas via mecanismo parácrino (Philandrianos *et al.*, 2012).

CONCLUSÕES

A terapia com as ADSCs no 15º dia após a indução da lesão apresentou as maiores taxas de contração cicatricial média das feridas e demonstrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo *sham* quanto à neovascularização, mensurada pela técnica imuno-histoquímica com o anticorpo VEGF. O tratamento com as células-tronco mesenquimais proporcionou uma relevante evolução clínica das feridas, que pode ser constatada, ao final do período de avaliação, por cicatrizes mais estreitas e compridas, com as medidas da área final inferiores às cicatrizes dos grupos controle e *sham*. Isso comprova a eficácia da terapia, ao proporcionar cicatrizes cosmeticamente mais aceitáveis do que aquelas dos grupos não tratados com as ADSCs.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Nance Beyer Nardi, pela realização da citometria de fluxo e pelo auxílio na interpretação dos resultados da imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da Ulbra-Canoas/RS.

REFERÊNCIAS

- ALTMAN, A.M.; MATTHIAS, N.; YAN, Y. *et al.* Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*, v.29, p.1431-42, 2008.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.41, p.27-51, 2005.
- BROWER, J.; BLUMBERG, S.; CARROLL, E. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. *Adv. Skin Wound Care*, v.24, p.524-532, 2011.
- CARELLI, S.; COLLI, M.; VINCI, V. *et al.* Mechanical activation of adipose tissue and derived mesenchymal stem cells: novel anti-inflammatory properties. *Int. J. Mol. Sci.*, v.19, p.1-16, 2018.

- CASTRO, J.L.C.; SILVEIRA, A.M.M.; CASTRO, V.S.P. *et al.* Criocirurgia – revisão de literatura. *Rev. Educ. Cont. Dermatol. Alergol. Vet.*, v.3, p.11-25, 2013.
- DEUS, G.C.; NORMANTON, M.; HAMERSCHLAK, N. *et al.* Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. *Einstein*, v.10, p.296-301, 2012.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy*, v.8, p.315-317, 2006.
- GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol. Med.*, v.18, p.128-134, 2012.
- GHIEH, F.; JURJUS, R.; IBRAHIM, A. *et al.* The use of stem cells in burn wound healing: a review. *BioMed. Res. Int.*, v.2015, p.1-9, 2015.
- HAIK, J.; BROWN, S.; LIRAN, A. *et al.* Deep frostbite: the question of adjuvant treatment. *Isr. Med. Assoc. J.*, v.18, p.56-57, 2016.
- HALLAM, M.J.; CUBISON, T.; DHEANSA, B.; IMRAY, C. *et al.* Managing frostbite. *Br. Med. J.*, v.341, p.58-64, 2010.
- HASSAN, W.U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.*, v.22, p.313-325, 2014.
- HASSI, J.; MÄKINEN, T.M. Frostbite: occurrence, risk factors and consequences. *Int. J. Circumpolar Health*, v.59, p.92-98, 2000.
- IKÄHEIMO, T.M.; HASSI, J. Frostbites in circumpolar areas. *Glob. Health Action*, v.4, p.1-7, 2011.
- JACKSON, W.M.; NESTI, L.J.; TUAN, R.S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Res. Ther.*, v.20, p.1-9, 2012.
- JAUREGUI, C.; YOGANARASIMHA, S.; MADURANTAKAM, P. Mesenchymal stem cells derived from healthy and diseased human gingiva support osteogenesis on electrospun polycaprolactone scaffolds. *Bioengineering*, v.5, p.1-16, 2018.
- KANAZAWA, M.; ATSUTA, I.; AYUKAWA, Y. *et al.* The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. *Int. J. Implant Dent.*, v.4, p.1-11, 2018.
- KLINGER, M.; MARAZZI, M.; VIGO, D.; TORRE, M. Fat injection for cases of severe burn outcomes: a new perspective of scar remodeling and reduction. *Aesthetic Plast. Surg.*, v.32, p.465-469, 2008.
- LUCAS, R.; LARSSON, C.E. O uso da criocirurgia na dermatologia veterinária. *Clín. Vet.*, v.69, p.74-84, 2007.
- MARCIANI, R.D.; TRODAHL, M.J. Postoperative sequelae of cryosurgery. *J. Oral Surg.*, v.33, p.458-461, 1975.
- MAXSON, S.; LOPEZ, E.A.; YOO, D. *et al.* Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl. Med.*, v.1, p.142-149, 2012.
- PESSOA, W.S.; ESTEVÃO, L.R.M.; SIMÕES, R.S. *et al.* Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina var. cebil*) in cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.*, v.27, p. 665-670, 2012.
- PHILANDRIANOS, C.; ANDRAC-MEYER, L.; MORDON, S. *et al.* Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. *Burns*, v.38, p. 820-829, 2012.
- SACHS, C.; LEHNHARDT, M.; DAIGELER, A.; GOERTZ, O. *et al.* The triaging and treatment of cold-induced injuries. *Dtsch. Arztebl. Int.*, v.112, p.741-747, 2015.
- SPRADA, A.G.; ROSA, M.P.; MACHADO, A.K. *et al.* Toxicity and oxidative stress of canine mesenchymal stromal cells from adipose tissue in different culture passages. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.35, Supl.1, p.15-20, 2015.
- TERRACIANO, P.; GARCEZ, T.; AYRES, L. *et al.* Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int.*, v.2014, p.1-8, 2014.
- UYVAL, C.A.; TOBITA, M.; HYAKUSOKU, H.; MIZUNO, H. The effect of bone-marrow-derived stem cells and adipose-derived stem cells on wound contraction and epithelization. *Adv. Wound Care*, v.3, p.405-413, 2014.
- VIDOR, S.B.; TERRACIANO, P.B.; VALENTE, F.S. *et al.* Adipose-derived stem cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. *Res. Vet. Sci.*, v.118, p.336-344, 2018.
- YANG, M.; SHENG, L.; ZHANG, T.R.; LI, Q. Stem Cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: where do we stand? *Biomed Res. Int.*, v.2013, p.1-8, 2013.
- ZIMMERMAN, E.E.; CRAWFORD, P. Cutaneous cryosurgery. *Am. Fam. Physician*, v.86, p.1118-24, 2012.