

ESCOLA DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO EM CLÍNICA MÉDICA

RAFAEL DOS SANTOS MAZZUCA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA  
ÓSSEA COM BIOMATERIAL NA REGENERAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS EM MODELO  
EXPERIMENTAL COM DIABETES**

Porto Alegre  
2017

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/CLÍNICA MÉDICA**

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO  
MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA COM BIOMATERIAL NA  
REGENERAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS EM MODELO EXPERIMENTAL  
COM DIABETES**

**RAFAEL DOS SANTOS MAZZUCA**

**PORTO ALEGRE  
2017**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO  
GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação da associação de células da fração mononuclear da medula óssea  
com biomaterial na regeneração de úlceras cutâneas em modelo experimental  
com diabetes**

Rafael dos Santos Mazzuca

Dissertação apresentada como requisito para a  
obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-  
Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da  
Escola de Medicina da Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre, 2017

## Ficha Catalográfica

M478a Mazzuca, Rafael dos Santos

Avaliação da associação de células da fração mononuclear da medula óssea com biomaterial na regeneração de úlceras cutâneas em modelo experimental com diabetes / Rafael dos Santos Mazzuca . – 2017.

81 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

1. Diabetes. 2. Úlcera. 3. Estreptozotocina. 4. Células-Tronco. 5. Engenharia Tecidual. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RAFAEL DOS SANTOS MAZZUCA

**AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA  
MEDULA ÓSSEA COM BIOMATERIAL NA REGENERAÇÃO DE ÚLCERAS  
CUTÂNEAS EM MODELO EXPERIMENTAL COM DIABETES**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

Orientadora: Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

---

Dra. Patrícia Sesterheim - UFRGS

---

Prof. Dr. Jefferson Luis Braga Silva - PUCRS

---

Dr. Daniel Rodrigo Marinowic - PUCRS

Porto Alegre

2017

“Dedico esta dissertação a todos meus familiares, que nunca faltaram com apoio e incentivo em todas as etapas da minha carreira profissional.”

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, meus irmãos e minha companheira Carolina, que sempre estiveram presentes, e são exemplos para mim, sempre contribuindo e apoiando em todas as etapas percorridas até hoje.

À minha orientadora, Prof. Dra. Denise Cantarelli Machado, que desde minha graduação ensinou tudo que sei hoje sobre biologia celular e molecular, imunologia, e tantos outros assuntos durante todo este período que convivemos.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Pesquisas Biomédica da PUCRS, que sempre fizeram com que o ambiente de trabalho fosse o mais leve possível, e sempre que puderam ajudaram e incentivaram. Principalmente ao Ricardo Zalewski, que sempre esteve disposto a ajudar, não importando o horário, inclusive aos sábados e domingos. A técnica do laboratório, Rafaela Radomski, que sempre ajudou no preparo de soluções, material cirúrgico, e tantas outras coisas que precisei. Ao Christian Viezzer, grande colaborador para a execução do projeto.

Ao Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia, especialmente à Prof. Dra, Ana Luisa Saraiva Homem de Carvalho e a técnica do laboratório, Janaina, pelo auxílio prestado na histologia.

A toda equipe do Instituto Simutec, meu local de trabalho, que vivenciaram esta etapa, e também sempre incentivaram, e me possibilitaram os horários mais flexíveis possíveis para que eu pudesse participar de todas as aulas e eventos durante o programa de mestrado.

Por fim, agradeço aqueles que de uma forma ou de outra, me fizeram levar este projeto a diante, àqueles que ouviram sobre meu projeto, me incentivaram e viram que era algo importante para o meu crescimento profissional. A todos os professores que cruzaram meu caminho, que me fizeram entender o que é e como funciona a pesquisa científica.

## RESUMO

A cada ano o número de pessoas com diabetes aumenta consideravelmente. Até o ano de 2014, foram registrados mais de 414 milhões de casos da doença em todo o mundo. Um grande problema é o crescente aumento no número de casos de pacientes diabéticos que desenvolvem úlceras nos membros inferiores, complicação decorrente principalmente do controle glicêmico inadequado, além do desequilíbrio na fase inflamatória durante o processo de regeneração tecidual, que muitas vezes, acaba levando à amputação dos membros inferiores. A partir deste panorama, do aumento de casos da doença e também do aumento no número de complicações derivadas da diabetes, são necessárias novas estratégias terapêuticas, que visem minimizar o desenvolvimento destas úlceras até casos mais graves. A terapia celular associada ao uso de biomateriais, produzidos através de processos de engenharia tecidual, representam uma nova alternativa para tratamentos atuais. O uso da fração de células mononucleares da medula óssea tem se mostrado um importante aliado neste processo, por ser uma fonte de fácil acesso e com a possibilidade de obtenção de grande quantidade de células. Este estudo teve como objetivo principal avaliar se o uso de um biomaterial como curativo biológico, associado ou não às células da fração mononuclear da medula óssea, seria capaz de melhorar a resposta regenerativa de lesões ulcerosas, reduzindo o tempo de cicatrização. Por meio do uso da estreptozotocina, foi possível criar um modelo animal de diabetes em ratos Wistar, seguido da realização de uma lesão no dorso do animal para simular uma ferida ulcerosa, frequentemente presente em membros inferiores de diabéticos. Por meio de análises macroscópicas, com o uso de imagens, foi possível observar que os animais tratados com o biomaterial associado à fração de células mononucleares da medula óssea, tiveram uma taxa de regeneração significativamente melhor nos primeiros 2 dias após a formação da lesão, quando comparado com os outros grupos aos quais foram aplicados somente o biomaterial ou sem tratamento. Além disso, análises dos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, possibilitaram definir o grau de regeneração de cada animal, levando em consideração a reepitelização da lesão e a abundância de infiltrado inflamatório. Os resultados obtidos indicam que o uso da fração de células mononucleares da medula óssea associado ao biomaterial pode ser um aliado terapêutico na regeneração de úlceras de diabetes.

**Palavras-Chave:** Diabetes Mellitus. Úlcera. Estreptozotocina. Células-Tronco. Engenharia Tecidual.

## ABSTRACT

Every year the number of people with diabetes increases considerably. By the year 2014, more than 414 million cases of the disease have been registered worldwide. A major problem is the increasing number of diabetic patients who develop ulcers in the lower limbs, a complication mainly due to inadequate glycemic control, besides the imbalance in the inflammatory phase during the process of tissue regeneration, which often leads to amputation of the lower limbs. The increase number of cases and complications derived from the diabetes require the development of new therapeutic strategies to minimize the development of these ulcers to more severe cases new therapeutic strategies are necessary, aiming to minimize the development of these ulcers that leads to a poor quality of life due to ulcers, and ultimately, amputations. Cell therapy associated with the use of biomaterials, produced through tissue engineering processes, represents a new alternative for current treatments. The use of bone marrow mononuclear cells has shown to be an important ally for the healing process, since they are a good quality and abundant cells of easy access. The purpose of this study was to evaluate whether the use of a biomaterial as a biological dressing, associated or not with bone marrow mononuclear cells, would improve the regenerative response of ulcer lesions, reducing the time of healing. Streptozotocin was used to induce diabetes in Wistar rats. To simulate an ulcer wound, a punch was created on the animal's back. The macroscopic analysis have shown that the animals treated with the biomaterial associated with the bone marrow mononuclear cells, had a significantly better regeneration rate in the first 2 days after the formation the wound formation, when compared with the other groups where only the biomaterial was applied or did not received any treatment. In addition, histological sections stained with hematoxylin and eosin, allowed to define the degree of regeneration that each animal have undergone, taking into account the reepithelialization and abundance of inflammatory infiltrate. Our results indicate that the use of the bone marrow mononuclear cells fraction associated with the biomaterial may be a therapeutic ally in the regeneration of diabetes ulcers.

**Key Words:** Diabetes. Ulcer. Streptozotocin. Stem Cell. Tissue Engineering.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Imagem da lesão em rato Wistar.....	32
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático da estratégia utilizada para realização dos cortes histológicos.....	35
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquemático da estratégia de análise dos cortes histológicos transversais corados com HE.....	36
<b>Figura 4.</b> Imagens das lesões.....	38
<b>Figura 5.</b> Perfil da expressão de marcadores de superfície nas células da FMMO.....	40
<b>Figura 6.</b> Gráfico de barras representando os graus de regeneração das lesões após 7 dias.....	42
<b>Figura 7.</b> Gráfico de barras representando os graus de regeneração das lesões com 14 dias.....	42
<b>Figura 8.</b> Representação dos cortes histológicos para cada grau de regeneração.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DM** – Diabetes Mellitus

**DMT1** – Diabetes Mellitus Tipo 1

**DMT2** – Diabetes Mellitus Tipo 2

**EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio

**FMMO** – Fração Mononuclear de Medula Óssea

**HA** - Hidroxiapatita

**IRCT** – Insuficiência Renal Crônica Terminal

**IGF-1** – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1

**MAPK** – Proteína-quinase ativada por mitógenos

**MMP-9** – Metalopeptidase 9

**NF-kappaB** – Fator Nuclear Kappa B

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**PKC** – Proteína Kinase C

**PU** – Poliuretano

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1 DIABETES MELLITUS.....	12
1.2 IMPACTO ECONÔMICO CAUSADO PELO DIABETES.....	13
1.3 COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELO DIABETES .....	14
1.4 ÚLCERA POR DIABETES.....	17
1.5 ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS .....	19
1.6 INDUÇÃO DE DIABETES EM ROEDORES .....	21
1.7 TERAPIA CELULAR E REGENERAÇÃO TECIDUAL .....	24
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	31
4.2 MODELO ANIMAL DE DIABETES E FORMAÇÃO DA LESÃO.....	31
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO DOS GRUPOS.....	32
4.4 BIOMATERIAL.....	33
4.5 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA	33
4.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA .....	34
4.7 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
4.7.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) .....	36
4.8 ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DA LESÃO .....	37
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1 INDUÇÃO DO DIABETES E FORMAÇÃO DA LESÃO .....	39
5.2 EXTRAÇÕES DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA E TRANSPLANTE PARA O LOCAL DA LESÃO .....	40

5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA .....	40
5.4 ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DA LESÃO .....	40
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	41
5.5.1 Coloração de Hematoxilina Eosina (HE) .....	41
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA .....	56
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	57
ANEXO 3 – IMAGEM DE RATO WISTAR APRESENTANDO RETINOPATIA .....	58
ANEXO 4 – ARTIGO .....	59

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus (DM) é considerado um grupo de doenças metabólicas, onde a característica principal é o quadro hiperglicêmico, que pode ser causado pela não produção da insulina pelo organismo, por um déficit na produção ou na recepção deste hormônio, entre outras causas. Esta doença está associada a diversas complicações, como nefropatias, retinopatias, doenças cardiovasculares, úlceras e amputações de membros. É um grande problema de saúde pública mundial, devido ao seu alto índice de prevalência e morbidade (Tao, 2015; Whiting, 2011).

Em 2016 foi lançado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no dia mundial da saúde, o primeiro relatório global sobre Diabetes, onde foi demonstrado que até 2014 cerca de 414 milhões de adultos estavam vivendo com diabetes, nos anos 80 a estimativa era de que 108 milhões de pessoas fossem acometidas por esta doença. A prevalência global praticamente dobrou em relação aos anos 80, passando de 4,7% da população adulta para 8,5%. Este aumento se deu mais rapidamente em países de baixo e médio desenvolvimento, mas também teve um aumento no número de casos em países desenvolvidos. Este aumento no número de casos estaria diretamente relacionado com um aumento dos fatores de risco para o desenvolvimento do diabetes, como sobrepeso e obesidade (Who, 2016).

Este relatório, da OMS, trouxe também dados importantes em relação ao número de mortes devido à doença. Em 2012, por exemplo, cerca de 1,5 milhões de mortes estão atribuídas diretamente ao diabetes, além disso, outras 2,2 milhões de mortes estão relacionadas aos níveis de glicose sanguínea superiores ao normal, devido ao aumento de fatores de risco como doenças cardiovasculares (Who, 2016).

Em grande parte dos casos, o diabetes é assintomático. Os sintomas clássicos, quando presentes, são: perda involuntária de peso, polifagia, poliúria e polidipsia. Além destes sintomas clássicos, conhecidos como os quatros P's, o paciente também pode apresentar fadiga, letargia, fraqueza e infecções recorrentes.

O diabetes é classificado como:

Diabetes tipo I (DMT1): neste caso, ocorre a destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, responsáveis pela secreção da insulina, levando a um estágio de deficiência absoluta na produção de insulina. Os indivíduos afetados pela doença necessitam, obrigatoriamente, da administração da insulina, para evitar a cetoacidose, coma, morte, entre outros problemas que podem ocorrer devido a não absorção da glicose pelas células. As células  $\beta$ -pancreáticas são destruídas pelo próprio organismo, em um processo autoimune, estando em alguns casos associadas a outras patologias autoimunes, como a tireoide de Hashimoto, doença de Addison e miastenia gravis. Os raros casos nos quais não é identificada a causa da destruição das células  $\beta$ -pancreáticas são denominados de diabetes tipo I idiopática. O diabetes tipo I pode se desenvolver de uma forma muito rápida e progressiva, em maior número entre as crianças e os adolescentes, o pico para o aparecimento da doença é entre os 10 e 14 anos. Mas também pode se desenvolver de maneira tardia, muitas vezes sendo confundida com o diabetes tipo II, denominada de doença autoimune latente em adultos (Michels e Gottlieb, 2000).

Diabetes tipo II (DMT2): há uma deficiência relativa de insulina e, nesses casos, a administração exógena da insulina não visa combater a cetoacidose, e sim regular o quadro hiperglicêmico. O indivíduo afetado apresenta defeitos na secreção da insulina ou resistência a ação desta. Existem diversos fatores de risco para o desenvolvimento da diabetes tipo II, como: idade superior a 45 anos, sobrepeso, histórico familiar de diabetes tipo II, hipertensão e doenças vasculares (DeFronzo *et al.*, 2000).

## 1.2 IMPACTO ECONÔMICO CAUSADO PELO DIABETES

O diabetes causa um grande impacto econômico dentro do sistema de saúde mundial, segundo o relatório global sobre diabetes. O impacto causado pela doença pode ser classificado por custos médicos direto, custos indiretos associados à falta de produtividade do indivíduo diabético, morte prematura, entre outros (Who, 2016).

Entre os custos médicos diretos impactados pela doença, podemos citar os gastos para prevenir e tratar o diabetes e as suas complicações, isso inclui cuidados

hospitalares, medicação e suprimentos necessários para o controle glicêmico, além do cuidado a longo prazo necessário do sistema de saúde sobre esses pacientes.

Foi estimado que o custo anual mundial direto do diabetes gire em torno de 827 bilhões de dólares, a Federação Internacional do Diabetes estimou que estes valores triplicaram no período de 2003-2013, isso se deve ao fato de ter ocorrido um grande aumento também no número de casos de diabetes ao redor do mundo (Seuring *et al.*; Coelho, 2016).

Outro dado importante exposto em um estudo recente estima que os gastos diretos e indiretos no sistema de saúde no período de 2011 – 2030 cheguem a 1,7 trilhões de dólares, sendo que deste, 900 bilhões em países desenvolvidos e 800 bilhões em países subdesenvolvidos (Bloom *et al.*, 2012).

### 1.3 COMPLICAÇÕES CAUSADAS PELO DIABETES

Entre as complicações causadas pelo diabetes podemos citar as nefropatias, retinopatias, doenças cardiovasculares, úlceras e amputações de membros, sendo uma das principais doenças causadoras de incapacidades físicas para o trabalho. É possível observar, em pacientes com DM, um retardo na reparação tecidual, causado por disfunções nos leucócitos, macrófagos e fibroblastos, assim como a presença de fase inflamatória mais prolongada e decréscimo na síntese de colágeno (Defronzo *et al.*, 2000; Michels e Gottlieb, 2000; Vinik *et al.*, 2000; Volarevic *et al.*, 2011; Tesfaye e Selvarajah, 2012; Baltzis *et al.*, 2014).

A retinopatia diabética pode ser caracterizada a partir de sinais de isquemia da retina, apresentando microaneurismas, hemorragias, anormalidades microvasculares na retina, neovascularização, além de diferenças no tamanho dos vasos. Nos Estados Unidos, é uma das complicações líderes em casos de cegueira, com grande número de casos em adultos ainda inseridos no mercado de trabalho (Group, 2004).

A severidade dos casos depende das características genéticas de cada indivíduo, e é modificada através do metabolismo e outros fatores hemodinâmicos, que influenciam o número de moléculas sinalizadoras intracelulares como, PKC, MAPK, NF-kappaB.

Segundo o *The Royal College of Ophthalmologists*, a retinopatia diabética é uma complicação do diabetes com alto potencial para cegueira, com duas vias principais. Uma delas é a partir da neovascularização, que pode levar a hemorragia intraocular com possível descolamento da retina, levando a uma perda total da visão, outra maneira seria através de lesões na mácula, com a perda da acuidade visual localizada.

A retinopatia diabética é responsável por 1,9% de deficiência visual moderada ou severa no mundo, e 2,6% dos casos de cegueira no ano de 2010. A incidência da retinopatia em diabéticos é maior nos casos de: diabetes tipo 1, pessoas com diabetes a longo tempo, caucasianos, e em pessoas com poder aquisitivo mais baixo.

O desenvolvimento da retinopatia diabética está associado aos altos níveis glicêmicos, principalmente entre os indivíduos que não realizam o controle glicêmico adequado, acompanhado do aumento da produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) e hexosaminas, metabolismo da glicose em polióis e produtos de glicação avançada (Group, 2004).

A nefropatia diabética, também é uma complicação muito presente entre os diabéticos. Normalmente ela é a principal causa para insuficiência renal crônica terminal (IRCT), que é caracterizada por uma perda de cerca de 90% da capacidade depuradora e filtrante do rim, com uma grande queda da filtração glomerular. Em uma avaliação feita em 54 países, foi demonstrado que a diabetes e a hipertensão foi a principal causa da IRCT em 80% dos casos (Forbes e Cooper, 2013).

A proporção de IRCT atribuída apenas a diabetes está entre 20-40%, sua incidência é cerca de 10 vezes maior em adultos diabéticos do que entre adultos saudáveis, sua prevalência também é fortemente dependente do acesso dos indivíduos a diálise, e transplante renal. É possível observar uma diminuição de novos casos na população com DMT1 através do controle adequado da glicemia, com uma ampla aplicação da triagem precoce e de medidas de prevenção eficazes neste grupo de indivíduos.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da nefropatia diabética além do inadequado controle glicêmico são: susceptibilidade genética, hipertensão arterial, obesidade e raça. Ela se apresenta inicialmente de forma assintomática, sua

detecção é feita a partir de triagem laboratorial. A principal evidencia clínica precoce é o aparecimento de níveis baixos e anormais de microalbuminúria, com progressão da doença levando ao aparecimento de proteinúria. Na população com DMT1, a nefropatia diabética se inicia geralmente em pessoas com mais de 10 anos de diabetes, e a progressão pelos estágios da doença se torna mais evidente neste grupo. Nos indivíduos com DMT2, o estágio de proteinúria clínica é geralmente precedido de hipertensão arterial, e parte destes indivíduos podem apresentar insuficiência renal sem ter uma albuminúria significativa. Até o desenvolvimento da IRCT o diabético pode desenvolver uma proteinúria nefrótica, seguida por uma diminuição da taxa de filtração glomerular, com um aumento significativo nos níveis de creatinina sérica (Tesch e Allen, 2007; Volarevic *et al.*, 2011; Deshpande, 2008; Forbes e Cooper, 2013).

O aumento de doenças cardiovasculares em diabéticos também é uma complicação comum neste grupo de indivíduos. Estudos relacionam cerca de 65% das mortes em pessoas diabéticas às doenças cardiovasculares, a maior parte delas sendo isquemia cardíaca e infarto. Comparando pessoas saudáveis com diabéticos o risco de uma doença cardiovascular é cerca de 2 a 4 vezes maior no grupo diabético. Estudos também demonstraram que cerca de 70% dos diabéticos apresentam pressão alta e são tratadas com medicamentos para controlar a hipertensão arterial (Forbes e Cooper, 2013).

Os fatores de risco para o aparecimento de doenças cardiovasculares em diabéticos são similares aos de pessoas sem diabetes, como: hipertensão, altos índices de colesterol e o tabagismo. Alguns estudos demonstraram que na década de 80-90 houve uma diminuição na incidência de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos, principalmente devido aos avanços nas terapias de controle glicêmico, assim como novas maneiras de controlar a hipertensão e os níveis de colesterol (Deshpande *et al.*, 2008).

Uma das complicações mais frequentes entre os diabéticos, a neuropatia diabética é a principal causa de morbidade e mortalidade entre esse grupo, o que resulta em um grande impacto econômico para seu manejo. É a causa mais comum de neuropatia em países desenvolvidos, causando um número muito maior de internações hospitalares do que as outras complicações do diabetes, além de ser

responsável por cerca de 50-70% de amputações não traumáticas (Vinik *et al.*, 2000; Dinh *et al.*, 2012; Boulton, 2013).

É caracterizada por atingir regiões distintas do sistema nervoso, de forma individual ou combinada, podendo ser assintomática em alguns casos. Os fatores de risco para o desenvolvimento da neuropatia incluem: hiperglicemia persistente, insuficiência microvascular, estresse oxidativo e destruição de nervos mediada pelo sistema autoimune. A progressão desta complicação se caracteriza pelo desenvolvimento de anormalidades vasculares, como a diminuição do diâmetro de capilares e hiperplasia endotelial, com conseqüente diminuição do aporte de oxigênio. A neuropatia em estado avançado, causada principalmente pela deterioração de fibras nervosas, é caracterizada pela perda sensorial progressiva. Esta perda sensorial é muitas vezes a principal causa para o surgimento de outras complicações, como úlceras por pressão, uma vez que o paciente em estado avançado da neuropatia perde a noção sensorial, muitas vezes não percebendo pequenas lesões que vão aumentando com o passar do tempo (Vinik *et al.*, 2000; Dinh *et al.*, 2012; Boulton, 2013).

#### 1.4 ÚLCERA POR DIABETES

A úlcera por diabetes é derivada de diversos fatores como: neuropatias, biomecânica anormal do pé e cicatrização precária das feridas. A neuropatia autonômica resulta em anidrose e um fluxo sanguíneo superficial alterado na região dos pés, promovendo um ressecamento da pele e formação de pequenas fissuras. A neuropatia motora faz com que o indivíduo tenha uma mecânica muscular anormal do pé, além de alterações estruturais nesta região, a neuropatia sensorial periférica interfere nos mecanismos normais de proteção, fazendo com que o diabético suporte traumatismos nas regiões periféricas, que podem ser recorrentes, e muitas vezes imperceptíveis. As infecções recorrentes são causadas pela redução na imunidade, na função fagocitária associada à hiperglicemia e pouca vascularização. Alguns fatores de risco são determinantes neste tipo de lesão como: sexo masculino, mais de 10 anos com diabetes, neuropatia periférica, estrutura anormal do pé, doença arterial periférica, tabagismo, histórico de úlceras ou amputações e controle glicêmico precário (Dinh *et al.*, 2012; Baltzis *et al.*, 2014).

Estudos realizados no Reino Unido demonstraram que cerca de 5% dos indivíduos com diabetes tipo II e 7% de indivíduos com diabetes tipo I e II combinadas, possuíam úlceras nos pés em algum momento da doença (Whiting *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2015).

A neuropatia periférica afeta cerca de 50% dos pacientes com diabetes mellitus, e pode ser considerada uma das maiores causas de morbidade e aumento da mortalidade nestes casos. Uma das principais manifestações clínicas resultantes da neuropatia periférica é o aparecimento de úlceras na região do pé, além de outras manifestações (Vinik *et al.*, 2000). Espera-se que até 2030 o número de indivíduos com neuropatia periférica chegue a 236 milhões de pessoas ao redor do mundo. E estes números elevarão ainda mais o custo para o tratamento destas pessoas. Nos EUA, o custo estimado para tratamento anual é de cerca de 10,9 bilhões de dólares. A incidência de amputações em pacientes com diabetes varia de 0,5 a 5 a cada 1000 indivíduos, mas estas taxas podem variar conforme o país, etnia e raça chegando a exceder a taxa de 20 indivíduos a cada 100.000. Porém a causa real de muitas amputações não está relacionada com a origem, mas sim com o acesso inadequado ao cuidado necessário para a recuperação da lesão.

A regeneração da ferida ulcerosa envolve uma cascata com diferentes fases que interagem entre si, desde a hemostasia, inflamação, proliferação, reepitelização e cicatrização, que pode ser afetada pela diabetes e por suas complicações. O efeito total causado pela diabetes no processo de regeneração não está bem elucidado, mas a função leucocitária deficiente e problemas na proliferação celular ocorrem devido ao estado hiperglicêmico. A infecção da ferida ulcerosa é uma importante causa no retardo da reparação tecidual e deterioração da lesão, levando ao uso de antibióticos para prevenir a infecção (Ladeira *et al.*, 2011; Dinh *et al.*, 2012; Lima e Araujo, 2013; Baltzis *et al.*, 2014).

Os princípios para o tratamento destas lesões partem primeiramente do tratamento das infecções. Após o tratamento das infecções é preciso verificar se existe a possibilidade de revascularização de qualquer isquemia associada à lesão. O terceiro passo é diminuir ao máximo a pressão sobre a região lesada e, finalmente, aplicações tópicas de medicamentos e remoção de calosidades. Porém, para isso é necessária uma atenção em saúde, o que muitas vezes não está disponível em diversos locais, fazendo com que os indivíduos tenham complicações

derivadas destas infecções. As feridas crônicas são ocasionadas devido a não recuperação causada por infecções bacterianas recorrentes, isquemia tecidual, trauma contínuo e o cuidado precário, levando à amputação do membro inferior (Dinh *et al.*, 2012; Game *et al.*, 2012; Baltzis *et al.*, 2014).

O melhor conhecimento e aperfeiçoamento de estratégias terapêuticas que possam interferir no processo de reparação tecidual, acelerando a cicatrização ou, pelo menos, reduzindo a progressão da lesão ulcerosa proporcionará a esses indivíduos uma menor suscetibilidade a infecções e todos os demais problemas decorrentes da exposição causada pela úlcera, evitando assim, a amputação dos membros inferiores, melhorando a qualidade e aumentando a expectativa de vida do paciente. Assim, a engenharia tecidual surge como uma fonte para auxiliar no processo regenerativo, por meio do desenvolvimento de novos biomateriais que tem demonstrado eficácia neste processo. Estes biomateriais podem ativar a regeneração da ferida, impedir a contração da mesma e proteger contra agentes infecciosos (Blumberg *et al.*, 2012; Game *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2013; El-Mesallamy *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2014).

## 1.5 ENGENHARIA TECIDUAL E BIOMATERIAIS

Dentro desta perspectiva, a engenharia tecidual surge como uma fonte para auxiliar no processo regenerativo, por meio do desenvolvimento de novos biomateriais que podem ativar a regeneração das feridas, impedir a contração da mesma e proteger contra os agentes infecciosos. Diversos grupos de pesquisadores têm se dedicado a síntese e modificação de novos materiais biocompatíveis para obter um produto que possa ser aplicado como um curativo para essas feridas. Entretanto, para que os biomateriais possam ser usados como curativos eficazes, os mesmos devem apresentar as seguintes características como: aderência à lesão, histocompatibilidade, controle de perda de fluidos e infecção, ausência de citotoxicidade, estabilidade mecânica e flexibilidade (Chen e Abatangelo, 1999). Entre os principais tipos de biomateriais desenvolvidos podemos citar os metálicos, cerâmicos e poliméricos.

Os biomateriais metálicos são utilizados quase que exclusivamente para suporte, como em implantes dentários, fixação de fraturas, implantes ósseos. Estes

biomateriais podem ser feitos de um único tipo metálico, ou a partir da combinação de metais. Os biomateriais produzidos com apenas um metal em sua composição apresentam maior capacidade de resistência à corrosão e força (Chen e Thouas, 2015).

Em relação aos biomateriais cerâmicos, eles são materiais compostos por elementos metálicos e não metálicos unidos por ligações iônicas e/ou covalentes. Este grupo de biomateriais geralmente apresentam características inorgânicas (não contém carbono na sua composição), fortemente inertes, duros e quebradiços e com alta força de compressão. Entre as aplicações dos biomateriais cerâmicos estão os implantes ortopédicos e dentários. Um dos principais biomateriais cerâmicos produzidos são os compostos por hidroxiapatita (HA). Os biomateriais constituídos por HA são conhecidos por sua osteocondutividade e sua baixa taxa de degradação quando implantado, fazendo com que o material se degrade lentamente e fique implantado após longos períodos de tempo.

Muitos polímeros têm sido desenvolvidos visando seu uso como biomaterial. Um grupo dos grupos principais e mais promissores de polímeros biocompatíveis, os quais podem ser utilizados na área médica, são constituídos pelos poli ( $\alpha$ -hidróxi ácidos). Os principais polímeros presentes neste grupo são: o poli (ácido láctico), a poli (e-caprolactona) (PCL), o poli (ácido glicólico) (PGA) e a poli (p-dioxanona) (PDO) (Chen *et al.*, 2003; Kohane e Langer, 2008).

O uso de polímeros poliuretanos (PU) bioreabsorvíveis é relativamente recente em aplicações biomédicas, tais como dispositivos implantáveis como, balão intraórtico, implantes mamários, balões de angioplastia, dispositivos para cateterismo, entre outros (Gorna e Gogolewski, 2002; Grad *et al.*, 2003; Teo *et al.*, 2016). Além disso, materiais tridimensionais baseados em poliuretanos têm sido utilizados para estudo no desenvolvimento e crescimento de vasos sanguíneos de órgãos e tecidos (Krucker *et al.*, 2006; Barikani e Mohammadi, 2007). Os poliuretanos se degradam *in vivo*, principalmente via hidrólise e, este processo pode ser auxiliado por componentes dos tecidos e células do organismo. Já a sua suscetibilidade à calcificação é uma característica interessante, pois poliuretanos podem formar uma matriz porosa que pode ser usada na reconstrução e crescimento de tecidos ósseos, cartilagem e outros (Grad *et al.*, 2003).

Um importante fator a ser levado em consideração é a capacidade de reabsorção do material utilizado. Diversos biomateriais apresentam esta característica. No momento da elaboração do biomaterial, existe a possibilidade de manipulação deste para que se degrade mais lentamente ou rapidamente dependendo do objetivo de sua utilização. Para o uso de biomateriais como curativos biológicos, é necessário que estes não se degradem tão rapidamente, permitindo que o biomaterial fique sobre a lesão tempo suficiente para que a mesma possa se regenerar, outra característica importante é que esse biomaterial apresente porosidade suficiente para permitir a troca gasosa do meio interno com o meio externo (Chen *et al.*, 2003; Teo *et al.*, 2016).

Segundo o relatório elaborado pela *Markets and Markets*, especializada em pesquisas de mercado, é previsto que até 2021 o mercado de biomateriais atinja a marca de 149 bilhões de dólares, em 2016 este valor foi de quase 71 bilhões. Isto se deve ao fato do aumento de financiamentos e suporte de órgãos governamentais para o desenvolvimento de novos produtos, além do avanço da tecnologia e das possibilidades de aplicação destes biomateriais (Markets, <sup>2016</sup>).

Em 2016, entre os principais tipos de biomateriais comercializados se encontram os formados por ligas metálicas, principalmente devido as suas propriedades mecânicas como força e resistência, além da biocompatibilidade, tornando-os adequados a diversos tipos de aplicações, em diversas áreas como a ortopedia, cardiologia e odontologia. Para os próximos anos, espera-se que os biomateriais poliméricos ganhem boa parte do mercado, principalmente devido ao uso crescente de polímeros em tecidos moles (Markets, <sup>2016</sup>).

## 1.6 INDUÇÃO DE DIABETES EM ROEDORES

Existem diversos métodos de indução da diabetes em roedores. O diabetes tipo 1, que tem por característica a não produção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, pode ser induzida de diferentes maneiras, tanto pela destruição destas células por compostos químicos, dietas específicas, indução cirúrgica, como pelo uso de animais transgênicos e knockouts. Os modelos mais utilizados são os que empregam compostos químicos para a sua indução, tendo em vista principalmente o baixo custo destes produtos (Carvalho *et al.*, 2003).

A utilização de compostos químicos visa a destruição de grande parte das células  $\beta$ . Como nem todas as células são destruídas, ainda existe uma pequena produção de insulina. Esta destruição das células  $\beta$ -pancreáticas leva a um estado hiperglicêmico e perda de peso. Existem dois compostos principais que visam a destruição das células pancreáticas e a consequente indução da diabetes: a estreptozotocina e a aloxana.

A Aloxana foi isolada pela primeira vez em 1818 por Brugnatelli, e o nome do composto foi dado por Wohler e Liebig em 1838. O modelo de indução de diabetes pela Aloxana foi descrito pela primeira vez, em coelhos, por Dunn, Sheen e McLetchie em 1943. O poder diabetogênico da aloxana é alcançado quando administrada de forma intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Diferentes dosagens são utilizadas, variando conforme a espécie animal, a via de administração e o estado nutricional. O efeito causador da diabetes pelo método de indução por aloxana se dá principalmente devido a rápida absorção deste composto pelas células  $\beta$ -pancreáticas e consequente destruição das mesmas (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008).

A indução da diabetes pelo método da aloxana acontece em 4 fases principais. A primeira fase ocorre logo nos primeiros minutos após a administração da aloxana, que é uma fase hipoglicêmica transitória, esta fase dura no máximo 30 minutos. Após cerca de uma hora da administração da aloxana, inicia-se a segunda fase de indução do diabetes, que leva a um aumento na concentração de glicose sanguínea. Esta fase hiperglicêmica pode durar de 2 a 4 horas, dependendo da concentração de aloxana administrada e da via de administração. Na terceira fase, ocorre novamente um estado hipoglicêmico, que pode ser observado depois de 4 a 8 horas após a administração da aloxana. A quarta e última fase, é o estado permanente de hiperglicemia, a partir da completa perda de integridade das células  $\beta$ -pancreáticas, após cerca de 24 a 48 horas da administração da aloxana (Szkudelski, 2001; Lerco *et al.*, 2003; Lenzen, 2008).

A estreptozotocina é sintetizada por uma bactéria gram-positiva, *Streptomyces achromogenes* e foi utilizada para induzir a diabetes pela primeira vez em 1963, por Rakieten e colaboradores, para se estudar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da diabetes e suas complicações, além de possíveis intervenções terapêuticas (Wu e Huan, 2001; Lenzen, 2008).

Sua via de administração pode ser intravenosa ou intraperitoneal, apesar de alguns estudos também terem demonstrado que a administração da estreptozotocina na via subcutânea, intracardíaca e intramuscular também serem capazes de induzir a diabetes.

A partir da administração da estreptozotocina, o composto entra nas células  $\beta$ -pancreáticas, através do transportador Glut-2, causando a alquilação do DNA, com subsequente ativação do Poly-ADP ribose (PARP), que leva a uma depleção do NAD<sup>+</sup>, reduzindo a produção de ATP e inibindo a produção de insulina. Usualmente a estreptozotocina é utilizada apenas uma vez, em uma dose elevada. Em camundongos é utilizado entre 100-200 mg/Kg e em ratos entre 35-65 mg/Kg. Cerca de 4 dias após a utilização da estreptozotocina os níveis de glicose sanguínea são mensurados, e resultados acima de 250 mg/dL podem ser considerados positivos para diabetes em ratos (Szkudelski, 2001; Wu e Huan, 2001; Akbarzadeh *et al.*, 2007).

Além disso, a estreptozotocina pode ser utilizada em pequenas doses, para induzir a insulite em camundongos, utilizando cerca de 20-40 mg/Kg em doses múltiplas, durante 5 dias, a quantidade de estreptozotocina utilizada pode variar conforme a espécie. A insulite é um processo inflamatório que ocorre nas células  $\beta$ -pancreáticas, a partir da infiltração linfócitos nas ilhotas de Langerhans, essa inflamação pode levar a destruição das células e conseqüentemente a não produção da insulina. Este método é utilizado principalmente para se estudar o processo imunológico da insulite e da destruição das células produtoras de insulina (Wu e Huan, 2001; Lenzen, 2008; Deeds *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Akbarzadeh e colaboradores foi induzida a diabetes em 6 roedores a partir da injeção intravenosa de 60 mg/Kg de estreptozotocina. Três dias após a indução os animais apresentaram sinais de diabetes, já demonstrando alterações nos níveis de glicose sanguínea e destruição da células  $\beta$ -pancreáticas a partir do 3º dia. Kuo e colaboradores induziram diabetes em ratos com 4 meses de idade, a partir de uma dose única de 50 mg/Kg de estreptozotocina. Uma semana após a indução da diabetes, a concentração de glicose no plasma foi mensurada, e os animais com níveis acima de 300mg/dL foram considerados diabéticos (Akbarzadeh *et al.*, 2007; Kuo *et al.*, 2011).

## 1.7 TERAPIA CELULAR E REGENERAÇÃO TECIDUAL

O processo de regeneração tecidual pode ocorrer de duas maneiras diferentes: substituição de células mortas por células saudáveis, idênticas ao do tecido lesado, ou substituição do tecido lesado por um tecido conjuntivo fibroso. Sabe-se que o processo de regeneração envolve uma cascata de reações e mecanismos moleculares que fazem a mediação deste processo (Hilfiker *et al.*, 2011).

O processo de reparo tecidual ocorre basicamente a partir de três fases distintas: inflamação, nova formação tecidual e remodelamento.

Logo após a lesão, se inicia o processo inflamatório, através da ativação da cascata de coagulação, vias inflamatórias e do sistema imune, visando prevenir a perda de sangue e fluido, além de atuar removendo o tecido morto e prevenir a infecção. Durante a fase inflamatória é possível identificar no tecido diversos tipos celulares que atuam no combate a infecção, como neutrófilos, linfócitos e plasmócitos (Oberyszyn, 2007).

Após a fase inflamatória, é dado início a nova formação tecidual, que é caracterizada principalmente pela proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. Durante esta fase, é possível observar uma grande quantidade de fibroblastos no tecido, e grande deposição de colágeno tipo III. Também durante este período é ativado o processo de revascularização, com a formação de novos vasos. Os principais tipos celulares encontrados durante a fase de proliferação celular são: queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (Oberyszyn, 2007; Guo e Dipietro, 2010; Eming *et al.*, 2014).

Cerca de três semanas após a lesão, é iniciada a fase de remodelamento, que pode durar um ou mais anos. Nesta fase, todos os processos iniciados anteriormente diminuem, os macrófagos e fibroblastos presentes na lesão morrem por apoptose e o colágeno depositado durante a fase de proliferação celular dá origem ao colágeno tipo I, formando a cicatriz da lesão (Oberyszyn, 2007; Eming *et al.*, 2014).

Vale lembrar que o processo de regeneração tecidual não traz de volta o tecido com as mesmas características de um tecido não lesado.

Em lesões crônicas de pacientes com diabetes é possível verificar um retardo no processo de regeneração tecidual, principalmente devido a fase inflamatória prolongada, com um desbalanço na secreção de enzimas anti e pró inflamatórias. Além disso, nesse grupo de indivíduos é observado algumas anormalidades celulares, como a diminuição na liberação de citocinas pelos macrófagos e a excessiva ativação de outras quimiocinas, que acabam prejudicando o processo de migração celular e diminuindo a secreção de fatores de crescimento (Baltzis *et al.*, 2014{Boulton, 2013 #11).

As células-tronco têm se mostrado uma importante fonte de células para a medicina regenerativa. Elas podem ser definidas em dois tipos distintos: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. Entre as principais características destas células estão a capacidade de autor renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares (Van Der Kooy e Weiss, 2000).

As células-tronco embrionárias, como o próprio nome já diz, são derivadas do próprio embrião. Elas possuem a capacidade de se diferenciar em todas as linhagens celulares do organismo, sendo denominadas de totipotentes. Estas células estão presentes na fase de clivagem do zigoto, até a formação do blastocisto (Biswas e Hutchins, 2007).

As células-tronco adultas estão presentes na forma indiferenciada, em diversos órgãos e tecidos após o desenvolvimento embrionário. Podem estar presentes em diversos locais, entre eles a medula óssea, cérebro e músculos. Elas podem se diferenciar em células específicas do tecido/órgão de onde são encontradas, ou mesmo de outros tecidos, desde que recebam os estímulos adequados. O transplante de células-tronco adultas hematopoiéticas, formadoras de células sanguíneas, é realizado há mais de 100 anos. Estas células podem permanecer no organismo de forma quiescente por muito tempo, até que são ativadas pela necessidade normal de se manter a integridade dos tecidos, ou para atuar em danos causados por doenças ou lesões teciduais. Diferentes grupos de pesquisa estão empenhados em desenvolver novas técnicas que possibilitem a produção em grande escala de células-tronco adultas em cultura e de manipulação destas para a utilização no tratamento de lesões e doenças (Wagers e Weissman, 2004; Trounson e McDonald, 2015).

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes que possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas do mesoderma, como condrócitos, adipócitos e osteócitos, mas também são capazes de se diferenciar em linhagens não mesodérmicas, como neurônios (ectoderma) e hepatócitos (endoderme). São tipicamente encontradas na medula óssea e possuem um grande potencial para o uso terapêutico. Este potencial é devido a sua capacidade de manter suas características de autorrenovação e multipotência quando colocadas em cultivo, além de serem facilmente obtidas a partir da extração de uma amostra da medula óssea (Bianco *et al.*, 2008).

A terapia celular, com células-tronco mesenquimais da medula óssea, tem se mostrado uma estratégia eficaz na reparação de tecidos danificados, devido às propriedades destas células. Apesar das vias envolvidas neste processo de reparo ainda não terem sido totalmente identificadas, sabe-se que as células transplantadas liberam fatores de crescimento que modulam a resposta imunológica, organização tecidual, promovem a angiogênese e, por sua vez, estimulam a diferenciação celular. Elas também respondem a fatores quimiotáticos liberados pela lesão, fazendo com que elas migrem para este nicho (Dimarino *et al.*, 2013).

Diversos estudos estão demonstrando que a utilização de células mesenquimais derivadas da medula óssea são capazes de restaurar a função cardíaca e regenerar o tecido em casos de lesões crônicas e agudas tanto em modelos experimentais quanto em humanos. Outros estudos demonstraram que este tipo celular é capaz de auxiliar na reparação da esclerose hipocampal em modelos animais de epilepsia (Costa-Ferro *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Venturin *et al.*, 2011; Costa-Ferro *et al.*, 2012; Shetty, 2012; Dimarino *et al.*, 2013).

Recentemente, foi demonstrado também que é possível acelerar o processo de cicatrização de feridas e cortes utilizando fio de sutura associado a células-tronco, em fístulas intestinais de ratos, que são feridas abertas no intestino. O processo de cicatrização normal em feridas deste tipo sem o uso das células tronco era de cerca de 10 semanas, com as células-tronco associadas ao fio de sutura, em apenas três dias foi possível visualizar um avanço no processo de cicatrização de cerca de 70% e em 21 dias estas feridas estavam totalmente fechadas ou 90% cicatrizadas, além disso, muitas delas sequer deixaram marcas. Outro estudo demonstrou a eficácia das células-tronco no processo de cicatrização da

abdominoplastia, onde foi transplantado para o local da cirurgia células-tronco do tecido adiposo, neste estudo a maioria das pacientes tiveram uma melhora no processo de cicatrização, além de estudos demonstrando a capacidade regenerativa de lesões cutâneas com o uso de células tronco (Hilfiker *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2013). Considerando os estudos recentes, a perspectiva de uso das células-tronco no processo regenerativo tem se mostrado um grande aliado terapêutico para diferentes casos.

## 2 JUSTIFICATIVA

As condições crônicas de saúde estão aumentando em ritmo acelerado, não distinguindo região nem classe social. Os problemas crônicos mais preponderantes, como o Diabetes Mellitus (DM), têm atingido proporções mundiais alarmantes, demandando assistência continuada de serviços e um ônus progressivo durante o tratamento para pacientes e familiares. As projeções de aumento de sua prevalência são preocupantes, devido ao grande aumento no número de novos casos. A exposição prolongada aos efeitos deletérios da hiperglicemia coloca os indivíduos diabéticos em grande risco, considerando que a maioria das complicações é dependente da duração da doença.

Os avanços no diagnóstico, bem como a identificação dos fatores de risco para as complicações do DM, têm permitido intervir precocemente, alterando o curso da doença, melhorando a qualidade de vida e diminuindo a mortalidade dos indivíduos afetados.

Entre as complicações mais preocupantes e de alto custo que afetam os indivíduos com diabetes, as úlceras nos pés são as de maior incidência, sendo estes responsáveis por cerca de 70% das amputações relacionadas a esta doença. O tratamento tópico das feridas serve para tornar o processo cicatricial mais eficaz, rápido e seguro. A reparação tecidual é um processo biológico que envolve fatores sistêmicos, embora sejam necessárias condições locais de suporte e de viabilidade do processo fisiológico.

Dentro da perspectiva de tratamento para os pacientes acometidos pela úlcera de diabetes são necessários novos métodos terapêuticos que possam reduzir os riscos decorrentes de infecções, causadas muitas vezes pela falta de tratamento adequado a estas lesões. Deste modo se faz necessárias pesquisas com o objetivo de analisar a interação de biomateriais e do potencial uso das células-tronco na regeneração da úlcera por diabetes. A engenharia tecidual é responsável pelo desenvolvimento de produtos para substituição de tecidos tais como pele, osso, cartilagem. Desta forma, a avaliação da associação da terapia celular com biomateriais poderá permitir o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas

visando atender às demandas da saúde pública, as quais se mostram urgentes devido ao grande aumento dos casos.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a aplicabilidade das células-tronco adultas em diversas estratégias de terapia celular na regeneração de tecidos como, por exemplo: cicatrização, acidente vascular cerebral, epilepsia, cardiopatias, entre outros, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em modelos animais ou em ensaios clínicos de fase I e II (Martins *et al.*, 2011; Venturin *et al.*, 2011; Friedrich *et al.*, 2012). Igualmente, a associação das células-tronco adultas com biomateriais tem sido alvo de pesquisa, principalmente visando a regeneração de tecido ósseo para implantes na área da Traumatologia Bucomaxilofacial (Silva *et al.*, 2009).

Assim, neste estudo foi investigada a eficácia da associação de células mononucleares da medula óssea com o biomaterial poliuretano na regeneração de úlceras de diabetes em ratos, visando contribuir com novas estratégias terapêuticas.

### 3 OBJETIVOS

Para avaliar a associação de células da fração mononuclear da medula óssea com o biomaterial de poliuretano (PU) na regeneração de úlceras de diabetes em modelo experimental de ratos, os objetivos do estudo foram:

1. Desenvolver um modelo de diabetes *in vivo*;
2. Desenvolver um modelo de úlcera de diabetes em ratos;
3. Avaliar a eficácia da aplicação do poliuretano na cicatrização das úlceras de diabetes em ratos;
4. Avaliar a eficácia da aplicação do PU e associado às células da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) na cicatrização das úlceras de diabetes em ratos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina da PUCRS sob número 6236, e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - PUCRS, registrado sob número 15/00469 (anexos 1 e 2, respectivamente).

Todos os procedimentos e técnicas utilizadas durante a experimentação animal estiveram de acordo com a regulamentação proposta nas Diretrizes Brasileiras para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos, pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2013) e do Comitê de Ética para Uso de Animais da PUCRS (CEUA).

### 4.2 MODELO ANIMAL DE DIABETES E FORMAÇÃO DA LESÃO

Para este estudo, foram utilizados 26 ratos adultos Wistar, fêmeas, com 60 dias de vida, obtidos do Centro de Modelos Biológicos Experimentais, CeMBE (PUCRS), com o peso variando entre 200 e 300 g, com alimentação e água *ad libitum*.

Os animais foram mantidos no vivário do CeMBE localizado no prédio 14 da PUCRS, localizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, e os procedimentos experimentais também foram realizados no mesmo local.

Todos os animais permaneceram em jejum 8 horas antes do procedimento de indução do diabetes.

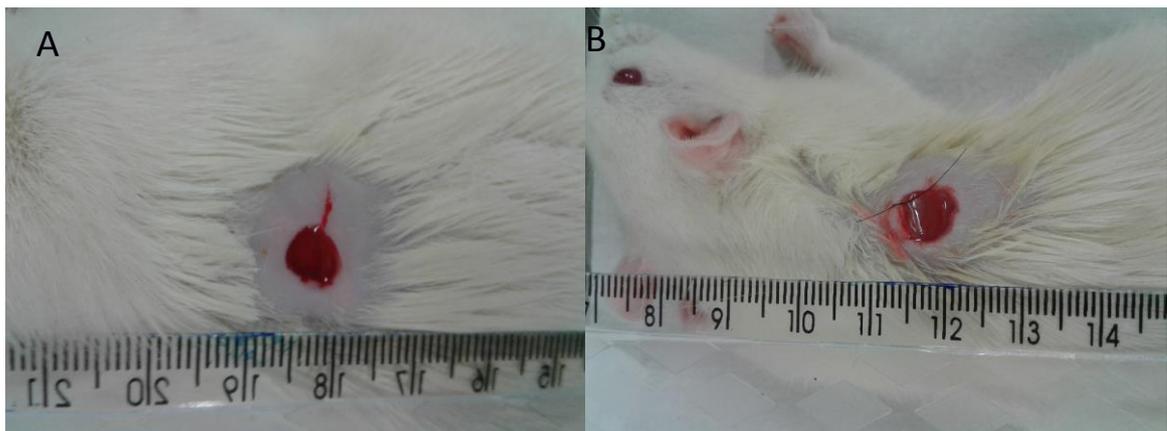
A indução da diabetes foi realizada a partir de uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (Sigma-Aldrich), numa concentração de 70 mg/kg, em uma solução de Tampão citrato pH 4,5, previamente a indução foram mensurados os níveis glicêmicos dos animais.

Sete dias após a injeção intraperitoneal de estreptozotocina foram mensurados os níveis de glicose sanguínea dos animais, utilizando o kit ACCU-

CHECK ACTIVE (Roche Diagnostics GmbH). Os animais que apresentaram níveis de glicose sanguínea acima de 250 mg/dL foram considerados diabéticos. Posteriormente à mensuração da glicose, os indivíduos foram divididos em seus grupos. Os animais foram divididos conforme descrito no item 4.3. Dois animais foram mantidos diabéticos e não foram incluídos nos grupos tratados, com a finalidade de se observar o avanço do quadro diabético até o final dos experimentos.

Os animais submetidos ao procedimento para criação da lesão ulcerosa passaram por uma anestesia de Ketamina 80% e Clorpromazina 20% seguida de uma incisão dorsal, de cerca de 6 mm de diâmetro, com *punch* de biópsia, simulando a ferida ulcerosa, conforme figura 1.

**Figura 1. Imagem da lesão em rato Wistar. A:** lesão em animal do grupo controle. **B:** lesão formada nos grupos 1 e 2 com a presença do biomaterial suturado.



Todos os procedimentos de indução da diabetes, mensuração da glicose e procedimentos cirúrgicos foram realizados nas instalações do Centro de Modelos Biológicos e Experimentais, Prédio 14 da PUCRS.

#### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO DOS GRUPOS

O número de animais utilizados para cada grupo foi de 8 indivíduos. Sendo assim, foram utilizados 24 ratos divididos em 3 grupos a saber:

(1) Grupo 1 (G1, controle) (n=8): animais diabéticos, com a lesão, sem o curativo biológico e sem células da fração mononuclear;

(2) Grupo 2 (G2, n=8): animais diabéticos, com a lesão ulcerosa e com o biomaterial suturado sobre a lesão.

(3) Grupo 3 (G3, n=8): animais diabéticos com o biomaterial e células da fração mononuclear da medula óssea transplantadas para o local da lesão.

Após a formação da lesão foram transplantados para cada animal do grupo 3 a quantidade total de  $1 \times 10^6$  células da fração mononuclear da medula óssea, através de uma injeção na borda da lesão, após este procedimento o biomaterial foi posicionado e suturado sobre a lesão e suturado.

Segundo estudos previamente realizados, o biomaterial a ser testado se degrada em cerca de 20 dias. Sendo assim, a histologia das regiões de regeneração das lesões foram avaliadas em dois períodos de tempo distintos:

(1) Tempo 1: 7 dias após o implante da membrana;

(2) Tempo 2: 14 dias após o implante da membrana.

#### 4.4 BIOMATERIAL

As membranas de poliuretano (PU) utilizadas como curativos já estavam disponíveis e haviam sido sintetizadas em um projeto anterior, em parceria com o Laboratório de Materiais Cerâmicos e Laboratório de Materiais Poliméricos, da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A membrana foi sintetizada a partir de materiais biodegradáveis, e consiste no inter cruzamento de quitosano com um poliéster uretano biodegradável, desta forma produzindo um hidrogel. Optou-se usar um poliéster que se degrade rapidamente, permitindo uma rápida absorção do mesmo por vias metabólicas. Sendo todos os materiais utilizados aprovados pela FDA para uso como biomateriais.

#### 4.5 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

Os animais doadores de medula óssea foram obtidos do CeMBE e eutanasiados conforme preconiza as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2013), a partir de uma sobredose três vezes superior a dosagem requerida para a

anestesia do animal, utilizado 30 mg/Kg de Xilazina combinada com 125 mg/Kg de Ketamina, por via intraperitoneal.

Após a eutanásia, os animais foram dissecados, e realizada a aspiração da medula óssea dos ossos longos (fêmur, tíbia e úmero), com o uso de uma seringa de aspiração e agulha de 26 G, contendo heparina, para evitar a coagulação. O material aspirado foi transferido para um tubo falcon e centrifugado a 430 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram resuspensas com meio RPMI e transferidas sobre uma cama Histopaque 1119(Sigma Aldrich). Após centrifugação a 400 *g* por 30 minutos, procedeu-se a retirada da camada de células mononucleares formada na interface entre o meio de cultura e o Histopaque seguido de lavagem com soro fisiológico 0,9%. A concentração e viabilidade das células foram avaliadas em câmara de Neubauer pelo método de exclusão por azul de tripan.

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

A caracterização das células da FMMO que foram utilizadas no tratamento do grupo 3, foi realizada pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos específicos para marcadores de superfície celular conforme preconizado por Dominici (Dominici *et al.*, 2006), obtidos da Becton & Dickinson and Company (BD).

Os anticorpos são específicos para as moléculas de superfície descritas na Tabela 1. Nas análises foram adquiridos os dados de 50.000 eventos.

**Quadro 1. Marcadores de superfície celular e respectivas especificidades.**

<b>Marcador</b>	<b>Especificidade</b>
CD31	Célula endotelial
CD45	Célula hematopoiética
CD90	Célula-tronco

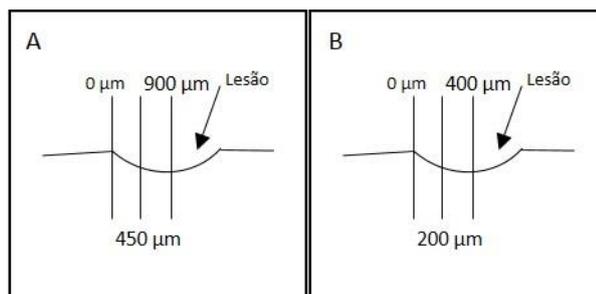
Os procedimentos descritos nos itens 4.5 e 4.6 foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, localizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

#### 4.7 PREPARO DO MATERIAL PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

As amostras para as análises histológicas da possível regeneração foram retiradas 7 e 14 dias após a formação da lesão, após a eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub>.

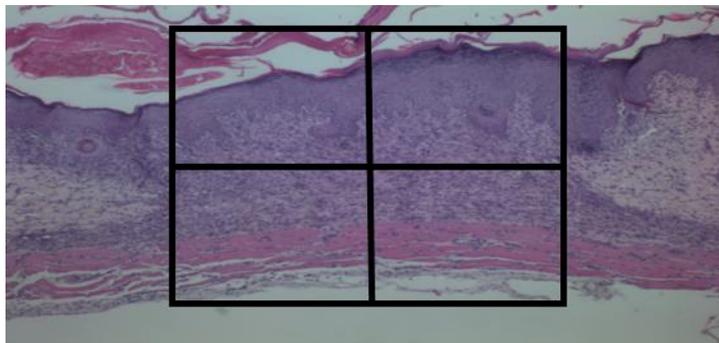
As amostras foram fixadas em formalina tamponada neutra e incluídas em parafina. Os cortes foram realizados utilizando um micrótomo. Para os animais analisados com 7 dias (2 animais por grupo), foram realizados 3 cortes histológicos, transversais, para cada amostra, o primeiro corte localizado logo no início da lesão, e os dois cortes subsequentes a 450 e 900  $\mu\text{m}$  de distância do corte inicial, conforme mostra a Figura 2 a. As amostras dos animais cujas lesões foram avaliadas 14 dias após a lesão (G1: n=3; G2: n=5; G3: n=6), o primeiro corte, transversal, foi realizado logo no início da cicatriz, e os cortes subsequentes em 200 e 400  $\mu\text{m}$  após a primeira secção (Figura 2 b). Cada secção foi feita com 4  $\mu\text{m}$  de espessura, corados com hematoxilina-eosina (HE). Todo o processo de análise histológica foi realizado no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da PUCRS, localizado na cidade de Porto Alegre/RS, Brasil, utilizando um microscópio óptico (BX50/OLYMPUS).

**Figura 2. Diagrama esquemático da estratégia utilizada para realização dos cortes histológicos. A:** representação dos cortes histológicos das amostras após 7 dias de lesão. **B:** representação dos cortes histológicos nas análises de 15 dias.



As análises foram realizadas por dois examinadores cegados, treinados previamente por uma patologista, e feita a calibração dos examinadores através do teste de coeficiente kappa. Para cada lâmina foram analisados 4 campos diferentes (figura 3) e feito a média dos resultados obtidos. Estes resultados foram posteriormente comparados para determinar se houve alguma diferença entre os grupos.

**Figura 3. Diagrama esquemático da estratégia de análise dos cortes histológicos transversais corados com HE.**



#### 4.7.1 Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE)

A técnica de coloração de HE foi utilizada para avaliar o grau de regeneração das lesões por meio da observação dos aspectos estruturais das células e tecidos. Levando em consideração os aspectos histológicos do epitélio e do tecido conjuntivo. Para a realização da análise do tecido epitelial, a profundidade da lesão coberta com células epiteliais foi levada em consideração. Para as análises do tecido conjuntivo foi considerado o processo inflamatório, mensurado através do tipo e quantidade de células inflamatórias e presença/ausência de fibrose.

A avaliação histológica foi feita com base na literatura prévia, baseado nos graus de regeneração sugerido por Martins e colaboradores, os graus de regeneração variavam de Grau 1 (reparação total do epitélio e do tecido conjuntivo) até o Grau 5 (com úlcera epitelial ainda presente e infiltrado inflamatório agudo) (Martins *et al.*).

As características microscópicas analisadas para cada grau foram:

Grau 1 – Reparação total do epitélio com presença de tecido conjuntivo fibroso, assim como ausência ou presença de poucas células inflamatórias.

Grau 2 – Reparação total do epitélio, com presença de tecido conjuntivo fibroso e quantidade moderada de células inflamatórias, representadas por macrófagos, plasmócitos e linfócitos.

Grau 3 – Presença de úlcera com dois terços (2/3) da sua profundidade coberta por epitélio, tecido conjuntivo com fibrose média e quantidade moderada de células inflamatórias, representadas por macrófagos, plasmócitos e linfócitos.

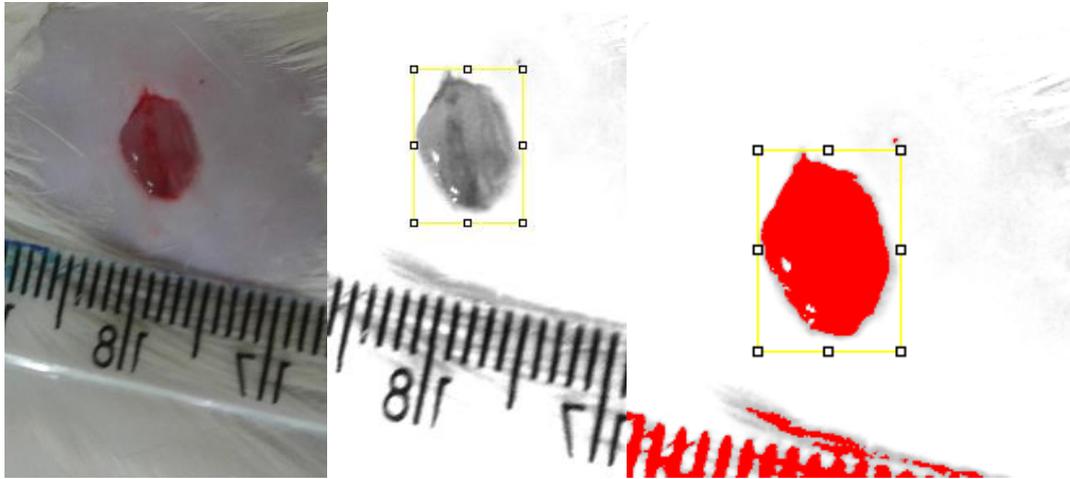
Grau 4 – Presença de úlcera com um terço (1/3) da sua profundidade coberta por epitélio, camada de tecido conjuntivo apresentando quantidade moderada de fibras e de células inflamatórias, representadas por macrófagos, plasmócitos e linfócitos.

Grau 5 – Presença de úlcera (total ou menos do que um terço (1/3) da profundidade com epitélio reparado), tecido conjuntivo apresentando quantidade severa ou moderada de células inflamatórias, representadas por neutrófilos, macrófagos, plasmócitos e linfócitos. Pode-se observar também a presença de micro abscessos.

#### 4.8 ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DA LESÃO

A regeneração da lesão foi analisada a partir de imagens obtidas em 2, 6 e 9 dias após a formação da lesão. Para realizar a mensuração da área da lesão foi utilizado o software ImageJ, primeiramente a imagem foi convertida para escalas de branco e preto, após foi utilizado a ferramenta *Thereshold* para destacar a área interna à borda da lesão, conforme demonstrado na figura 4.

**Figura 4. Imagens das lesões.** **A:** Imagem original da lesão. **B:** Imagem transformada para escala de branco/preto. **C:** Resultado da imagem após o uso da ferramenta Thershold, destacando a área da lesão.



A fórmula utilizada para mensurar a taxa de regeneração da lesão foi dada da seguinte maneira: Taxa de Regeneração (%) =  $(\text{Área original da Ferida} - \text{Área detectada}) / \text{Área original da ferida} \times 100$ .

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados quantitativos foram expressos na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Para a comparação da regeneração da lesão entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA seguido de Tukey. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software estatístico SigmaStat.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 INDUÇÃO DO DIABETES E FORMAÇÃO DA LESÃO

No total 24 animais receberam a injeção intraperitoneal de estreptozotocina para a indução do diabetes. Sete dias após a indução todos os animais demonstraram níveis glicêmicos superiores a 250 mg/dL, comparando os valores pré (88,42±6,98 mg/dL) e pós indução (431±86,6 mg/dL;  $p < 0,05$ ) temos níveis significativamente elevados em relação aos níveis iniciais, conforme a tabela 1. Sendo assim todos os animais foram considerados diabéticos de acordo com o critério pré-estabelecido.

**Tabela 1. Níveis Glicêmicos Iniciais e 7 dias após a indução.**

Animal	Nível Glicêmico Inicial (mg/dL)	Nível Glicêmico Após 7 Dias (mg/dL)
1	102	267
2	100	348
3	81	347
4	89	407
5	94	600
6	90	416
7	84	584
8	89	600
9	83	466
10	82	385
11	91	374
12	88	587
13	101	421
14	95	468
15	92	409
16	87	394
17	92	337
18	88	373
19	73	429
20	88	455
21	82	392
22	88	467
23	84	429
24	79	409

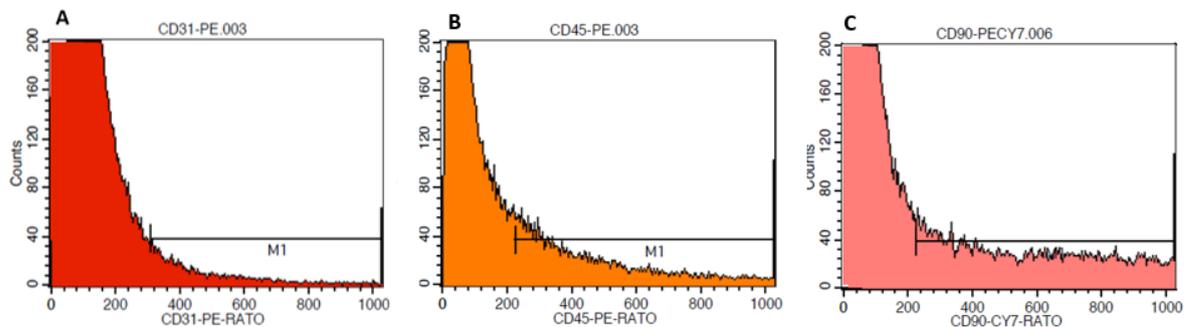
## 5.2 EXTRAÇÕES DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA E TRANSPLANTE PARA O LOCAL DA LESÃO

Após a preparação das células conforme descrito no item 4.5, estas foram separadas em alíquotas, e transplantados através de uma injeção na borda da lesão dos animais do grupo 3, com um total de  $1 \times 10^6$  células em solução salina.

## 5.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

Para a realização da caracterização fenotípica, foi utilizada a técnica de citometria com marcadores específicos conforme descrito no item 4.6, os histogramas obtidos a partir da técnica estão representados na figura 5.

**Figura 5. Perfil da expressão de marcadores de superfície nas células da FMMO.** A: CD31 representando 10%. B: CD45 representando 23,7%. C: CD90 representando 46,1%.



## 5.4 ANÁLISE DA REGENERAÇÃO DA LESÃO

O resultado obtido a partir da análise das imagens está descrito na tabela 2, em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Os valores demonstram a taxa percentual média de regeneração em relação a área original da lesão em cada grupo tratado.

Os dados apresentados demonstraram uma diferença significativa entre o grupo tratado com o biomaterial e com células da FMMO (G3) em relação ao grupo

controle (G1) ( $p < 0,05$  ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey) dois dias após a formação da lesão nos animais.

**Tabela 2. Taxa percentual média das regenerações das lesões nos diferentes grupos**

Grupos	Dias após a lesão		
	2	6	9
G1	14,12±13,74	70,92±11,89	95,54 ±0,03
G2	30,24±18,37	74,85±12,97	97,25± 2,16
G3	38,46±19,92*	74,48±23,09	97,37±3,52

Os dados estão expressos em forma de média  $\pm$  desvio padrão. Anova de uma via seguido de teste Tukey. \* $p < 0,05$  vs G1.

## 5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

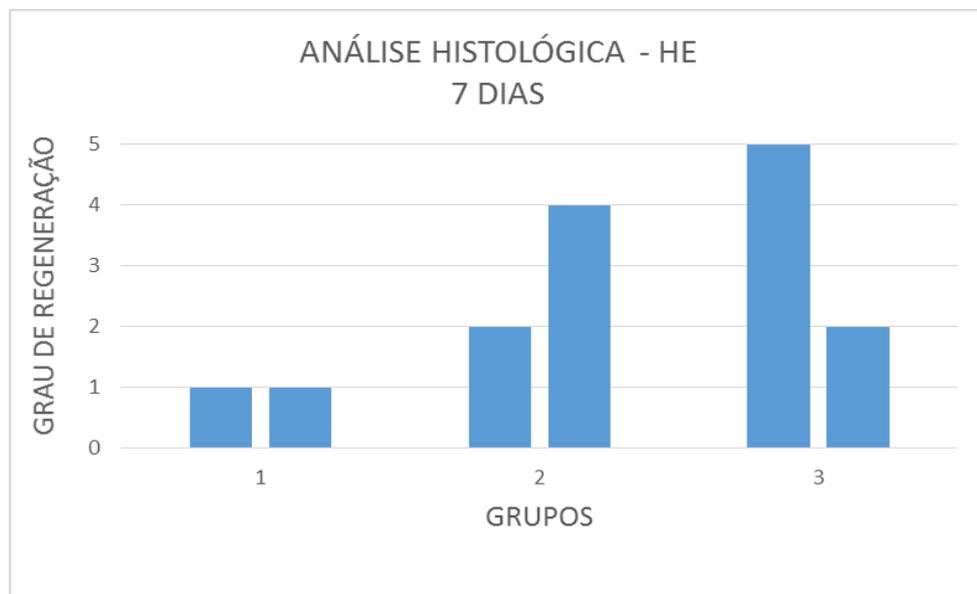
### 5.5.1 Coloração de Hematoxilina Eosina (HE)

A partir da análise histológica pela técnica de coloração de HE, foi possível observar que nos primeiros 7 dias após a criação da lesão e tratamento dos grupos, os animais do grupo 1 apresentaram o grau de regeneração melhor do que os outros grupos, apresentando um epitélio íntegro e poucas ou nenhuma célula inflamatória na lesão. Um dos animais do grupo 2 apresentou o epitélio íntegro e uma quantidade moderada de células inflamatórias, o outro animal analisado apresentou o epitélio com cerca de 2/3 da sua profundidade reparada e quantidade moderada de células inflamatórias. No grupo 3 um dos animais analisados apresentou o epitélio íntegro e uma quantidade moderada de células inflamatórias, já o outro animal do grupo 3 apresentou o epitélio com menos de 1/3 da sua profundidade reparado e quantidade moderada de células inflamatórias, conforme representado na figura 6.

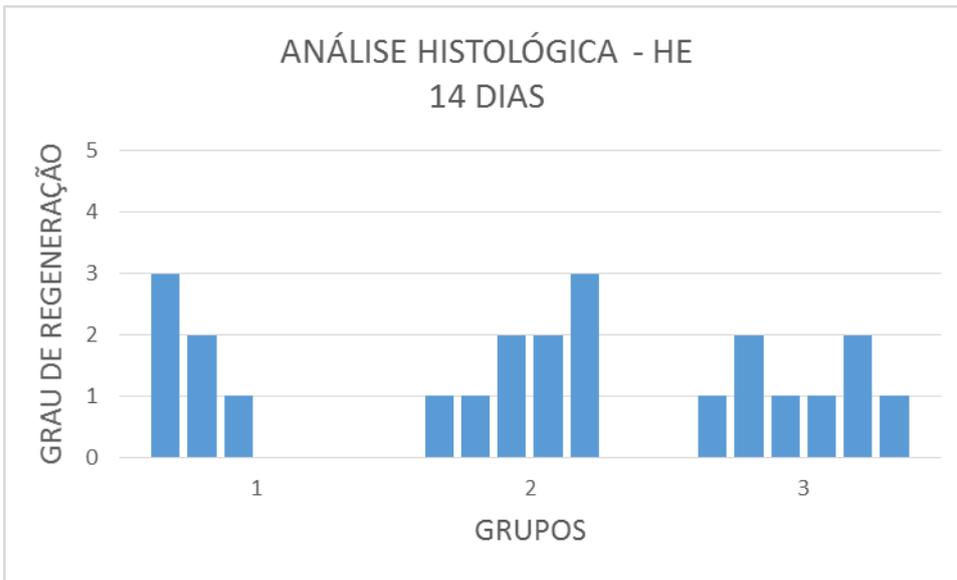
Nas análises realizadas 14 dias após a formação da lesão, foi observado que nos animais do grupo 1, dois deles apresentaram reepitelização completa com quantidade moderada de células inflamatórias nos campos analisados, um animal apresentou a lesão com cerca de 2/3 da sua profundidade reepitelizada, com quantidade moderada de células inflamatórias. Entre os indivíduos do grupo 2, dois animais apresentaram reepitelização completa, com pouca ou nenhuma célula

inflamatória na lesão, outros dois animais apresentaram reepitelização total, e quantidade moderada de células inflamatória, e apenas um animal apresentou a lesão com cerca de 2/3 de sua profundidade reepitelizada e quantidade moderada de infiltrado inflamatório. No grupo 3, foi observado a melhor resposta regenerativa, sendo que dos 6 animais analisados, todos apresentaram a reepitelização completa, sendo 4 deles com pouca ou nenhuma célula inflamatória na lesão, e apenas 2 animais apresentando uma quantidade moderada de células inflamatórias, conforme a figura 7.

**Figura 6. Gráfico de barras representando os graus de regeneração das lesões após 7 dias.**



**Figura 7. Gráfico de barras representando os graus de regeneração das lesões com 14 dias.**



## 6 DISCUSSÃO

Tendo em vista os altos custos relacionados ao tratamento de pacientes com úlceras nos membros inferiores, e o alto índice de morbidade e mortalidade causado por este tipo de lesão, a busca por novos tratamentos se faz necessária.

As terapias atuais para o tratamento desta complicação não se mostram totalmente eficazes, apesar de muitos pacientes se submeterem a tratamentos oferecidos pelo sistema de saúde, o número de pessoas com esta complicação segue aumentando a nível mundial.

Os pacientes diabéticos acometidos por úlceras nos membros inferiores demonstram durante o processo de regeneração tecidual uma fase inflamatória prolongada, com persistência do perfil pró-inflamatório, passando de um estado agudo para crônico, essa inflamação prolongada está diretamente relacionada a cicatrização precária destas lesões, levando estes indivíduos a infecções recorrentes, e quando não tratado de forma adequada, desde o início, podem levar a amputação.

Segundo um estudo recente conduzido por Dinh e colaboradores, os principais fatores envolvidos na cicatrização inadequada das feridas seriam os altos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, MMP-9 e outros fatores de crescimento. Além disso foi observado uma resistência à ação dos fatores de crescimento, devido, principalmente, a glicação destes fatores, juntamente com o aumento na expressão de MMP-9 (Dinh *et al.*, 2012).

Nosso estudo teve como principal objetivo identificar se a utilização de um curativo biológico associado ou não com células da fração mononuclear da medula óssea de ratos seria capaz de melhorar a resposta regenerativa em lesões ulcerosas em ratos diabéticos.

A partir da utilização da estreptozotocina, de forma intraperitoneal, foi possível estabelecer um modelo animal de diabetes. É um composto produzido por uma bactéria da espécie *Streptomyces achromogenes*, após a administração da estreptozotocina, o composto entra nas células  $\beta$ -pancreáticas, através de receptores do tipo Glut-2, levando a reações que causam a inibição da produção da insulina. Muitos autores sugerem a utilização de uma dosagem de 65 mg/Kg de

estreptozotocina para a indução do diabetes, e ainda a utilização de animais machos para o procedimento, além disso colocam que existe uma perda de 30% dos animais após a indução.

Em nosso estudo, foram utilizadas fêmeas, e os animais foram induzidos com uma única dose de 70 mg/Kg, que se mostrou eficiente e sem nenhum óbito após a indução. A comprovação do diabetes nos animais foi definida pela mensuração dos níveis de glicose sanguínea. Como sugerido por diversos autores: animais com valores superiores a 250 mg/dL foram considerados diabéticos, não tendo ocorrido a reversão do quadro em nenhum dos animais ao longo do estudo. Além disso, após a indução foi possível perceber uma perda de peso progressiva, ingestão excessiva de alimento e água e poliúria, caracterizando um quadro diabético severo e progressivo. Dois animais foram mantidos diabéticos por 35 semanas (conforme descrito no item 4.2), ao final do período de tempo os animais apresentavam uma severa retinopatia, estando totalmente cegos (anexo 3).

Após ter o modelo estabelecido, foi possível criar uma lesão no dorso do animal para simular uma ferida ulcerosa, simulando a úlcera presente em indivíduos diabéticos nos membros inferiores. Durante o procedimento cirúrgico para a criação da lesão nenhum animal foi submetido a desconforto ou a sensações dolorosas, devido ao protocolo anestésico utilizado, além disso, durante o tratamento, não foi utilizado nenhum tipo de antibiótico ou anti-inflamatório, visando não haver interferência no processo cicatricial durante o estudo.

Ao longo do nosso estudo foi observado que o grupo de animais tratados com o biomaterial associado ao transplante da FMMO mostrou um resultado significativamente melhor em termos de cicatrização nos dois primeiros dias após a formação da lesão em relação aos outros dois grupos testados.

A principal fase presente no processo regenerativo nos primeiros dois dias é, segundo alguns autores, a fase inflamatória, que se inicia logo após o dano tecidual, através da ativação de vias inflamatórias e do sistema imunológico, primeiramente para evitar a perda de sangue e fluídos, além da remoção de tecido morto para prevenção da infecção. A hemostasia é ativada pela formação de um tampão plaquetário, seguido por uma matriz de fibrina, tornando-se o suporte para as células infiltrantes (Eming *et al.*, 2014)

Podemos perceber, durante os primeiros dias, que os animais que tiveram o biomaterial suturado sobre a lesão apresentaram uma ferida mais limpa e seca, quando comparado macroscopicamente com os animais que não receberam nenhum tipo de tratamento, sugerindo que o próprio biomaterial agiu de forma a realizar a hemostasia da lesão, servindo como um tampão e dando suporte para a formação da matriz de fibrina e para a infiltração celular. Além disso, os animais tratados com o uso das células da FMMO além do biomaterial apresentaram uma taxa de regeneração significativamente melhor do que os outros grupos, como mencionado anteriormente, tendo uma redução acentuada do tamanho da lesão, através da diminuição do tempo da fase inflamatória e início precoce da fase de migração celular. Isso se dá possivelmente pelo fato das células da FMMO secretarem fatores tróficos e citocinas capazes de induzir a migração celular para o sítio lesado.

A partir das análises dos cortes histológicos corados com HE foi possível observar que nos animais avaliados 7 dias após a formação da lesão, os indivíduos do grupo 1 foram os que apresentaram os melhores resultados, uma vez que apresentavam as lesões completamente reepitelizadas e com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório, os animais que tiveram o biomaterial implantado sobre a lesão, apresentaram as lesões com quantidades moderadas ou severas de infiltrado inflamatório, com apenas um animal de cada grupo apresentando o processo de reepitelização completo. A não regeneração completa da lesão, e o maior número de células inflamatórias pode ser devido ao fato de ter sido implantado o biomaterial causando reação inflamatória adversa devido à presença desse novo material.

Entre os animais avaliados 14 dias após a lesão, foi observado que o grupo que apresentou a melhor resposta regenerativa foi o grupo 3, onde dos 6 animais analisados, 66% deles apresentaram regeneração completa da lesão com poucas ou nenhuma célula inflamatória nos campos avaliados, além disso os demais animais apresentaram regeneração completa e uma quantidade moderada de células inflamatórias. Nos animais do grupo 2, 40% deles apresentaram regeneração completa da lesão e poucas ou nenhuma célula inflamatória, outros 40% apresentaram regeneração completa e quantidade moderada de infiltrado inflamatório, e por fim, um dos animais apresentou regeneração incompleta com um número moderado de células inflamatórias. Entre os animais avaliados do grupo 1,

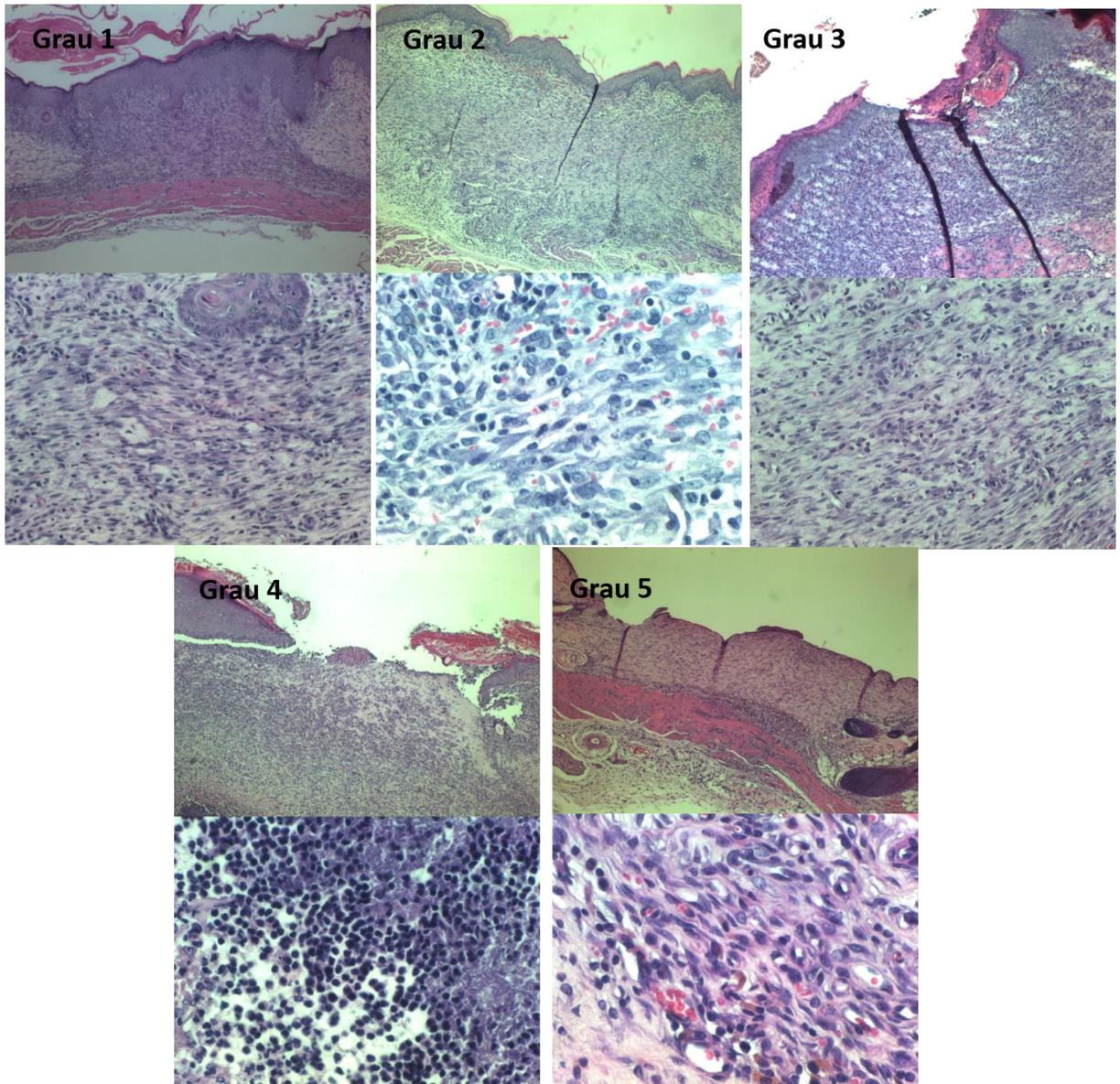
dois deles apresentaram regeneração completa com poucas células inflamatórias, e um animal apresentou a regeneração incompleta com um número moderado de infiltrado inflamatório.

Podemos considerar que o grupo 3, tratado com o biomaterial e as células da fração mononuclear da medula óssea, podem ter apresentado melhores resultados aos 14 dias após a lesão pelo fato das células FMMO induzirem a diferenciação e migração celular para o sítio da lesão, através dos seus fatores tróficos secretados. A figura 8 representa as características de analisadas para cada grau de regeneração estipulado conforme o item 4.7.1.

Em um estudo conduzido por Elsharawy e colaboradores, foram induzidos 30 ratos albinos para desenvolverem diabetes, também com o uso da estreptozotocina, e feita uma lesão semelhante na região frontal da perna destes ratos. Os animais foram divididos em dois grupos com tratamentos distintos, um grupo controle, com animais diabéticos e sem nenhum tratamento, e outro grupo com animais tratados com células tronco humanas derivadas de cordão umbilical. Em seus resultados também foi observado que o grupo tratado com células tronco apresentou uma regeneração média maior na área da lesão quando comparado com o grupo controle, além do aumento na espessura do epitélio, maior número de vasos e maior deposição de colágeno (Elsharawy *et al.*, 2012).

Outro estudo semelhante foi realizado por Gao e colaboradores, foi investigado o uso de células mesenquimais na regeneração de úlceras em um modelo de diabetes em camundongos. Neste estudo, o grupo concluiu que as células mesenquimais de camundongos saudáveis expressavam maiores níveis de IGF-1 do que as células de camundongos diabéticos. As células mesenquimais dos camundongos saudáveis aceleraram o processo de regeneração, apresentando um aumento na taxa de contração da lesão. Além disso a administração das células mesenquimais aumentou os níveis de insulina assim como aumentou a expressão da via de sinalização do GLUT4, reprimindo ainda os níveis de glicose e lipídeos, resultando numa melhora metabólica (Gao *et al.*, 2014)

**Figura 8. Representação dos cortes histológicos para cada grau de regeneração. Grau 1:** Reepitelização completa com nenhum ou pouco infiltrado inflamatório. **Grau 2:** Reepitelização completa com quantidade moderada de infiltrado inflamatório. **Grau 3:** Lesão com 2/3 de reepitelização com quantidade moderada de infiltrado inflamatório. **Grau 4:** Lesão com 1/3 de reepitelização com quantidade moderada de células inflamatórias. **Grau 5:** Lesão não reepitelizada com quantidade severa moderada ou severa de células inflamatórias.



Kuo e colaboradores também investigaram o uso de células mesenquimais derivadas da medula óssea na regeneração de úlceras de diabetes em um modelo experimental a partir do uso da estreptozotocina em ratos. Neste estudo também foi demonstrado que o uso das células mesenquimais acelerou o processo de regeneração tecidual, diminuindo significativamente o tamanho da lesão nos animais

tratados com as células mesenquimais derivadas da medula óssea. Além disso, o tempo para a cicatrização total da lesão também foi significativamente menor no grupo tratado com células mesenquimais. Os níveis do fator de crescimento vascular endotelial estavam significativamente mais elevados no grupo tratado com células mesenquimais (Kuo *et al.*, 2014).

Estes achados corroboram com nosso estudo, uma vez que os grupos tratados com células-tronco apresentaram melhores resultados em relação aos grupos que não recebiam o mesmo tratamento. Este fato provavelmente se deve aos muitos fatores tróficos secretados pelas células-tronco, que acabam induzindo a migração celular, diferenciação celular e a angiogênese.

O biomaterial utilizado tem papel importante no processo regenerativo, uma vez que funciona como um tampão da lesão, dando suporte para formação da matriz de fibrina e ao agregado plaquetário que atua nos primeiros momentos da regeneração tecidual, além de permitir a troca gasosa. Este material quando associado as células da fração mononuclear da medula óssea parece dar ainda mais suporte à migração celular para o sitio da lesão, fazendo com que o tempo de regeneração seja ainda mais rápido, e diminuindo a inflamação ao longo do tempo.

## 7 CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliado se o uso da fração mononuclear da medula óssea, associado ou não com biomaterial influencia no tempo de regeneração tecidual e no grau de regeneração em úlceras de ratos Wistar diabéticos induzidos com estreptozotocina.

A partir dos dados obtidos, podemos concluir que:

- Foi possível desenvolver um modelo de diabetes em ratos da linhagem Wistar a partir de uma única dose de 70 mg/Kg de estreptozotocina por via intraperitoneal.
- A partir do uso de um *punch* de biópsia foi possível simular uma ferida ulcerosa na região dorsal dos ratos diabéticos.
- O uso do biomaterial de poliuretano se mostrou eficaz na cicatrização das lesões, uma vez que as lesões dos grupos tratados com a presença do biomaterial cicatrizaram em tempos semelhantes em relação ao grupo controle, e foram mais eficientes durante os primeiros dias após a fixação do material sobre a lesão.
- O biomaterial associado às células da fração mononuclear da medula óssea se mostrou eficaz na regeneração da lesão, sendo que nos primeiros 2 dias após o início do tratamento foi capaz de reduzir cerca de 50% a área original da lesão, além de ter apresentado o perfil inflamatório melhor do que os outros grupos testados ao final do experimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007. ISSN 0970-1915 0974-0422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453807/> >.
- BALTZIS, D.; ELEFThERiADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. **Advances in Therapy**, v. 31, n. 8, p. 817-836, 2014/08/01 2014. ISSN 0741-238X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x> >.
- BARIKANI, M.; MOHAMMADI, M. Synthesis and characterization of starch-modified polyurethane. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 4, p. 773-780, 4/23/ 2007. ISSN 0144-8617. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861706004139> >.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 4/10/ 2008. ISSN 1934-5909. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590908001148> >.
- BISWAS, A.; HUTCHINS, R. Embryonic stem cells. **Stem cells and development**, v. 16, n. 2, p. 213-222, 2007. ISSN 1547-3287.
- BLOOM, D. E. et al. **The global economic burden of noncommunicable diseases**. Program on the Global Demography of Aging. 2012
- BLUMBERG, S. N. et al. The role of stem cells in the treatment of diabetic foot ulcers. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 96, n. 1, p. 1-9, 4// 2012. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016882271100595X> >.
- BOULTON, A. J. M. The Pathway to Foot Ulceration in Diabetes. **Medical Clinics of North America**, v. 97, n. 5, p. 775-790, 9// 2013. ISSN 0025-7125. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712513000485> >.
- CARVALHO, E. N. D.; CARVALHO, N. A. S. D.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 60-64, 2003. ISSN 0102-8650. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502003001100009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003001100009&nrm=iso) >.
- CHEN, C.-C. et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1167-1173, 3// 2003. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202004660> >.
- CHEN, Q.; THOUAS, G. A. Metallic implant biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 87, p. 1-57, 1// 2015. ISSN 0927-796X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X14001077> >.
- CHEN, W. Y.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair Regen**, v. 7, n. 2, p. 79-89, Mar-Apr 1999. ISSN 1067-1927 (Print) 1067-1927 (Linking).

COELHO, G. L. L. M. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4· 4 million participants. 2016. ISSN 0140-6736.

COSTA-FERRO, Z. S. et al. Prevention of seizures and reorganization of hippocampal functions by transplantation of bone marrow cells in the acute phase of experimental epilepsy. In: (Ed.). **Seizure**. England: 2010. Published by Elsevier Ltd., v.19, 2010. p.84-92. ISBN 1532-2688 (Electronic) 1059-1311 (Linking).

COSTA-FERRO, Z. S. M. et al. Transplantation of bone marrow mononuclear cells decreases seizure incidence, mitigates neuronal loss and modulates pro-inflammatory cytokine production in epileptic rats. **Neurobiology of Disease**, v. 46, n. 2, p. 302-313, 5// 2012. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996111003767> >.

DEEDS, M. C. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011. Disponível em: < <http://lan.sagepub.com/content/45/3/131.abstract> >.

DEFRONZO, R. A.; CERSOSIMO, E.; MANDARINO, L. J. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus 6. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P., et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc., 2000.

DESHPANDE, A. D.; HARRIS-HAYES, M.; SCHOOTMAN, M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. **Physical therapy**, v. 88, n. 11, p. 1254-1264, 2008. ISSN 0031-9023.

DIMARINO, A. M.; CAPLAN, A. I.; BONFIELD, T. L. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013-September-4 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < [http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1245&name=inflammation&ART\\_DOI=10.3389/fimmu.2013.00201](http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1245&name=inflammation&ART_DOI=10.3389/fimmu.2013.00201) >.

DING, D.-C.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011. ISSN 0963-6897.

DINH, T. et al. Mechanisms Involved in the Development and Healing of Diabetic Foot Ulceration. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2937-2947, 2012. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/61/11/2937.abstract> >.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: (Ed.). **Cytotherapy**. England, v.8, 2006. p.315-7. ISBN 1465-3249 (Print) 1465-3249 (Linking).

EL-MESALLAMY, H. O. et al. Cell-Based Regenerative Strategies for Treatment of Diabetic Skin Wounds, a Comparative Study between Human Umbilical Cord Blood-Mononuclear Cells and Calves' Blood Haemodialysate. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e89853, 2014. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0089853> >.

ELSHARAWY, M. A.; NAIM, M.; GREISH, S. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v. 14, n. 3, p. 288-293, 2012. Disponível em: < <http://icvts.oxfordjournals.org/content/14/3/288.abstract> >.

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, Dec 3 2014. ISSN 1946-6234.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 137-188, 2013. Disponível em: < <http://physrev.physiology.org/content/93/1/137.abstract> >.

FRIEDRICH, M. A. et al. Intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with moderate to severe middle cerebral artery acute ischemic stroke. In: (Ed.). **Cell Transplant**. United States, v.21 Suppl 1, 2012. p.S13-21. ISBN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking).

GAME, F. L. et al. A systematic review of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, p. 119-141, 2012. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2246> >.

GORNA, K.; GOGOLEWSKI, S. In vitro degradation of novel medical biodegradable aliphatic polyurethanes based on  $\epsilon$ -caprolactone and Pluronic<sup>®</sup> with various hydrophilicities. **Polymer Degradation and Stability**, v. 75, n. 1, p. 113-122, // 2002. ISSN 0141-3910. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391001002105> >.

GRAD, S. et al. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. **Biomaterials**, v. 24, n. 28, p. 5163-5171, 12// 2003. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961203004629> >.

GROUP, E. D. P. R. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. **Archives of ophthalmology**, v. 122, n. 4, p. 552, 2004.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010/03/01 2010. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0022034509359125> >. Acesso em: 2017/01/25.

HILFIKER, A. et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, n. 4, p. 489-497, 2011/04/01 2011. ISSN 1435-2443. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00423-011-0762-2> >.

KATO, J. et al. Mesenchymal stem cells ameliorate impaired wound healing through enhancing keratinocyte functions in diabetic foot ulcerations on the plantar skin of rats. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 28, n. 5, p. 588-595, 9// 2014. ISSN 1056-8727. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056872714001317> >. Acesso em: 2014/10//.

KOHANE, D. S.; LANGER, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **Pediatr Res**, v. 63, n. 5, p. 487-491, 05//print 2008. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7> >.

KRUCKER, T.; LANG, A.; MEYER, E. P. New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics. **Microsc Res Tech**, v. 69, n. 2, p. 138-47, Feb 2006. ISSN 1059-910X (Print) 1059-910X (Linking).

KUO, Y. R. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Plast Reconstr Surg**, v. 128, n. 4, p. 872-80, Oct 2011. ISSN 0032-1052.

LADEIRA, P. R. S. D. et al. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares. **2011**, v. 90, n. 3, 2011. ISSN 1679-9836. Disponível em: < <http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/58903> >.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, Feb 2008. ISSN 0012-186X (Print) 0012-186x.

LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 132-142, 2003. ISSN 0102-8650.

LIMA, M. H. D. M.; ARAUJO, E. P. Diabetes mellitus e o processo de cicatrização cutânea. **Cogitare Enfermagem**, v. 18, p. 170-172, 2013. ISSN 1414-8536. Disponível em: < [http://www.revenf.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1414-85362013000100026&nrm=iso](http://www.revenf.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-85362013000100026&nrm=iso) >.

MARKETS, M. A. **Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2021.** <sup>2016</sup>

MARTINS, M. D. et al. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. n. 1099-1573 (Electronic), 20090126 DCOM- 20090205

MARTINS, P. D. E. et al. Adipose tissue mature stem cells in skin healing: a controlled randomized study. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, p. 394-401, 2011. ISSN 1983-5175.

MICHELS, A.; GOTTLIEB, P. Pathogenesis of Type 1A Diabetes. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P., et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc., 2000.

OBERSZYNY, T. M. Inflammation and wound healing. **Front Biosci**, v. 12, n. 8, p. 2993-9, 2007.

SEURING, T.; ARCHANGELIDI O FAU - SUHRCKE, M.; SUHRCKE, M. The Economic Costs of Type 2 Diabetes: A Global Systematic Review. n. 1179-2027 (Electronic), 20150730 DCOM- 20160617

SHETTY, A. K. Neural Stem Cell Therapy for Temporal Lobe Epilepsy. 2012.

SILVA, T. S. N. et al. Effect of titanium surface roughness on human bone marrow cell proliferation and differentiation: an experimental study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, p. 200-205, 2009. ISSN 0102-8650.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408.

TAO, Z.; SHI, A.; ZHAO, J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, p. 1-5, 2015/02/25 2015. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-015-0598-4> >.

TEO, A. J. T. et al. Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 2, n. 4, p. 454-472, 2016/04/11 2016. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00429> >.

TESCH, G. H.; ALLEN, T. J. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy (Methods in Renal Research). **Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 261-266, 2007. ISSN 1440-1797. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x> >.

TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 28, p. 8-14, 2012. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.2239> >.

TROUNSON, A.; MCDONALD, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 11-22, 7/2/ 2015. ISSN 1934-5909. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915002672](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915002672) >.

VAN DER KOOY, D.; WEISS, A. S. Why Stem Cells? **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1439-1441, 2000. Disponível em: < <http://www.sciencemag.org/content/287/5457/1439.abstract> >.

VENTURIN, G. T. et al. Bone marrow mononuclear cells reduce seizure frequency and improve cognitive outcome in chronic epileptic rats. **Life sciences**, v. 89, n. 7, p. 229-234, 2011. ISSN 0024-3205.

VINIK, A.; CASELLINI, C.; NEVORET, M. L. Diabetic Neuropathies. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P., et al (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc., 2000.

VOLAREVIC, V. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cell Treatment of the Complications of Diabetes Mellitus. **STEM CELLS**, v. 29, n. 1, p. 5-10, 2011. ISSN 1549-4918. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/stem.556> >.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 3/5/ 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404002089> >.

WAN, J. et al. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 647107, 2013. ISSN 2314-6745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671884> >.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 3, p. 311-321, 12// 2011. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822711005912> >.

WHO. **Global Report on Diabetes**. p.88. 2016. (978 92 4 156525 7)

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In: (Ed.). **Current Protocols in Pharmacology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471141754.

**ANEXOS****ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA**

**SIPESQ**  
Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6236

Porto Alegre, 10 de agosto de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA COM CURATIVOS BIOLÓGICOS NA REGENERAÇÃO DE ÚLCERAS DE DIABETES." coordenado por DENISE CANTARELLI MACHADO. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE MEDICINA

## ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 84/2015 - CEUA

Porto Alegre, 06 de novembro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

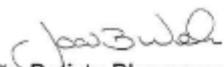
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00469 intitulado **“Avaliação da eficácia da associação de células da fração mononuclear da medula óssea com curativos biológicos na regeneração de úlceras de diabetes”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

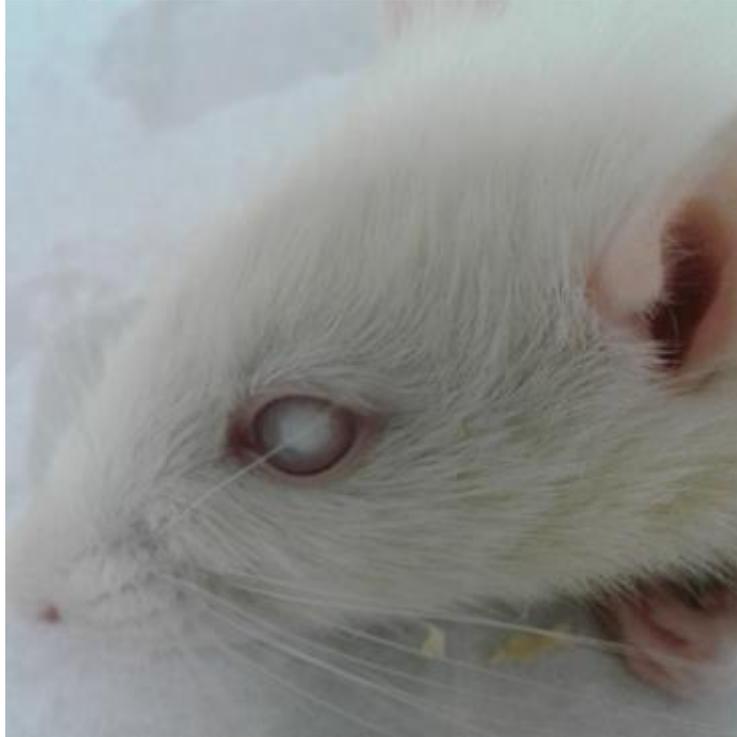
Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
50	Rattus norvegicus	10/2015 – 10/2017

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

## ANEXO 3 – IMAGEM DE RATO WISTAR APRESENTANDO RETINOPATIA



## ANEXO 4 – ARTIGO

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine



**Evaluation of the association of bone marrow mononuclear cell fraction with biomaterial in wound regeneration in diabetes animal model.**

Journal:	<i>Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>
Manuscript ID	TERM-17-0301
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	22-Jun-2017
Complete List of Authors:	Mazzuca, Rafael; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul Faculdade de Medicina; Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS Viezzler, Christian; Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS Zalewsky, Ricardo; Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS da Silva, Rafaela; Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS Machado, Denise; Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer); Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS
Keywords:	Diabetes, Ulcer, Streptozotocin, Stem Cell, Tissue Engineering, Biomaterials

SCHOLARONE™  
Manuscripts

## Evaluation of the association of bone marrow mononuclear cell fraction with biomaterial in wound regeneration in diabetes animal model.

Rafael Mazzuca<sup>a,b</sup>, Christian Viezzer<sup>b</sup>, Ricardo Zalewski<sup>c</sup>, Rafaela Radomski da Silva<sup>c</sup>, Denise C. Machado<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Medicine and Health Sciences, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. 6690 Ipiranga Avenue, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil

<sup>b</sup>Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga Avenue 6990, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 6690 Ipiranga Avenue 6990, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil.

**Corresponding Author:** Rafael Mazzuca, [biomazzuca@gmail.com](mailto:biomazzuca@gmail.com), Phone: +55 51 991132321. Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 6690 Ipiranga Avenue, Jardim Botânico, Porto Alegre – RS, Zip Code: 90610-000, Brazil.

**Abstract.** A major health problem is the increasing number of diabetic patients who develop ulcers in the lower limbs, a complication mainly due to inadequate glycemic control, besides the imbalance in the inflammatory phase during the tissue regeneration process, which often leads to amputation of the lower limbs. New therapeutic strategies are needed to treat these ulcers. In this study, streptozotocin was used to induce diabetes in 24 Wistar rats, they were divided into 3 groups, the control group with diabetic rats and the wound only (G1), one group with diabetic animals and a biomaterial sutured on the wound (G2), and one diabetic group with mononuclear cells transplanted into the wound and the biomaterial covering it (G3). A wound was created on the animal's back using a biopsy punch with 6mm of diameter to simulate an ulcer. Images of the wound were used to compare the regeneration area between the groups, and histological analyses were used to determine the regeneration grade, considering the inflammatory cells and the epithelial regeneration. The macroscopic analysis has shown that the animals treated with the biomaterial associated with the bone marrow mononuclear cells, had a significantly better regeneration rate in the first 2 days after the wound formation, when compared with the other groups where only the biomaterial was applied or did not receive any treatment. Our results indicate that the use of the bone marrow mononuclear cells fraction associated with the biomaterial may be a therapeutic ally in the regeneration of diabetes ulcers.

**Key Words:** Diabetes, Ulcer, Streptozotocin, Stem Cell, Tissue Engineering, Biomaterials

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is considered a group of metabolic diseases, where the main characteristic is the hyperglycemic status, which can be caused by the lack of production of insulin by the body, a deficit in the production or reception of this hormone, among other causes. This disease is associated with several complications, such as nephropathies, retinopathies, cardiovascular diseases, ulcers and limb amputations. It is a major public health problem worldwide due to its high prevalence rate and morbidity (Michels e Gottlieb, 2000; Whiting *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014; Tao *et al.*, 2015).

In 2016, the first Global Report on Diabetes was launched by the World Health Organization on World Health Day, where it was shown that in 2014 about 414 million adults were living with diabetes. The overall prevalence practically doubled in relation to the 80s, rising from 4.7% of the adult population to 8.5%. This increase occurred more rapidly in low- and middle-income countries, but also had an increase in the number of cases in developed countries (Who, 2016). This increase in the number of cases would be directly related to an increase in the risk factors for the development of diabetes, such as overweight and obesity (Whiting *et al.*, 2011; Tao *et al.*, 2015; Who, 2016).

Diabetic foot ulcer is one of the main complication that causes physical incapacity; it is derived from several factors such as: neuropathies, abnormal biomechanics of the foot and poor wound healing. Autonomic neuropathy results in anhidrosis and altered superficial blood flow to the feet, promoting dryness of the skin and formation of small fissures. Motor neuropathy causes the individual to have abnormal muscle mechanics of the foot, in addition to structural alterations in this region, peripheral sensory neuropathy interferes with the normal protection mechanisms, causing the diabetic to sustain trauma in the peripheral regions, which may be recurrent and often imperceptible. Recurrent infections are caused by reduced immunity, phagocytic function associated with hyperglycemia and poor vascularization. Some risk factors are determinants for this type of injury: male, more than 10 years with diabetes, peripheral neuropathy, abnormal foot structure, peripheral arterial disease, smoking, history of ulceration or amputation, and poor glycemic control (Dinh *et al.*, 2012; Boulton, 2013; Baltzis *et al.*, 2014).

The process of tissue regeneration can occur in two different ways: replacement of dead cells by healthy cells, identical to that of the injured tissue, or replacement of the damaged tissue by a fibrous connective tissue. It is known that the regeneration process involves a cascade of reactions and molecular mechanisms that mediate this process (Hilfiker *et al.*, 2011). The process of tissue repair occurs from three distinct phases: inflammation, new tissue formation and remodeling (Eming *et al.*, 2014).

Cell therapy, with bone marrow mesenchymal stem cells, has shown to be an effective strategy to repair damaged tissues due to the properties of these cells. Although the pathways involved in this repair process have not been fully identified, it is known that transplanted cells release growth factors that modulate the immune response, tissue organization, promote angiogenesis and, in turn, stimulate cell differentiation. They also respond to chemotactic factors released by the injury, causing them to migrate into this niche (Bianco *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011; Dimarino *et al.*, 2013; Trounson e McDonald, 2015).

Tissue engineering appears as a source to aid in the regenerative process, through the development of new biomaterials that can activate the regeneration of wounds, prevent the contraction and protect the wounds against infectious agents. Several groups of researchers have been focused on the synthesis and modification of new biocompatible materials to obtain a product that can be applied as a wound dressing. However, for biomaterials to be effective, they must have the following characteristics: wound adherence, histocompatibility, fluid loss control and avoid infections (Chen e Abatangelo, 1999; Kohane e Langer, 2008; Markets, 2016).

There are several methods of inducing diabetes in rodents. Type 1 diabetes, which is characterized by non-production of insulin by  $\beta$ -pancreatic cells, can be induced in different ways, both by the destruction of these cells by chemical compounds, specific diets, surgical induction, and by the use of transgenic animals and knockouts. The most used models are those that employ chemical compounds for their induction (Carvalho *et al.*, 2003). The use of chemical compounds aims the destruction of the  $\beta$ -cells. This destruction of  $\beta$ -pancreatic cells leads to a hyperglycemic state and weight loss. There are two main compounds that aim the destruction of pancreatic cells and the consequent induction of diabetes: streptozotocin and alloxan.

Streptozotocin is synthesized by a gram-positive bacterium, *Streptomyces achromogenes* and was used to induce diabetes for the first time in 1963 by Rakiety and colleagues to study the mechanisms involved in the development of diabetes and its complications, as well as possible therapeutic interventions (Wu e Huan, 2001; Lenzen, 2008). The streptozotocin enters in the  $\beta$ -pancreatic cells through the Glut-2 transporter, causing DNA alkylation, with subsequent activation of Poly-ADP ribose, leading to NAD<sup>+</sup> depletion, reducing the production of ATP and inhibiting the production of insulin. Usually streptozotocin is used only once, in a high dose. In mice it is used between 100-200 mg/kg and in rats between 35-65 mg/kg. About 4 days after the use of streptozotocin, blood glucose levels are measured, and results above 250 mg/dL can be considered positive for diabetes in rats (Szkudelski, 2001; Wu e Huan, 2001; Akbarzadeh *et al.*, 2007).

Due to the treatment perspectives of foot ulcer from diabetic patients, new therapeutics approach are needed to reduce the risks of infections, that usually leads to necrosis and amputations, it's urgent to develop new approaches to overcome the healing failure.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Ethical Aspects**

This research was published and approved by the Health Sciences Commission of the School of Medicine of PUCRS under number 6236, and also by the Committee on Ethics in the Use of Animals - PUCRS, registered under number 15/00469. All procedures and techniques used during the animal experimentation are in accordance with the regulation proposed in the Brazilian Guidelines for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes, by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA, 2013) and the Ethics Committee for Use of Animals of PUCRS (CEUA).

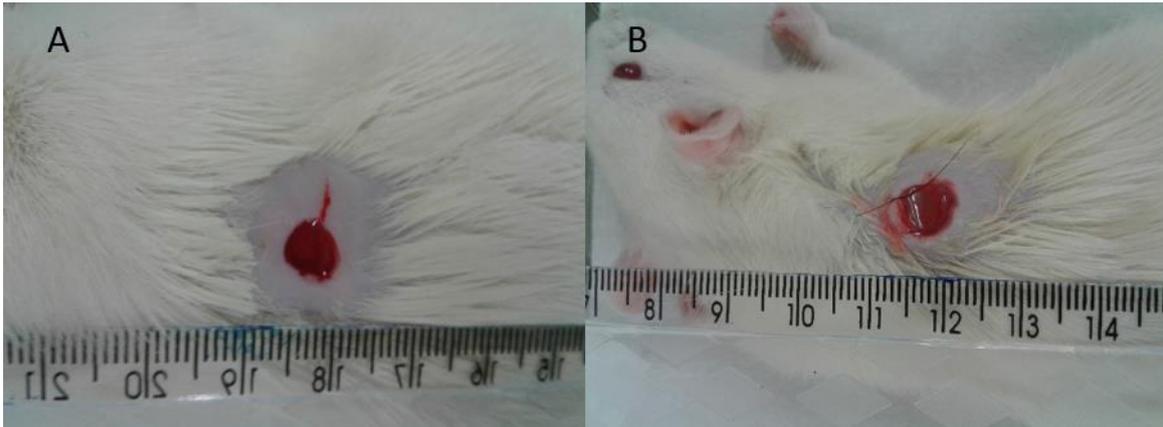
### **2.2. Animal Model of Diabetes and Injury Formation**

Adult Wistar female rats with 60 days old were obtained from the Experimental Biological Models Center, CeMBE, weighing between 200 and 300 g, with feed and water ad libitum. The animals were kept in the CeMBE vivarium, and the experimental procedures were performed in the same building, located at PUCRS, Porto Alegre city, state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Tail blood was collected on time 0 to evaluate the glycemic levels, after that, all animals were fasted 8 hours prior of induction diabetes. Diabetes induction was performed by an intraperitoneal injection of Streptozotocin (Sigma-Aldrich)(70 mg/kg), in a buffer solution with pH 4.5.

Seven days after the intraperitoneal injection of streptozotocin the blood glucose levels of the animals were measured using the ACCU-CHECK ACTIVE kit (Roche Diagnostics GmbH). Animals that had blood glucose levels above 250 mg/dL were considered diabetic. After glucose measurement, animals were divided into their groups, as described in item 2.3.

The animals submitted to the procedure to create the ulcer wound underwent anesthesia of 80% Ketamine and 20% Chlorpromazine followed by a 6 mm diameter dorsal incision with a biopsy punch simulating the ulcer wound, as shown in figure 1.



**Figure 1. Image of lesion in rat Wistar.** A: animal wound of the control group; B: wound formed in groups 1 and 2 with the presence of sutured biomaterial.

## 2.2. Biomaterial

The membrane was synthesized from biodegradable materials, and consists of the cross-linking of chitosan with a biodegradable polyester urethane, producing a hydrogel. It has been chosen to use a polyester that degrades rapidly, allowing rapid absorption by metabolic pathways. All materials used are approved by the FDA for use as biomaterials.

## 2.3. Experimental Design and Treatment of Groups

The number of animals used for each group was 8 individuals. Thus, 24 rats were divided into 3 groups, namely:

(1) Group 1 (control) (n=8): diabetic animals, with the wound, without the biological dressing and without cells of the mononuclear fraction;

(2) Group 2 (n=8): diabetic animals, with ulcerous wound and biomaterial sutured on the wound;

(3) Group 3 (n=8): diabetic animals with biomaterial and bone marrow mononuclear cells transplanted to the wound site.

After the formation of the wound,  $1 \times 10^6$  cells of the mononuclear bone marrow cells were transplanted to each animal of the group 3 by injection into the border of the wound. After this procedure, the biomaterial was positioned and sutured on the wound.

The animals were evaluated histologically in two different periods of time:

(1) Time 1: 7 days after membrane implantation

(2) Time 2: 14 days after membrane implantation

#### **2.4. Mononuclear Bone Marrow Fraction Preparation**

After the euthanasia of the donor animals, they were dissected; the bone marrow was aspirated from the long bones (femur, tibia and humerus), performed using a 26G aspiration syringe and heparin-containing needle to avoid coagulation. The aspirated material was placed in falcon tube containing RPMI medium, shortly after, the material contained in the falcon was transferred to another tube containing FicollPaque (Histopaque 1119, Sigma Aldrich) and centrifuged at 400G. The mononuclear cell layer formed on FicollPaque was collected and washed with DPBS. Then, the concentration of cells present on the Ficoll layer and its viability was determined using a Neubauer camera and the trypan blue exclusion method.

#### **2.5. Histological Analysis**

Samples obtained for the histological analyzes of the wound were removed 7 and 14 days after wound formation. To obtain the sample, the wound area was removed from the animals' backs, after the euthanasia procedure in the CO<sub>2</sub> chamber.

All samples were fixed in neutral buffered formalin and included in histological paraffin.

For the animals analyzed at 7 days, 3 histological sections were performed for each sample, the first cut located at the beginning of the wound, and the two subsequent cuts at 450 and 900 $\mu$ m from the initial cut (Figure 2A), for the animals analyzed at 14 days after the first cut was performed at the beginning of the scar, and subsequent cuts at 200 and 400 $\mu$ m after the first section (Figure 2B). Each section was made with 4 $\mu$ m thick, stained with hematoxylin-eosin (HE).

The histological analysis were performed at the Oral Pathology Laboratory of the Odontology School of PUCRS, Porto Alegre city, state of Rio Grande do Sul, Brazil.

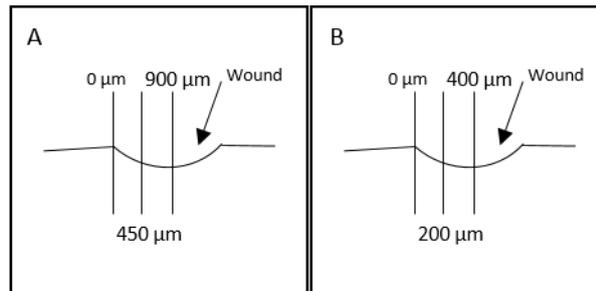


Figure 2. **Schematic diagram of the strategy used to perform the histological sections.**

A: representation of the histological sections of the samples after 7 days of injury. B: representation of the histological sections in the 15-day analyzes.

The analyzes were performed by two blinded examiners, with previous training by a pathologist, and calibration of the examiners were made with the kappa coefficient test.

## 2.6. Hematoxylin-Eosin staining (HE)

For the analysis of the epithelial tissue, the depth of the epithelial cell-covered wound was taken into account. For the analysis of connective tissue was considered the inflammatory process, measured by the type and quantity of inflammatory cells and presence / absence of fibrosis, using HE staining.

Histological evaluation was based on previous literature, based on the degrees of regeneration suggested by Martins *et al.*, degrees of regeneration ranged from grade 1 (total repair of epithelium and connective tissue) to grade 5 (with epithelial ulcer still present and infiltrated Inflammatory)(Martins *et al.*).

The microscopic characteristics analyzed for each grade were:

Grade 1 - Total repair of the epithelium with presence of fibrous connective tissue, as well as absence or presence of few inflammatory cells.

Grade 2 - Total repair of the epithelium, with presence of fibrous connective tissue and moderate amount of inflammatory cells, represented by macrophages, plasma cells and lymphocytes.

Grade 3 - Presence of ulcer with two thirds (2/3) of its depth covered by epithelium, connective tissue with medium fibrosis and moderate amount of inflammatory cells cells, represented by macrophages, plasma cells and lymphocytes.

Grade 4 - Presence of ulcer with one-third (1/3) of its depth covered by epithelium, a layer of connective tissue presenting moderate amounts of fibers and inflammatory cells, represented by macrophages, plasma cells and lymphocytes.

Grade 5 - Presence of ulcer (total or less than one-third (1/3) of the depth with repaired epithelium), connective tissue presenting severe or moderate amount of inflammatory cells, represented by neutrophils, macrophages, plasma cells and lymphocytes. The presence of micro abscesses can also be observed.

For each slide, four different fields were analyzed and the results obtained were averaged (figure 3). These results were then compared to determine if there was any difference between groups.

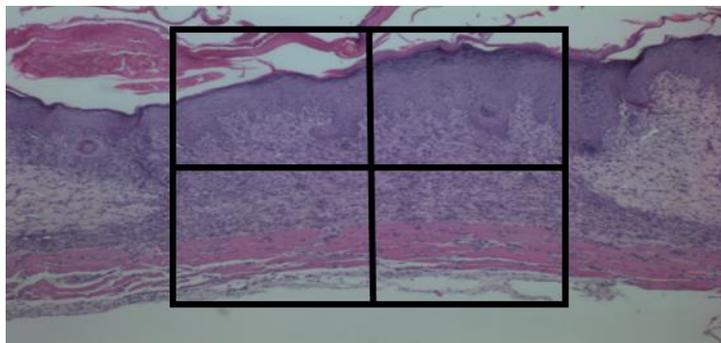


Figure 3. **Diagram of the analysis strategy of transverse histological sections stained with HE.**

## 2.7. Tissue Regeneration Analysis

The size of the wound was measured comparing images taken during the experiment, in day 2, 6 and 9 after the wound formation, and analyzed with the ImageJ software, using a tool called Threshold, which makes possible to highlight the internal area at the edge of the wound.

The formula that was used to measure the rate of regeneration of the wound was given as follows:  $\text{Regeneration Rate (\%)} = (\text{Original Wound Area} - \text{Detected Area}) / \text{Original wound area} \times 100$ .

## **2.8. Statistical Analysis**

Quantitative data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. To compare the regeneration of the wound between the groups, ANOVA followed by Tukey was used. Values with  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All statistical analysis was performed using the statistical software SigmaStat.

## **3. Results**

### **3.1. Establishing the animal model and wound formation**

All of twenty-four animals received intraperitoneal injection of streptozotocin for diabetes induction. Seven days after that, all animals showed glycemic levels higher than 250 mg/dL, which is considered diabetic according to Akbarzadeh et al. (Akbarzadeh *et al.*, 2007). Besides that, it was possible to observe that the animals showed a higher water intake, weight loss, and higher levels of urine. The comparison between the pre ( $88.42 \pm 6.98$  mg/dL) and post-induction ( $431 \pm 86.6$  mg/dL) glycemic levels shown significantly higher ( $p > 0,05$ ) as described in table 1. After the confirmation of the induction process, the animals were submitted to the wound formation procedure that was made with a 6mm diameter biopsy punch.

Table 1. Glycemic levels pre and post induction

Glycemic Levels (mg/dL)			
Animal	Initial	After 7 Days	≠
1	102	267	165
2	100	348	248
3	81	347	266
4	89	407	318
5	94	600	506
6	90	416	326
7	84	584	500
8	89	600	511
9	83	466	383
10	82	385	303
11	91	374	283
12	88	587	499
13	101	421	320
14	95	468	373
15	92	409	317
16	87	394	307
17	92	337	245
18	88	373	285
19	73	429	356
20	88	455	367
21	82	392	310
22	88	467	379
23	84	429	345
24	79	409	330
<b>Mean ± SD</b>	<b>82.42 ± 86.6</b>	<b>431 ± 8.6</b>	<b>p&lt;0.05</b>

### 3.2. Wound Regeneration Rate by Image Analysis using ImageJ

The wound regeneration evaluation by image analysis are presented as mean  $\pm$  SD in table 2. The values was obtained comparing the original area size with the size of the wound area during the regeneration process on day 2,6 and 9 after the wound formation procedure (Figure 4). After these values been obtained was possible to estimate the average percentage rate of the area that had regenerated in the different groups.

On day 2, it was possible to observe that the treated groups (G2 and G3) had shown at least a twice regenerated area comparing to the control group (G1), that had not been treated as the group with the biomaterial (G2) or with the biomaterial and mononuclear cells (G3). Therefore, the data presented demonstrate a significant difference between the group treated with the biomaterial and mononuclear cells(G3) cells in relation to the control group (G1) ( $p < 0.05$  one-way ANOVA followed by Tukey's test) two days after wound formation in animals.

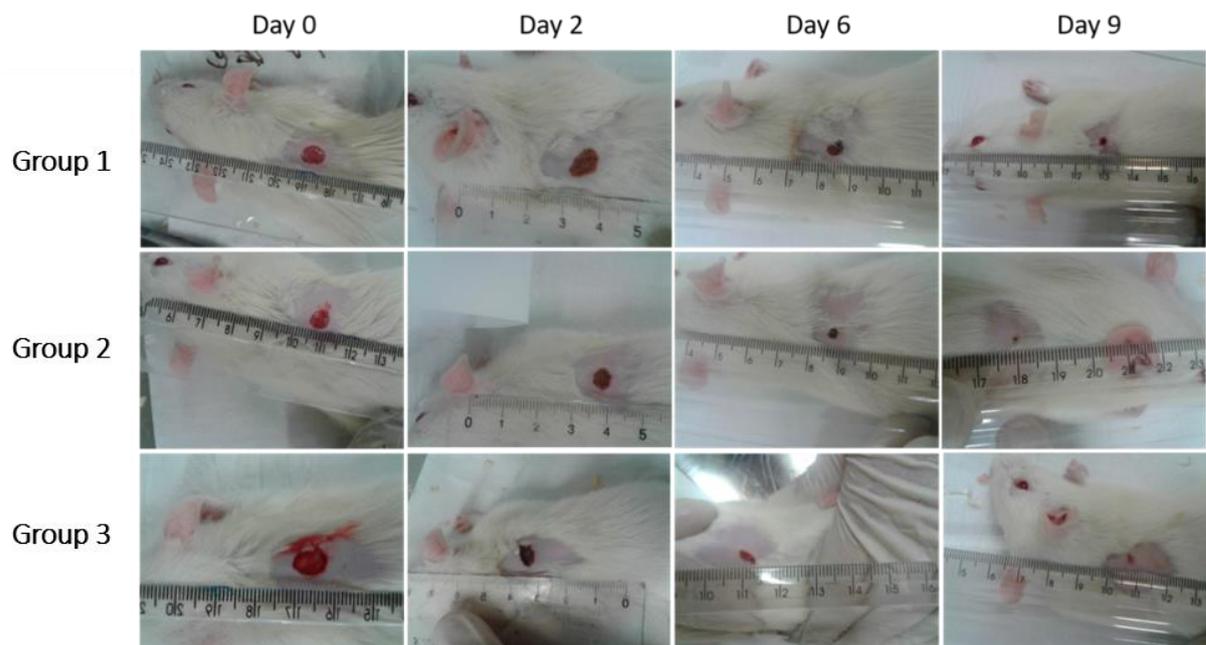


Figure 4. Images comparing the wound healing in the day of the wound procedure (day 0), 2,6 and 9 day after the wound formation.

Table 2 – Average percentage rate of wound regeneration in different groups

Groups	Day after the wound		
	2	6	9
G1	14.12±13.74	70.92±11.89	95.54 ±0.03
G2	30.24±18.37	74.85±12.97	97.25± 2.16
G3	38.46±19.92*	74.48±23.09	97.37±3.52

Data are expressed as mean ± standard deviation. One-way Anova followed by Tukey test. \* P <0.05 vs G1.

### 3.3 Wound healing evaluation by histological staining with Hematoxylin Eosin (HE)

From the histological analysis by the staining technique of HE, it was possible to observe that in the first 7 days after the creation of the wound and treatment of the groups, the animals of group 1 presented the degree of regeneration better than the other groups, presenting an epithelium and no or few inflammatory cells in the wound. One of the animals in group 2 presented the integral epithelium and a moderate amount of inflammatory cells, the other animal presented the epithelium with about 2/3 of its repaired depth and moderate amount of inflammatory cells. In group 3, one of the animals analyzed presented the integral epithelium and a moderate amount of inflammatory cells, while the other animal of group 3 presented the epithelium with less than 1/3 of its repaired depth and moderate amount of inflammatory cells, as represented in the figure 5.

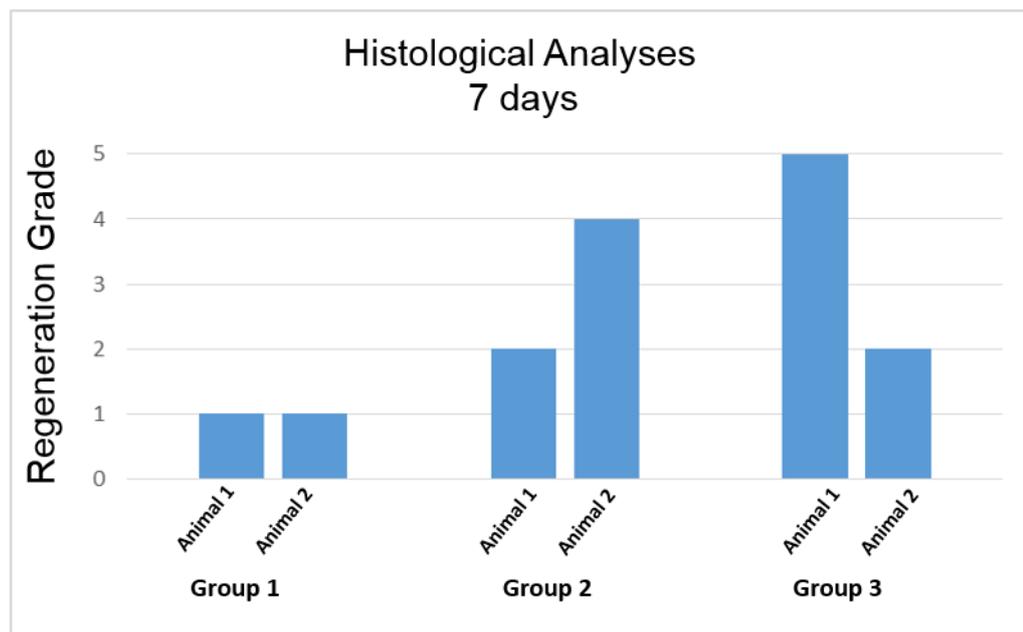


Figure 5 – Graph representing the regeneration grade of the lesions after 7 days.

In the analyzes performed 14 days after wound formation, it was observed that in the animals of first group (G1), two of them presented complete reepithelialization with moderate amount of inflammatory cells in the analyzed fields, one animal presented the wound with about 2/3 of its reepithelialized depth , With moderate amount of inflammatory cells. Among the individuals in the group treated only with the biomaterial (G2), two animals presented complete reepithelialization, with few or no inflammatory cell in the wound, two other animals presented total reepithelialization, and moderate amount of inflammatory cells, and only one animal presented the wound with about 2/3 of its reepithelialized depth and moderate amount of inflammatory infiltrate. In the group treated with the biomaterial and the mononuclear cells (G3) the best regenerative response was observed, 6 animals were analyzed, all of them presented complete reepithelialization, 4 of them with few or no inflammatory cells in the wound, and only 2 animals with a moderate amount of inflammatory cells, according to figure 6.

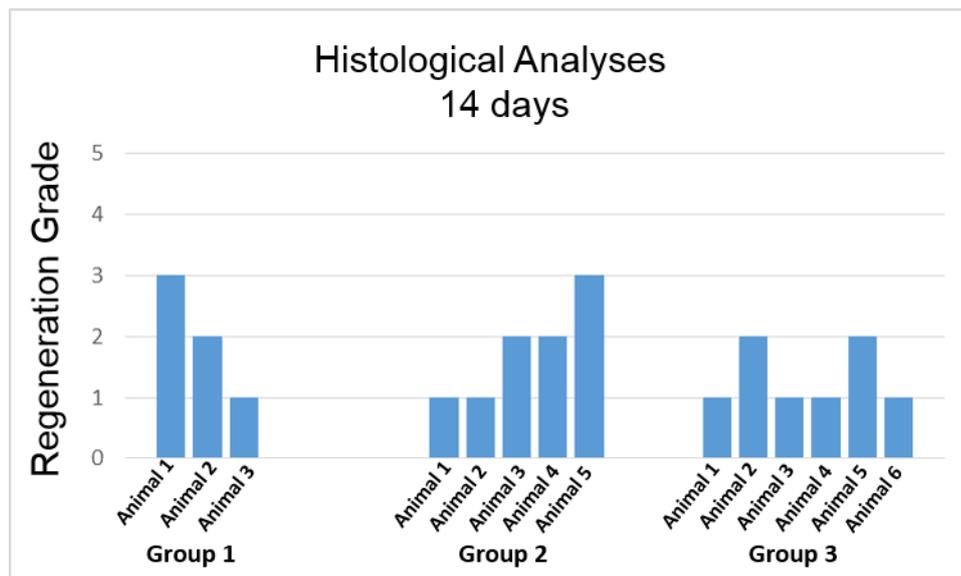


Figure 6 – Graph representing the regeneration grade of the lesions after 14 days.

#### 4. Discussion and Conclusion

Considering the high costs related to the treatment of patients with ulcers in the lower limbs, and the high morbidity and mortality rate caused by this type of wound, the search for new treatments is necessary.

The diabetic patients affected by ulcers in the lower limbs demonstrate during the process of tissue regeneration a prolonged inflammatory phase, with persistence of the pro-inflammatory profile, passing from an acute to chronic state, this prolonged inflammation is directly related to the precarious healing of these wounds, leading These individuals to recurrent infections, and when not treated properly from the outset, can lead to amputation.

Our study aimed to identify whether the use of a biological dressing associated or not with mononuclear bone marrow fraction cells of rats would be able to improve the regenerative response in ulcerous wounds in diabetic rats.

From the intraperitoneal use of streptozotocin, it was possible to establish an animal model of diabetes.

Streptozotocin is a compound produced by a bacterium of the species *Streptomyces achromogenes*, after administration of streptozotocin, the compound enters the  $\beta$ -pancreatic cells, through receptors of the Glut-2 type, leading to reactions that cause inhibition of insulin production. Many authors suggest the use of a 65mg/kg of streptozotocin for the diabetes induction, and also the use of male animals for the procedure, furthermore, there is a 30% loss of the animals after induction.

In our study, females were used, and the animals were induced with a single dose of 70 mg / kg, which was efficient and without any death due to the procedure. Evidence of diabetes in animals was defined by the measurement of blood glucose levels. As suggested by several authors: animals with values higher than 250 mg / dL were considered diabetic.

In addition, after induction it was possible to perceive progressive weight loss, excessive intake of food and water and polyuria, characterizing a severe and progressive diabetic condition. Two animals were kept diabetic for 35 weeks, at the end of the time the animals presented severe retinopathy, being totally blind.

After the model was established, it was possible to create a wound on the animal's back to simulate an ulcer wound, simulating the ulcer present in diabetic individuals in the lower limbs. During the surgical procedure for the creation of the wound no animal was submitted to discomfort or painful sensations, due to the anesthetic

protocol used; in addition, during the treatment, no antibiotic or anti-inflammatory type as used, in order to avoid interference during the study.

Throughout our study, it was observed that the group of animals treated with the biomaterial associated to the mononuclear cells (G3) showed a significantly better results in terms of healing in the first two days after the formation of the wound in relation to the other two groups tested.

According to some authors, the main phase present in the regenerative process in the first two days is the inflammatory phase, which begins immediately after tissue damage, through the activation of inflammatory pathways and the immune system, primarily to prevent blood and fluid loss. In addition to the removal of dead tissue to prevent infection. Hemostasis is activated by the formation of a platelet buffer, followed by a fibrin matrix, becoming the support for the infiltrating cells (Oberyszyn, 2007; Eming *et al.*, 2014).

During the first few days, we observed that the animals that had the biomaterial sutured on the wound had a cleaner and dry wound, when compared macroscopically with the animals that did not receive any type of treatment, suggesting that the biomaterial acted in a way to perform homeostasis of the wound, supporting the formation of the fibrin matrix and for cell infiltration. In addition, animals treated with the mononuclear cells in addition to the biomaterial showed a significantly better regeneration rate than the other groups as mentioned above, with a marked reduction in wound size, by decreasing the time of the inflammatory phase and early onset of the cell migration phase. This is possibly because the bone marrow mononuclear cells secrete trophic factors and cytokines capable of inducing cell migration to the injured site.

From the analysis of histological sections stained with hematoxylin and eosin was possible to observe that in the animals evaluated 7 days after wound formation, the individuals of group 1 presented the better results, once they presented the wounds completely reepithelialized with little or any inflammatory infiltrate cells, the animals that had the biomaterial implanted on the wound, presented the wounds with moderate or severe amounts of inflammatory infiltrate, with only one animal from each group presenting the complete reepithelization process. The no regeneration of the wound, and the greatest number of inflammatory cells may be due to the fact that

the biomaterial was implanted causing an adverse inflammatory reaction due to the presence of this new material.

Among the animals evaluated 14 days after the injury, it was observed that the group that presented the best regenerative response was the group that had been treated with the biomaterial and the mononuclear cells (G3), with six animals analyzed, 66% presented complete regeneration of the wound with few or no inflammatory cells in the evaluated fields, in addition the other animals presented complete regeneration and a moderate amount of inflammatory cells. In the animals of group 2, treated only with biomaterial, 40% presented complete regeneration of the wound and few or no inflammatory cells, another 40% presented complete regeneration and moderate amount of inflammatory infiltrate, and finally one of the animals presented incomplete regeneration with a moderate number of cells inflammatory. Among the animals evaluated in group 1, without treatment, two of them presented complete regeneration with few inflammatory cells, and one animal presented incomplete regeneration with a moderate number of inflammatory infiltrates.

In a study conducted by Elsharawy et al., 30 albino rats were induced to develop diabetes, also with the use of streptozotocin, and a similar wound was made in the frontal region of the leg of these rats. The animals were divided in two groups with different treatments, one control group, with diabetic animals and without any treatment, and another group with animals treated with human stem cells derived from umbilical cord. In their results it was also observed that the stem cell group presented a higher average regeneration in the wound area when compared to the control group, besides the increase in epithelial thickness, greater number of vessels and greater deposition of collagen (Elsharawy *et al.*, 2012).

Another similar study was conducted by Gao et al., The use of mesenchymal cells in the regeneration of ulcers in a model of diabetes in mice was investigated. In this study, the group concluded that mesenchymal cells from healthy mice expressed higher levels of IGF-1 than cells from diabetic mice. The mesenchymal cells of the healthy mice accelerated the regeneration process, presenting an increase in the rate of contraction of the wound. In addition, administration of mesenchymal cells increased insulin levels as well as increased expression of the GLUT4 signaling pathway, further suppressing glucose and lipid levels, resulting in metabolic improvement (Gao *et al.*, 2014).

Kuo et al. Also investigated the use of bone marrow-derived mesenchymal cells in the regeneration of diabetes ulcers in an experimental model from the use of streptozotocin in rats. In this study it was also demonstrated that the use of mesenchymal cells accelerated the tissue regeneration process, significantly reducing the wound size in animals treated with mesenchymal cells derived from the bone marrow. In addition, the time for total wound healing was also significantly lower in the mesenchymal cell treated group. Levels of vascular endothelial growth factor were significantly higher in the group treated with mesenchymal cells (Kuo *et al.*, 2011).

These findings corroborate our study, since the groups treated with stem cells presented better results in relation to the groups that did not receive the same treatment. This fact is probably due to the many trophic factors secreted by the stem cells, which end up inducing cellular migration, cell differentiation and angiogenesis.

The biomaterial used plays an important role in the regenerative process, since it acts as a buffer of the wound, giving support to fibrin matrix formation and to the platelet aggregate that acts in the first moments of the tissue regeneration, besides allowing the gas exchange. This material, when associated with the cells of the mononuclear bone marrow fraction, seems to give even more support to the cell migration to the wound site, making the regeneration time even faster, and decreasing the inflammation over time.

From the findings of this study, we can assert that the use of the mononuclear bone marrow fraction associated with the biomaterial increased the regenerative response of the wound in the first days, as well as an improvement in the inflammatory process at the end of the 14 days. The group treated with the biomaterial alone also demonstrated a better regenerative rate than did the diabetic group that did not undergo any type of treatment, demonstrating that the biomaterial is an important tool in the regeneration process. Further studies are needed to identify the inflammatory pathways involved during this process.

### **Acknowledgment**

Oral Pathology Laboratory of the Odontology School of PUCRS.

## References

AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v. 22, n. 2, p. 60-64, 2007. ISSN 0970-1915

0974-0422. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3453807/> >.

BALTZIS, D.; ELEFThERiADOU, I.; VEVES, A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. **Advances in Therapy**, v. 31, n. 8, p. 817-836, 2014/08/01 2014. ISSN 0741-238X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x> >.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 4/10/ 2008. ISSN 1934-5909. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590908001148> >.

BOULTON, A. J. M. The Pathway to Foot Ulceration in Diabetes. **Medical Clinics of North America**, v. 97, n. 5, p. 775-790, 9// 2013. ISSN 0025-7125. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712513000485> >.

CARVALHO, E. N. D.; CARVALHO, N. A. S. D.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 60-64, 2003. ISSN 0102-8650. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-86502003001100009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003001100009&nrm=iso) >.

CHEN, W. Y.; ABATANGELO, G. Functions of hyaluronan in wound repair. **Wound Repair Regen**, v. 7, n. 2, p. 79-89, Mar-Apr 1999. ISSN 1067-1927 (Print)

1067-1927 (Linking).

DIMARINO, A. M.; CAPLAN, A. I.; BONFIELD, T. L. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. **Frontiers in Immunology**, v. 4, 2013-September-4 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < [http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1245&name=inflammation&ART\\_DOI=10.3389/fimmu.2013.00201](http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1245&name=inflammation&ART_DOI=10.3389/fimmu.2013.00201) >.

DING, D.-C.; SHYU, W.-C.; LIN, S.-Z. Mesenchymal stem cells. **Cell transplantation**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011. ISSN 0963-6897.

DINH, T. et al. Mechanisms Involved in the Development and Healing of Diabetic Foot Ulceration. **Diabetes**, v. 61, n. 11, p. 2937-2947, 2012. Disponível em: < <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/61/11/2937.abstract> >.

ELSHARAWY, M. A.; NAIM, M.; GREISH, S. Human CD34+ stem cells promote healing of diabetic foot ulcers in rats. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v. 14, n. 3, p. 288-293, 2012. Disponível em: < <http://icvts.oxfordjournals.org/content/14/3/288.abstract> >.

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, Dec 3 2014. ISSN 1946-6234.

GAO, D. et al. Mesenchymal stromal cells enhance wound healing by ameliorating impaired metabolism in diabetic mice. **Cytotherapy**, v. 16, n. 11, p. 1467-75, Nov 2014. ISSN 1465-3249.

HILFIKER, A. et al. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 396, n. 4, p. 489-497, 2011/04/01 2011. ISSN 1435-2443. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00423-011-0762-2> >.

KOHANE, D. S.; LANGER, R. Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering. **Pediatr Res**, v. 63, n. 5, p. 487-491, 05//print 2008. ISSN 0031-3998. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1203/01.pdr.0000305937.26105.e7> >.

KUO, Y. R. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced diabetic wound healing through recruitment of tissue regeneration in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. **Plast Reconstr Surg**, v. 128, n. 4, p. 872-80, Oct 2011. ISSN 0032-1052.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-26, Feb 2008. ISSN 0012-186X (Print).

MARKETS, M. A. Biomaterials Market by Type of Materials (Metallic, Ceramic, Polymers, Natural) & Application cardiovascular, Orthopedic, Dental, Plastic Surgery, Wound Healing, Neurology, Tissue Engineering, Ophthalmology) - Global Forecast to 2021. 2016

MARTINS, M. D. et al. Comparative analysis between Chamomilla recutita and corticosteroids on wound healing. An in vitro and in vivo study. n. 1099-1573 (Electronic), 20090126 DCOM- 20090205

MICHELS, A.; GOTTLIEB, P. Pathogenesis of Type 1A Diabetes. In: DE GROOT, L. J.;BECK-PECCOZ, P., et al/ (Ed.). **Endotext**. South Dartmouth MA: MDText.com, Inc., 2000.

OBERSZYN, T. M. Inflammation and wound healing. **Front Biosci**, v. 12, n. 8, p. 2993-9, 2007.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res**, v. 50, n. 6, p. 537-46, 2001. ISSN 0862-8408 (Print)

0862-8408.

TAO, Z.; SHI, A.; ZHAO, J. Epidemiological Perspectives of Diabetes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, p. 1-5, 2015/02/25 2015. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-015-0598-4> >.

TROUNSON, A.; MCDONALD, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 11-22, 7/2/ 2015. ISSN 1934-5909. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915002672](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590915002672) >.

WHITING, D. R. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, n. 3, p. 311-321, 12// 2011. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168822711005912> >.

WHO. **Global Report on Diabetes**. p.88. 2016. (978 92 4 156525 7)

WU, K. K.; HUAN, Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In: (Ed.). **Current Protocols in Pharmacology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471141754.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)