

**Biomateriais acelulares associados a Células-tronco  
mononucleares autólogas derivadas da medula óssea  
melhoram o processo de cicatrização por efeitos  
parácrinos.**

**DOUTORANDO: Ísio Carvalho de Souza**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza**

Curitiba, 21 de Março de 2023

**ÍSIO CARVALHO DE SOUZA**

**Biomateriais acelulares associados a Células-tronco  
mononucleares autólogas derivadas da medula óssea  
melhoram o processo de cicatrização por efeitos  
parácrinos.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza

Curitiba, 21 de Março de 2022

Dados da Catalogação na Publicação

S729b  
2022 Souza, Ísio Carvalho de  
Biomateriais acelulares associados a célula-tronco mononucleares autólogas derivadas da medula óssea melhoram o processo de cicatrização por efeitos parácrinos / Ísio Carvalho de Souza ; orientador: Luiz César Guarita Souza.– 2022. 89 f. ; il. : 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2022  
Inclui bibliografia

1. Cicatrização de feridas. 2. Células-tronco. 3. Animais de laboratório.  
4. Ciências médicas. I. Guarita-Souza, Luiz César. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDD. 20. ed. – 610

Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Sônia Maria Magalhães da Silva – CRB 9/1191



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Escola de Medicina e Ciências da Vida  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE  
CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos **21 dias do mês de março de 2023 às 19:00**, realizou-se a sessão aberta de Defesa de Tese “: **BIOMATERIAIS ACELULARES ASSOCIADOS A CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES AUTÓLOGAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA MELHORAM O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO POR EFEITOS PARÁCRINOS**” apresentado por **Ísio Carvalho de Souza** para obtenção do título de Doutor; Área de concentração: Pesquisa Médica Translacional.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

| MEMBROS DA BANCA                                    | ASSINATURA |
|-----------------------------------------------------|------------|
| Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza - Presidente     |            |
| Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai (PUCPR)             |            |
| Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha (PUCPR)                 |            |
| Prof. Dr. Marcelo Spegiorin Moreno (UNISALESIANO)   |            |
| Prof. Dr. Orlando Adas Saliba Junior (UNISALESIANO) |            |

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

|                                      |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
| Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza   | Conceito: Aprovado |
| Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai      | Conceito: Aprovado |
| Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha          | Conceito: Aprovado |
| Prof. Dr. Marcelo Spegiorin Moreno   | Conceito: Aprovado |
| Prof. Dr. Orlando Adas Saliba Junior | Conceito: Aprovado |

Parecer Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza  
Presidente da Banca Examinadora

Profa. Dra. Cristina Pellegrino Baena  
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza, por pela tranquilidade, paciência, encorajamento e confiança na produção desta dissertação. Além de tudo, agradeço muito pelos ensinamentos e por sempre estar disponível nos momentos mais difíceis.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que mesmo em tempos difíceis e a distância, conseguiram cumprir seu papel de incentivadores da pesquisa científica e conseguiram transmitir conhecimento. Especialmente: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia de Noronha, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Olandoski, Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai

Ao Prof. Dr. Júlio Cesar Francisco pela dedicação e solicitude na pesquisa, inclusive na redação e aplicação do artigo.

À e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristina Pellegrino Baena por acreditar e oferecer a oportunidade de participar deste projeto.

Ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUCPR, por todos que participaram da realização do experimento em especial a Dra. Aline Takejima

A equipe do Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, por todo o suporte e empenho na realização deste trabalho.

Ao PPGCS e a todos os funcionários do programa de pós-graduação, em especial a Paula Maira Portela do Nascimento e a Vanessa Almeida, pelo carinho e solidariedade.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos meus colegas do DINTER de Araçatuba pelo apoio e companheirismo durante todos estes anos.

Agradeço a Deus e a minha família! Minha esposa, Patrícia que me apoiou e incentivou, aos meus filhos Iasmim, Bianca e Felipe que me deram força e coragem para continuar.

Ao meu irmão, Fausto, que sempre me deu uma palavra de incentivo e inspiração com o seu exemplo.

E finalmente aos meus pais, Maurício e Brígida (*in memoriam*).

**I. C. Souza. Biomateriais acelulares associados a Células-tronco mononucleares autólogas derivadas da medula óssea melhoram o processo de cicatrização por efeitos parácrinos.**

**Banca examinadora:**

Presidente:

**Prof. Dr. Luiz César Guarita Souza**

PUCPR. Escola de Medicina e Escola da Vida PPGCS

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

Membros:

**Prof. Dr. Roberto Hirochi Herai**

PUCPR. Escola de Medicina e Escola da Vida PPGCS

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha**

PUCPR. Escola de Medicina e Escola da Vida PPGCS

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Marcelo Spegiorin Moreno**

Faculdade de Medicina do UNISALESIANO – Araçatuba - SP

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Orlando Adas Saliba Júnior**

Faculdade de Medicina do UNISALESIANO – Araçatuba - SP

Julgamento:\_\_\_\_\_ Assinatura:\_\_\_\_\_

## **FOLHA INFORMATIVA**

Esta tese foi elaborada em formato de artigo, seguindo as normas estabelecidas pela ABNT. Este trabalho experimental foi realizado no ambulatório de Técnica Cirúrgica Experimental da PUC-PR e suas análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Fisiopatologia Experimental da UNESC.

Não há conflito de interesse na realização da tese.

## RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo complexo de reparo que envolve a interação entre diferentes tipos celulares coordenadas entre a sinalização intracelular e extracelular. Estratégias terapêuticas baseadas em células-tronco da medula óssea (CT-MO) e membrana amniótica acelular (MA) tem grande potencial na regeneração tecidual inclusive no tratamento de feridas completas de pele. Assim, este estudo avaliou os efeitos locais da associação das CT-MO e a MA no reparo tecidual em modelo utilizando ratos com lesão incisional completa de retalho cutâneo. No experimento foram utilizados quarenta ratos Wistar. Os animais foram randomizados em quatro grupos: grupo I – controle (C) (n = 10), sem (CT-MO) ou MA (n = 10); grupo II- injetado (CT-MO) (n = 10); grupo III - abrangidos pela MA; grupo IV- injetado (MA+CT-MO) (n = 10). Níveis de citocinas interleucina 1 e interleucina 10, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GRs) e os níveis de atividade carbonil foram medidos por ELISA no 28º dia, e o TGF- $\beta$  foi avaliado por imuno-histoquímica, a expressão de colágeno foi avaliada pela coloração de Picrosirius. Nossos resultados mostraram que a interleucina IL-1 foi maior no grupo controle, e a IL-10 apresentou média maior no grupo tratado com MA + CT-MO quando comparada ao grupo controle. Os grupos com CT-MO e MA apresentaram os menores níveis de expressão de TGF- $\beta$ . A análise de SOD e GRs demonstrou aumento significativo ( $p < 0,001$ ) em favor da combinação CT-MO + MA em relação ao controle e aos grupos célula e membrana. O grupo carbonila mostrou redução de 80% entre o controle e o grupo CT-MO + MA. A fibra colágena tipo I foi predominante em todos os grupos tratados; entretanto, o grupo MA+ CT-MO obteve uma média maior quando comparado ao grupo controle sem atingir significância estatística ( $p = 0.057$ ). Nossos achados sugerem que a associação entre MA + CT-MO age na cicatrização de feridas cutâneas, provavelmente devido ao seu efeito parácrino atribuído à promoção de novo colágeno para reparo tecidual e, com isso, apresenta um potencial terapêutico em feridas completas de pele.

**Palavras-chave:** membrana amniótica acelular humana; modelos animais experimentais; sistema antioxidante; células-tronco; cicatrização ferida; parácrina.

## ABSTRACT

Wound healing is a complex process of repair that involves the interaction between different cell types and involves coordinated interactions between intracellular and extracellular signaling. Bone marrow stem cells (BM-MNCs) based and acellular amniotic membrane (AM) therapeutic strategies with the potential for treatment and regeneration of tissue. We aimed to evaluate the involvement of paracrine effects in tissue repair after flap skin lesion rat model. In the full-thickness flap skin experiment of forty Wistar rats: The animals were randomized into four groups: group I – control (C) (n = 10), with full-thickness lesions on the back, without (BM-MNCs) or AM (n = 10); group II–injected (BM-MNCs) (n = 10); group III – covered by AM; group IV–injected (AM+BM-MNCs) (n = 10). Cytokine levels IL-1, and IL-10 assay kit, superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GRs) and carbonyl activity levels were measured by ELISA 28th day, and TGF- $\beta$  was evaluated by immunohistochemical, the expression collagen was evaluated by Picrosirius staining. Our results showed that the IL-1 interleukin was higher in the control group, and the IL-10 presented a higher mean when compared to the control group. The groups with BM-MNCs and AM showed the lowest expression levels of TGF- $\beta$ . SOD, GRs, and carbonyl activity analysis showed a predominance in groups that received treatment from 80%. The collagen fiber type I was predominant in all groups; however, the AM+BM-MNCs group obtained a higher average when compared to the control group. Our findings suggest that the AM+ BM-MNCs promote skin wound healing probably owing to their paracrine effect attributed to the promotion of new collagen for tissue repair and, therefore, presents a therapeutic potential in complete skin wounds.

**Keywords:** Human acellular amniotic membrane; experimental animal models; Antioxidant system; stem cells; wound healing; paracrine.

## **RESUMO POPULAR**

O processo de cicatrização de feridas na pele parece simples, mas na verdade é bem complexo e envolve diversos tipos celulares e elementos da matriz extracelular com seus sinalizadores como as citocinas e espécies reativas de oxigênio interagindo entre si.. Há um crescente número de pessoas vítimas de queimaduras extensas, portadores de doenças crônicas como diabetes, problemas vasculares induzidos pelo tabaco e pessoas idosas que normalmente portam condições que dificultam a cicatrização de feridas na pele. Elementos como a glicose elevada ou quantidades elevadas de espécies reativas de oxigênio determinam uma atividade inflamatória persistente que interrompem o processo natural da cicatrização gerando uma ferida que não fecha completamente ou fecha mas com um aspecto muito diferente do tecido original. Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando biomateriais capazes de modular os fatores inflamatórios e os componentes do sistema gerador de espécies reativas de oxigênio. Realizamos um estudo experimental utilizando células-tronco derivadas da medula óssea associadas a membrana amniótica humana acelular em feridas em ratos e investigamos seus efeitos locais sobre os principais indicadores inflamatórios e estresse oxidativo. Os efeitos são sabidamente positivos sobre a cicatrização quando utilizados isoladamente, mas há poucos estudos com seu uso combinado e o mecanismo exato dos seus efeitos sobre a cicatrização ainda não são totalmente compreendidos. Um ponto a ser ressaltado é a origem dos biomateriais empregados: a membrana amniótica é obtida de material de descarte e as células-tronco são retiradas do próprio indivíduo.

Pudemos concluir que essa combinação de biomateriais promove efeitos locais de atenuação dos marcadores pró inflamatórios e do sistema gerador de espécies reativas de oxigênio, gerando uma produção de colágeno de melhor qualidade e, conseqüentemente, uma cicatriz de melhor qualidade.

Este trabalho contribui no entendimento dos efeitos locais das células-tronco e membrana amniótica no processo de cicatrização e cria uma alternativa custo-eficiente para tratamento de feridas na pele.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|       |                                                                                               |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| CEP   | Comitê de Ética em Pesquisa                                                                   |
| CEUA  | Comitê de Ética para o Uso de Animais                                                         |
| COBEA | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal                                                   |
| CT    | Células-tronco                                                                                |
| CTM   | Células-tronco mononucleares                                                                  |
| CT-MO | Células-tronco da medula óssea                                                                |
| CTMA  | Células-tronco amnióticas mesenquimais                                                        |
| CTPi  | Células-tronco pluripotentes induzidas                                                        |
| DNTP  | Dinitrofenilhidrazina                                                                         |
| EGF   | Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>Epidermal Growth Fator</i> )                    |
| ELISA | Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme Linked Imunosonosorbent Assay</i> )               |
| EO    | Estresse oxidativo                                                                            |
| ERO   | Espécies reativas de oxigênio                                                                 |
| FGF   | Fator de crescimento fibroblástico (do inglês <i>Fibroblast Growth Fator</i> )                |
| GSH   | Glutathiona peroxidase (do inglês <i>Glutathione Peroxidase</i> )                             |
| GSr   | Glutathiona redutase                                                                          |
| HE    | Hematoxilina-eosina                                                                           |
| IL-1  | Interleucina 1                                                                                |
| IL-10 | Interleucina 10                                                                               |
| LPS   | Lipopolissacarídeo                                                                            |
| MA    | Membrana amniótica                                                                            |
| MAD   | Membrana amniótica descelularizada                                                            |
| MEC   | Matriz extracelular                                                                           |
| MMPs  | Metaloproteinases                                                                             |
| MSC   | Células-tronco mononucleares mesenquimais                                                     |
| OPT   | <i>o-ftaldialdeído</i>                                                                        |
| PBS   | Tampão fosfato salino                                                                         |
| PDGF  | Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i> ) |
| PGE-2 | Prostaglandina-E2                                                                             |
| PUCPR | Pontifícia Universidade Católica do Paraná                                                    |
| ROS   | Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i> )                     |

|              |                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| SDS          | Duodecil sulfato de sódio                                                          |
| SOD          | Superóxido dismutase                                                               |
| TGF- $\beta$ | Fator de crescimento transformador beta                                            |
| UFSC         | Universidade Federal de Santa Catarina                                             |
| UNESC        | Universidade do Extremo Sul Catarinense                                            |
| VEGF         | Fator de crescimento vascular (do inglês <i>Vascular Endotelial Growth Fator</i> ) |

## **LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 - Modelo de pele de rato e humana

FIGURA 2 - Características e vantagens da membrana amniótica como substituto adequado da pele

39

## SUMÁRIO

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                     | 11 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA.....                           | 16 |
| 2.1 Pele.....                                          | 16 |
| 2.2 Feridas de Pele .....                              | 18 |
| 2.3 Cicatrização.....                                  | 20 |
| 2.3.1 Fase da Hemostasia .....                         | 22 |
| 2.3.2 Fase Inflamatória.....                           | 24 |
| 2.3.3 Fase Proliferativa.....                          | 27 |
| 2.3.4 Fase Remodelação.....                            | 30 |
| 2.4 Engenharia de Tecidos .....                        | 33 |
| 2.5 Membrana Amniótica.....                            | 34 |
| 2.5.1 Anatomia .....                                   | 35 |
| 2.5.2 Propriedades Biológicas.....                     | 37 |
| 2.6 As Células-Tronco na Cicatrização de Feridas ..... | 39 |
| 2.6.1 Classificação das Células Tronco.....            | 39 |
| 2.6.2 Propriedades Biológicas.....                     | 42 |
| 2.7 Estresse Oxidativo.....                            | 45 |
| 2.7.1 O Estresse Oxidativo na Ferida Cutânea.....      | 47 |
| 3 JUSTIFICATIVA.....                                   | 49 |
| 4 OBJETIVOS.....                                       | 50 |
| 4.1 Objetivos Gerais.....                              | 50 |
| 4.2 Objetivos Específicos.....                         | 50 |
| 5. Artigo .....                                        | 51 |
| 1. Introduction .....                                  | 52 |
| 2. Materials and Methods .....                         | 53 |
| 3. Results .....                                       | 56 |
| 4. Discussion .....                                    | 61 |
| 5 References .....                                     | 64 |
| 6 CONCLUSÃO .....                                      | 67 |
| REFERÊNCIAS .....                                      | 68 |
| ANEXOS .....                                           | 85 |

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem como funções básicas impedir a perda excessiva de líquidos, proteger dos efeitos de agentes externos, regular a temperatura corpórea, sintetizar vitamina D com a exposição aos raios solares e agir como órgão dos sentidos.<sup>1</sup> Como é a primeira barreira de proteção do organismo está mais exposta aos danos físicos.<sup>2</sup>

No Brasil e no mundo as feridas constituem um grave problema, devido ao grande número de pessoas com alterações na integridade da pele, embora sejam falhos os registros desses atendimentos o que dificulta determinar com exatidão sua exata prevalência.<sup>3</sup> A venda de insumos para o tratamento de feridas em todo o mundo atingiu 18,5 bilhões de dólares em 2017, evidenciando a magnitude do problema. Com o aumento da prevalência de diabetes, envelhecimento da população mundial, surgimento de programas para tratamento de feridas e crescente número de acidentes de trânsito com lesões em decorrência dos traumas em todo o mundo, fatores que alimentam o mercado de cuidados com a pele e feridas, a previsão é que esses valores superem os 25 bilhões de dólares em 2025<sup>4</sup>.

A reparação de feridas é um dos processos biológicos mais complexos que ocorre durante a vida humana. Após uma lesão, várias vias biológicas são imediatamente ativadas e sincronizadas para responder aos danos<sup>5</sup>. A cascata de acontecimentos desencadeados por uma ferida na pele é muito similar aqueles observados por outros eventos importantes no corpo, tais como um infarto agudo do miocárdio ou uma lesão na medula espinhal. Pela sua acessibilidade, a pele consiste em um dos melhores modelos para o estudo dos mecanismos de reparo aos danos teciduais. Assim, o estudo da cicatrização e regeneração da pele pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias em medicina regenerativa para diversos tecidos, como o intestino, o pulmão e o fígado<sup>5,6</sup>. A maioria das feridas da pele podem curar naturalmente através de processos dinâmicos e interativos, que envolvem fatores solúveis (ex: citocinas,

quimocinas), elementos sanguíneos, componentes da matriz extracelular (MEC) e células<sup>7</sup>. No entanto para danos extensos, muitas vezes, são necessárias estratégias de cobertura imediata da pele usando substitutos ou matrizes para orientar a reparação e a regeneração<sup>8</sup>.

A cicatrização de feridas é um processo multicelular que envolve fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, bem como células inflamatórias. O processo de cicatrização segue um conjunto ordenado de eventos composto por quatro fases distintas, porém sobrepostas: hemostasia, a fase inflamatória, a fase de proliferação e a fase de remodelação. As fases da cicatrização de feridas são reguladas por meio da interação entre diferentes grupos de moléculas, incluindo a MEC, integrinas, fatores de crescimento e metaloproteinases (MMPs). A migração de células na MEC e sua remodelação por MMPs compõe parte fundamental no reparo de feridas<sup>9</sup>.

A busca por estratégias clínicas que possam melhorar os mecanismos naturais de reparação do corpo precisará ser baseada em uma compreensão completa da biologia básica da reparação e regeneração<sup>5,10</sup>.

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando novas estratégias terapêuticas para lesões extensas de pele com objetivo de melhorar a qualidade do produto da cicatrização e diminuir o tempo de tratamento<sup>11,12</sup>. O objetivo final de tais pesquisas muitas vezes é entender como os animais ainda em formação produzem uma regeneração tecidual, ou seja, o tecido produzido, é exatamente o mesmo que o tecido original. Sabe-se que o processo de reparação de feridas na pele de fetos com menos de 22 semanas de gestação é perfeito, ou seja, forma-se um tecido completamente saudável, com todas as suas características específicas, sem a formação de cicatrizes e tecido fibrótico. Embora os mecanismos que viabilizam esse processo perfeito de regeneração ainda não sejam completamente conhecidos, acredita-se que fatores múltiplos estejam envolvidos, como uma reação inflamatória diminuída, diferenças na

composição e arquitetura da matriz extracelular, e uma menor carga mecânica sobre a pele fetal<sup>13</sup>.

Inicialmente creditou-se à regeneração perfeita das feridas dos fetos à totipotência celular, motivando o estudo e utilização das células-tronco (CT) no tratamento de feridas agudas ou crônicas. Essa estratégia resulta em uma aceleração no processo cicatricial, decorrente do impacto benéfico que as CT trazem para todas as fases da cicatrização.<sup>14</sup>

Dessa forma, diversos experimentos têm sido desenvolvidos, utilizando estas células onde observam um aumento na migração epitelial, na angiogênese e na taxa de cicatrização, além da formação de uma cicatriz menos evidente.<sup>15,16</sup> Estas CT tem seus efeitos imunomodulatórios durante a cicatrização de feridas tanto agudas como crônicas, com característica de interação ao ambiente da ferida e modular sua atividade liberando múltiplos fatores, que facilita, o processo de cicatrização de feridas com atividade inflamatória reduzida, atenuação da fibrose, moderação no dano oxidativo, diferenciação em células essenciais em todas as fases do processo de cicatrização, como: queratinócitos, células endoteliais e pericitos e fibroblastos<sup>17,18</sup>.

Os dados recentes sugerem que a contribuição da diferenciação da CT é limitada devido a dificuldades do enxerto, o que pode comprometer a sobrevivência das células tronco no local da ferida e, conseqüentemente, a sua contribuição para o processo de cicatrização<sup>19</sup>. As vias usuais de aplicação das células-tronco na cicatrização de feridas são a intravenosa e a local, sendo essa última a mais indicada. Os métodos de aplicação local de células-tronco incluem: injeção ao redor da ferida, spray tópico de fibrina e a incorporação em um material que permaneça aderido à ferida à semelhança de um curativo<sup>11,19,20</sup>. Nesse último caso, o emprego de biomateriais apropriados tem surgido como uma alternativa viável para ampliar os efeitos de multipotência como fonte progenitora de células assim como seus efeitos imunomodulatórios e pró angiogenese<sup>21-23</sup>.

Um dos biomateriais mais populares, a membrana amniótica, é a camada mais interna da placenta fetal e apresenta características importantes que favorecem o seu emprego no processo de aplicação local das células tronco, tais como promoção da reepitelização, propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, inibição da fibrose, formação de cicatriz, resistência mecânica e baixo custo<sup>24</sup>. Alguns resultados evidenciam que o uso da membrana amniótica no recobrimento das feridas promove efeitos positivos na qualidade e velocidade de cicatrização e que o uso dessa membrana como suporte para a aplicação das células tronco apresenta resultados satisfatórios<sup>25-27</sup>.

A membrana amniótica tem sido utilizada e pesquisada como biomaterial de forma a preencher o papel MEC, derivadas de tecidos humanos ou animais, como pericárdio, peritônio, derme descelularizada, submucosa intestinal e a membrana amniótica acelular, sendo que algumas formas já comercializadas e utilizadas na clínica.<sup>25,28-30</sup>

A descelularização tecidual tem se tornando uma técnica comum para obter membrana amniótica descelularizada (MAD)<sup>31</sup>. A lógica para a descelularização está relacionada a minimizar uma possível reação imunológica e/ou inflamatória induzida pelos elementos celulares do tecido transplantado. Portanto, a MAD é geralmente obtida por métodos químicos, enzimáticos e/ou descelularizações físicas, desenvolvidos para eliminar as células e seus resíduos, principalmente DNA.<sup>23</sup> Esses procedimentos produzem materiais descelularizados formados pelos múltiplos componentes da MEC, que são mantidos semelhantes ao tecido original, em composição e arquitetura<sup>32</sup>.

A MAD pode ser carregada com drogas, elementos metálicos e/ou combinação de dois ou mais tipos distintos de materiais, inclusive as células-tronco, com características complementares, de forma a criar materiais mais adequados para a cicatrização de feridas, ou simplesmente ser utilizada como cobertura da área afetada.<sup>29</sup>

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do uso combinado entre as células tronco da medula óssea a membrana amniótica humana sobre os principais marcadores celulares de sinalização parácrina em feridas totais de ratos Wistars, na fase tardia do processo de cicatrização.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem diversas funções como proteger os tecidos internos contra danos mecânicos, infecções microbianas, radiação ultravioleta e temperaturas extremas, manter temperatura corporal estável, equilíbrio hídrico e a produção de vitamina D.<sup>33</sup> Essa defesa também corresponde a uma barreira imunológica sofisticada que protege contra infecções patogênicas e ao mesmo tempo que apoia microrganismos comensais por meio de um eixo hospedeiro-microbiota bem adaptado<sup>34</sup>.

A pele é composta pela epiderme e derme sendo que a epiderme é constituída predominantemente por dois tipos celulares: queratinócitos e células dendríticas. Os queratinócitos predominam e diferem das células dendríticas por possuírem pontes intercelulares e ampla quantidade de citoplasma corável. Além destas há ainda outros tipos celulares como os melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme comumente é dividida em quatro camadas de acordo com a morfologia e posição dos queratinócitos. À medida que se diferenciam a partir das camadas mais profundas em direção as camadas mais superficiais, incluindo a camada de células basais (estrato germinativo), a camada de células escamosas (estrato espinhoso), a camada de células granulares (estrato granuloso), e a camada de células cornificadas ou córneas (estrato córneo). A epiderme encontra-se em constante renovação da epiderme externa, é um tecido dinâmico em movimento não sincronizado em direção à superfície da pele<sup>35</sup>.

A junção derme-epiderme é formada por uma zona de membrana basal capaz de permitir o trânsito de células e fluidos, os queratinócitos basais são os componentes mais importantes e os fibroblastos dérmicos em menor extensão.<sup>35</sup> A lâmina basal é uma camada sintetizada pelas células basais da epiderme, consistindo principalmente de colágeno tipo IV, bem como fibrilas de ancoragem e microfibrilas dérmicas. Isso inclui uma zona elétron-lúcida conhecida como

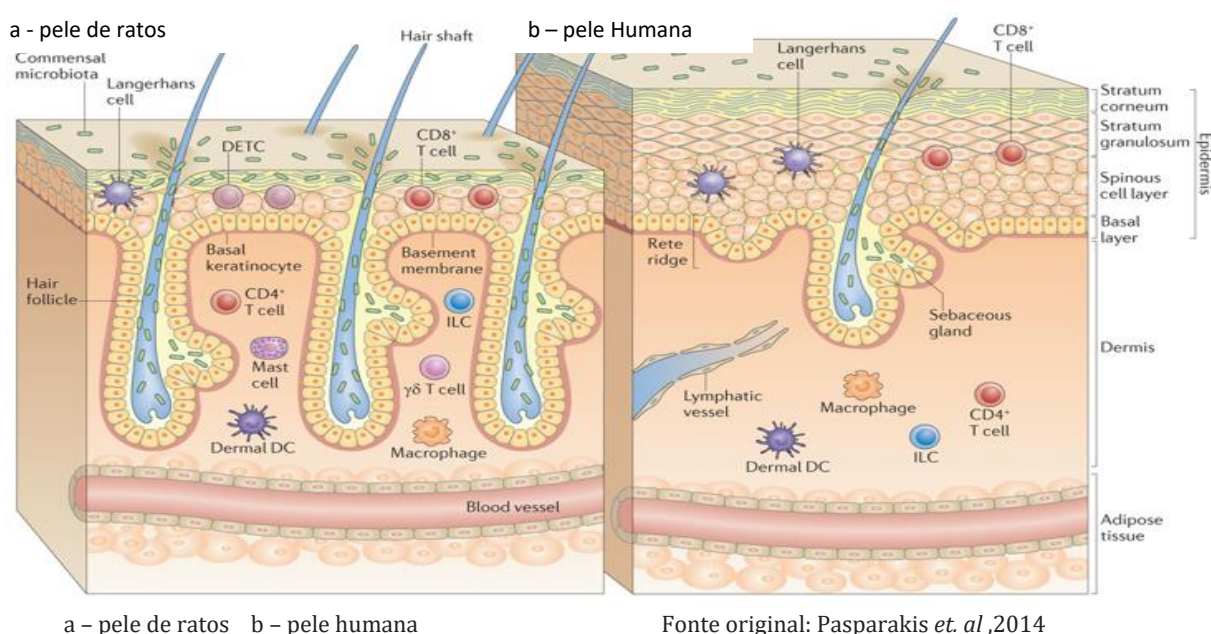
lâmina lúcida, bem como lâmina densa, as membranas plasmáticas das células basais são fixadas a lamina basal por hemidesmossomos que dão força de tração ou cisalhamento através do epitélio.<sup>35,36</sup> Esta junção age como suporte para a epiderme, estabelece a polaridade celular e o sentido de crescimento, direciona a organização do citoesqueleto nas células basais, fornece sinais de desenvolvimento, funcionando ainda como uma barreira semipermeável entre as camadas<sup>37</sup>.

Os *anexos* cutâneos são um agrupamento de apêndices derivados da ectoderme, incluindo glândulas écrinas e apócrinas, dutos e unidades pilossebáceas que se originam como crescimento descendente da epiderme<sup>38</sup>. Em resposta a possíveis lesões as estruturas anexiais são capazes de reepitelização por meio da migração de queratinócitos do epitélio anexial para a superfície da epiderme, áreas como a face e o couro cabeludo que contêm uma grande quantidade de unidades pilossebáceas, a reepitelização ocorre mais rapidamente após a lesões nessas áreas e menos em regiões com menos estruturas anexiais, como as costas<sup>38</sup>.

A derme é um sistema integrado de tecido conjuntivo fibroso, filamentosos e amorfo que acomoda nervos o sistema vascular local, apêndices derivados da epiderme, fibroblastos, macrófagos e mastócitos, outras células levadas pelo sangue como linfócitos e leucócitos que também podem entrar na derme em resposta a diversos estímulos. Estas características conferem à derme sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Confere ainda a proteção contra lesões mecânicas, controle hídrico, ajuda na regulação térmica e comporta os receptores de estímulos sensoriais. As duas regiões, derme e epiderme, colaboram durante o desenvolvimento na morfogênese da junção dermoepidérmica, apêndices epidérmicos e interagem na reparação e remodelação da pele à medida que as feridas são curadas. Os componentes da matriz, incluem colágeno e tecido conjuntivo elástico, também variam de maneira dependente da profundidade<sup>38</sup>.

Existem diferenças específicas da espécie nas populações de células imunes que colonizam o epitélio na epiderme e folículos pilosos (Figura 1). Em contraste com os camundongos, os humanos têm uma proporção maior de epiderme interfolicular em relação ao epitélio do folículo piloso. Além disso, as células T dendríticas epidérmicas que expressam o receptor de células T  $\gamma\delta$  ( $\gamma\delta\text{TCR}^+$ ) estão presentes na pele de camundongos, mas estão ausentes na pele humana. É importante levar em conta essas diferenças ao interpretar os fenótipos inflamatórios da pele observados em modelos de camundongos em relação aos mecanismos que impulsionam a patogênese das doenças inflamatórias da pele humana<sup>203</sup>.

**Figura 1 – Modelo de pele de rato e humana**



## 2.2 Feridas de Pele

Ferida de pele pode ser definida quando há uma ruptura da integridade das estruturas anatômicas da pele com dano funcional,<sup>39</sup> pode ser de natureza diversa como queimadura, secundária a procedimentos cirúrgicos, limitação da circulação sanguínea, doenças crônicas como diabetes melito e o próprio envelhecimento.<sup>25</sup>

Podem ser classificadas como ferida de espessura parcial (derme incompleta) ou espessura total (derme completa ou estendida ao tecido celular subcutâneo). No primeiro caso pode originar-se de procedimentos dermatológicos dermoabrasão, peelings químicos ou pequenos traumas superficiais e/ou queimaduras, normalmente a reparação ocorre a reepitelização dos anexos ou epitélio derivado da pele não acometida e o resultado é uma cicatriz imperceptível. Já no segundo caso, feridas completas, dependendo da profundidade e extensão, haverá a formação de um novo tecido, o tecido de granulação e a reepitelização ocorrerá apenas nas margens da ferida, e neste caso a cicatriz será bem evidente e, às vezes, pronunciada.<sup>40</sup>

As feridas podem ser tratadas de três maneiras (Figura 2), as depender das características destas lesões como profundidade, extensão e a presença ou não de infecção, cicatrização por: primeira, segunda e terceira intenção.<sup>40</sup> Na primeira intenção a cicatrização que ocorre nos ferimentos em que os bordos são unidos cirurgicamente logo após a lesão ou até algumas horas depois (idealmente, menos de 6 horas). Nesse modelo, as fases inflamatória, proliferativa e de maturação ficam abreviadas, havendo menor deposição de tecido fibrótico e melhor resultado estético final. Na segunda intenção as bordas da ferida não são aproximadas (normalmente há grandes perdas de substância ou ausência de condições locais - má circulação, deficiências nutricionais, radioterapia, infecção). Ocorre um prolongamento das fases de cicatrização, principalmente da inflamação e da fibroplasia, com formação de tecido cicatricial de má qualidade e grande hipertrofia. A contração da lesão pelos miofibroblastos tem grande importância no fechamento dessas lesões<sup>41</sup> e na cicatrização por terceira intenção a ferida na qual a sutura dos bordos (primeira intenção) é postergada por alguns dias com o intuito de melhorar as condições locais. As lesões são frequentemente contaminadas, que, nesse intervalo, se beneficiam tanto dos cuidados médicos (curativos e antibióticos) como da infiltração de polimorfonucleares no local, reduzindo assim as chances de complicações.<sup>41</sup>

No tratamento das feridas de pele os objetivos primários são o fechamento rápido com proteção a entrada de agentes nocivos, com uma cicatriz funcional e esteticamente próximo a original. Portanto para atingir tais objetivos, diversos materiais e técnicas, como antibioticoterapia, desbridamento cirúrgico, utilização de pressão negativa, curativos para feridas, oxigenoterapia hiperbárica, materiais simulando pele modificados por bioengenharia e fatores de crescimento, têm sido utilizados na tentativa de regeneração tissular, porém com sucesso limitado, o que ilustra a complexidade da cicatrização de feridas. Enxertos de pele de fontes alogênicas ou autólogas, retalhos de tecido e substitutos de pele também podem ser úteis no tratamento de feridas mais extensas ou crônicas.<sup>42,43</sup>

Nas lesões de pele mais extensas e/ou profundas a utilização de autoenxertos são considerados como o padrão ouro, mas há limitações como a morbididade do doador, baixa disponibilidade e as baixas taxas de sucesso do enxerto tornam explícitas a necessidade de novas estratégias alternativas.<sup>44,45</sup> A engenharia de tecidos humanos é um campo em expansão com pesquisas interdisciplinares com o objetivo de reproduzir as propriedades biológicas da matriz extracelular (MEC) e com isso avançar na obtenção de materiais mais eficientes no processo de tratamento de feridas com maior acessibilidade.<sup>45,46</sup>

A importância do MEC no processo de reparo tecidual está bem descrita e o desenvolvimento de materiais biomiméticos e bioinspirados da MEC tem passado por grande crescimento.<sup>47,48</sup> Mesmo com o avanço tecnológico dos materiais e dos avanços no desenvolvimento de novos polímeros, não reproduzem perfeitamente o MEC e todas suas bioatividades. Portanto o desafio é encontrar novos biomateriais e provavelmente combiná-los com diferentes tipos celulares, elementos de matriz e formas de associação.<sup>25,49,50</sup>

## **2.3 Cicatrização**

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico e regulado por mecanismos celulares, humorais e moleculares que começa imediatamente após o dano tecidual e pode se estender por anos.<sup>33</sup> A partir da ruptura da estrutura anatômica normal e perda consecutiva de sua função inicia-se um processo de reparo tecidual que segue dois caminhos, o primeiro seria a regeneração tecidual com a substituição específica do tecido, ou seja, surge um novo tecido idêntico ao tecido original, tanto estrutural como funcionalmente falando, e o segundo caminho seria a cicatrização, uma forma de reparo onde o tecido final não apresenta as mesmas características anatômicas e funcionais do tecido original constituindo um processo de reparação imperfeito.<sup>51,52</sup>

O processo de cicatrização de feridas cutâneas é frequentemente descrito como uma orquestra ou como os atos de um drama,<sup>52</sup> com a interação entre células, fatores de crescimento e citocinas que culmina em fechamento da ferida mesmo que uma das células e/ou mediadores não estejam presentes, pois um elemento age compensando outros que por ventura estejam ausentes.<sup>53</sup> Este complexo sistema de reparo de feridas pode ser classificado em quatro fases principais sobrepostas: hemostasia (minutos), inflamação (minutos-horas), proliferação (dias-semanas) e remodelação (semanas-meses-anos).<sup>54</sup>

Na primeira fase da ferida o reparo ocorre imediatamente após o dano ao tecido e começa com a formação de um tampão de plaquetas, seguido pela consolidação de uma matriz de fibrina que se torna o suporte para as células infiltrantes.<sup>55</sup> Recrutamentos de neutrófilos e monócitos, seguidos por monócitos que se diferenciam em Macrófagos com o fenótipo M1 durante os primeiros 2-3 dias de lesão.

Estes agentes inflamatórios e as vias imunológicas são fundamentais para remover resíduos celulares e tecidos desvitalizados e evitar infecções. Após 3 dias a seguir da lesão, ocorre uma mudança de um perfil inflamatório para um processo de resolução, caracterizada por uma redução no recrutamento de neutrófilos e mudança do fenótipo macrófágico M1 para

M2 com uma menor quantidade de citocinas pró-inflamatórias.<sup>55,56</sup> A fase proliferativa período de uma a três semanas após a lesão, e envolve principalmente a migração e proliferação de diferentes tipos de células. A angiogênese é importante neste momento, definida como o crescimento de novos vasos, envolvendo a ação de células endoteliais.<sup>41</sup> Ao mesmo tempo, fibroblastos substituem a matriz de fibrina por tecido de granulação composto por colágeno tipo III, elastina, proteoglicanos e ácido hialurônico (HA), que formam um andaime provisório para o sangue dos vasos que forneçam nutrição e oxigênio ao tecido.<sup>57</sup> O terceiro estágio do reparo da ferida, remodelamento, começa dentro duas a três semanas de lesão e pode durar anos, dependendo das características da ferida. Nesta fase, os vasos se formaram e o tecido de granulação não é mais necessário sendo removido por processo de apoptose. Devido à ação das metaloproteinases da matriz secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I altamente estruturado.<sup>57</sup>

O sistema imunológico, a matriz extracelular e as células-tronco mesenquimais, orquestram o tecido nos processos de reparo e regeneração dependendo da capacidade regenerativa de cada tecido. Considerando isso, se a lesão ocorre em um tecido ou órgão altamente regenerativo (por exemplo, epitélio, fígado, intestino), uma regeneração completa de componentes celulares danificados será alcançada por meio da diferenciação e proliferação de células-tronco residentes.<sup>58</sup> Dependendo das características da lesão, uma regeneração completa também ocorreria em tecidos com capacidade regenerativa intermediária (por exemplo, pele, ossos, cartilagem, tendões e músculo). Em contraste, se a lesão ocorreu em um tecido com reduzida capacidade regenerativa, como o coração ou sistema nervoso central, os tecidos serão reparados, mas não regenerados, deixando uma cicatriz e uma área da ferida.<sup>55,58</sup>

### **2.3.1 Fase da Hemostasia**

Assim que a lesão ocorre há uma imediata cascata de eventos iniciando com a contração dos pequenos vasos, concentração de plaquetas e formação de coágulo de sangue minimizando o sangramento, essa vasoconstrição dura entre 5 e 10 minutos, seguida de vasodilatação que permite a chegada de células ao espaço extravascular.<sup>59</sup> As plaquetas são os principais elementos celulares nesta etapa, ativadas quando entram em contato com a matriz vascular subendotelial.<sup>54</sup> Os receptores das plaquetas (ex.: glicoproteína VI) interagem com proteínas da ECM (ex.: fibronectina, colágeno e fator von Willebrand), levando a adesão à parede dos vasos sanguíneos. Posteriormente, a trombina desencadeia a ativação plaquetária, induzindo uma alteração conformacional e liberação de grânulos alfa e densos contendo moléculas bioativas como citocinas e fatores pró e anti-inflamatórios que reforçam a coagulação.<sup>60</sup> Um coágulo insolúvel de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondina,<sup>61</sup> servindo principalmente para tapar a ferida e prevenir sangramento e este também cumpre uma série de funções secundárias, incluindo a proteção contra a invasão bacteriana, formação de um andaime para células imunes de entrada e abrigando um reservatório de citocinas e fatores de crescimento para orientar o comportamento das células feridas no reparo precoce.<sup>60,61</sup>

Embora as plaquetas reconhecidamente tenham um papel central na contenção do sangramento, evidências experimentais e clínicas crescentes identificam essas células enucleadas como moduladores relevantes de outros processos fisiopatológicos, incluindo inflamação e regeneração de tecidos.<sup>62,63</sup> Para isso, há a liberação de fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ),<sup>64</sup> citocinas (ex:IL-1) e moduladores da matriz extracelular com importante papel na revascularização do tecido danificado por meio da indução da migração, proliferação, diferenciação e estabilização das células endoteliais promovendo a neoangiogênese, restauração do tecido conjuntivo danificado por meio da migração, proliferação e ativação de fibroblastos com a proliferação e diferenciação

de células-tronco mesenquimais em tipos de células específicas de tecido, além disso produzem peptídeos de ação inibitória bacteriana.<sup>63,65</sup>

### **2.3.2 Fase Inflamatória**

Na fase inflamatória (0 a 3 dias), após a vasoconstrição e múltiplas ações plaquetárias os leucócitos representados principalmente pelos neutrófilos e macrófagos assumem o papel de protagonismo inflamatório coordenando inclusive a restauração tecidual.<sup>66</sup> Os neutrófilos tentam eliminar invasores patogênicos penetrando no tecido lesado fagocitando microrganismos e produzindo enzimas que auxiliam monócitos a fagocitar os restos necróticos do local.<sup>66</sup>

Os fibroblastos são atraídos pelos monócitos para a área afetada da ferida, dando início a síntese de colágeno e estes monócitos se diferenciam em macrófagos quando ingressam na ferida, fagocitando tecidos e fragmentos necróticos. Ao se diferenciarem em macrófagos, produzem e liberam proteases desbridantes responsáveis pela retirada de coágulos de fibrina e colágeno, restos e fragmentos de células mortas.<sup>67</sup>

A inflamação inata representa uma defesa primária contra a invasão patogênica de feridas, inicia-se assim que o tecido é lesado com a quebra da integridade das barreiras anatômicas da epiderme e derme. Padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) liberados por células necróticas e tecido danificado, e padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) de componentes bacterianos. Esses PAMPs e DAMPs ativam células imunes residentes, como mastócitos, células Langerhans, células T e macrófagos, ligando receptores de reconhecimento de padrões para obter vias inflamatórias.<sup>68</sup> A liberação de citocinas pró-inflamatórias atraem novos leucócitos circulantes para o local da lesão.<sup>69</sup> Moléculas pró-inflamatórias promovem a vasodilatação, que, juntamente com a expressão de moléculas de adesão celular endotelial, como selectinas, facilita a adesão neutrofílica e

monocítica e a diapedese.<sup>70</sup> De fato, a importância das seleções no recrutamento de células imunes tem sido claramente demonstrada, com o bloqueio genético e farmacológico<sup>71</sup> das selectinas P e E, prejudicando a infiltração de células imunes e a cicatrização de feridas.<sup>72</sup>

Os neutrófilos chegam precocemente na ferida, são recrutados por citocinas como a IL-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e endotoxinas bacterianas como lipopolissacárides (LPS).<sup>73</sup> Em resposta aos sinais pró-inflamatórios, e ativação de vias de sinalização inflamatória (por exemplo, NF- $\kappa$ B),<sup>21</sup> neutrófilos (e outras células feridas) liberam suas próprias citocinas. Os neutrófilos removem tecido necrosado e patógenos através da fagocitose e a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), peptídeos antimicrobianos, eicosanoides e enzimas proteolíticas.<sup>73</sup> Eles também prendem e matam patógenos em uma rede de DNA revestido por peptídeos antimicrobianos e algumas histonas citotóxicas, denominadas armadilhas extracelulares.<sup>24</sup>

A resposta inflamatória é bem complexa e dela participam fatores intrínsecos e extrínsecos, porém quando descontrolada e/ou excessiva determina lesão tecidual ou retarda a cicatrização como ocorre em diabéticos, entretanto quando ocorre recrutamento insuficiente de células imunes, por exemplo, em camundongos com TLR3 ausente, dificulta o reparo da lesão.<sup>74,75</sup> Portanto a resposta das células imunes no processo de cicatrização é situacional e assim que os agentes patogênicos são eliminados, a maioria dos neutrófilos sofrem processo de apoptose, necrose ou fagocitose ou podem deixar o tecido inflamado e sofrem uma migração reversa através do endotélio, como observado nos Zebrafish,<sup>76</sup> camundongos e em neutrófilos do ser humano *in vitro*.<sup>77</sup>

Os macrófagos se diferenciam a partir dos monócitos, sendo recrutados praticamente a o mesmo tempo que os neutrófilos.<sup>78</sup> Os macrófagos têm efeito mestre na reparação tecidual com alta versatilidade e plasticidade, atinam o pico de infiltração em 72 horas após lesões em camundongos e 7 dias no ser humano.<sup>79</sup> Assim como os neutrófilos tem seu papel na limpeza e

proteção do leito da ferida mas também apresentam mudanças de comportamento e morfológicas em resposta a citocinas,<sup>79</sup> e além disso, os macrófagos liberam o TGF- $\beta$  iniciando um ciclo de feedback positivo como TGF- $\beta$  estimula ainda mais macrófagos para segregar citocinas adicionais como EGF, PDGF, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interleucina (IL)-1 $\beta$ .<sup>80</sup>

Os macrófagos classicamente são divididos em duas classes principais: estimulados por M1 e estimulados por M2, porém esta classificação dicotômica tornou-se ultrapassada quando se trata de macrófagos humanos<sup>81</sup> e murinos<sup>82</sup> por mostrarem respostas transcricionais e fenotípicas a diferentes estímulos.<sup>83</sup> Desta forma, a atividade dos macrófagos é regida pelo estado tecidual e sinais ambientais. Para simplificar referindo-se a grupos classicamente ativados (pró-inflamatórios/M1) e, alternativamente, ativados (anti-inflamatórios/M2).<sup>81-83</sup>

Macrófagos ativados classicamente são induzidos por estímulos pró-inflamatórios, como LPS e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), e promovem inflamação liberando espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular, VEGF e PDGF). Esses macrófagos também fagocitam neutrófilos apoptóticos, substituindo-os como o principal mediador inflamatório.<sup>84</sup> Com o avanço da inflamação há uma transição para ativação alternativa, que ocorre através da neo-diferenciação de monócitos recém-recrutados, ou através da troca de macrófagos existentes *in situ* para um fenótipo anti-inflamatório. Embora não tenha sido descrito de forma clara, este interruptor fenotípico pode ser estimulado por mudanças ambientais nas citocinas<sup>85</sup> e eferocitose.<sup>86</sup> Além disso, pode ser impulsionado por miRNAs, fatores de transcrição, e modulação de receptores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.<sup>87,88</sup>

Macrófagos ativados como (M2) expressam citocinas pró-resolutórias (IL-4, IL-10, IL-13)<sup>65</sup> e arginase, um fator-chave para o reparo efetivo da ferida.<sup>89</sup> Macrófagos anti-inflamatórios também liberam uma série de fatores de crescimento para promover a reepitelialização,

fibroplasia<sup>84</sup> e angiogênese.<sup>85</sup> Mais recentemente, os macrófagos têm se mostrado cruciais na estabilização e remodelação dos vasos sanguíneos em camundongos e peixes.<sup>90</sup>

A importância dos macrófagos é reafirmada em estudos ablação seletiva, onde a exclusão específica do *Cd11b* de macrófagos causa atraso no reparo da ferida e ao aumento da inflamação.<sup>91</sup> Da mesma forma, o knockdown induzido de macrófagos durante a cura precoce causou reepitelização retardada, angiogênese e formação de tecido de granulação, enquanto o knockdown de macrófagos no meio da cicatrização levou a danos celulares endoteliais, hemorragia grave e granulação imatura<sup>92</sup>.

O predomínio da presença de macrófagos e neutrófilos pode mascarar a importância de outras células mieloides no processo de reparo de feridas. Entretanto, estudos recentes revelaram que as células T residentes cumprem papel crítico na resposta inflamatória precoce na lesão, são recrutadas para resolver inflamação.<sup>50,93</sup> De fato, camundongos mais velhos e diabéticos mostram redução nas células T epidérmicas dendríticas residentes e uma cicatrização retardada, enquanto a administração subcutânea de células T epidérmicas dendríticas é capaz de restaurar a cicatrização.<sup>93,94</sup> Além disso, a remoção de células T anti-inflamatórias regulatórias retarda a reparação de tecidos em camundongos.<sup>50,93</sup> Os mastócitos também desempenham um papel nas feridas, liberando histamina para ajudar o recrutamento de neutrófilos durante a inflamação precoce.<sup>95</sup>

### 2.3.3 Fase Proliferativa

A fase da proliferação (ou fibroplásica ou de reparo entre 3 a 14 dias), dentro do processo de cicatrização, tem como característica a ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, e células endoteliais para harmonizar o fechamento da ferida, deposição de elementos do MEC e angiogênese. Logo após 12 horas do início da lesão os queratinócitos são ativados por modificações na tensão mecânica e gradiente elétricos, e exposição a peróxido de

hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), patógenos, fatores de crescimento e citocinas.<sup>96</sup> Essa ativação do queratinócito na borda da ferida faz com que sejam submetidos à transição epitélio-mesenquimal parcial, quando desenvolvem um fenótipo mais invasivo e migratório.<sup>97</sup> A fisiológica polaridade de baixo para cima agora muda de direção tornando-se lateralmente através da ferida para ampliar sua capacidade de cobertura e reepitelizar a superfície.<sup>96</sup> Os queratinócitos na nova epiderme liberam metaloproteínas matriciais (MMPs) para auxiliar seu caminho na migração e ao mesmo tempo em que cria novas proteínas no MEC para reconstituir a membrana basal<sup>98</sup>.

O grupo das metaloproteinases é formado por cerca de 25 proteínas divididas em: collagenases (MMPs 1, 8 e 13), gelatinases (MMPs 2 e 9), estromelisinases (MMPs 3, 7 e 10), matrilisinas (MMPs 7 e 26), MMPs tipo membrana (MMPs 14, 15, 16, 17 e 24) e outras MMPs, que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo com a sua estrutura.<sup>9</sup> A MMP-8 é uma collagenase intersticial que é secretada pelos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos da ferida e quando expressa de forma aumentada em feridas crônicas torna-se prejudicial para a reparação, causando a degradação do colágeno tipo 1.<sup>9</sup> As MMPs degradam os colágenos tipos 1, 2, 3, 10 e 13 e as fibras de colágeno não funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida<sup>59</sup>.

As células-tronco (CT) do folículo piloso são recrutadas e estimuladas a atender a demanda celular necessária no processo de reparo. Essas CT migram a partir dos apêndices danificados em feridas rasas ou chegam até a borda em feridas de espessura total<sup>99</sup>.

Os queratinócitos se comunicam por meio de detritos e tecidos necrosados do leito da ferida com as proteínas estruturais da matriz preliminar através de receptores de integrin, as MMPs, principalmente a MMP-1 e MMP-9, são vitais na migração dos queratinócitos por auxiliarem na dissociação do receptor integrin.<sup>98</sup> No momento que os queratinócitos de bordas

opostas se encontram, a migração termina (através de um mecanismo indeterminado), uma fina camada epitelial é estabelecida e os queratinócitos formam novas aderências à matriz subjacente. Os queratinócitos então reconstituem totalmente a membrana basal e passam por diferenciação terminal, para estratificar e regenerar a epiderme<sup>100</sup>.

Os fibroblastos são as células responsáveis pela substituição da matriz provisória rica em fibrinas por um tecido de granulação mais organizado, tornam-se predominante entre o 7º ao 14º. Os fibroblastos residentes e derivados mesenquimais respondem a um meio de moléculas de sinalização de plaquetas, células endoteliais e macrófagos, incluindo fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento de fibroblasto (PDGF). Estes sinais direcionam os fibroblastos para se tornarem pró-fibrosos, estabelecendo proteínas ECM, ou diferenciar-se em miofibroblastos que orientam a contração da ferida.<sup>61</sup> Na verdade, os fibroblastos têm uma diversidade funcional, auxiliando o reparo dérmico de diferentes formas, se originam de duas linhagens distintas, onde a linhagem superior auxilia a re-epitelialização, enquanto a linhagem inferior contribui para a deposição do ECM. Descobertas recentes têm desafiado ainda mais a compreensão convencional da origem do fibroblasto da ferida, mostrando que dois terços dos fibroblastos de tecido de granulação são na verdade derivados de mielóides,<sup>101</sup> e são, portanto, propensos a se originar de macrófagos de feridas. Os fibroblastos degradam a matriz provisória produzindo MMPs e a substituem por um tecido de granulação rico em fibronectina, colágenos (Tipo I) imaturos e proteoglicanos. Este tecido de granulação atua como um andaime para a migração e diferenciação das células feridas, apoiando tanto a formação de novos vasos sanguíneos quanto a deposição de ECM maduro<sup>101</sup>.

Novos vasos sanguíneos são criados durante o processo de angiogênese para atender às demandas metabólicas do tecido em proliferação. A angiogênese é estimulada pela hipóxia, que por sua vez impulsiona a expressão de fatores indutores de hipóxia e ciclooxygenase 2, e posterior liberação de VEGF e outros fatores. Em resposta a essas mudanças, as células

endoteliais microvasculares proliferam e migram para o leito da ferida, gerando novos vasos que se unem a outros para desenvolver redes estáveis e tubulares<sup>102</sup>.

Em resumo com aumento do número de fibroblastos ativados para produção de colágeno no local, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais denso e elástico. Esse processo é denominado de fibroplasia e sua eficiência é dependente da formação concomitante da neoangiogenese, ou seja, da neovascularização.<sup>103,104</sup> Os fibroblastos são os principais componentes do tecido de granulação e, após influência dos fatores de crescimento, são ativados e migram das bordas para o centro da ferida<sup>104,105</sup> e passam a exibir propriedades contráteis devido à expressão de alfa actina músculo liso ( $\alpha$ -AML) se transformam em miofibroblastos com um papel pivotal na contração e fechamento da ferida<sup>106</sup>.

Os macrófagos têm um papel importante na angiogênese, influenciando no comportamento das células endoteliais produzem proteases como MMPs para degradar a densa rede fibrina e fatores quimioatrativos (por exemplo, TNF- $\alpha$ , VEGF e TGF- $\beta$ ) para conduzir a migração endotelial. Os macrófagos também participam da remodelação da nova vasculatura, orientando sua disposição anatômica e amortecendo a resposta angiogênica para evitar vascularização excessiva<sup>102</sup>.

#### **2.3.4 Fase Remodelação**

A fase de remodelação (14 dias a > 1ano) é a fase final de remodelamento correspondendo ao final da cicatrização e tentativa de reestabelecimento da estrutura original do tecido lesado com a formação de uma cicatriz madura, rica em colágeno tipo I.<sup>99</sup> Neste momento há um remodelamento do colágeno em busca do equilíbrio na formação e catabolismo, e a substituição do colágeno tipo III, típico da cicatriz imatura em fase precoce, pelo colágeno tipo I, muito mais resistente e predominante na cicatriz madura.<sup>105,107,108</sup> Os fibroblastos são os principais tipos de células responsáveis pela remodelação do MEC da ferida,

substituindo o coágulo de fibrina inicial por ácido hialurônico, fibronectina e proteoglicanos formando fibras maduras.<sup>109</sup> Os proteoglicanos auxiliam da construção de fibrilas de colágeno madura, transversais e atuam no canal para migração celular<sup>110</sup>.

A pele adulta saudável é composta de aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 10% de colágeno tipo III. Em contrapartida, o tecido de granulação compreende predominantemente o colágeno imaturo como ocorre no embrião, colágeno tipo III (aproximadamente 30%), com apenas 10% de colágeno tipo I.<sup>111</sup> À medida que o processo de reparo prossegue, o colágeno tipo III é substituído pelo colágeno tipo I, engrandecendo a resistência à tração da cicatriz formando.<sup>112</sup> A integridade e arquitetura da cicatriz ECM nunca retorna totalmente à pele afetada. Fibrilas de colágeno na derme cicatrizam na forma de grandes feixes paralelos, enquanto as fibrilas da pele sadia adotam uma mais eficiente como a tecelagem de uma cesta. Assim, o tecido da cicatriz da ferida confere apenas até 80% da força original.<sup>111,113</sup>

Esse importante processo é coordenado pelas metaloproteinases (MMPs) produzidas pelos macrófagos, fibroblastos e queratinócitos<sup>59</sup>.

As MMPs degradam os colágenos tipos 1, 2, 3, 10 e 13 e as fibras de colágeno não funcionais presentes na ferida. A deposição de colágeno está diretamente relacionada à resistência à tração exercida pela ferida. Na fase de remodelação as quantidades de fibronectina e ácido hialurônico da MEC são reduzidos e a quantidade de proteoglicanos aumentam<sup>59</sup>.

A elastina, outro componente da MEC chave, deve refazer as fibras elásticas para recuperar a elasticidade da pele. Entretanto, a degradação da matriz dérmica normal causa a liberação de fragmentos de elastina, ou elastocinas, que agem como moléculas de sinalização.<sup>114</sup> A elastina é formada a partir de seu precursor, tropoelastina, e no início da cura mostra o arranjo aberrante. Na verdade, as fibras maduras de elastina são muitas vezes apenas aparentes no tecido cicatricial muitos meses após a lesão<sup>115,116</sup>.

A expressão elevada de TGF- $\beta$  e tensão mecânica estimulam a diferenciação de miofibroblasto *in vivo* e *in vitro*.<sup>116</sup> Os miofibroblastos são caracterizados por uma expressão abundante de actina muscular alfa-lisa ( $\alpha$ -SMA), associada à capacidade de gerar fortes forças contratuais e aderências focais.<sup>117</sup> De forma menos esperada, os camundongos sem a codificação genética  $\alpha$ -SMA, *Acta2*, cicatrizam suas feridas normalmente sem nenhuma mudança óbvia na contração do fibroblasto.<sup>115</sup> Essa aparente redundância, com compensação por outros microfilamentos, destaca a importância da contração da ferida. Os miofibroblastos se unem através de desmosomos, ligando-se às fibrilas matriciais e desenhando a matriz em conjunto por um processo chamado contratura.<sup>58,59,118,119</sup> A resposta de cura da ferida diminui quando macrófagos, células endoteliais e fibroblastos são submetidos à apoptose ou saem do local da lesão, deixando uma cicatriz<sup>120</sup>.

O TGF- $\beta$ , na verdade, está envolvido em uma série de processos na cicatrização de feridas: inflamação, angiogênese estimulante, proliferação de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno e remodelamento da nova matriz extracelular.<sup>204</sup> Com suas isoformas (TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 3) o TGF-  $\beta$  tem sido estudado em cicatrizes hipertróficas, Rorison *et al* mostraram que os níveis plasmáticos de TGF- $\beta$  talvez um indicador preditivo em crianças que desenvolvem cicatrizes hipertróficas após uma queimadura. Eles mostraram que as crianças cujas queimaduras cicatrizaram bem e sem cicatrizes hipertróficas mostraram elevação do TGF- $\beta$  no plasma por duas semanas após a queimadura. No entanto, aqueles que desenvolveram cicatrizes hipertróficas não demonstraram esse aumento precoce nos níveis de TGF- $\beta$ .<sup>205</sup> Vários grupos vêm estudando a manipulação do TGF- $\beta$  na prevenção de cicatrizes normais e hipertróficas. Os anticorpos neutralizantes do TGF- $\beta$  demonstraram inibir a fibrose em vários modelos animais, no entanto, a redução acentuada na sinalização do TGF- $\beta$  tem sido associada a feridas crônicas ou não cicatrizantes<sup>206</sup>.

## 2.4 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de Tecidos (ET) é um campo interdisciplinar que envolve a engenharia de processos, ciência de materiais, biologia, química, física e medicina, que concentra suas ações no desenvolvimento de análogos de tecidos destinados a apoiar as respostas celulares na regeneração de tecidos e órgãos perdidos ou danificados. ET engloba células, andaimes ou suportes além de fatores de crescimento ou biomoléculas para induzir o crescimento do tecido. A ideia básica por trás da ET é a produção de uma nova estrutura de tecido funcional sem andaime ou baseada em andaime, que pode ser na forma de construções de engenharia de tecido.<sup>27</sup>

Os materiais utilizados na ET são obtidos pela colonização de um arcabouço com células, que devem ser capazes de proliferar, diferenciar e replicar. O andaime serve de plataforma para a semeadura celular e deve permitir a infiltração celular para o desenvolvimento de um tecido funcional. Portanto, as células requerem o desenvolvimento de um arcabouço biocompatível de tecido humano nativo, material sintético ou uma combinação dos dois que imita a matriz extracelular.<sup>27</sup> O andaime ideal deve ser biodegradável, o que significa que uma vez transplantado ou inserido no ambiente do tecido lesado, deve se degradar de forma não tóxica, sendo substituído por componentes do local lesado assim que a regeneração do tecido for concluída e as funções fisiológicas normais forem restauradas.<sup>121,122</sup>

No processo de regeneração tecidual os componentes que vão exercer o papel de suporte devem ter como propriedade facilitar a adesão celular, migração, diferenciação, proliferação e apoptose celular, mas além disso, as forças mecânicas têm papel importante na secreção da MEC, por exemplo foi demonstrado que aplicação de forças mecânicas, incluindo pressão hidrostática em culturas de condrócitos resulta em mais secreção de MEC em comparação a cultura estática.<sup>123</sup>

## 2.5 Membrana Amniótica

O processo de reparação tecidual é muito complexo e envolve diferentes tipos celulares, fatores inflamatórios, citocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio entre outros elementos, portanto parece lógico pensar que para se obter um reparo tecidual rápido e eficiente serão necessários mais de um elemento no tratamento de feridas, surge, então, a engenharia tecidual (ET) que por definição visa induzir crescimento tecidual combinando células, suportes celulares ou andaimes, fatores de crescimento e biomoléculas.<sup>124,125</sup> Este suporte celular deve ser capaz de integrar os tecidos e ser facilmente colonizado com células e ser capaz de aderir, proliferar, sobreviver, diferenciar e replicar a função celular e/ou tecidual. Esse andaime requer ainda ser facilmente produzido, ser biodegradável e biocompatível e ter propriedades mecânicas adequadas ao local anatômico de implantação, podendo ser permeável ou poroso.<sup>126</sup> A área de engenharia de tecidos é multidisciplinar e se baseia em especialistas da medicina clínica, engenharia mecânica, ciência dos materiais, genética e disciplinas relacionadas tanto da engenharia quanto das ciências da saúde.<sup>125,126</sup>

A membrana amniótica tem sido estudada isoladamente ou em combinação em diversas áreas como cirurgia oral, óssea, pele, entre outras áreas nos últimos anos.<sup>125-131</sup> Sua ampla gama de propriedades como a capacidade em promover reepitelização produzindo fatores de crescimento, efeitos anti-inflamatórios pela produção local de citocina (IL-10), antitrombóticos, antimutagênico e antiangiogênicos, além de suas propriedades físicas, como fina espessura, suavidades e transparência também contam a seu favor.<sup>132</sup>

Recentemente tem sido utilizada na reparação de queimaduras oculares térmicas ou químicas, Síndrome de Stevens-Johnson e cirurgia de pterígio, além de ser estudada, como curativo biológico, em diversos outros campos como úlceras diabéticas, úlceras venosas, reconstrução da cavidade oral e bexiga, timpanoplastia, artroplastia e na prevenção de adesão

tecidual em cirurgias de cabeça e pescoço, abdome, pelve, vagina e laringe.<sup>133-136</sup> A MA derivado da placenta é um resíduo cirúrgico podendo ser descartado após cirurgia eletiva de cesariana, portanto, é um tecido biológico altamente abundante, disponível e de baixo custo sem muitos questionamentos éticos.<sup>27</sup>

### 2.5.1 Anatomia

A placenta humana tem papel fundamental no desenvolvimento e sobrevivência do feto, atuando como proteção física e biológica, é composta por duas membranas fetais: uma membrana coriônica externa e uma membrana amniótica interna ou âmnio. A MA ou âmnio composta por uma membrana basal e a camada mesenquimal, tem uma estrutura resistente, lisa, translúcida, brilhante e fina com uma espessura de 0,02 a 0,05 mm, os nutrientes e oxigênio são fornecidos pelo fluido coriônico circundante, fluido amniótico e vasos da superfície fetal através de mecanismos de difusão.<sup>137,138</sup> Pode ser dividida em três camadas microscopicamente distintas: monocamada epitelial que é separada da camada mesenquimal ou do estroma por uma membrana basal.<sup>139,140</sup>

A camada epitelial monocelular amniótica humana geralmente tem formato colunar ou cuboidal e expressam marcadores de células-tronco (CT) mantendo a pluripotência do epiblasto indiferenciado com a capacidade se diferenciar nas três camadas germinativas.<sup>139,141</sup> As células epiteliais são fortemente aderidas a membrana basal e secretam colágenos tipo III e IV, bem como glicoproteínas (laminina e fibronectina) que formam a membrana basal. Essa é a mais grossa membrana basal encontrada no ser humano e fornece suporte ao feto.<sup>140</sup>

A terceira camada é o estroma, é uma camada mesenquimal rica em colágeno com três componentes principais: uma camada densa e acelular composta por colágeno tipo I, colágeno tipo III e fibronectina., uma camada fibroblástica onde podem ser observadas células mesenquimais semelhantes aos fibroblastos e a camada mais externa chamada de camada

esponjosa pela alta quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas que projetam um aspecto esponjoso na histologia.<sup>142</sup> Esta camada esponjosa é composta por fibras de colágeno fracamente arranjadas e separa o mesoderma amniótico e coriônico. Os tipos de colágeno I, III, V e VI, secretados pelo células-tronco são as principais proteínas do MEC na camada de estroma.<sup>143</sup> Essas células atendem aos critérios mínimos para caracterizar como células-tronco,<sup>143</sup> com divergência sobre sua pluripotência:<sup>67</sup> essas células não possuem marcadores associados à pluripotência, como TRA-1-60 e TRA-1-81,<sup>88</sup> enquanto os marcadores de pluripotência SSEA-3 e SSEA-4 foram relatados como positivos.<sup>144</sup>

Na maioria dos tecidos animais adultos, o principal componente em volume não são as células, mas a estrutura tridimensional (3D) secretada por elas conhecida como matriz extracelular. Proteínas estruturais como colágeno e proteoglicanos são alguns dos componentes macromoleculares da MEC, que interagem nesta rede com múltiplas funções essenciais como: integridade estrutural, suporte mecânico, reservatório e local para troca ativa de íons, nutrientes, água e metabólitos.<sup>145</sup>

A placenta é geralmente obtida de pacientes gestantes saudáveis submetidas a cesariana eletiva após consentimento informado esclarecido, assim que ocorre o parto é colocada em meio de transporte estéril para evitar secagem, processada em meio asséptico para se obter a membrana amniótica, sendo lavada e facilmente separada do córion. Armazenamento por longa data é estimulado pelas agências regulatórias de muito países para se evitar possível período de janela de infecções.<sup>146</sup> A criopreservação é o método mais utilizado e mais eficiente em comparação, por exemplo, a liofilização.<sup>147</sup> Entretanto, a criopreservação limita e impacta negativamente na viabilidade celular da membrana amniótica, além de necessitar temperatura - 80 graus celsius e dificultar seu transporte.<sup>67</sup>

Algumas técnicas enzimáticas, químicas ou mecânicas foram desenvolvidas para desnudar membrana amniótica.<sup>146</sup> De fato, a âmnio descelularizado promove uma melhor

proliferação e diferenciação celular, melhor integridade estrutural e crescimento celular mais uniforme em comparação com o formato intacto.<sup>148,149</sup> Além disso, o propósito seria remover os principais componentes celulares imunogênicos, antígenos associados à membrana e proteínas solúveis, reduzindo assim uma possível resposta imune mediada e rejeição. A descelularização resulta em uma diminuição significativa da espessura da membrana amniótica sem reduzir sua força de tração final, extensibilidade ou elasticidade.<sup>148</sup>

## 2.5.2 Propriedades Biológicas

A MA provou ser um suporte excelente para a engenharia de tecidos com sua capacidade de permitir o transporte de água e à presença de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epitelial, tem características vantajosas:

- Efeitos anti-inflamatórios devido à produção de fatores como ácido hialurônico;
- Supressão de citocinas pró-inflamatórias;
- Propriedades antibacterianas devido a moléculas tais como  $\beta$ -defesas e elafin;<sup>150</sup>
- Propriedades antifibróticas devido à regulação negativa de TGF- $\beta$  e sua expressão de receptor;<sup>150</sup>
- Baixa antigenicidade;<sup>150</sup>
- Propriedades imunomoduladoras em decorrência do fator secretado pelas células epiteliais, que inibe a migração de macrófagos e células natural killer para prevenir um ataque imune materno.<sup>151</sup>

Até o momento, dois tipos de células podem ser isolados na MA: as células epiteliais amnióticas e as células-tronco mesenquimais amnióticas (CTMA) derivadas do epitélio e da camada estromal.<sup>150</sup>

A MA possui atividades metabólicas, como transporte de água e de materiais solúveis, produção de fatores bioativos como peptídeos vasoativos, fatores de crescimento e citocinas.

Além de diminuir a contração da cicatriz em sua fase de maturação, tornando a área final com características macroscópicas mais semelhantes à da pele local.<sup>152</sup> Portanto, características ativas na reepitelização, manutenção da viabilidade celular e componentes da MEC reunidas compõe um modelo de biomaterial testado, com resultados positivos no processo de reparo tecidual.<sup>153</sup>

A MEC serve como o ambiente onde as células residentes se conectam, comunicam e interagem, regulando assim a dinâmica e seu comportamento celular, contribuindo para a manutenção dos fenótipos e funções celulares específicas de cada tecido, portanto exercem um papel central para as células-tronco no processo de diferenciação, homeostase e regeneração tecidual.<sup>154</sup>

Matrizes ou andaimes teciduais fornecem uma estrutura de colágeno para remodelação de tecidos, enquanto a remoção de células viáveis, no processo de descelularização, visa minimizar ou prevenir a resposta inflamatória ou imunogênica.<sup>23</sup> O excelente efeito das matrizes descelularizada se deve a duas características principais: primeiro, a manutenção da estrutura 3D, fornecendo suporte, resistência a tração e locais de fixação para receptores de superfície e segundo, a disponibilidade de componentes bioativos que modulam a angiogênese, migração celular e orientação das feridas.<sup>155</sup> Apesar dessas muitas vantagens, as desvantagens do MA incluem propriedades mecânicas precárias e uma alta taxa de biodegradabilidade, que complicam seu uso extensivo na clínica.<sup>156</sup>

**FIGURA 2 - Características e vantagens da membrana amniótica como substituto adequado da pele**



Fonte: Adaptado de Farhadhosseinabadiet al.<sup>156</sup>

## 2.6 As Células-Tronco na Cicatrização de Feridas

A utilização das células-tronco no tratamento de feridas tem sido amplamente utilizada devido as suas características de geração de diversas linhagens celulares, autorrenovação, efeitos imunomodulatórios e controle do estresse oxidativo. Além disso, apresenta baixa imunogenicidade, características que as elegem como adequadas para sua utilização no auto-enxerto. Representam uma esperança no tratamento de lesões de pele e diversas outras doenças.<sup>157,158</sup>

### 2.6.1 Classificação das Células Tronco

As CT podem ser classificadas quanto à sua origem e plasticidade celular, quando falamos em origem podem ser subdivididas. Existem três principais fontes de células-tronco, ou seja, tecidos embrionários (CTE), tecidos adultos ou somáticas e células somáticas

diferenciadas após serem geneticamente reprogramadas, que são conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (CPTi). As fontes mais comuns para utilização são o sangue do cordão umbilical, medula óssea, sangue periférico e tecido adiposo.<sup>64,158</sup> Embora o potencial terapêutico de CTE e CPTi seja enorme devido ao seu potencial proliferativo e pluripotencialidade, ainda existem algumas limitações ao seu uso prático devido à regulação celular da formação de teratoma, considerações éticas, preocupações imunológicas em relação às CTE e dificuldades com manipulação genética com respeito às iPSCs. Em contraste, as células-tronco adultas pós-natais são, por sua natureza, imunocompatíveis e não há preocupações éticas relacionadas ao seu uso. No entanto, nem todas as células-tronco adultas pós-natais podem ser úteis para a engenharia de tecidos porque o número de células que podem ser obtidas é limitado.<sup>123</sup>

As células-tronco adultas ou somáticas desenvolvem-se a partir do ectoderma (células epidérmicas, neurônios, células pigmentares), mesoderma (células músculo cardíaco, músculo estriado, músculo liso, tubulares do rim, sanguíneas, tecido adiposo), endoderma (células pancreáticas, das tireoides, pulmões) e células germinativas.<sup>159</sup>

Quanto à plasticidade podemos classificar como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As CT totipotentes são células que têm capacidade de se diferenciar em todos os tecidos do organismo humano, inclusive os gametas (óvulo e espermatozóide) e os anexos embrionários. As CT pluripotentes podem se diferenciar em todos os tecidos e células dos três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma) menos gametas e os anexos embrionários, sendo essas as células-tronco embrionárias. As CT multipotentes apresentam uma capacidade de se diferenciar mais limitada, se diferenciando em alguns tipos celulares.<sup>64,158,160</sup>

As células da medula óssea são pluripotentes e podem sofrer dois processos de diferenciação: as células mononucleares, que são indiferenciadas, e as multinucleares. A partir

das células mononucleares, a linhagem hematopoiética originará as células do sangue (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, células vermelhas e plaquetas) e a mesenquimal, que poderá originar células musculares, hepatócitos, osteócitos, tecido adiposo, condrócitos e estroma.<sup>161</sup>

Estudos têm apontado que as células-tronco adultas estão também presentes no próprio tecido, representando um reservatório de células de reparação, podendo serem mobilizadas e diferenciadas em resposta a sinais de doenças, contribuindo, portanto, para o processo de reparo ou regeneração de diversos tecidos, como a pele.<sup>158,162-164</sup>

Podemos encontrar CT presentes nas camadas mais profundas da pele, a hipoderme, onde ocorre o amadurecimento com posterior migração em direção as camadas mais superficiais dando origem as células da epiderme e anexos cutâneos.<sup>165</sup>

A localização das células-tronco na pele, segundo Alonso, é na camada basal da epiderme, uma membrana rica em matriz extra-celular e fatores de crescimento. Periodicamente estas células interrompem seu ciclo, se diferenciam em células terminais e migram para a superfície. Este mecanismo cria uma barreira que se perpetua e protege o organismo contra a invasão de microorganismos e a perda de líquidos essenciais ao corpo.<sup>166</sup>

Verstappen et al.<sup>167</sup> referiram que há duas populações de células-tronco na epiderme. A primeira estaria na camada basal, distribuída entre unidades proliferativas epidermais, que compõem a epiderme e a segunda população estaria localizada na região do bulbo dos folículos pilosos. Alonso e Fuchs<sup>166</sup> relataram que, geralmente, a proliferação e diferenciação de células-tronco adultas epidermais podem reparar pequenas lesões de pele, entretanto, o baixo número destas células, não permite o reparo de lesões maiores, podendo acarretar na formação de cicatrizes.

## 2.6.2 Propriedades Biológicas

A manutenção da integridade da pele ocorre por ação das células-tronco epidermais. Pequenos reparos podem ser realizados pelas CT do bulbo. No caso de danos mais extensos as células-tronco da medula óssea são recrutadas, porém é necessário um tempo maior para que consigam chegar ao sítio da ferida, esse tempo pode ser reduzido com o emprego da terapia celular que isola muitas células de sítios doadores, são cultivadas se necessário, e devolvidas ao paciente.<sup>167</sup>

As células-tronco trazem benefícios significativos no reparo de feridas cutâneas, acelerando a cicatrização e reepitelização, melhora a qualidade e resistência do resultado final, recuperam as feridas crônicas. As principais fontes de CT são a medula óssea e o tecido adiposo. Outras fontes têm sido estudadas, como os folículos pilosos.<sup>168</sup>

Existem diversas possibilidades pelas quais as CT auxiliam a cicatrização, mas duas são importantes: por sinalização parácrina e por diferenciação. A primeira mostra que elas têm a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Ao migrarem para a ferida, são ativadas ao entrarem em contato com o meio de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das CT poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no microambiente da ferida e secretar fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a plasticidade e habilidade que essas células possuem para se diferenciarem em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos. Portanto, as CT facilitariam a cicatrização de feridas pela diferenciação em múltiplas células que residem na pele (queratinócitos, pericitos e células endoteliais).<sup>169-171</sup> Contudo, a parcela de contribuição de cada um desses mecanismos de atuação das CT ainda não é totalmente conhecida, sendo ainda elemento de pesquisa.<sup>172</sup>

A células-tronco apresentam um bom desempenho no processo de cicatrização em feridas crônicas ou agudas e em todas as fases do processo de cicatrização (hemostática,

inflamatória, proliferativa e remodelamento),<sup>14,67</sup> agindo no aumento da migração epitelial, na angiogênese, e na taxa de cicatrização, produzindo uma cicatriz menos evidente.<sup>173,174</sup>

Na fase inflamatória, as CT coordenam a atividade das células inflamatórias e impedem os reduzindo os efeitos deletérios das citocinas inflamatórias, como o TNF e o IFN- $\gamma$ .<sup>67</sup> Assim, o processo inflamatório da ferida ativa as CT para iniciarem as suas funções imunomodulatórias, incluindo um aumento da ativação da ciclooxygenase-2 (COX-2) e da ativação da expressão da prostaglandina E2 (PGE2), as quais têm múltiplos efeitos fibroreguladores na ferida.<sup>173</sup> Além disso, as CT auxiliam na eliminação de infecções por meio da secreção direta de fatores antimicrobianos como a espécies reativas de oxigênio, e estimulam a fagocitose por células imunes.<sup>67</sup>

As CT têm papel crucial na transição da fase inflamatória para a proliferativa no tratamento das feridas crônicas onde há níveis elevados e persistentes de fatores pro inflamatórios que impedem a cura destas feridas. As CT estimulam a neoangiogenese pela ação parácrina secretando FGF e o fator de crescimento vascular (VEGF), que juntos promovem a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais dos vasos, além disso facilitam a neovascularização através da diferenciação dos pericitos.<sup>67</sup>

Por último, regulam a remodelação da ferida cicatrizada, promovendo a deposição organizada da MEC. Como tal, os benefícios das CT na cicatrização de feridas foram demonstrados em vários estudos pré-clínicos e clínicos. Assim, diversos mecanismos estão envolvidos na cicatrização de feridas mediada por CT, incluindo atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas, imunomoduladoras e reparadoras de tecidos.<sup>67</sup>

A utilização de CT mesenquimais se mostraram resistentes a morte induzida por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio e capazes de gerenciar o sistema oxidativo de forma eficiente e este sistema tem um papel essencial em todas as fases da inflamação.<sup>175</sup>

Para que todos estes efeitos benéficos das CT sobre o processo de cicatrização ocorram é essencial que estas células permaneçam e se mantenham viáveis no leito da ferida. As vias mais utilizadas são a endovenosa e local.<sup>169,176,177</sup>

Os métodos de aplicação local de CT incluem: injeção ao redor da ferida, spray tópico de fibrina e a incorporação a um *scaffold*,<sup>172</sup> isto é, matrizes que são estruturas que mantêm as células aderidas ao sítio alvo.<sup>178</sup> Quando as CT são aplicadas, diretamente na lesão ou na sua periferia, se aderem e se diferenciam em vários tipos de células cutâneas (queratinócitos, células endoteliais e pericitos) potencializando o processo de cicatrização.<sup>172</sup>

A melhor via da aplicação terapêutica da CT vem sendo buscada. As CT aplicadas por via sistêmica são capazes de migrarem e se enxertarem na região do tecido lesionado,<sup>79</sup> diversos tipos diferentes de quimiocinas são responsáveis por esta migração e ao mesmo tempo fazem parte da modulação do processo inflamatório, reparação de danos teciduais e regeneração tecidual.<sup>67</sup> A partir dessas características, aplicações de CT locais ou sistêmicas apresentam resultados semelhantes na cicatrização de feridas.<sup>171,179</sup> Entretanto a infusão sistêmica de células-tronco em ratos onde o diâmetro das células era superior ao dos capilares do pulmão, gerou dificuldade respiratória e fibrose em alguns animais.<sup>180</sup>

Em 2006, Moseley, Zhu e Hendrick<sup>181</sup> sugeriram que as células-tronco injetadas sozinhas junto ao defeito, não respondem de maneira satisfatória. Uma estratégia seria a combinação de células com alguns componentes, conhecidos como matriz ou *scaffold*, para produzir um implante bem-sucedido. Lam e Longaker<sup>182</sup> afirmam que células injetadas se dissipam ou morrem no organismo, sendo que a adesão das células está diretamente relacionada à sua proliferação e diferenciação. Deste modo, o desenvolvimento de estratégias em engenharia de tecidos, associando as CT às matrizes, como a membrana amniótica, consiste em tecnologias promissoras para se atingir melhores resultados.

Em 2002, Tamai et al.<sup>183</sup> mencionaram fatores que devem ser observados para utilização bem-sucedida do *scaffold*: não devem ocorrer reações inflamatórias ou tóxicas ocasionadas pela composição do biomaterial; sua apresentação deve ser tridimensional e porosa, proporcionar uma elevada área superficial que permita adesão e crescimento celular e deve haver espaço para regeneração da matriz extra-celular.

## 2.7 Estresse Oxidativo

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico cumprindo funções biológicas essenciais. Durante os processos metabólicos esses radicais atuam como mediadores em várias reações bioquímicas, sua produção em proporções adequadas, possibilita ações como ativação gênica, defesa, mediador no processo inflamatório, entre outras atividades, mas sua produção excessiva pode conduzir a danos oxidativos.<sup>184</sup>

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e agem como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólitos.<sup>185</sup> Essas espécies, radicais ou não, são oxidantes potentes e podem causar danos teciduais significativos, sendo coletivamente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROS).<sup>186</sup>

Durante o metabolismo celular, a maior parte do oxigênio molecular sofre completa redução à água. Entretanto uma pequena parte (<2%) do O<sub>2</sub> é convertida a produtos parcialmente reduzidos como radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radicais oxidrila (OH<sup>-</sup>).<sup>186</sup>

Para reduzir ou bloquear os efeitos negativos das EROs os organismos desenvolveram um amplo sistema de defesa antioxidante que pode ser classificado conforme seu mecanismo

de ação: antioxidantes de prevenção, pois agem na formação das EROs, antioxidantes varredores, porque impedem o ataque destas espécies as células, antioxidantes de reparo, pois reparam os danos das moléculas de DNA e reconstituição das membranas danificadas.<sup>187</sup>

Os mecanismos de defesa podem ser enzimáticos e/ou químicos (não enzimáticos). O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Este sistema é formado por diversas enzimas destacando-se a glutathiona peroxidase (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).<sup>136</sup>

Os radicais livres são produzidos por todas as células durante o curso normal dos processos metabólicos, e na cadeia respiratória, quando há agressão ao tecido grandes quantidades de radicais livres são produzidos no tecido ferido e inflamado pelo NADPH oxidase, um complexo enzimático, que é expresso em altas níveis por células inflamatórias.<sup>187</sup> Este fenômeno tem sido descrito como "explosão respiratória". Após a ativação da NADPH oxidase, as células produzem o ânion radical superóxido ( $OH^-$ ) altamente reativo. Imediatamente ocorre uma reação onde este ânion é dismutado em peróxido de oxigênio e água. Embora o  $H_2O_2$  não seja um radical, pode causar danos devido à geração de radicais hidroxila na presença de íons de ferro ou cobre (reação de Fenton). Radicais hidroxila são altamente agressivos, resultando na oxidação de macromoléculas celulares. Portanto, o  $H_2O_2$  deve ser rapidamente desintoxicado, e isso pode ser conseguida por catalase, várias peroxidases e por per oxiredoxinas. Estes últimos também são capazes de desintoxicar os peróxidos lipídicos.

Além das enzimas desintoxicantes de ROS, a defesa de radicais livres é alcançada por uma variedade de moléculas exógenas e endógenas de baixo peso molecular. Se a desintoxicação for insuficiente ou se EROS são produzidos em quantidades excessivas, ocorre estresse oxidativo, resultando em danos celulares graves, envelhecimento prematuro ou mesmo neoplásico transformação<sup>136,137</sup>.

### 2.7.1 O Estresse Oxidativo na Ferida Cutânea

A sinalização redox e o aumento do estresse oxidativo tem um papel significativo na evolução da cicatrização normal das feridas de pele, facilitando a hemostasia, inflamação, angiogênese, formação de tecido de granulação, fechamento da ferida e desenvolvimento e maturação da matriz extracelular.<sup>188</sup> As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em todas as fases do processo de cicatrização de feridas, pois baixas concentrações da geração EROS são necessárias para combater microrganismos invasores e sinalização de sobrevivência celular.<sup>186,189,190</sup>

O estresse oxidativo excessivo e descontrolado contribui para sustentar e desregular o processo inflamatório, desempenhando papel crucial na patogênese das feridas crônicas<sup>191</sup> e algumas estratégias com propriedades antioxidante e anti-inflamatórias têm demonstrado claros benefícios em feridas crônicas.<sup>190</sup>

Lembrando que as espécies reativas de oxigênio (EROS) são pequenas moléculas derivadas de oxigênio produzidas principalmente pela cadeia respiratória nas mitocôndrias; alguns deles são peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ , ânion superóxido  $O_2^-$  ou peróxido  $O^{2-}$ . Eles são agentes oxidantes e principais contribuintes para o dano celular<sup>190,192</sup>, mas também têm papéis benéficos e, em particular, desempenham um papel crucial na preparação da resposta normal de cicatrização de feridas.<sup>193</sup> Portanto, um equilíbrio adequado entre níveis baixos ou altos de EROS é essencial. Baixos níveis de EROS são benéficos na proteção dos tecidos contra infecções e estimulam a cicatrização eficaz de feridas pela produção de sinalização celular protetora<sup>194,195</sup>, mas, quando presentes em excesso, produzem estresse oxidativo levando a danos celulares e um estado pró-inflamatório.<sup>196</sup> O desequilíbrio redox ocorre se os níveis de ROS excedem a capacidade dos antioxidantes endógenos de eliminá-los, o que desregula o processo de cicatrização<sup>197</sup>.

Não há um ponto de corte claro para o nível de EROS nos tecidos, mas para o peróxido de hidrogênio (o EROS mais comum) a faixa de 100-250 $\mu$ M é considerada para feridas normais.<sup>194,198</sup> Além disso, alguns estudos relataram que níveis de 10  $\mu$ M de peróxido de hidrogênio atuam como quimio atrativos e estimulam a proliferação de fibroblastos e células endoteliais; a 100 $\mu$ M estimula a angiogênese através da produção de fator de crescimento endotelial vascular; mas a 500  $\mu$ M levou a um estado pró-inflamatório através da produção de proteína inflamatória produzida pelo macrófagos conhecida como 1-alfa(1- $\alpha$ )<sup>199</sup>.

Não basta que haja a regeneração mais rápida das feridas, é muito importante que os tecidos produzidos nessa etapa de recuperação do corpo sejam funcionais, saudáveis e esteticamente adequados. Nesse sentido, além de características relacionadas à redução da área de ferida ao longo do tempo de recuperação, têm sido empregados alguns marcadores inflamatórios (citocinas) e do estresse oxidativo que sinalizam as respostas do corpo reagindo e recuperando as lesões<sup>194,200,201</sup>. Esses marcadores celulares estão envolvidos com a sinalização parácrina, que é o principal mecanismo que contabiliza os efeitos benéficos das células tronco nas respostas a lesões como inflamação, angiogênese e fibroproliferação.<sup>11</sup> Embora os mecanismos celulares envolvidos nesta sinalização parácrina ainda não tenham sido totalmente desvendados,<sup>25,154</sup> muito progresso tem sido alcançado na associação de características clínicas, celulares e moleculares durante o processo normal de cicatrização<sup>100,202</sup>.

### **3 JUSTIFICATIVA**

As perspectivas futuras das lesões de pele projetam números crescentes, inclusive lesões crônicas em função do envelhecimento e do aumento epidêmico da diabetes melitos na população, e as atuais ferramentas de manejo têm sido insatisfatórias, portanto, há uma busca por novas terapias para otimizar o processo de reparo de feridas.

As células-troncos autólogas associadas à membrana amniótica descelularizada têm sido utilizadas em diversas áreas como na cardiologia, oftalmologia, dentre outras. Desta forma, testamos sua utilidade no tratamento de feridas completas de pele em ratos Wistars e estudando seus efeitos locais sobre sua atividade inflamatória, no estresse oxidativo e na qualidade do colágeno produzido em uma fase tardia da cicatrização comparada ao placebo.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos Gerais**

Avaliar a interação local das células-tronco mononucleares associada a membrana amniótica descelularizada no processo da cicatrização de feridas completas de pele em ratos Wistars.

### **4.2 Objetivos Específicos**

A partir de retalhos de pele retirados das bordas das feridas, vamos mensurar as seguintes variáveis:

- Dosar, por meio de teste utilizando ELISA, os fatores inflamatórios interleucina 1 (IL-1) e interleucina 10 (IL-10),
- Determinar componentes do estresse oxidativo, através de análise bioquímica, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH),
- Identificar e dosar as proteínas do grupo carbonil (dano oxidativo),
- Determinar através da análise histológica, colágeno, tipo I e tipo III, e imuno-histoquímica o TGF- $\beta$ .

## 5. ARTIGO

### Article

# Acellular biomaterials associated with autologous bone marrow-derived mononuclear stem cells improve wound healing through Paracrine Effects.

Isio Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Aline Luri Takejima<sup>1</sup>, Rossana Baggio Simeoni<sup>1</sup>, Luize Kremer Gamba<sup>1</sup>, Victoria Stadler Tasca Ribeiro<sup>1</sup>, Katia Martins Foltz<sup>1\*</sup>, Lucia de Noronha<sup>1</sup>, Meila Bastos de Almeida<sup>5</sup>, Jose Rocha Faria Neto<sup>1</sup>, Katherine Athayde Teixeira de Carvalho<sup>3</sup>; Paulo Cesar Lock da Silveira<sup>4</sup>, Ricardo Aurino Pinho<sup>2</sup>, Julio Cesar Francisco<sup>1</sup> and Luiz Cesar Guarita-Souza<sup>1</sup>. \*

- <sup>1</sup> Experimental laboratory of Institute of Biological and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). 1555 Imaculada Conceição Street. Curitiba, State of Parana, Zip Code 80215-901.
  - <sup>2</sup> Laboratory of Exercise Biochemistry in Health, School of Medicine, Graduate Program in Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). 1555 Imaculada Conceição Street. Curitiba, State of Parana, Zip Code 80215-901.
  - <sup>3</sup> Cell Therapy and Biotechnology in Regenerative Medicine Department, The Pelé Pequeno Príncipe Institute, Child and Adolescent Health Research & Pequeno Príncipe Faculties, 1632 Silva Jardim Avenue. Curitiba, State of Parana, Zip Code 80240-02
  - <sup>4</sup> Laboratory of Experimental Pathophysiology, Graduate Program in Health Sciences, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brazil
  - <sup>5</sup> Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba 80060-000, Paraná, Brazil;
- \* Correspondence: julio.apfr@gmail.com +55-41-30456144.

**Citation:** de Souza, I.; Takejima, A.L.; Simeoni, R.B.; Foltz, K.M.; de Almeida, M.; Neto, J.R.F.; de Carvalho, K.; Pinho, R.A.; Francisco, J.C.; Cesar, L. Acellular biomaterials associated with autologous bone marrow-derived mononuclear stem cells improve wound healing through Paracrine Effects. *Biomedicine* **2022**, *10*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date

Accepted: date

Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org>

**Abstract:** Wound healing is a complex process of repair that involves the interaction between different cell types and involves coordinated interactions between intracellular and extracellular signaling. Bone Marrow Mononuclear Stem Cells (BM-MNCs) based and acellular amniotic membrane (AM) therapeutic strategies with the potential for treatment and regeneration of tissue. We aimed to evaluate the involvement of paracrine effects in tissue repair after flap skin lesion rat model. In the full-thickness flap skin experiment of forty Wistar rats: A total of 40 male Wistar rats were randomized into four groups: group I – control (C) (n = 10), with full-thickness lesions on the back, without (BM-MNCs) or AM (n = 10); group II – injected (BM-MNCs) (n = 10); group III – covered by AM; group IV – injected (AM+BM-MNCs) (n = 10). Cytokine levels IL-1, and IL-10 assay kit, superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GRs) and carbonyl activity levels were measured by ELISA 28th day, and TGF- $\beta$  was evaluated by immunohistochemical, the expression collagen expression was evaluated by Picrosirius staining. Our results showed that the IL-1 interleukin was higher in the control group, and the IL-10 presented a higher mean when compared to the control group. The groups with BM-MNCs and AM showed the lowest expression levels of TGF- $\beta$ . SOD, GRs, and carbonyl activity analysis showed a predominance in groups that received treatment from 80%. The collagen fiber type I was

predominant in all groups; however, the AM+ BM-MNCs group obtained a higher average when compared to the control group. Our findings suggest that the AM+ BMNCs promote skin wound healing probably owing to their paracrine effect attributed to the promotion of new collagen for tissue repair.

**Keywords:** Human acellular amniotic membrane; experimental animal models; Antioxidant system; stem cells; wound healing; paracrine

---

### 1. Introduction

Wound healing is a complex process of repair that involves the interaction between different cell types, biochemical and physiological events such as proliferation, and remodeling tissue [1].

This process involves five main distinct stages: hemostasis, inflammation, angiogenesis, growth, proliferation, and remodeling. Wound repair also involves of specialized cells in regeneration, the formation of granulation tissue (monocytes, basophils, eosinophils, and neutrophils), and the reconstruction of tissue which is triggered in inflammatory phases and supported by biochemical mediators [2].

Studies suggest that the wound healing process occurs through epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), platelet-derived growth factors (PDGF), the transformation of growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), and vascular endothelial growth factor (VEGF) and protein in the extracellular matrix (ECM) proteins such as collagen, fibrin, fibronectin that stimulate wound healing by indirectly enhance inflammation and tissue repair [3-4].

Although, there are many barriers to solve, such as the rapid degradation of growth factors. Numerous strategies and biomaterials have been applied to replace skin damage. Finding the ideal material for skin replacement is a field of skin tissue engineering. The ideal material for skin replacement should its stationary biocompatibility and degradability is essential for performing and maintaining essential cellular activities which include the ability of cell adhesion and proliferation [5]. Since 1940, the amniotic membrane widely used as an alternative in wound healing and various areas of tissue engineering and regenerative medicine [6,7].

The amniotic membrane has shown great potential as an ideal biomaterial, due to its growth factors and biological structure, which contains appropriate microarchitecture, epithelialization stimulation capacity, antibacterial properties, and lower immunogenicity [8].

Additionally, it has been demonstrated in clinical studies that the use of an acellular amniotic membrane (AM) improves the healing process due to bioactive factors, proteases, including a large group of cytokines and effective anti-inflammatory proteins, which remain intrinsic after the decellularization process that can be used physical, chemical, and biological methods, such as VEGF, TGF $\beta$ 1, bFGF and EGF [9].

In recent years, many studies have shown to exhibit through their bioinductive properties, the acellular membrane may also promote epithelialization while suppressing inflammation, angiogenesis, vasculogenesis, and scarring [10,11]. In the field of cell therapeutic strategies, stem cell-based regenerative therapies have been successfully

developed, that facilitate skin repair and regeneration, stem cells have been reported as a cellular source in regenerative medicine.

Similar to other stem cells, Bone Marrow Mononuclear Stem Cells (BM-MNCs), can differentiate into local components of tissue injury, and have paracrine factors and cytokines capable of activating tissue survival, repair, and regeneration [12]. Thus, recent studies reported that BMSCs and paracrine mechanisms together may be key to the regeneration of damaged tissue [13]. This study was conducted to evaluate the role of paracrine interaction of Bone Marrow Mononuclear Stem Cells (BM-MNCs) associated with acellular amniotic membrane (AM) in the wound healing pre-clinic model.

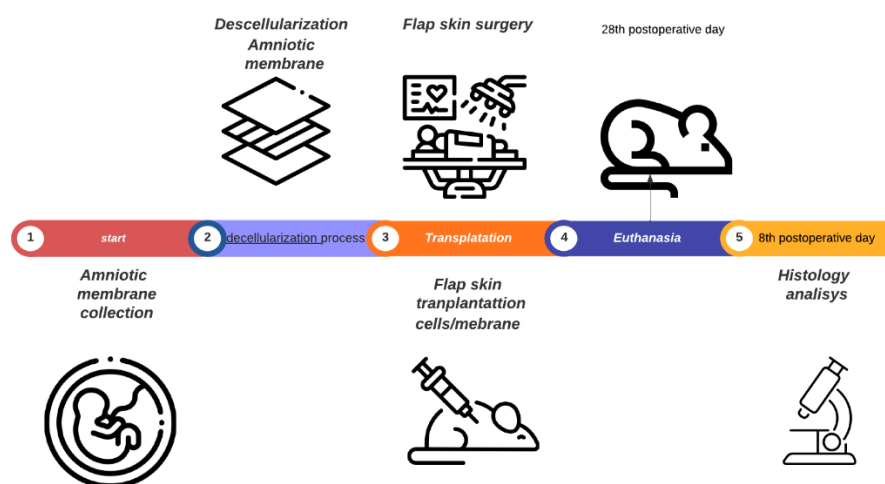
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

All the experimental procedures were performed with the approval of Ethics Committee (CEP) and Ethics Committee for the Use Animals (CEUA), under approval number 01238 of the Experimental Medical school of Pontificia Universidade Católica do Paraná, and all procedures conformed to the NIH guidelines. The animals were housed in individual cages and maintained in an environmentally controlled laboratory (12-h light/dark cycle at 25 °C), with access to food and water *ad libitum* [7].

### 2.2. Experimental Design

Forty male Wistar rats weighing between (250 g -350 g) were used in this study. The animals were randomized into four groups: group I – control (C) (n = 10), with full-thickness lesions on the back, without (BM-MNCs) or AM (n = 10); group II– injected (BMSCs) (n = 10); group III – covered by AM; group IV–injected (AM+BM-MNCs) (n = 10). The animals were subjected to random skin flaps and the BMSCs and AM were transplanted. Thirty days after surgery, all animals were analyzed by the viability of flaps that were determined by the clinic (color and capillaries) and histological analysis. All rats were euthanized by a lethal dose of thiopental sodium (100 - 250 mg/kg, i.p) and histopathological examinations were performed (Figure 1).



**Figure 1.** Experimental design: 1-amniotic membrane collection, 2- stem cell isolation, and process membrane decellularization, 3- flap skin surgery, implant, 4- euthanasia, 5- histopathological analysis.

### 2.3. Isolation and characterization of BMSCs / Acellular Amniotic Membrane Preparation

Hospital (Curitiba, Brazil). The patients were informed a priori and consented to donation. The study was conducted conformed to tenets of the declaration of Helsinki. The BMSCs were obtained by the iliac crest of male Wistar rats (250 - 300 g) as previously described [10]. Centrifugation was applied to isolate BMSCs after aspirated into the iliac crest of each rat. Briefly, the BMSCs was collected and centrifuged at 1400 rpm for 40 minutes and diluted in essential Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), gently separated by the Ficoll-Hypaque density gradient method (density = 1.077 g/mL). Subsequently, sediment after 2 washing steps, at 1500 rpm for 10 minutes, obtained was resuspended with DMEM and the cells count was performed in the Neubauer chamber. For the validation of the cell viability was verified utilizing Trypan blue stain.

Decellularization was performed using an aseptic technique in a Class II BioSAFE (Veco®) biological. Thereafter, it was treated with process chemical and mechanical used 0.01% SDS solution (sodium dodecyl sulfate) and SD (sodium deoxycholate) at 0.01% for 24 hours at 37°C in pH 7.2 saline phosphate buffer (PBS), with the aid of a stirrer mechanic (Shaking table 109 M, Nova ÉticaLtda, Brazil.). Then preserved in PBS (Gibco) at 4 °C, according to the methodology described by Blume et.al, 2021 [7].

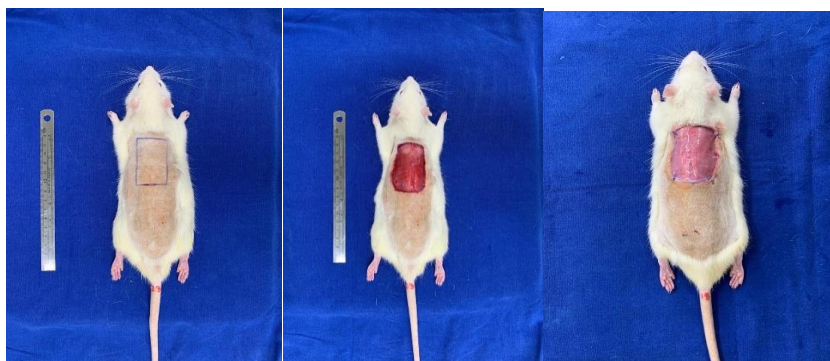
### 2.4. Flow Cytometry cell Analysis

Flow cytometry was performed to determine the expression BM-MNCs cellular face markers was performed on freshly isolated mononuclear cells and on adherent cell populations, Cells were trypsinized and resuspended in PBS for 30 min at 4 °C were incubated for 2 h at room temperature in the dark with the following immunophenotypic analyses for CD34, CD 45, CD105, CD 90, CD73, CD105 were performed with a commercially available kit (Stem Kit, Beckmann Coulter, Krefeld) and mouse IgGk1 isotype controls (BD Pharmingen, 5 µg/ml) were used as control primary antibodies. We use all of the analysis tools by a CyFlow™ Space flow cytometer (Sysmex Partec GmbH) with FloMax 2.8 software (Sysmex Partec GmbH).

### 2.5. Rat Flap skin model and Membrane Implant

The surgical flap preparation technique was applied as proposed by Takejima et al. 2021[14]. The animals were intraperitoneally anesthetized with ketamine hydrochloride 10% at a dose of 90 mg/kg, and xylazine 2% at a dose of 10 mg/kg, the animals where dorsum trichotomy was performed and, the animal was performed with an area of approximately 5 × 3 cm rectangular mold (stamp), the area where the cutaneous lesion was to be induced in the dorsal region between the two scapulae was delimited, with the largest axis in the longitudinal direction. Rats were then randomly divided into four groups of ten each, as described above. BM-MNCs ( $1 \times 10^7$  total cells) or BM-MNCs + AM were injected in eight areas (subcutaneously administered  $1 \times 10^7$  cells/area for eight areas in all wound edges). The suspension of cells or vehicles was applied along the margin of the dorsal wound. The flap was covered with a Vaseline rayon dressing that was sutured with a simple 5-0 nylon stitch on the four vertices of the lesion to avoid contamination and manipulation by other

animals. These dressings were removed after two days of evolution. All rats received 20 mg/kg ibuprofen, and then repeated every 12 hours for three days (Figure 2).



**Figure 2.** Flap skin exposition with a 30 × 50 mm (150 mm<sup>2</sup>) defect made with a scalpel.

The animals were submitted to injection of BM-MNCs on the skin defect. The flaps were sutured with a 4.0 polypropylene thread, After the sin flap was re-suture, the skin tissues were covered.

#### 2.6. Measurements of Cytokines, IL-1, IL10, and TGF- $\beta$ levels

The IL-1 assay kit IL-10 and TGF- $\beta$  assay kit (cat. no. DY522-05) were purchased from Cloud-Clone Corp (Cloud-Clone Corp Technology co., Ltd., Wuhan, China). Briefly, for IL-1 and IL-10 assay, 100  $\mu$ l of a standard blank or samples was added into the appropriate wells and then incubated for 1 h at 37° C. After aspiration, 100  $\mu$ l of prepared detection reagent was added to each well and incubated for 1 h at 37°C. After aspiration and washing, 90  $\mu$ L of substrate solution was added to wells and incubated for 15 min at 37°C. The optical density (OD) of the reaction product was read on a microplate reader (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) at 450 nm [15].

#### 2.7. Determination of the oxidative damage

Protein carbonylation was determined according to Levine et al. [15]. Briefly, carbonyl group levels were estimated spectrophotometrically at 412 nm using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DTNB), and the amounts of TNB formed (equivalent to the amounts of carbonyl were calculated).

#### 2.8. Superoxide dismutase activity and glutathione reductase

To measure the superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GRs) levels, the dorsum partial skin tissues were immediately put into ice-cold normal saline containing 50 U/mL aprotinin. The tissue homogenate (10%, w/v) was prepared and centrifuged at 1200 × g for 10 min. The supernatant was measured by the ELISA method following the manufacturer's protocols, using the absorbance at 480 nm [16].

#### 2.9. Measurements of protein

The protein content from skin tissue homogenates was assayed using bovine serum albumin as a standard according to the method described by Lowry et al. [17]. Folin phenol reagent (phosphomolybdic-phosphotungstic reagent) was added to the protein homogenate. The

bound reagent was slowly reduced, changing from yellow to blue. The absorbance was read at 480 nm.

#### 2.10. Euthanasia

All Animals were euthanized with a lethal dose of pentobarbital Sodium Thiopental (100 to 250 mg/kg) injected intraperitoneally. Then, their skin tissues were carefully removed and frozen at -80°C, for the determination of cytokine protein and oxidative stress.

#### 2.11. Immunohistochemistry Analysis

Immunohistochemistry was performed using the avidin-biotin complex method <https://www.abcam.com/abpromise> as described in our previous study [16]. Rabbit polyclonal to TGF- $\beta$  Receptor I was used as primary antibodies. Sections were then incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody. Peroxidase activity was determined using diaminobenzidine (DAB) substrate (Abcam, Cambridge, MA, USA).

#### 2.12. Histopathological Analysis

The sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Picrosirius Red for histological evaluation and fixed in 10% [paraformaldehyde](#), and embedded in paraffin. Then, 5- $\mu$ m-thick sections were cut from the blocks, affixed to glass slides coated with poly-L-lysine, examined under a microscope (Nikon Eclipse E400; Nikon, Tokyo, Japan), and evaluated with a digital image analysis system. Immunohistochemically analysis was performed as previously described by Jones et, al. 2008 [18] Briefly, the skin samples were incubated with a primary antibody applied for 1 h at room temperature. Tissue sections were then incubated with TGF- $\beta$  primary antibody (1:200, Abcam Inc; <http://www.abcam.com>) 1h at 25°C and incubated with primary antibodies overnight at 4°C, followed by incubation with secondary antibodies for 2h at 25°C, followed by washing and visualized using an isothiocyanate-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) and imaged with an optical microscope Axio Scan.Z1 scanner (Carl Zeiss, Germany).

#### 2.13. Statistical Analysis

The results of the markers were described by mean  $\pm$  standard deviation (SD) and amplitude interquartile. For the comparison of the groups, in relation to variables that met the normality condition, the variance analysis model (ANOVA) was used with a factor and the Bonferroni post-hoc test. The other variables were analyzed using the nonparametric kruskal-Wallis test and Dunn's post-hoc test corrected by Bonferroni. The condition normality of the variables was evaluated by the Shapiro-Wilk test. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . All analyses were accomplished using the software in SPSS statistical software version 25 (SPSS Inc., IBM, USA).

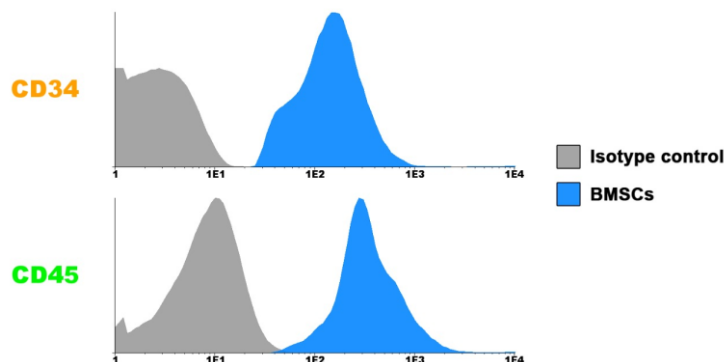
### 3. Results

Forty animals were initially included in the study, one died in group II seventh postoperative day during anesthetic induction. Thus, 39 animals were included and randomized into four groups: four groups: group I – control (C) (n = 10), with full-thickness lesions on the back, without (BM-MNCs) or AM (n = 10); group II– injected (BM-MNCs) (n =

9);group III – covered by AM; group IV–injected (BM-MNCs) and covered by AM (n = 10).

### 3.1. Characterization of BM-MNCs

As shown in Fig.3, flow cytometry analysis of Bone marrow to characterize the BM-MNCs

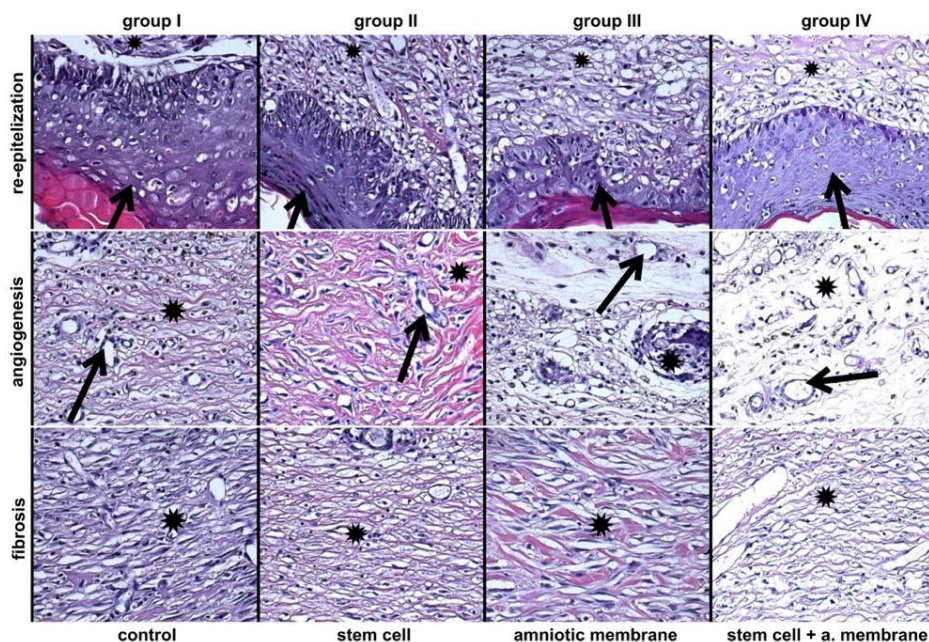


**Figure 3.** Characteristics of BM-MNCs. Flow cytometry Histograms of Bone marrow mononuclear cells. The histograms show that the population is positive for anti-CD45 and CD34.

BMSCs expression of the markers CD105, CD 90 and CD73 exhibited high expression levels, and for hematopoietic markers CD45 (Pro-B), and CD34(Lymphocyte) showed were positive, using a previously published protocol [14].

### 3.2. Assessment of H&E Staining findings

Evaluation of H&E staining to detect the presence of re-epithelialization, angiogenesis, and fibrosis with remodeling with evidenced by a well-formed epidermis Figure 4.



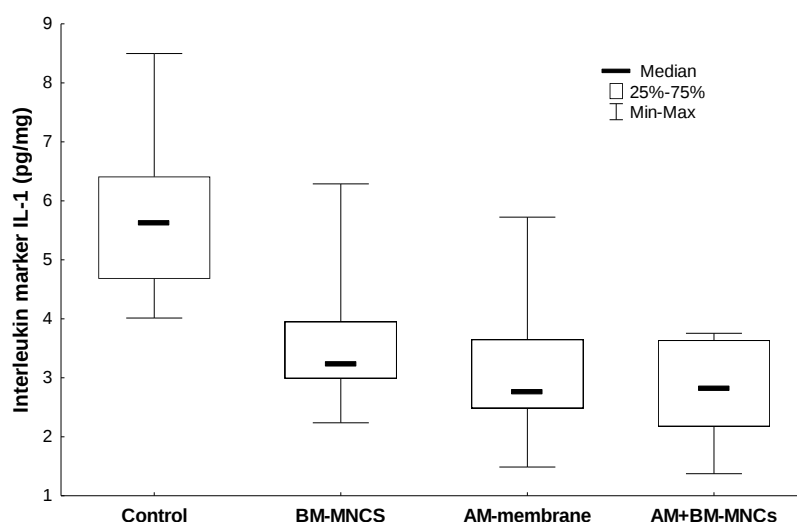
**Figure 4.** Depicts the signs of re-epithelialization, angiogenesis, and fibrosis with remodeling in four different groups: control (I), stem cell (II), amniotic membrane (III), and stem cell + amniotic membrane (IV). The samples were taken from the center of the lesion and analyzed using HE staining (hematoxylin-eosin) at 200x magnification. All groups, from I to IV, exhibit

indications of complete re-epithelialization, as evidenced by a well-formed epidermis (indicated by a black arrow) over mature fibrous tissue (indicated by an asterisk). Angiogenesis is represented by numerous newly formed vessels (indicated by a black arrow) amidst fibrous stroma (indicated by an asterisk). Additionally, fibrosis with remodeling is represented by dense connective tissue containing thick, pink fibers that penetrate newly formed vessels (indicated by an asterisk).

### 3.3. Comparison of interleukin protein 1 (IL1) concentration in tissues adjacent to the skin wound in rats

To investigate the comparison of interleukin protein 1 (IL-1) concentration in tissues adjacent to the skin wound in groups of rats received stem cells and/or amniotic membrane compared to the control group.

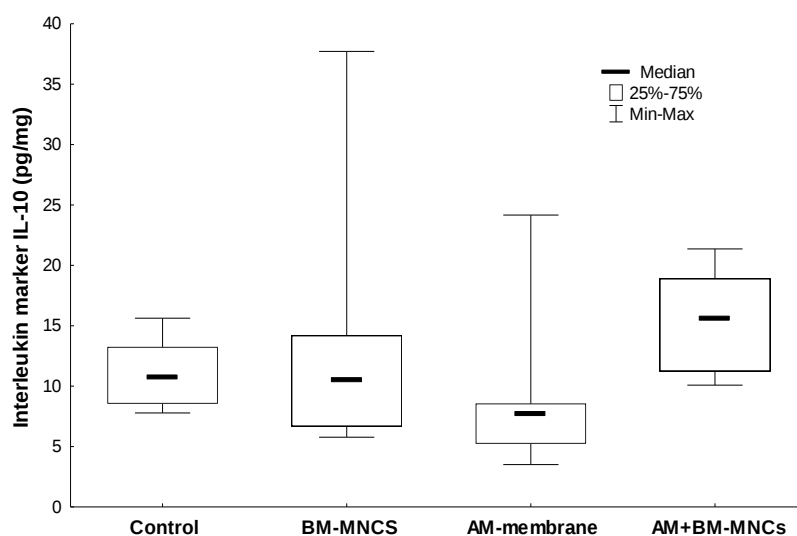
The IL-1 expression revealed a lower expression in groups BM-MNCs and BM-MNCs +AM compared to control ( $3.615 \pm 1.28$  and  $2.817 \pm 0.82$ ;  $p < 0,001$ ). No significant variation in IL-1 was observed in the BM-MNCs and AM when compared to each other. (Figure 05).



**Figure 5.** Effect of AM and BM-MNCs on Interleukin marker IL-1. Results are expressed as median [interquartile range]  $\pm$  SEM (N = 10).  $p < 0.05$  denoted statistical significance in comparison to the control group. BM-MNCs: Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells; AM: acellular human amniotic membrane.

### 3.4. Comparison of interleukin protein 10 (IL10) concentration in tissues adjacent to the skin wound in rats.

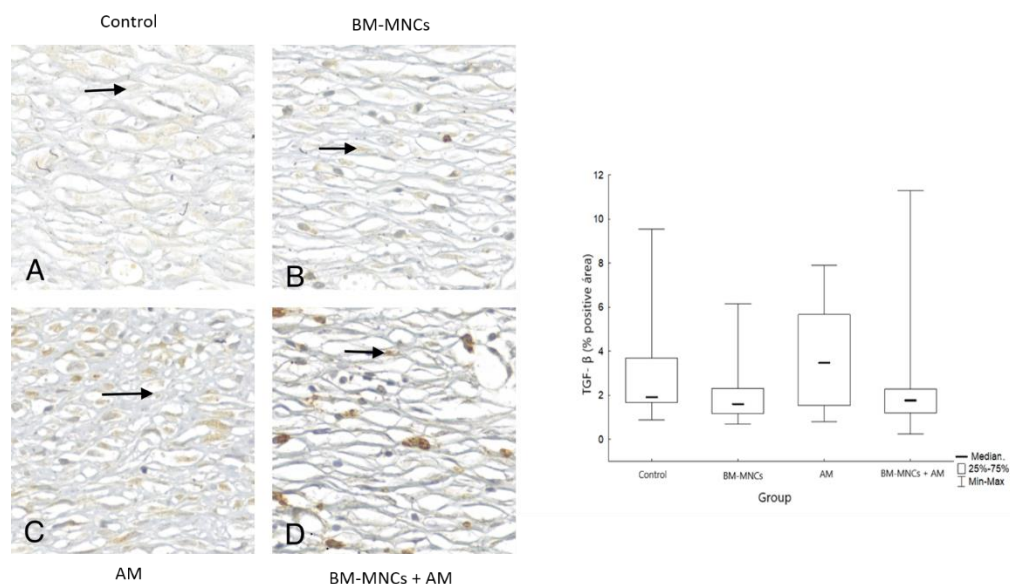
The results of these experiments are show in (Figure 06). In the intergroup analysis after 28 days, the IL-10 revealed a significant lower expression in group AM ( $8,886 \pm 6.172$  and  $15.479 \pm 3.81$ ;  $p = 0,011$ ). No significant variation in IL-10 was observed in another groups.



**Figure 6.** Effect of AM and BM-MNCs on Interleukin marker IL-10. Results are expressed as median [interquartile range]  $\pm$  SEM (N = 10).  $p < 0.05$  denoted statistical significance in comparison to the control group. BM-MNCs: bone marrow mononuclear stem cells; AM: acellular human amniotic membrane.

### 3.5. Comparison of interleukin protein (TGF- $\beta$ ) concentration in tissues adjacent to the skin wound in rats

Immunostaining analysis performed in the present study are represented in Figure 4. The expression of TGF- $\beta$  in skin tissue tended to decrease on day 28, compared with the control group, but this was not significant ( $p=0.468$ ) (Figure 07).

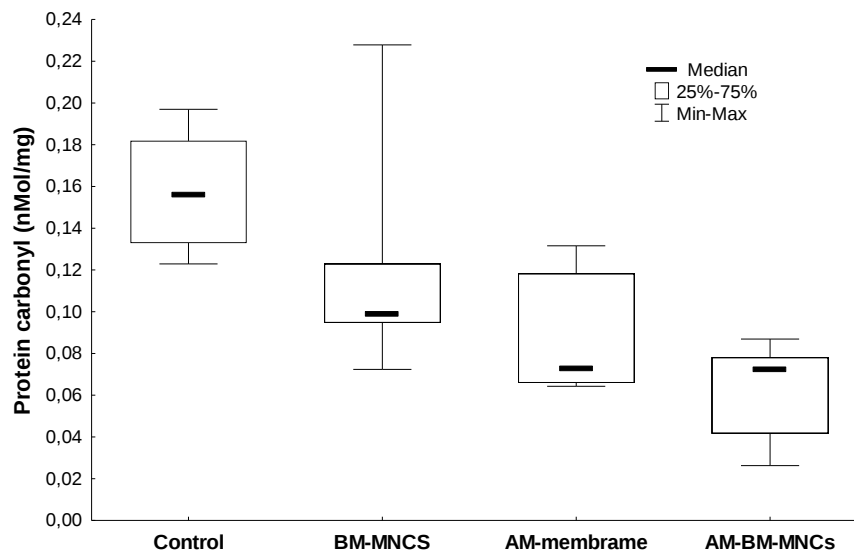


**Figure 7.** Representative immunohistochemical staining images the expression of TGF- $\beta$  showed the lowest percentages in the control, BM-MNCs, AM and BM-MNCs+ AM groups on the 28th day of the experiments.

Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation [interquartile range].  $p < 0.05$  denoted no statistical significance in comparison to the control group or intragroup 28th-day analysis (\*). TGF- $\beta$ : Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ); BM-MNCs: bone marrow mononuclear stem cells; AM (acellular amniotic membrane).

### 3.6. Oxidative damage markers

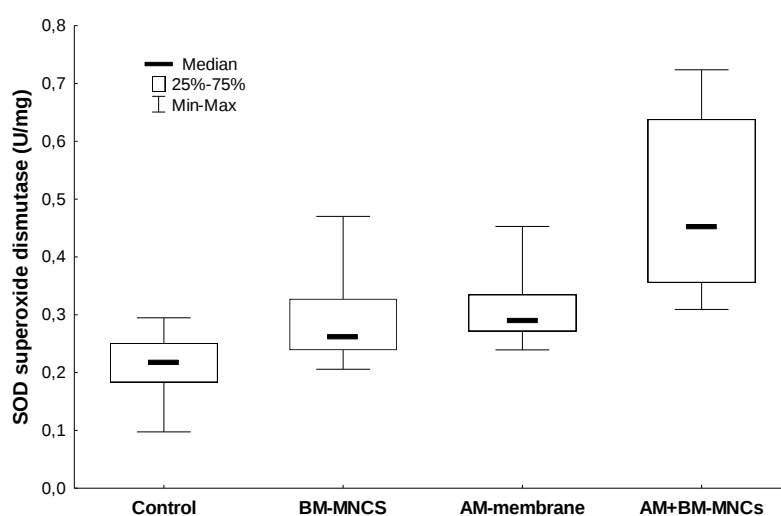
We evaluated the effect of BM-MNCs +AM on flap skin protein carbonylation content. BM-MNCs +AM decreased skin protein carbonylation by 80% ( $P < 0.001$ ) and a decreased AM group at 28 days as compared to the control group. ( $p=0,02$ ) (Figure 08).



**Figure 8.** Effect of AM and BM-MNCs on carbonyl activity. Results are expressed as mean [interquartile range]  $\pm$  SEM (N = 10).  $p < 0.05$  denoted statistical significance in comparison to the control group. BM-MNCs: bone marrow mononuclear stem cells; AM: acellular human amniotic membrane.

### 3.7. Antioxidant system

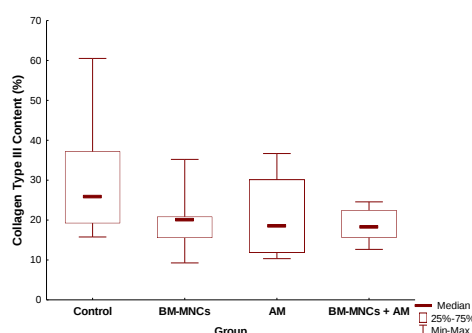
In the 28<sup>th</sup> days post-surgery, skin tissue SOD activity samples were found to be significantly lower in the control group compared to BM-MNCs+AM ( $p < 0.001$ ). No significant differences were observed between the levels of SOD in the skin tissues of control compared to the other groups ( $P > 0.05$ ), as shown in (Figure 09).



**Figure 9.** Effect of AM and BM-MNCs on SOD superoxide dismutase activity. Results are expressed as mean [interquartile range]  $\pm$  SEM (N = 10).  $p < 0.05$  denoted statistical significance in comparison to the control group. BM-MNCs: bone marrow mononuclear stem cells; AM: acellular human amniotic membrane.

### 3.9. Collagen level analysis

After 28 days of treatment, the concentration of type I collagen has a tendency ( $p=0,57$ ) to be higher in the group BM-MNCs, and the relative expression of collagen type III is the highest average but also without reaching statistical significance ( $81,5 \pm 3,8$ ,  $p= 0.57$ ) in the control group when compared to other groups. This indicates that a capacity for tissue regeneration, suggested by the development of immature collagen and the formation of tissue, despite the lack of statistical significance (figure 10).



**Figure 10.** Effect of AM and BM-MNCs on SOD Collagen Type III content (%). Results are expressed as mean [interquartile range]  $\pm$  SEM (N = 10).  $p = 0.57$  denoted no statistical significance in comparison to the control group. BM-MNCs: bone marrow mononuclear stem cells; AM: acellular human amniotic membrane.

### 4. Discussion

We used a model of flap wounds in rats to evaluate the role of paracrine interaction of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MNCs) in the wound healing and oxidative stress parameters 28th postoperative. Histological analysis showed that BM-MNCs treatment re-established the epithelization epidermal, and atrophy induced by surgery.

BM-MSCs possibly acted on epithelialization, increasing the proliferation of epidermal cells residing in the participation of epidermal growth factor, probably developed by bone marrow cells or by their differentiation in epidermal cells. Our findings indicate that the acellular matrix combined with BM-MNCs cells results in a significant increase in the initial postoperative formation of collagen fibers and elastic fibers after skin reconstruction, probably due to their anti-inflammatory effect on cells or fusion between them.

Wound healing is a complex system that provides the molecular mechanisms of cell-cell interactions, cell-matrix interactions, cellular proliferation, matrix formation, remodeling, and tissue organization [19].

Clinical trials and preclinical studies have used amniotic membrane (AM) in the treatment of various diseases such as chronic skin wounds, and thermal burns because AM contains growth factors, proteases, and fibrosis inhibitors, conferring its anti-inflammatory and antimicrobial effects, which are crucial for regenerative medicine [20,21].

IL-1 $\beta$  is a pro-inflammatory cytokine, that plays an important role in the early phase of inflammation in the wound-healing process, stimulating the production of extracellular matrix proteins [22]. As well, IL-10 plays a vital role in cell healing, wound healing, tissue repair,

angiogenesis, and antifibrotic tissue repair properties being a vital reparative cytokine. IL 10 is anti-inflammatory that is involved in the wound healing process and inhibition of the synthesis of proinflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  among other macrophages activated in the inflammatory process. In the present study, the IL-1 $\beta$  expression after treatment for 28 days suggested decreased inflammation, although the level the IL-10 no significant differences in between the treated group and the control group which facilitated healing [23].

Some studies have revealed that AM and BM-MNCs can express angiogenic factors, is crucial to tissue flap regeneration and a complex process; it involves the proliferation of endothelial cells and the cooperation of various growth factors [24,25,26]. In the current study, immunohistochemical staining together with the cytokine level showed that the IL-1 and IL-10 were overexpressed at the late stages of healing (28 days postoperative), these data corroborate with publications.

The possible mechanism of the therapeutic effects of AM+ BM-MNCs on skin fibrosis might be attributed to the stimulation of TGF- $\beta$  which is considered a favorable regulator of angiogenesis via the recruitment of inflammatory cells, such as macrophages, monocytes, and neutrophils, due to the up-regulation of various chemokines expressions which modulates the formation of fibroblasts, which in turn are responsible for the healing process [27]. Similar to the developmental roles of interleukins, TGF- $\beta$  is implicated in stimulating the paracrine mechanism BM-MNCs that promote angiogenesis tissue and a variety of differentiated strains, including immune cells [28].

The mechanism of anti-fibrotic effect of the human AM can be explained by the inhibitory action of this tissue on TGF- $\beta$  expression, which activates fibroblasts that, in turn, are responsible for the healing process. As a result, the fibrotic process is inhibited [12]. In this way, the AM through the stimulation of tissue reconstruction

The internal imbalance of the body's pro and antioxidants and known as oxidative stress. Moreover, it is important to note that in the process of wound healing, the oxidative stress and production of reactive oxygen species (ROS) increase, and these are very relevant in tissue regeneration. The two most important enzymes produced in the body are superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GRs) which will be present when there is an excessive oxidation reaction [29].

Our data showed that carbonyl activity increased in the AM+ BM-MNCs group being almost 80% higher than the average of the other treatments and was significantly decreased ( $p < 0,001$ ) in the control group demonstrating that due to its antioxidant action. We also observed a significant increase in glutathione levels during treatment with AM group alone and the AM+ BMSCs group and a decrease in the control group ( $p = .036$ ).

However, evidence was found of higher levels in the AM+ BM-MNCs group and the AM group of GRs enzymes, and SOD that helps the body cope with oxidative stress. Moreover, there was also a significant decrease in the activity of the antioxidant enzymes SOD and GRs which are important antioxidant enzymes, which can scavenge free radicals and protect the cell membrane. Studies show that there is a direct relationship between wound healing and the prevention of scar tissue formation depending on the decrease in oxidative stress [30,31].

These results are likely the consequence of the acute inflammation induced by flap wounds and application of cells, in which the excessive

production of ROS and inhibition of antioxidant enzymes occur. Abundant ROS production can lead to cellular damage and even death, while ROS production is very useful for the maintenance of homeostasis of the intracellular redox state [32].

Studies suggested that BMSCs partially reduced oxidative tissue damage and mitigated interleukin-1 $\beta$ -induced cell apoptosis. Although diverse types of methods and cells have been proposed for replacing wound healing. However, it is an ideal material with the potential for skin replacement still needs to be discovered [35].

After decellularization, the amniotic membrane offers several growth factors and other proteins that maintain the orientation of collagen fibers that are preserved during the process of such glycoproteins, proteoglycans, collagen, hyaluronic acid, and fibronectin [36,37].

In this study, the application of AM+ BM-MNCs together demonstrated a positive effect by increasing the rate of collagen fiber formation, that are important for the quality of wound healing. These findings also can be explained by increasing oxygen levels that promote collagen synthesis, cell proliferation, and neoangiogenesis [38].

Thus, the decellularization process also increases biocompatibility, due to the absence of secretion of human epithelial cells from soluble factors that promote inflammatory responses to cells that contribute to tissue repair and that collagen fibrils remained regularly organized [39]. Our previous study demonstrated the effects of this acellular biologic matrix for skin reconstruction using the rat model, suggesting that AM can promote skin repair accelerating epithelialization mainly through paracrine signaling and differentiation cells [14].

Flap skin was performed, and the defects were change by the AM+ BM-MNCs cells. Histological examination showed the replacement of type III collagen for type I in the treatment group reached maturity more rapid when compared to the control at 30 days treatment after surgery. In this way, combining this therapy is a new perspective for treating tissue injury and promoting tissue regeneration. Previous studies proposed the benefits of mesenchymal or stem cell transplantation in scaffolding in promoting wound healing [40].

Thus, the combination of this therapy is a new perspective for the treatment of tissue injury that allows tissue regeneration. The acellular membrane promotes several therapeutic advantages can be by increasing only the acellular process, but also paracrine effects and growth factors inherent to the membrane, as well as its epithelialization and tissue regeneration [41].

It will take considerable dedication to implement this purpose in clinical practices. In this study, AM facilitated the growth of human epithelial cells, suggesting that together AM+ BMSCs is an appropriate material for the skin and has a potential therapeutic tool for the reconstruction of a functional tissue surface.

In conclusion, AM+ BM-MNCs can promote tissue regeneration. This effect may be attributed to the promotion of new collagen ECM synthesis by cell proliferation and neoangiogenesis demonstrated an important role in the paracrine effects of the acellular matrix combined with cells.

**Author Contributions:** J.C.F., K.A.T.C, and L.C.G.-S. designed the experiments and prepared the manuscript, M.B.A, J.C.F., I.C.S., A.L.T executed the animal

surgery, animal observation, and tissue preparation, J.C.F., and A.L.T performed the immunostaining, L.N., made the schematic draw, R.B.S. and J.C.F., and I.C.S, V.S.T.R interpreted the data and revised the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Pontifical Catholic University of Paraná Animal Use Committee, numbered 01238 (CEUA-PUCPR) and the date of approval was 2020, April 19.

**Informed Consent Statement:** “Not applicable.” The study did not involve humans.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We thank the Pelé Pequeno Principe Institute for providing acellular membranes and cell culture.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## 5 References

1. Dehkordi A.N., Babaheydari F.M., Chehelgerdi M., Dehkordi S.R. Skin tissue engineering: Wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Res. Ther.* 2019; 10:111.
2. Shpichka A., Butnaru D., Bezrukov E.A., Sukhanov R.B., Atala A., Burdukovskii V., Zhang Y., Timashev P. Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem Cell Res. Ther.* 2019; 10:94.
3. Xie Z, Paras CB, Weng H, et al. Dual growth factor releasing multifunctional nanofibers for wound healing. *Acta Biomater.* 2013;9(12):9351–9359.
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Perspective article: growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(5):585–601.
5. Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials* [Internet]. 2010;31(2):216–25.
6. Cargnoni A., Di Marcello M., Campagnol M., Nassuato C., Albertini A., Parolini O. Amniotic Membrane Patching Promotes Ischemic Rat Heart Repair. *Cell Transpl.* 2009;18:1147–1159.
7. Blume G.G., Machado-Júnior P.A.B., PaludoBertinato G., Simeoni R.B., Francisco J.C., Guarita-Souza L.C. Tissue-engineered amniotic membrane in the treatment of myocardial infarction: A systematic review of experimental studies. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2021;11:1–11.
8. Han X, Ma Y, Lu X, Li W, Xia E, Li TC, Zhang H, Huang X. Transplantation of Human Adipose Stem Cells Using Acellular Human Amniotic Membrane Improves Angiogenesis in Injured Endometrial Tissue in a Rat Intrauterine Adhesion Model. *Cell Transplant.* 2020.
9. Babaki D, Khoshsimaybargard M, Yaghoubi S, Gholami M. Comparison of Vestibular Depth Relapse and Wound Healing After Reconstructive Preprosthetic Surgery Using Cryopreserved Amniotic Membrane and Acellular Dermal Matrix - A Comparative Study. *Ann Maxillofac Surg.* 2021 Jan-Jun;11(1):12-16.
10. McQuilling JP, Vines JB, Mowry KC. In vitro assessment of a novel, hypothermically stored amniotic membrane for use in a chronic wound environment. *Int Wound J.* 2017 Tseng SCG, Espana EM, Kawakita T, et al. How does amniotic membrane work? *Ocul Surf.* 2004;2(3):177–87.
11. Wang J, Xie H, Zhang M. Characterization of Ex Vivo Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol.* 2017;2017.
12. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 May;20(5):303-320.
13. Seo M, Kim JC, Kim HK, Choi EW, Jeong S, Nam KC, Jang M. A Novel Secretory Vesicle from Deer Antlerogenic Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media (DaMSC-CM) Promotes Tissue Regeneration. *Stem Cells Int.* 2018.
14. Takejima AL, Francisco JC, Simeoni RB, de Noronha L, Garbers LAFM, Foltz KM, Junior PABM, Souza IC, Pinho RA, Carvalho KAT, Guarita-Souza LC. Role of mononuclear stem cells and decellularized amniotic membrane in the treatment of skin wounds in rats. *Tissue Barriers.* 2021 Oct 6:1982364.
15. R. Levine, D. Garland, C. Oliver, Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol.* 186 (1983) 464–478.
16. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;32:279–312.
17. O.H. Lowry, et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275.

18. Jones ML, Bancroft JD, Gamble M. Connective tissues and stains. In: Bancroft JD, Gamble M editors. *Theory and practice of histological techniques*. 6th. Philadelphia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2008. p. 135–160 .
19. Kogan S, Sood A, Granick MS. Amniotic Membrane Adjuncts and Clinical Applications in Wound Healing: A Review of the Literature. *Wounds*. 2018 Jun;30(6):168-173.
20. Chehelcheraghi F, Eimani H, Homayoonsadraie S, Torkaman G, Amini A, AlaviMajd H, Shemshadi H. Effects of Acellular Amniotic Membrane Matrix and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Improving Random Skin Flap Survival in Rats. *Iran Red Crescent Med J*. 2016 Jun 1;18(6):e25588.
21. Liu F, Zhou H, Du W, Huang X, Zheng X, Zhang C, Hu H, Wang J, Quan R. Hair follicle stem cells combined with human allogeneic acellular amniotic membrane for repair of full thickness skin defects in nude mice. *J Tissue Eng Regen Med*. 2020 May;14(5):723-735.
22. Koper-Lenkiewicz, O.M.; Sutkowska, K.; Wawrusiewicz-Kurylonek, N.; Kowalewska, E.; Matowicka-Karna, J. Proinflammatory Cytokines (IL-1, -6, -8, -15, -17, -18, -23, TNF- $\alpha$ ) Single Nucleotide Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis—A Literature Review. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 2106.
23. Kazmi, S.; Khan, M.A.; Shamma, T.; Altuhami, A.; Ahmed, H.A.; Mohammed Assiri, A.; Broering, D.C. Targeting Interleukin-10 Restores Graft Microvascular Supply and Airway Epithelium in Rejecting Allografts. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 1269
24. S. Barrientos, H. Brem, O. Stojadinovic, et al. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing *Wound Repair Regen.*, 22 (78) (2014), Article 569, 10.1111/wrr.12205
25. P. Bao, A. Kodra, M. Tomic-Canic, M.S. Golinko, H.P. Ehrlich, H. Brem The role of vascular endothelial growth factor in wound healing *J. Surg. Res.*, 153 (2) (2009), pp. 347-358, 10.1016/j.jss.2008.04.023
26. Yu C, Xu ZX, Hao YH, Gao YB, Yao BW, Zhang J, Wang B, Hu ZQ, Peng RY. A novel microcurrent dressing for wound healing in a rat skin defect model. *Mil Med Res*. 2019 Jul 23;6(1):22.
27. Manuelpillai U, Tchongue J, Lourensz D, Vaghjiani V, Samuel CS, Liu A, Sievert W, Sievert W. Transplantation of human amnion epithelial cells reduces hepatic fibrosis in immunocompetent CCl<sub>4</sub>-- treated mice. *Cell Transplant*. 2010; 19:1157–1168.
28. Lee HS. Paracrine role for TGF- $\beta$ -induced CTGF and VEGF in mesangial matrix expansion in progressive glomerular disease. *Histology and Histopathology*. 2012 Sep;27(9):1131-1141.
29. Fitzmaurice SD, Sivamani RK, Isseroff RR. Terapias antioxidantes para cicatrização de feridas: um guia clínico para produtos atualmente disponíveis comercialmente. *Skin PharmacolPhysiol* . 2011; 24 ( 3 ):113-126.
30. Dilsiz OY, Akhundzada I, Bilkay U, et al. Effects of metoclopramide and ranitidine on survival of flat template mcfarlane skin flaps in a rat wound healing model. *Drug Res*. 2013; 63:1–7.
31. Kumar P, Kumar D, Sikkaa P, Singh P. Sericin supplementation improves semen freezability of buffalo bulls by minimizing oxidative stress during cryopreservation. *AnimReprod Sci*. 2015;152:26–31.
32. C. Feng, M. Yang, M. Lan et al., “ROS: crucial intermediators in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration,” *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2017, Article ID 5601593, 12 pages, 2017.
33. Y. Hu, L. Huang, M. Shen et al., “Pioglitazone protects compression-mediated apoptosis in nucleus pulposus mesenchymal stem cells by suppressing oxidative stress,” *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2019, Article ID 4764071, 2019.
34. L. Zhu, Y. Shi, L. Liu, H. Wang, P. Shen, and H. Yang, “Mesenchymal stem cells-derived exosomes ameliorate nucleus pulposus cells apoptosis via delivering miR-142-3p: therapeutic potential for intervertebral disc degenerative diseases,” *Cell cycle*, vol. 19, no. 14, pp. 1727–1739, 2020.
35. Hopper, R.A.; Woodhouse, K.; Semple, J.L. Acellularization of Human Placenta with Preservation of the Basement Membrane. *Ann. Plast. Surg*. 2003, 51, 598–602. Zhang, J.; Liu, Z.; Li, Y.; You, Q.; Yang, J.; Jin, Y.; Zou, G.; Tang, J.; Ge, Z.; Liu, Y. FGF-2-Induced Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Seeded on a Human Acellular Amniotic Membrane Scaffold Accelerated Tendon-to-Bone Healing in a Rabbit Extra-Articular Model. *Stem Cells Int*. 2020, 2020, 1–14.
36. Han, X.; Ma, Y.; Lu, X.; Li, W.; Xia, E.; Li, T.-C.; Zhang, H.; Huang, X. Transplantation of Human Adipose Stem Cells Using Acellular Human Amniotic Membrane Improves Angiogenesis in Injured Endometrial Tissue in a Rat Intrauterine Adhesion Model. *Cell Transplant*. 2020, 29.
37. Muthukumar T, Anbarasu K, Prakash D, Sastry TP. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-in vivo wound healing. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;121:178–188.
38. Zhang J, Zhang CW, Du LQ, Wu XY. Acellular porcine corneal matrix as a carrier scaffold for cultivating human corneal epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Int J Ophthalmol*. 2016 Jan 18;9(1):1-8. doi: 10.18240/ijo.2016.01.01.
39. Hatzfeld AS, Pasquesoone L, Germain N, Danzé P, Drucbert A, Tardivel M, Marchetti P, DuquennoyMartinot V, Guerreschi P, Marchetti P. Benefits of cryopreserved human amniotic membranes in association with conventional treatments in the management of full-thickness burns. *Int Wound J*. 2019;16:1354–1364.
40. Francisco JC, Uemura L, Simeoni RB, da Cunha RC, Mogharbel BF, Simeoni PRB, Naves G, Napimoga MH, No-ronha L, Carvalho KAT, Moreira LFP, Guarita-Souza LC. Acellular Human Amniotic Membrane Scaffold

with 15d-PGJ2 Nanoparticles in Postinfarct Rat Model. *Tissue Eng Part A*. 2020 Nov;26(21-22):1128-1137. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0340.

Francisco JC, Uemura L, Simeoni RB, da Cunha RC, Mogharbel BF, Simeoni PRB, Naves G, Napimoga MH, No-ronha L, Carvalho KAT, Moreira LFP, Guarita-Souza LC. Acellular Human Amniotic Membrane Scaffold with 15d-PGJ2 Nanoparticles in Postinfarct Rat Model. *Tissue Eng Part A*. 2020 Nov;26(21-22):1128-1137. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0340. Epub 2020 Aug 18

## 6 CONCLUSÃO

A ocorrência de feridas de pele na população deve aumentar nos próximos anos, assim como a ocorrência de feridas crônicas. Encontrar soluções eficientes e de baixo custo será cada vez mais importante, entretanto o processo de regeneração tecidual não é completamente compreendido.

Nosso modelo, utilizando células tronco autólogas originária da medula óssea injetadas na ferida induzida em ratos recoberta com a membrana amniótica descelularizada comprovou ser eficiente em reduzir a atividade pró-inflamatória, reduzir a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e acelerar a produção de colágeno, por um mecanismo local. Portanto, a associação entre estes dois biomateriais pode ser considerada como uma possível terapia no tratamento de feridas.

## REFERÊNCIAS

1. DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Textbook of veterinary anatomy**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2010.
2. TÉOT, L. *et al.* (Ed.). **Textbook on scar management**: state of the art management and emerging technologies. Cham: Springer, 2020.
3. BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de condutas para úlceras neurotróficas e traumáticas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
4. FIOR MARKETS. **Global skin and wound care market is expected to reach USD 25.98 billion by 2025**: fior markets. 2020. Disponível em: <https://www.globenewswire.com/news-release/2020/03/04/1995036/0/en/Global-Skin-and-Wound-Care-Market-Is-Expected-to-Reach-USD-25-98-Billion-by-2025-Fior-Markets.html>. Acesso em: 22 fev. 2021.
5. EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. 265, p. 265sr6, 2014.
6. NASALAPURE, A. V. *et al.* Tissue engineering of skin: a review. **Trends Biomater. Artif. Organs.**, v. 31, n. 2, p. 69–80, 2017.
7. CLARK, R. A. F. Wound repair: lessons for tissue engineering. *In*: LANZA, R. *et al.* (Ed.). **Principles of tissue engineering**. Amsterdam: Elsevier, 1997. p. 737-768.
8. JÄRBRINK, K. *et al.* Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. **Syst. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 152, 2016.
9. CALEY, M. P.; MARTINS, V. L.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and wound healing. **Adv. Wound Care**, v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015.
10. XIAO, T. *et al.* Proinflammatory cytokines regulate epidermal stem cells in wound epithelialization. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 11, n. 1, p. 232, 2020.
11. HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Exp. Cell Res.**, v. 316, n. 14, p. 2213-2219, 2010.
12. PESSOLATO, A. G. *et al.* Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. **Burns**, v. 37, n. 7, p. 1192-1201, 2011.

13. LEAVITT, T. *et al.* Scarless wound healing: finding the right cells and signals. **Cell Tissue Res.**, v. 365, n. 3, p. 483-493, 2016.
14. HOCKING, A. M. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous wounds. **Adv. Wound Care**, v. 1, n. 4, p. 166-171, 2012
15. VASANTHAN, J. *et al.* Role of human mesenchymal stem cells in regenerative therapy. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 54, 2020.
16. NAVAS, A. *et al.* Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of human amniotic membrane mesenchymal stem cells and their potential in corneal repair. **Stem Cells Transl. Med.**, v. 7, n. 12, p. 906-917, 2018.
17. DAI, Y. *et al.* Skin epithelial cells in mice from umbilical cord blood mesenchymal stem cells. **Burns**, v. 33, n. 4, p. 418-428, 2007.
18. KANJI, S.; DAS, H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. **Mediators Inflamm.**, v. 2017, p. 5217967, 2017.
19. BOYKO, T. V.; LONGAKER, M. T.; YANG, G. P. Laboratory models for the study of normal and pathologic wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 139, n. 3, p. 654-662, 2017.
20. WANG, M. *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy for burn wound healing. **Burns Trauma**, v. 9, p. tkab002, 2021.
21. CHENG, A. Y.; GARCÍA, A. J. Engineering the matrix microenvironment for cell delivery and engraftment for tissue repair. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 24, n. 5, p. 864-871, 2013.
22. WELLING, R. K. S. **Análise histológica da membrana amniótica utilizada na reconstrução do pericárdio em ratos.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2012.
23. SOLARTE DAVID, V. A. *et al.* Decellularized tissues for wound healing: towards closing the gap between scaffold design and effective extracellular matrix remodeling. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 10, p. 821852, 2022.
24. TODA, A. *et al.* The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 105, n. 3, p. 215-228, 2007.
25. DUSSOYER, M.; MICHOPPOULOU, A.; ROUSSELLE, P. Decellularized scaffolds for skin repair and regeneration. **Appl. Sci.**, v. 10, n. 10, p. 3435, 2020.

26. KHASHJOORI, B. K. *et al.* Evaluation of the effects of adipose derived mesenchymal stem cells cultured on decellularized amniotic membrane in wound healing of distal part of the limbs in horse. **Iran. J. Vet. Med.**, v. 13, n. 1, p. 11–25, 2019.
27. LEAL-MARIN, S. *et al.* Human amniotic membrane: a review on tissue engineering, application, and storage. **J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.**, v. 109, n. 8, p. 1198-1215, 2021.
28. DA, L. C. *et al.* Membranous extracellular matrix-based scaffolds for skin wound healing. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, p. 1796, 2021
29. DA, L. C.; HUANG, Y. Z.; XIE, H. Q. Progress in development of bioderived materials for dermal wound healing. **Regen. Biomater.**, v. 4, n. 5, p. 325-334, 2017.
30. UWIZEYIMANA, T. *et al.* The multi sectorial approach to COVID-19 pandemic in limited-resource settings: discussing rwandan experience. **J. Public Health Int.**, v. 3, n. 4, p. 19-24, 2021.
31. SONG, M. *et al.* The repairing of full-thickness skin deficiency and its biological mechanism using decellularized human amniotic membrane as the wound dressing. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.**, v. 77, p. 739-747, 2017.
32. CRAPO, P. M.; GILBERT, T. W.; BADYLAK, S. F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. **Biomaterials**, v. 32, n. 12, p. 3233-3243, 2011.
33. RODRIGUES, M. *et al.* Wound healing: a cellular perspective. **Physiol. Rev.**, v. 99, n. 1, p. 665-706, 2019.
34. NAIK, S. *et al.* Commensal-dendritic-cell interaction specifies a unique protective skin immune signature. **Nature**, v. 520, n. 7545, p. 104-108, 2015.
35. DEHDASHTIAN, A. *et al.* Anatomy and physiology of the skin. In: RIKER, A. I. (Ed.). **Melanoma: a modern multidisciplinary approach**. Cham: Springer, 2018. p. 15-26.
36. AUMAILLEY, M.; KRIEG, T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 106, n. 2, p. 209-214, 1996.
37. STEPP, M. A. *et al.* Alpha 6 beta 4 integrin heterodimer is a component of hemidesmosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 22, p. 8970–8974, 1990.

38. KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **J. Dermatol. Nurses. Assoc.**, v. 3, n. 4, p. 203–213, 2011.
39. LAZARUS, G. S. *et al.* Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair Regen.*, v. 2, n. 3, p. 165–170, 1994.
40. MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares: parte I. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393–408, 2003.
41. ANGELI, A. L.; BRANDÃO, C. V. S.; FREITAS, R. S. Cirurgia reconstrutiva: retalhos cutâneos em pequenos animais. **MEDVEP Rev. Cient. Med. Vet.**, v. 4, n. 12, p. 87-95, 2006.
42. POWERS, J. G. *et al.* Wound healing and treating wounds: chronic wound care and management. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 74, n. 4, p. 607–625, 2016.
43. VALACCHI, G. *et al.* Emerging topics in cutaneous wound repair. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1259, n. 1, p. 136–144, 2012.
44. KONOFAOS, P.; VER HALEN, J. P. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. **J. Reconstr. Microsurg.**, v. 29, n. 3, p. 149–163, 2013.
45. KARTUS, J.; MOVIN, T.; KARLSSON, J. Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. **Arthroscopy**, v. 17, n. 9, p. 971–980, 2001.
46. ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 2, n. 5, p. 510–525, 2010.
47. KIM, Y. *et al.* Extracellular matrix revisited: roles in tissue engineering. **Int. Neurourol. J.**, v. 20, n. 2, p. 168, 2016.
48. ROUSSELLE, P.; MONTMASSON, M.; GARNIER, C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. **Matrix Biol.**, v. 75–76, p. 12–26, 2019.
49. GENTILE, P. *et al.* Systematic review: advances of fat tissue engineering as bioactive scaffold, bioactive material, and source for adipose-derived mesenchymal stem cells in wound and scar treatment. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 12, n. 1, p. 318, 2021.
50. TOTTOLI, E. M. *et al.* Skin wound healing process and new emerging technologies for

skin wound care and regeneration. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 8, p. 735, 2020.

51. GURTNER, G. C. *et al.* Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

52. KRAFTS, K. P. Tissue repair: the hidden drama. **Organogenesis**, v. 6, n. 4, p. 225–233, 2010.

53. EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 3, p. 514–525, 2007.

54. BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 117, n. 7, p. 1e–S–32e–S, 2006.

55. RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **J. Cell Commun. Signal.**, v. 10, n. 2, p. 103–120, 2016.

56. KRZYSZCZYK, P. *et al.* The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. **Front. Physiol.**, v. 9, p. 419, 2018.

57. XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular matrix reorganization during wound healing and its impact on abnormal scarring. **Adv. Wound Care**, v. 4, n. 3, p. 119–136, 2015.

58. FORBES, S. J.; ROSENTHAL, N. Preparing the ground for tissue regeneration: From mechanism to therapy. **Nat. Med.**, v. 20, n. 8, p. 857–869, 2014.

59. REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **Eur. Surg. Res.**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

60. GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: from haemostasis to wound healing and beyond. **Blood Rev.**, v. 29, n. 3, p. 153–162, 2015.

61. ZAIDI, A.; GREEN, L. Physiology of haemostasis. **Anaesth. Intensive Care Med.**, v. 20, n. 3, p. 152–158, 2019.

62. ETULAIN, J. Platelets in wound healing and regenerative medicine. **Platelets**, v. 29, n. 6, p. 556–568, 2018.

63. SCULLY, D. *et al.* Optimising platelet secretomes to deliver robust tissue-specific regeneration. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 14, n. 1, p. 82–98, 2020.

64. CARVALHO, A. C. C. D.; GOLDENBERG, R. C. D. S. **Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações**. São Paulo: Atheneu, 2012.
65. BARRIENTOS, S. *et al.* Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 16, n. 5, p. 585–601, 2008.
66. VIDINSKÝ, B. *et al.* Histological study of the first seven days of skin wound healing in rats. **Acta Vet. Brno**, v. 75, n. 2, p. 197–202, 2006.
67. MAXSON, S. E. *et al.* Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells Transl. Med.**, v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012.
68. CHEN, L.; DIPIETRO, L. A. Toll-like receptor function in acute wounds. **Adv. Wound Care**, v. 6, n. 10, p. 344–355, 2017.
69. MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.
70. VESTWEBER, D. How leukocytes cross the vascular endothelium. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 15, n. 11, p. 692–704, 2015.
71. YUKAMI, T. *et al.* Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 3, p. 519–531, 2007.
72. SUBRAMANIAM, M. *et al.* Role of endothelial selectins in wound repair. **Am. J. Pathol.**, v. 150, n. 5, p. 1701–1709, 1997.
73. KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
74. BONIAKOWSKI, A. E. *et al.* Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing. **J. Immunol.**, v. 199, n. 1, p. 17–24, 2017.
75. LIN, Q. *et al.* Impaired wound healing with defective expression of chemokines and recruitment of myeloid cells in TLR3-deficient mice. **J. Immunol.**, v. 186, n. 6, p. 3710–3717, 2011.
76. YOO, S. K.; HUTTENLOCHER, A. Spatiotemporal photolabeling of neutrophil trafficking during inflammation in live zebrafish. **J. Leukoc. Biol.**, v. 89, n. 5, p. 661–667, 2011.
77. WANG, J. *et al.* Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. **Science**, v. 358, n. 6359, p. 111–116, 2017.

78. RODERO, M. P. *et al.* In vivo imaging reveals a pioneer wave of monocyte recruitment into mouse skin wounds. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e108212, 2014.
79. MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, n. 4, p. 344–346, 2005.
80. HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 2, p. 231–255, 2004.
81. XUE, J. *et al.* Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 274–288, 2014.
82. LAVIN, Y. *et al.* Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312–1326, 2014.
83. GINHOUX, F. *et al.* New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. **Nat. Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 34–40, 2016.
84. DELAVARY, B. M. *et al.* Macrophages in skin injury and repair,” **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 753–762, 2011.
85. KHALLOU-LASCHET, J. *et al.* Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8852, 2010.
86. DAS, A. *et al.* Role of Micro-Rna-21 in the resolution of wound inflammation. **J. Immunol.**, v. 192, n. 3, p. 1120–1129, 2014.
87. NELSON, S. M.; LEI, X.; PRABHU, K. S. Selenium levels affect the IL-4-induced expression of alternative activation markers in murine macrophages. **J. Nutr.**, v. 141, n. 9, p. 1754–1761, 2011.
88. LIN, Y. W. *et al.* Receptor-interacting protein 140 orchestrates the dynamics of macrophage M1/M2 polarization. **J. Innate Immun.**, v. 8, n. 1, p. 97–107, 2016.
89. CAMPBELL, L. *et al.* Local arginase 1 activity is required for cutaneous wound healing. **J. Invest. Dermatol.**, v. 133, n. 10, p. 2461–2470, 2013.
90. JETTEN, N. *et al.* Wound administration of M2-polarized macrophages does not improve murine cutaneous healing responses. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.
91. MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is

- detrimental to wound healing in mice. **Am. J. Pathol.**, v. 175, n. 6, p. 2454–2462, 2009.
92. LUCAS, T. *et al.* Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **J. Immunol.**, v. 184, n. 7, p. 3964–3977, 2010.
93. NOSBAUM, A. *et al.* Regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing. **J. Immunol.**, v. 196, n. 5, p. 2010–2014, 2016.
94. KEYES, B. E. *et al.* Impaired epidermal to dendritic T cell signaling slows wound repair in aged skin. **Cell**, v. 167, n. 5, p. 1323–1338.e14, 2016.
95. WELLER, K. *et al.* Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. **FASEB J.**, v. 20, n. 13, p. 2366–2368, 2006.
96. SHAW, T. J.; MARTIN, P. Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 42, p. 29–37, 2016.
97. LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin. Dermatol.**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.
98. ROUSSELLE, P.; BRAYE, F.; DAYAN, G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 146, p. 344–365, 2019.
99. ITO, M. *et al.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. **Nature**, v. 447, n. 7142, p. 316–320, 2007.
100. BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatol. Surg.**, v. 31, n. 6, p. 674–686, 2005.
101. DRISKELL, R. R. *et al.* Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v. 504, n. 7479, p. 277–281, 2013.
102. HUANG, S. P. *et al.* Cyclooxygenase-2 increases hypoxia-inducible factor-1 and vascular endothelial growth factor to promote angiogenesis in gastric carcinoma. **J. Biomed. Sci.**, v. 12, n. 1, p. 229–241, 2005.
103. FERREIRA, A. M. *et al.* Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 46, n. 3, p. 752–760, 2012.
104. HARTLAPP, I. *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial

cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB J.**, v. 15, n. 12, p. 2215–2224, 2001.

105. OLIVEIRA, I. V. P.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta Vet. Bras.**, v. 6, n. 4, p. 267–271, 2012.

106. TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano: Regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 2002.

107. CHENG, W. *et al.* The content and ratio of type I and III collagen in skin differ with age and injury. **African J. Biotechnol.**, v. 10, n. 13, p. 2524–2529, 2011.

108. WANG, L. *et al.* Exosomes secreted by human adipose mesenchymal stem cells promote scarless cutaneous repair by regulating extracellular matrix remodelling. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 13321, 2017.

109. DARBY, I. A. *et al.* Clinical, cosmetic and investigational dermatology dovepress fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, v. 4, n. 7, p. 301–311, 2014.

110. SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 17, n. 2, p. 153–162, 2009.

111. WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v. 77, n. 3, p. 509–528, 1997.

112. DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci.**, v. 9, p. 283–289, 2004.

113. YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery**, v. 29, n. 10, p. 475–479, 2011.

114. ALMINE, J. F.; WISE, S. G.; WEISS, A. S. Elastin signaling in wound repair. **Birth Defects Res. Part C Embryo Today**, v. 96, n. 3, p. 248–257, 2012.

115. AMADEU, T. P. *et al.* Fibrillin-1 and elastin are differentially expressed in hypertrophic scars and keloids. **Wound Repair Regen.**, v. 12, n. 2, p. 169–174, 2004.

116. HINZ, B. *et al.* Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 3, p. 1009–1020, 2001.

117. DARBY, I. A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, v. 7, p. 301–311, 2014.

118. STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am. J. Surg.**, v. 176, n. 2A, p. 26S-38S, 1998.
119. RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1243, n. 1, p. 88–102, 2011.
120. LAROUCHE, J. *et al.* Immune regulation of skin wound healing: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Adv. Wound Care**, v. 7, n. 7, p. 209–231, 2018.
121. NGADIMAN, N. H. A. *et al.* A review of evolution of electrospun tissue engineering scaffold: From two dimensions to three dimensions. **Proc. Inst. Mech. Eng. Part H J. Eng. Med.**, v. 231, n. 7, p. 597–616, 2017.
122. YANG, S. *et al.* The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Eng.**, v. 7, n. 6, p. 679–689, 2001.
123. IKADA, Y. (Ed.). Challenges in tissue engineering. *In*: IKADA, Y. (Ed.). **Tissue engineering: fundamentals and applications**. London: Elsevier, 2006. p. 423–462.
124. VACANTI, J. P.; LANGER, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **Lancet**, v. 354, sup. 1, p. 32–34, 1999.
125. FÉNELON, M. *et al.* Applications of human amniotic membrane for tissue engineering. **Membranes**, v. 11, n. 6, p. 1–27, 2021.
126. MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 80–86, 2004.
127. NAUNG, N. Y.; SHEHATA, E.; VAN SICKELS, J. E. resorbable versus nonresorbable membranes: when and why? **Dent. Clin. North Am.**, v. 63, n. 3, p. 419–431, 2019.
128. GUALDI, T. *et al.* In vitro osteodifferentiation of intact human amniotic membrane is not beneficial in the context of bone repair. **Cell Tissue Bank.**, v. 20, n. 3, p. 435–446, 2019.
129. GRÉMARE, A. *et al.* Cartography of the mechanical properties of the human amniotic membrane. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater.**, v. 99, p. 18–26, 2019.
130. FENELON, M. *et al.* Assessment of fresh and preserved amniotic membrane for guided bone regeneration in mice. **J. Biomed. Mater. Res. - Part A**, v. 108, n. 10, p. 2044–2056, 2020.

131. ODET, S. *et al.* Surgical application of human amniotic membrane and amnion-chorion membrane in the oral cavity and efficacy evaluation: corollary with ophthalmological and wound healing experiences. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 9, p. 685128, 2021.
132. ZHANG, L. *et al.* An updated view on stem cell differentiation into smooth muscle cells. **Vascul. Pharmacol.**, v. 56, n. 5-6, p. 280-287, 2012.
133. PETRIC, I. *et al.* Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. **Acta Clin. Croat.**, v. 41, n. 4, p. 23–28, 2002.
134. SORSBY, A.; SYMONS, H. M. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye (burns of the second degree). **Br. J. Ophthalmol.**, v. 30, p. 337–345, 1946.
135. KIRSNER, R. S. *et al.* Comparative effectiveness of a bioengineered living cellular construct vs. a dehydrated human amniotic membrane allograft for the treatment of diabetic foot ulcers in a real world setting. **Wound Repair Regen.**, v. 23, n. 5, p. 737–744, 2015.
136. DAVIS, J. S. Skin transplantation with a review of 550 cases at the Johns Hopkins Hospital. **Johns Hopkins Med. J.**, v. 14, p. 542–549, 1910.
137. BINTE ATIQUE, F. *et al.* Effects of gamma irradiation on bacterial microflora associated with human amniotic membrane. **Biomed Res. Int.**, v. 2013, p. 586561, 2013.
138. NIKNEJAD, H. *et al.* Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **Eur. Cells Mater.**, v. 15, p. 88–99, 2008.
139. PAROLINI, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300–311, 2008.
140. PASQUIER, J. C.; DORET, M. Les membranes fœtales: développement embryologique, structure et physiopathologie de la rupture prématurée avant terme. **J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.**, v. 37, n. 6, p. 579–588, 2008.
141. ARRIZABALAGA, J. H.; NOLLERT, M. U. Human amniotic membrane: a versatile scaffold for tissue engineering. **ACS Biomater. Sci. Eng.**, v. 4, n. 7, p. 2226–2236, 2018.
142. BRYANT-GREENWOOD, G. D. The extracellular matrix of the human fetal membranes: Structure and function. **Placenta**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 1998.
143. MALAK, T. M. *et al.* Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III,

IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. **Placenta**, v. 14, n. 4, p. 385–406, 1993.

144. SILINI, A. R. *et al.* Perinatal derivatives: where do we stand? A roadmap of the human placenta and consensus for tissue and cell nomenclature. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, v. 8, p. 610544, 2020.

145. GATTAZZO, F.; URCIUOLO, A.; BONALDO, P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1840, n. 8, p. 2506-2519, 2014.

146. RIAU, A. K. *et al.* Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. **Biomaterials**, v. 31, n. 2, p. 216–225, 2010.

147. RODRÍGUEZ-ARES, M. T. *et al.* Effects of lyophilization on human amniotic membrane. **Acta Ophthalmol.**, v. 87, n. 4, p. 396–403, 2009.

148. NIELSEN, P. **Coastal and estuarine processes**. Austális: The University of Queensland, 2009.

149. KOIZUMI, N. *et al.* Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.**, v. 245, n. 1, p. 123–134, 2007.

150. LIM, R. Concise review: fetal membranes in regenerative medicine: new tricks from an old dog? **Stem Cells Transl. Med.**, v. 6, n. 9, p. 1767–1776, 2017.

151. MAMEDE, A. C.; BOTELHO, M. F. (Ed.) **Amniotic membrane: origin, characterization and medical applications**. Cham: Springer, 2015.

152. BARBUTO, R. C. *et al.* Use of the amniotic membrane to cover the peritoneal cavity in the reconstruction of the abdominal wall with polypropylene mesh in rats. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 42, n. 1, p. 49–55, 2015.

153. GUÉRIN, L. P. *et al.* The human Tissue-Engineered Cornea (hTEC): recent progress. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 3, p. 1291, 2021.

154. HUSSEY, G. S.; DZIKI, J. L.; BADYLAK, S. F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. **Nat. Rev. Mater.**, v. 3, p. 159-173, 2018.

155. EWEIDA, A. M.; MAREI, M. K. Naturally occurring extracellular matrix scaffolds for dermal regeneration: do they really need cells? **Biomed. Res. Int.**, v. 2015, p. 839694, 2015.
156. FARHADIHOSSEINABADI, B. *et al.* Amniotic membrane and its epithelial and mesenchymal stem cells as an appropriate source for skin tissue engineering and regenerative medicine. **Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.**, v. 46, sup. 2, p. 431-440, 2018.
157. ZHU, X. *et al.* The comparition of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res.**, v. 350, n. 2, p. 277-287, 2012.
158. BACAKOVA, L. *et al.* Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. **Biotechnol. Adv.**, v. 36, n. 4, p. 1111-1126, 2018.
159. GOMES, R. S. Perspectivas do uso de células-tronco em cirurgia plástica. **Rev. Bras. Cir. Plást.**, v. 26, n. 1, p. 151-159, 2011.
160. FEYEN, D. A. M. *et al.* Stem cell-based therapy: Improving myocardial cell delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 106, p. 104-115, 2016.
161. LÓPEZ LARREA, C.; LÓPEZ VÁZQUEZ, A.; ÁLVAREZ, B. S. **Stem cell transplantation**. Texas: Springer, 2012.
162. KATAOKA, K. *et al.* Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. **Am. J. Pathol.**, v. 163, n. 4, p. 1227-1231, 2003.
163. BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 36, n. 4, p. 568-584, 2004.
164. WU, Y. *et al.* Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. **Wound Repair Regen.**, v. 15, sup. 1, p. S18-S26, 2007.
165. REHEN, S.; PAULSEN, B. **Células-tronco. O que são? Para que servem?** Rio de Janeiro: Vieira & Lent, 2007.
166. ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, sup. 1, p. 11830-11835.
167. VERSTAPPEN, J. *et al.* A functional model for adult stem cells in epithelial tissues. **Wound Repair Regen.**, v. 17, n. 3, p. 296-305, 2009.

168. WANG, Y. *et al.* Future application of hair follicle stem cells: capable in differentiation into sweat gland cells. **Chin. Med. J.**, v. 126, n. 18, p. 3545-3552, 2013.
169. SASAKI, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J. Immunol.**, v. 180, n. 4, p. 2581-2587, 2008.
170. SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 1, n. 4, p. 30, 2010.
171. WU, Y.; ZHAO, R. C.; TREDGET, E. E. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem Cells**, v. 28, n. 5, p. 905-915, 2010.
172. BROWER, J. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy and delivery systems in nonhealing wounds. **Adv. Skin Wound Care**, v. 24, n. 11, p. 524-532, 2011.
173. 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. 3, n. 3, p. 20, 2012.
174. HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair Regen.**, v. 22, n. 3, p. 313-325, 2014.
175. VALLE-PRIETO, A.; CONGET, P. A. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. **Stem Cells Dev.**, v. 19, n. 12, p. 1885-1893, 2010.
176. FALANGA, V. *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.**, v. 13, n. 6, p. 1299-1312, 2007.
177. WU, Y. *et al.* Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.
178. LEIBACHER, J.; HENSCHLER, R. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 7, p. 7, 2016.
179. MCFARLIN, K. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair Regen.**, v. 14, n. 4, p. 471-788, 2006.

180. BEYER NARDI, N., SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handb. Exp. Pharmacol.**, n. 174, p. 249-282, 2006.
181. MOSELEY, T. A.; ZHU, M.; HEDRICK, M. H. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 118, n. 3, p. 121S-128S, 2006.
182. LAM, M. T.; LONGAKER, M. T. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, v. 6, sup. 3, p. s80-s86, 2012.
183. TAMAI, N. *et al.* Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 59, n. 1, p. 110-117, 2002.
184. MOYER, K. L.; TREPANIER, L. A. Erythrocyte glutathione and plasma cysteine concentrations in young versus old dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 234, n. 1, p. 95-99, 2009.
185. SILVEIRA, P. C. L. *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. **Lasers Med. Sci.**, v. 26, p. 125–131, 2011.
186. SCHÄFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacol. Res.**, v. 58, n. 2, p. 165-171, 2008
187. BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
188. SEN, C. K.; ROY, S. Redox signals in wound healing. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1780, n. 11, p. 1348-1361, 2008.
189. DUNNILL, C. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **Int. Wound J.**, v. 14, n. 1, p. 89–96, 2017.
190. SCIALÒ, F.; FERNÁNDEZ-AYALA, D. J.; SANZ, A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ros signaling: potential roles in health and disease. **Front. Physiol.**, v. 8, p. 428, 2017.
191. SEN, C. K. Wound healing essentials: let there be oxygen. **Wound Repair Regen.**, v. 17,

n. 1, p. 1–18, 2009.

192. ZHAO, R. Z. *et al.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling. **Int. J. Mol. Med.**, v. 44, p. 3–15, 2019.

193. BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 547–581, 1998.

194. CANO SANCHEZ, M. *et al.* Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 98, 2018.

195. RODRIGUEZ, P. G. *et al.* The role of oxygen in wound healing: A review of the literature. **Dermatol. Surg.**, v. 34, p. 1159–1169, 2008.

196. PONUGOTI, B. *et al.* FOXO1 promotes wound healing through the up-regulation of TGF-beta1 and prevention of oxidative stress. **J. Cell Biol.**, v. 203, p. 327–343, 2013.

197. JOHNSON, J. B. *et al.* A cut above the rest: oxidative stress in chronic wounds and the potential role of polyphenols as therapeutics. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 74, n. 4, p. 485-502, 2022.

198. ANDRE-LEVIGNE, D. *et al.* Reactive oxygen species and nox enzymes are emerging as key players in cutaneous wound repairs. **Int. J. Med. Sci.**, v. 18, p. 2149, 2017.

199. KLYUBIN, I. V.; KIRPICHNIKOVA, K. M.; GAMALEY, I. A. Hydrogen peroxide-induced chemotaxis of mouse peritoneal neutrophils. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 70, p. 347–351, 1996.

200. GNECCHI, M. *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circ. Res.**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

201. VANNELLA, K. M.; WYNN, T. A. Mechanisms of organ injury and repair by macrophages. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 79, p. 593-617, 2017.

202. WILKINSON, H. N.; HARDMAN, M. J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biol.**, v. 10, n. 9, p. 200223, 2020.

203. PASPARAKIS, Manolis; HAASE, Ingo; NESTLE, Frank O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 14, n. 5, p. 289-301, 2014.

204. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1986 Jun;83(12):4167-71.
205. Rorison P, Thomlinson A, Hassan Z, Roberts SA, Ferguson MW, Shah M. Longitudinal changes in plasma Transforming growth factor beta-1 and post-burn scarring in children. **Burns**. 2010 Feb;36(1):89-96. Epub 2009 Jun 12.
206. Pastar I, Stojadinovic O, Krzyzanowska A, Barrientos S, Stuelten C, Zimmerman K, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. **Mol Med**. 2010 Mar;16(3-4):92-101. Epub 2010 Jan 6.

## ANEXOS

### ANEXO A - CEUA – Comitê de Ética para uso de Animais



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 06 de junho de 2019.

#### PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

**REGISTRO DO PROJETO:** 01288 – (emenda)

**TÍTULO DO PROJETO:** EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MONONUCLEARES ASSOCIADA A MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS EM RATOS

#### PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CÉSAR GUARITA SOUZA

#### EQUIPE DE PESQUISA

ROSSANA BAGGIO SIMEONI, ALINE LURI TAKEJIMA, MILKA LIE TAKEJIMA

#### INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

#### ESCOLA

Escola de Medicina – Medicina

|                     |                          |                                                |                      |
|---------------------|--------------------------|------------------------------------------------|----------------------|
| VIGÊNCIA DO PROJETO | 11/2018 a 11/2020        | QUANTIDADE DE ANIMAIS                          | Ver parecer original |
| ESPECIE/LINHAGEM    | <i>Rattus norvegicus</i> | Nº SISBIO<br>(Somente animais de vida livre)   | Não se aplica        |
| SEXO                | Macho                    | ATIVIDADES<br>(Somente animais de vida livre)  | Não se aplica        |
| IDADE / PESO        | Adultos / 400g           | ESPECIE – GRUPO<br>TAXONÔMICOS (de vida livre) | Não se aplica        |
| ORIGEM DO ANIMAL    | Biotério USFC            | LOCAL (IS)<br>(Somente animais de vida livre)  | Não se aplica        |

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO COM RECOMENDAÇÃO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

**Recomendação:** Este protocolo está aprovado com a condição de que o experimento ocorra somente nas datas estipuladas na autorização da Técnica Operatória.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador - CEUA PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

## ANEXO B



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 24 de junho de 2018.

## PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01238 – 1ª versão

TÍTULO DO PROJETO: REPARAÇÃO TRAQUEAL DE COELHOS COM MATRIZ ACELULAR CULTIVADAS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE 15-DEOXY-12, 14 PROSTAGLANDINA/2

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DE TRAQUEOSTOMIAS EM COELHOS

## PESQUISADOR RESPONSÁVEL

LUIZ CÉZAR GUARITA SOUZA

## EQUIPE DE PESQUISA

ANNA FLÁVIA RIBEIRO DOS SANTOS, FLÁVIA LUCENA

## INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

## CURSO

Medicina

|                     |                              |                                                |               |
|---------------------|------------------------------|------------------------------------------------|---------------|
| VIGÊNCIA DO PROJETO | 06/2018 A 12/2018            | QUANTIDADE DE ANIMAIS                          | 20            |
| ESPECIE/LINHAGEM    | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | Nº SISBIO<br>(Somente animais de vida livre)   | Não se aplica |
| SEXO                | F                            | ATIVIDADES<br>(Somente animais de vida livre)  | Não se aplica |
| IDADE / PESO        | Adulto / 3,0 a 3,6 kg        | ESPECIE – GRUPO<br>TAXONÔMICOS (de vida livre) | Não se aplica |
| ORIGEM DO ANIMAL    | FEGA PUCPR                   | LOCAL (IS)<br>(Somente animais de vida livre)  | Não se aplica |

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi APROVADO pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil  
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

## ANEXO C – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

### 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu, na Carolina Freire Damilho, RG nº 41.296.429 estou sendo convidada a participar de um estudo denominado "Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular associada a nanopartículas de 15-deoxy- $\Delta^{12}$ , 14 prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

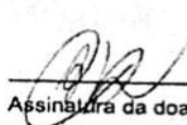
Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guanira Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flavia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Lí, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concorde, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

  
Assinatura da doadora da placenta

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável

Tel: (41)

\_\_\_\_\_  
Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR

Tel: (41) 996859499

Curitiba 27 de setembro de 2018.

# 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios sobre o estudo de pesquisa clínica no qual você está sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido se concordar em participar deste estudo.

Eu, Martha Ferreira Aguiar da Silva, RG nº 91.572.696-9, estou sendo convidada a participar de um estudo denominado "Reparação traqueal de coelhos com matriz acelular associada a nanopartículas de 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandina J2".

Sei que para o avanço da pesquisa a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso eu aceite participar desta pesquisa, doarei a minha placenta após o nascimento da minha criança assim como responderei a um questionário médico, se necessário.

Entendo que a placenta é um órgão da gestação e que após o término do parto sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não havendo prejuízo para a mãe e nem para o meu (minha) filho (a) recém-nascido (a).

Entendo que a placenta será utilizada para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

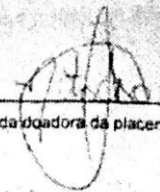
Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dr. Luiz César Guanta Souza e a Mestranda em Ciências da Saúde Anna Flavia Ribeiro dos Santos com quem poderei manter contacto pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientado quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeito com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas. Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

  
Assinatura da doadora da placenta

\_\_\_\_\_  
Pesquisador Responsável  
Tel: (41)

\_\_\_\_\_  
Mestrando em Ciências da Saúde - PUCPR  
Tel: (41) 996859499

Curitiba 14 de março de 2018.