

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Interação entre células mesenquimais adipoderivadas e *scaffold* de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) *epox* confeccionado a partir de *centrifugal spinning*: estudo *in vitro*

Emanuelle Bortolotto Degregori

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Interação entre células mesenquimais adipoderivadas e *scaffold* de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) *epox* confeccionado a partir de *centrifugal spinning*: estudo *in vitro*

Autora: Emanuelle Bortolotto Degregori
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Cirurgia e Anestesiologia Veterinária pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini
Co-orientadora: Dra. Fernanda dos Santos de Oliveira

Porto Alegre

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Degregori , Emanuelle Bortolotto
Interação entre células mesenquimais adipoderivadas e scaffold de poli (ácido lático-co-glicólico) e poli (isopreno) epox confeccionado a partir de centrifugal spinning: estudo in vitro / Emanuelle Bortolotto Degregori . -- 2020.

71 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Fernanda dos Santos de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Biomaterial. 2. Células Estromais Mesenquimais. 3. Engenharia de Tecidos. 4. Integração celular. 5. MTT. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. de Oliveira, Fernanda dos Santos, coorient. III. Título.

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

Emanuelle Bortolotto Degregori

Interação entre células mesenquimais adipoderivadas e *scaffold* de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) *epox* confeccionado a partir de *centrifugal spinning*: estudo *in vitro*.

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2020.

APROVADO POR:

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. NATASHA MAURMANN
Membro da Comissão (UFRGS)

Prof. Dra. ELIZABETH OBINO CIRNE-LIMA
Membro da Comissão (HCPA-UFRGS)

Prof. Dr. CRISTIANO GOMES
Membro da Comissão (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini pelo incentivo à pesquisa, disposição, conselhos e confiança nesses dois anos de mestrado.

À minha co-orientadora Fernanda dos Santos de Oliveira pela paciência, profissionalismo e por compartilhar seus conhecimentos sobre engenharia de tecidos.

À minha família, em especial minha mãe Jussara Maria Bortolotto, meu pai Gessi Degregori e ao meu irmão Marco Antônio Bortolotto Degregori, que sempre me apoiaram, confiaram e nunca mediram esforços para que meus sonhos se tornassem realidade. A minha pretinha Maya, que sempre alegra meus piores dias. Obrigada por ser meu pontinho de luz. Aos meus dindos, Gilca Bellaguarda e Paulo Werner, por todos os momentos únicos ao lado de vocês, pelo carinho, dedicação e confiança. Eu amo vocês, e isso tudo é por vocês sempre!

A toda a equipe do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, em especial a Prof. Dra. Elizabeth Obino Cirne-Lima e Dra. Paula Barros Terraciano, por me receberem de braços abertos e permitir fazer parte desta equipe fantástica.

Às minhas amigas e colegas, Nathalia Franco e Nicole Henckes, as quais compartilhei minhas dúvidas, inseguranças, felicidades e êxito. Obrigada por nunca medirem esforços para que esse projeto se findasse!

À amiga, Dra. Natasha Maurmann por sanar minhas dúvidas, pela paciência e disponibilidade, por mostrar a luz no fim do túnel! Você é exemplo de profissionalismo. Obrigada por tudo!

Aos estagiários de iniciação científica, Mariana Malves, Jeferson Rigon, Bruna Gomes e Geciéle Teixeira pelo auxílio na contagem celular e cultivo de células. Obrigada por tanto!

A toda equipe do Laboratório de Biomateriais, excepcionalmente ao Henrique Zaninni Luz e Prof. Dr. Luis Alberto Loureiro dos Santos, por me proporcionarem as matrizes para a execução deste projeto, e sanarem minhas dúvidas sobre a confecção das fibras.

A Francieli Rhoden, pela disponibilidade, dedicação e paciência em auxiliar na citometria, e procura incansável pelas células na microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço imensamente à querida Cris Khul, por me ajudar com toda a estatística do trabalho, pela paciência nas explicações e, muitas vezes, me ouvir desabafar.

Aos meus amigos da pós-graduação, do vôlei e da vida, por tornarem tudo mais leve e mais feliz! Em especial Andressa Trombetta, Simone Bianchi, Luciana Teixeira, Camila Calliari, Isabel Cirne-Lima, por momentos ímpares ao lado de vocês, pelas risadas, pelos dias incansáveis dentro do bloco cirúrgico, pelas festas, conselhos e esclarecimentos de dúvidas. Ao meu amigo e colega Matheus Pippi da Rosa, por despertar em mim o amor à pesquisa com células tronco, pelos ensinamentos e sempre me incentivar nessa jornada, sou grata sempre!

Eternamente agradecida por todos os professores da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da UFRGS, por compartilharem seus conhecimentos, pela amizade e por sempre acreditarem nos seus alunos! Além disso, gostaria de agradecer toda equipe do Hospital de Clínicas Veterinárias por esses dois anos de convivência, pelas conversas e risadas.

Gostaria de agradecer ao apoio financeiro do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e por ceder sua estrutura para que esse projeto fosse desenvolvido.

RESUMO

A engenharia de tecidos compreende o uso de células tronco mesenquimais associadas com biomateriais, tendo como finalidade o reparo, regeneração e restauração de tecidos lesados. O objetivo desse trabalho foi avaliar a interação entre células mesenquimais adipoderivadas de humanos com *scaffold* de PLGA/PI *epox*, confeccionado através da técnica de *centrifugal spinning*. Preconizou-se, a partir de testes *in vitro*, o estabelecimento da melhor densidade de plaqueamento entre $0,325 \times 10^5$, $0,65 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^5$ e melhor tempo de cultivo entre 24, 48 ou 72 horas. A partir das características fibroblastóides, aderência a garrafas plásticas de cultivo celular, diferenciação em linhagens adipogênicas e osteogênicas e imunofenotipagem positiva para CD90 e CD105 e negativa para CD34 e CD45, as células utilizadas neste estudo foram consideradas tronco mesenquimais. A integração das células à matriz fibrosa foi observada por meio de microscopia eletrônica de varredura, onde foi possível evidenciar a emissão de pseudópodes celulares. As fibras confeccionadas pela técnica de *centrifugal spinning* apresentaram-se fibrosas e porosas, com diâmetro médio de $3,61 \pm 2,81 \mu\text{m}$, tendo uma maior representatividade de fibras com $1 \mu\text{m}$ ($n=113$). A atividade metabólica das células cultivadas junto ao biomaterial foi similar aos seus respectivos controles (células aderidas no fundo da placa, padrão ouro) ($p > 0,05$). A exceção evidenciada entre os grupos testes e controle, perante ao teste de MTT, foi notória no cultivo de $1,3 \times 10^5$ em 72 horas, onde as células cultivadas junto ao *scaffold* mostraram-se metabolicamente mais ativas que o controle ($2,87 \pm 0,30$; $2,18 \pm 0,15$, $p > 0,05$), demonstrando a não interferência do biomaterial na viabilidade celular. A menor absorvância foi no grupo de $0,325 \times 10^5$ ADSCs ($0,69 \pm 0,19$; $1,27 \pm 0,46$; $1,25 \pm 0,43$, diferindo em todos os tempos de avaliação em relação ao grupo de $1,3 \times 10^5$ células ($1,96 \pm 0,53$; $2,45 \pm 0,26$; $2,87 \pm 0,30$, $p < 0,05$), porém foi homogênea ao plaqueamento de $0,65 \times 10^5$ ($1,02 \pm 0,24$; $2,07 \pm 0,71$; $1,77 \pm 0,56$, $p > 0,05$). Esse último, apresentou menor absorvância quando contrastado ao grupo de maior densidade nas avaliações de 24 e 72 horas ($p < 0,05$). Perante a coloração do citoesqueleto celular, não foram demonstradas alterações quando as células foram cultivadas junto as matrizes fibrosas, independente do tempo de incubação e densidade. A contagem celular foi realizada por meio da coloração nuclear com DAPI, onde a maior média obtida por campo foi no plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ células, durante 24 horas ($529 \pm 81,70$). Porém, há uma tendência ao descolamento celular com o passar das horas, podendo se justificar pelas forças moleculares atuantes entre o *scaffold* e as células e por ter um número alto de células aderidas inicialmente. Porém, as células retornam a proliferar em 72 horas de avaliações. Fundamentado nos achados descritos acima, constatamos que o plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ por 24 horas foi o mais eficaz. Ademais, o uso do biomaterial junto ao cultivo durante três dias de avaliações, não interferiu na viabilidade e morfologia das células. Segundo esses resultados, associação entre PLGA/PI *epox* e células mesenquimais adipoderivadas podem ser consideradas para futuros estudos *in vivo* na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Biomaterial. Células Estromais Mesenquimais. Engenharia de Tecidos. Integração celular. MTT. PLGA/PI *epox*.

ABSTRACT

Tissue engineering comprises the use of mesenchymal stem cells associated with biomaterials, with the purpose of repairing, regenerating and restoring damaged tissues. The aim of this work was to evaluate the interaction between human adipoderivated mesenchymal cells with PLGA/PI *epox* scaffold, made using the centrifugal spinning technique. It was recommended, based on in vitro tests, the establishment of the best plating density between 0.325×10^5 , 0.65×10^5 and 1.3×10^5 and the best culture time between 24, 48 or 72 hours. From fibroblastoid characteristics, adherence to plastic bottles of cell culture, differentiation into adipogenic and osteogenic lines and positive immunophenotyping for CD90 and CD105 and negative for CD34 and CD45, the cells used in this study were considered mesenchymal stem. The integration of cells in the fibrous matrix was observed by means of scanning electron microscopy, where it was possible to evidence the emission of cellular pseudopods. The fibers made by the spinning centrifugal technique were fibrous and porous, with an average diameter of $3.61 \pm 2.81 \mu\text{m}$, with a greater representation of fibers with $1 \mu\text{m}$ ($n = 113$). The metabolic activity of cells grown next to the biomaterial was similar to their respective controls (cells adhered to the bottom of the plate, gold standard) ($p > 0.05$). The exception shown between the test and control groups, compared to the MTT test, was evident in the cultivation of 1.3×10^5 in 72 hours, where cells cultured next to the scaffold were more metabolically active than the control (2.87 ± 0.30 ; 2.18 ± 0.15 $p > 0.05$), demonstrating the non-interference of the biomaterial in cell viability. The lowest absorbance was in the group of 0.325×10^5 ADSCs (0.69 ± 0.19 ; 1.27 ± 0.46 ; 1.25 ± 0.43 , differing at all times in relation to the 1.3×10^5 group cells (1.96 ± 0.53 ; 2.45 ± 0.26 ; 2.87 ± 0.30 , $p < 0.05$), but it was homogeneous at 0.65×10^5 (1.02 ± 0.24 ; 2.07 ± 0.71 ; 1.77 ± 0.56 , $p > 0.05$). The latter showed lower absorbance when compared to the group with higher density in the 24 and 72 hour evaluations ($p < 0.05$). Due to the staining of the cell cytoskeleton, no changes were demonstrated when the cells were cultured with fibrous matrices, regardless of the incubation time and density. Cell count was performed by means of nuclear staining with DAPI, where the highest average obtained by field was in the plating of 1.3×10^5 cells for 24 hours (529 ± 81.70). However, there is a tendency for cell detachment over time, which may be justified by the molecular forces acting between the scaffold and the cells and for having a high number of cells adhered initially. However, the cells return to proliferate in 72 hours of evaluations. Based

on the findings described above, we found that the plating of 1.3×10^5 for 24 hours was the most effective. In addition, the use of biomaterial with the culture during three days of evaluations, did not interfere in the viability and morphology of the cells. According to these results, an association between PLGA/PI *epox* and adipoderivated mesenchymal cells can be considered for future in vivo studies in tissue engineering.

Keywords: Biomaterial. Cellular integration. Mesenchymal Stromal Cells. MTT. PLGA/PI *epox*. Tissue Engineering.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Em evidência (seta amarela), cilindro com orifícios da saída da blenda de PLGA/PI epox (A), anteparo circular horizontal (B), exemplar do scaffold utilizado para cultivo celular..... 32
- Figura 2** - Ensaio de diferenciação in vitro das ADSCs após 21 dias de cultivo. Fotomicroscopia das ADSCs no estágio de indiferenciação (40x) (A), submetidas à diferenciação adipogênica com coloração Oil Red O (20x) (B), e osteogênica com coloração Alizarin Red S (20x) (C). 37
- Figura 3** – Demonstração gráfica dos marcadores de superfície celular, quando realizado ensaio de imunofenotipagem. Os gráficos A, D e G demonstram todos os eventos detectados por citometria (vermelho), para avaliação da expressão dos marcadores. O mesmo mostra no eixo Y a complexidade das células e no eixo X a população total a ser analisada. Os gráficos B, E e H representam as células que são negativas (verde) para os marcadores de superfície (CD34 e CD45). Os gráficos C, F, e I retratam as células marcadas (rosa) para CD90 e CD105..... 38
- Figura 4** - Imagem capturada por MEV, demonstrando o aspecto poroso e fibroso do scaffold de PLGA/PI epox, confeccionadas pela técnica de centrifugal spinning (800x). 39
- Figura 5** – Imagem representativa da regularidade do diâmetro das fibras do scaffold de PLGA/PI epox, fabricado por centrifugal spinning. nm: nanofibras. 39
- Figura 6** – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, comprovando a adesão celular às fibras. Notar pseudópode (seta amarela) (C). 40
- Figura 7** – Imagens feitas através de imunofluorescência com corante nuclear DAPI, para avaliação da contagem celular a partir da adesão às fibras de PLGA/PI epox. Plaqueamento de $0,325 \times 10^5$ em 24 horas (A), $0,65 \times 10^5$ em 24 horas (B), $1,3 \times 10^5$ em 24 horas (C), $0,325 \times 10^5$ em 48 horas (D), $0,65 \times 10^5$ em 48 horas (E), $1,3 \times 10^5$ em 48 horas (F), $0,325 \times 10^5$ em 72 horas (G), $0,65 \times 10^5$ em 72 horas (H), $1,3 \times 10^5$ em 72 horas (I) (10X). 43
- Figura 8** – Imagem capturada por microscopia confocal, demonstrando morfologia do citoesqueleto das ADSCs após cultivo junto aos andaimes de PLGA/PI epox (63x)..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do efeito de tempo e de incubação e concentração celular em relação a viabilidade celular das ADSCs, a partir do teste colorimétrico de MTT.....41

Tabela 2 - Contagem por meio de coloração nuclear com DAPI das células aderidas ao biomaterial em relação a concentração e tempo de cultivo celular.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões
a. C	Antes de Cristo
ADSCs	<i>Adipose Derived Stem Cells</i>
BC	Biomaterial acrescido com células
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CO ₂	Dióxido de Carbono
CT	Controle
DAPI	<i>4',6'-diamino-2-feliril-indol</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Sulfóxido de metila
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
epox	Epoxidado
ET	Engenharia de tecidos
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
H	Horas
H ₂ O	Água
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HepG2	Linhagem Celular de Hepatoma Humano-G2
HMV-II	Linhagem Celular de Melanoma de Vagina Humano-II
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4
INF- γ	Interferon Gama
kV	Kilovolt

LABIOMAT	Laboratório de Biomateriais
M	Molar
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTT	3-[4,5dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NK	Natural Killer
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
PGA	Ácido Glicólico
PI	Poli(isopreno)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PLGA/PIepox	Poli(ácido láctico-co-glicólico) e Poli(isopreno) epoxidado
PLLA	L-ácido Láctico
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Engenharia de Tecidos	17
3.2 Células Tronco Mesenquimais.....	18
3.3 Biomateriais	21
3.4 Blenda polimérica de poli (ácido láctico- <i>co</i> -glicólico) e poli (isopreno) epox.....	23
3.5 <i>Centrifugal spinning</i>	25
4 MANUSCRITO	27
4.1 RESUMO.....	27
4.2 INTRODUÇÃO	28
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.3.1 Blenda de PLGA/PI epox.....	30
4.3.2 Produção das fibras por <i>centrifugal spinning</i>	31
4.3.3 Células mesenquimais adipoderivadas (ADSCs) de humanos.....	32
4.4 Cultivo celular nos <i>scaffolds</i>	34
4.6 Viabilidade Celular (ensaio de MTT)	34
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
4.9 Integração celular.....	35
4.7 Morfologia celular.....	36
4.10 Análise Estatística.....	36
4.4 RESULTADOS.....	36
4.5 DISCUSSÃO	44
4.6 CONCLUSÃO	48
4.7. FINANCIAMENTO	49
4.8 REFERÊNCIAS.....	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO 1	65
ANEXO 2	69

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é uma área em constante crescimento devido ao cenário mundial da saúde. Este, demonstra índices elevados de traumas, anomalias congênitas, doenças degenerativas e crônicas, que, inúmeras vezes não respondem aos tratamentos convencionais. Na pretensão de moderar essa situação, uma nova abordagem terapêutica tem sido proposta pela engenharia de materiais e medicina regenerativa. Esta, inclui o uso de biomateriais em associação a células tronco mesenquimais, visando a promoção da regeneração ou substituição de órgãos e/ou tecidos lesionados.

As células tronco mesenquimais ou células estromais, são células indiferenciadas, com características de autorrenovação e multiplicação, propiciando a reposição celular ativa. Também são células capazes de diferenciar-se em vários tecidos e com habilidades imunomodulatórias e anti-inflamatórias. No entanto, apesar de ser um tratamento promissor, algumas pesquisas revelaram que, quando administradas em suspensão, as células são rapidamente eliminadas pelo sistema imunológico devido à ausência de uma matriz extracelular.

No intuito de manter essas células por um período maior e até tratar feridas mais extensas, a combinação aos biomateriais é capaz de fornecer suporte para a manutenção local. Esses biomateriais são substâncias projetadas para estabelecer interfaces com sistemas biológicos, com a finalidade de proporcionar condições químicas, morfológicas e estruturais adequadas para o estímulo do crescimento celular. Porém, tendo em vista suas propriedades intrínsecas, para o uso humano ou animal, evidencia-se a necessidade de experimentos prévios regulamentadores, inicialmente *in vitro*, submetendo o material a culturas celulares controladas. É desejável que o referido material apresente estrutura capaz de suportar a migração, adesão e proliferação, mantendo a viabilidade celular sem causar níveis de toxicidade.

Existem vários métodos para a confecção de biomateriais, cada qual com suas vantagens e desvantagens, porém o principal objetivo é oferecer características satisfatórias para o desenvolvimento celular. A fabricação de biomateriais apresenta uma das principais áreas da pesquisa na medicina regenerativa, pois desempenha um papel único na regeneração de tecidos e reparação. O método por *centrifugal spinning* atua sob

força centrífuga. Nos últimos anos, tem ganhado ênfase por ser considerado um método de baixo custo e com alta produtividade.

O uso de blendas poliméricas, como biomateriais, está associado à obtenção de novas características, através da combinação de polímeros distintos, visando à neutralização dos pontos negativos de cada um. Nesse sentido, o poli (ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA) é um polímero usado em larga escala, entretanto sua característica frágil o inviabiliza para o uso em dispositivos que necessitam de alta deformação plástica. Com o intuito de compensar essa característica, o *cis*-1,4-poliisopreno, polímero natural, chamado de poli (isopreno) (PI) foi acrescido ao PLGA. Essa mistura foi registrada, inicialmente, com o nome de Cellprene® e teve patente solicitada em 2011. Sua forma epoxidada, combinada com células e fatores bioativos, teve a patente solicitada em 2018 (BR102018016252-7). Alguns estudos foram realizados com o uso dessas blendas, os quais demonstraram resultados positivos, sugerindo seu uso na engenharia de tecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar, através de análises *in vitro*, a interação entre células mesenquimais adipoderivadas de lipoaspirado humano com *scaffold* de PLGA/PI epox, produzido pela técnica de *centrifugal spinning*, para posterior translação *in vivo*, visando auxílio na cicatrização de feridas cutâneas.

2.2 Específicos

- Isolar, cultivar, diferenciar e caracterizar células estromais originárias de tecido adiposo de lipoaspirado humano;
- Determinar o melhor tempo de incubação celular ao biomaterial, entre 24, 48 e 72 horas;
- Avaliar a melhor densidade celular de plaqueamento, entre $0,325 \times 10^5$, $0,65 \times 10^5$, $1,3 \times 10^5$;
- Avaliar o perfil metabólico das células, quando cultivadas junto as fibras, por meio de teste indireto de citotoxicidade de 3-[4,5dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT);
- Avaliar o comportamento de adesão celular às fibras através da coloração nuclear e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Mensurar, com o auxílio de *software*, o diâmetro das fibras do biomaterial confeccionado;
- Avaliar comportamento morfológico do citoplasma e núcleo celular após adesão ao biomaterial por técnica de imunofluorescência;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Engenharia de Tecidos

Frente ao cenário mundial, com índices cada vez mais elevados de traumas, anomalias congênitas e doenças degenerativas, associados a elevados custos de assistência médica ou a não resolução dos problemas pelo uso de fármacos, diante de uma infinidade de alterações (tratamento de feridas crônicas ou graves, não-união óssea ou união retardada, neoplasias, necessidade de transplantes, etc), a medicina regenerativa, em conjunto com a engenharia de tecidos, têm realizado inúmeras pesquisas no intuito de desenvolver novas ferramentas terapêuticas. Dentre elas, pode-se destacar, o uso de biomateriais associados a células tronco. Além de transportar as células, esses biomateriais servem como matrizes condutoras para o desenvolvimento do novo tecido (LANGER, VACANTI, 1993; KAIGLER; MOONEY, 2001; MIKOS et al., 2006; FEINBERG, 2012).

A engenharia de tecidos consiste na agregação de áreas relacionadas à biomedicina, biotecnologia e engenharia, objetivando a manutenção, regeneração ou substituição de órgãos ou tecidos. Os avanços, nessa área, são evidentes e a aplicação dos estudos tem sido cada vez maiores (RODRIGUES et al., 2018). A partir da dissociação de tecidos autólogos, células são cultivadas *in vitro* sobre *scaffolds*. Posteriormente, essa fusão é transferida ao paciente, visando à formação e ajuste de um microambiente que ofereça resposta celular adequada (LANGER; VACANTI, 1993; GRIFFITH; NAUGHTON, 2002; SANTOS et al., 2005).

Alguns estudos demonstraram que as células tronco, quando administradas em suspensão, não sobrevivem por longos períodos no leito da lesão. Sem a presença da matriz extracelular (MEC), essas células são rapidamente retidas e eliminadas pelo sistema imunológico (MCLAUGHLIN; MARRA, 2013; HIWATASHI et al., 2014; KOKAI; MARRA; RUBIN, 2014; PARK; CHUNG; AHN, 2014; TSUJI; RUBIN; MARRA, 2014). Foi demonstrado, em estudos anteriores, que células mesenquimais associadas à matriz resultaram em melhor retenção local em modelos de feridas cutâneas (FENG et al., 2017; SUN et al., 2017). Além disso, quando utilizadas com *scaffolds* permitem tratar feridas maiores e mais complexas (MCCARTHY et al., 2018).

O ponto chave desse processo é a criação de construções artificiais que ofereçam características similares da MEC natural. Faz-se necessário que a MEC produzida seja hábil, para direcionar e controlar o comportamento celular e apresentar o mínimo de complexidade (ZHOU et al., 2009). Essas células, cultivadas sobre os arcabouços, se proliferam, migram e se diferenciam no tecido desejado, ao mesmo tempo que produzem os componentes da MEC, consideradas essenciais para a formação tecidual. Dessa forma, os tecidos manipulados podem se integrar ao paciente, auxiliando no reestabelecimento da função (KIM; MOONEY, 1998; SACHOLS; CZERNUSZKA, 2003; HOLLISTER, 2005; ZHANG et al., 2010).

Espera-se, a partir dessa nova abordagem terapêutica, uma revolução nos tratamentos de pacientes que possuem algum comprometimento tecidual. Almeja-se que, futuramente, tal ferramenta viabilize a regeneração ou a substituição de tecidos/órgãos afetados em razão de doenças como: diabetes, queimaduras, traumas, câncer, entre outras (SEAL; OTERO; PANITCH, 2001).

3.2 Células Tronco Mesenquimais

As Células Tronco Mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*) foram descritas inicialmente por Friedensten e colaboradores, em 1966, e são tidas como células multipotentes adultas ou células tronco somáticas, capazes de manter a rotatividade celular. Pela facilidade de isolamento e possibilidade de cultura em laboratórios, as referidas células são opções ótimas para a medicina regenerativa (GOMILLION; BURG, 2006; ZAGO; COVAS, 2006; GEBLER et al., 2012; GINANI et al., 2012).

Além de manterem-se em cultura por longos períodos, tais células apresentam características importantes para a regeneração tecidual. Apresentam capacidade de diferenciação celular, autorrenovação, multiplicação com reposição ativa da população celular que foram eliminadas devido às lesões ou doenças (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; CHENG et al., 2011 AMORIN et al., 2012; KOBOLAK et al., 2016).

Após tal descoberta, diversos estudos, relacionados aos tecidos que podem ser dissociados em MSCs, foram desenvolvidos. A partir disso, foi observado que as MSCs

fazem parte de uma classe celular residente em quase todos os órgãos e estão situadas no tecido conjuntivo, sendo facilmente isoladas devido à natureza “adesiva” (KOBOLAK et al., 2016). As MSCs já foram isoladas, a partir do tecido adiposo do pulmão, medula óssea, cordão umbilical, sinóvia, sangue fetal, fígado, polpa dentária, musculatura esquelética, sistema circulatório, rim, pâncreas e tendões (NARDI; MEIRELES, 2006; SCHIPANI; KRONENBERG, 2008; SEONG et al., 2010).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular delimitou critérios para a caracterização das MSCs: devem apresentar aderência às placas plásticas de cultivo; diferenciar-se em osteócitos, condrócitos e adipócitos; possuir morfologia semelhante aos fibroblastos; expressar marcadores de superfície celular CD105, CD73, CD90 e CD44 e, ainda, não expressar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006). Subsequentemente, outros autores acrescentaram novos marcadores, como CD13, CD44, CD54, 106 e Stro-1, os quais devem ser expressos, e não marcados de CD31 (GOMILLION; BURG, 2006; GEBLER; ZABEL; SELIGER, 2012; YANG et al., 2013; KOBOLAK et al., 2016).

Atualmente, o tecido adiposo é um local de extração de MSCs empregadas em estudos pré-clínicos e clínicos. O lipoaspirado é uma fonte abundante e de fácil obtenção, sendo possível extrair uma fração de células tronco adipoderivadas (*Adipose Derived Stem Cells* – ADSCs), que também são tidas como MSCs. Essas células foram identificadas em 2001 e, desde então, são amplamente empregadas, demonstrado serem eficazes e promissoras (ZUK et al., 2001, 2002; BADIAVAS; FALANGA, 2003; RIGOTTI et al., 2007; OTTO; WRIGHT, 2011; TSUJI; RUBIN; MARRA, 2014).

As ADSCs são consideradas fontes doadoras para a substituição de células autólogas. São células com atributos e características semelhantes as MSCs, com benefícios indiscutíveis, correspondentes à fácil obtenção (lipoaspirado ou lipectomia), baixa morbidade frente ao paciente doador, baixo potencial oncogênico e alto rendimento. A partir de 300ml de material biológico, obtém-se cerca de 2 a 3×10^8 de células-tronco. Em contrapartida, quando comparada à medula óssea, tem-se 1×10^5 (ZUK et al., 2001; FRASER et al., 2006; NAKAGAMI et al., 2006; NAMBU et al., 2009; GINANI; SOARES; BARBOSA, 2012; WANG et al., 2013; HASSAN; GREISER; WANG, 2014).

Mesmo que as MSCs não sejam células imortais, possuem capacidade de expansão em até 50 vezes *in vitro*, mantendo seu potencial de crescimento e plasticidade. Contudo, ao atingirem a confluência, ocorre uma redução na proliferação, sendo

necessário sucessivas passagens para obter quantidades celulares puras (BYDLOWSKI et al., 2009). Segundo alguns relatos, voltados aos objetivos de pesquisa, desencoraja-se o uso de passagens acima de 11, devido ao potencial mutagênico celular. Da mesma forma, a eficácia nos tratamentos também pode ser afetada pela fonte e pelas condições a que foram coletadas. Células provenientes de doadores mais velhos apresentam capacidade de diferenciação mais baixas. Semelhantemente, as MSCs de doadores diabéticos são propensas a uma baixa proliferação e aumento da apoptose celular (ALT et al., 2012; WU; NIKLASON; STEINBACHER, 2013; DUSCHER et al., 2014; CRONK et al., 2015).

Além das características já descritas, as MSCs também são utilizadas devido ao seu potencial imunomodulatório, pois detêm capacidade de acumularem-se ao redor de processos inflamatórios e tumorais. Sabe-se que as ADSCs imunomodulam células do sistema imune inato, bem como as do adaptativo, células dendríticas, NK assim como neutrófilos, linfócitos T e B e, ainda, células T regulatórias (SOUZA et al., 2010). Quando as MSCs são administradas, seja local ou pela via intravenosa, as células dendríticas maduras reduzem a expressão de MCH II, CD11c, CD83, moléculas co-estimulatórias e de IL-12. A atenuação dessas moléculas de superfície afeta a apresentação antigênica (BARTHOLOMEW, et al., 2002). Já, quando as células T são inibidas ocorre uma baixa na produção de INF- γ , enquanto que a produção de IL-4 aumenta, representando alteração no perfil da resposta imune de pró-inflamatório para anti-inflamatório (NAUTA et al., 2006). Para que ocorra imunomodulação, há a atuação de fatores solúveis, como o de crescimento transformante, de crescimento dos hepatócitos, a indoleamina 2,3 dioxigenase, a prostaglandina 2 e o óxido nítrico (SOUZA et al., 2010).

Sendo assim, todas as características descritas, como o fácil isolamento, multipotencialidade, potenciação de regeneração e efeito imunomodulador, fez com que o uso de MSCs/ADSCs, como terapia celular, apresentasse resultados significativos e interessantes à medicina regenerativa e à engenharia de tecidos (ZAGO; COVAS, 2006; KOLF, CHO, TUAN, 2007; BYDLOWSKI et al., 2009).

3.3 Biomateriais

Segundo Williams (2014), biomateriais são substâncias projetadas para assumir uma forma isolada ou associada a um sistema complexo, com o objetivo de direcionar o curso de procedimentos terapêuticos e diagnósticos, por meio do controle de interações com componentes de sistemas vivos.

Biomateriais podem formar arcabouços, matrizes ou *scaffolds* que estabelecem interfaces com os sistemas biológicos, tendo como finalidade avaliar, tratar, aumentar ou substituir um órgão, tecido ou função do organismo (HELMUS; TWEDEN, 1995). São tidos como alicerces que proporcionam condições químicas, morfológicas e estruturais adequadas para o estímulo do crescimento celular (GILPIN; YANG, 2017).

Seu uso relacionado à saúde humana não é recente, registros são encontrados há 2000 a. C, no Egito Antigo, pelo uso de suturas de linho e ouro. Além disso, substitutos ósseos, tendo como matéria a madeira, também foram encontrados na Idade Média, sendo observada eficiente osteointegração. Nos primórdios, o objetivo era a obtenção de material biocompatível para substituir tecido lesado e prover suporte mecânico. Por conseguinte, a ideia era desenvolver materiais biodegradáveis, capazes de promover a incorporação ou absorção pelo hospedeiro. Atualmente, o conceito de biomimética tem ganhado espaço e resume-se pela busca de materiais que atuem ativamente no processo de recuperação com estimulação em nível celular (PIRES et al., 2015).

Técnicas tradicionais fazem uso de ambientes em duas dimensões (2D). Nesses sistemas, as células são cultivadas numa superfície plana. Em outros métodos, as células são mantidas suspensas, no meio de cultura, não aderindo a nenhuma superfície. Contudo, os métodos descritos acima, não são representativos das interações que ocorrem *in vivo*. Como nova alternativa para a resolução desses vieses, surgiram os modelos de cultura em três dimensões (3D) (CUKIERMAN et al., 2001; HOSSEINKHANI et al., 2014). Mesmo que esses cultivos em 3D mimetizem o ambiente estrutural *in vivo* para as células, colaborando com as interações entre elas, o fluxo de líquidos não se faz presente em culturas estáticas (CUKIERMAN et al., 2001; CHEN; HU 2006; BHUMIRATANA et al., 2014; STEFFENS et al., 2018).

Existem algumas características referentes aos biomateriais que devem ser levadas em consideração antes de serem usadas clinicamente. Essas devem atender a algumas exigências físicas, as quais estão relacionadas à resistência, dureza, densidade e flexibilidade, bem como exigências químicas associadas à toxicidade e reatividade

biológica pertinente à biocompatibilidade. Sendo assim, é imprescindível que os *scaffolds* sejam capazes de manter sua integridade estrutural, enquanto auxilia no suporte para a adesão, proliferação e diferenciação celular. Quando esses materiais são degradados, os produtos decorrentes desse processo não podem ser tóxicos e devem ser metabolizados; quando reabsorvidos organicamente, o tempo deve ser compatível com a formação do novo tecido. Além disso, há a necessidade de que as fibras apresentem espaçamento suficiente entre si, para permitirem a ligação das células com o biomaterial, sendo que os poros menores que as células inviabilizam a adesão das mesmas. Ademais, faz-se necessário que as moléculas bioativas tenham acesso às células; devam ser mecanicamente adequadas ao sítio onde será realizada a inclusão e que a integração ao novo tecido seja perfeita e sem rejeição (NAIR; LAURENCIN, 2007; KRAMSCHUSTER; TURNG, 2013).

Na engenharia, há uma ampla gama de materiais disponíveis, podendo ser encontrados na natureza e então modificados química e fisicamente para a aplicação. Esses polímeros podem ser naturais ou então produzidos industrialmente, se tratando de materiais sintéticos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2011; KEANE; BADYLAK, 2014). Os polímeros naturais são biocompatíveis, versáteis, pouco tóxicos e são estruturalmente próximos aos tecidos humanos e animais. Além dessas características, quando disponíveis em exuberância, são pouco onerosos e por isso, atualmente, estão sendo empregados clinicamente. Entretanto, apresentam alta imunogenicidade, sendo que as reações adversas podem ser suprimidas se os antígenos específicos forem modificados quimicamente (YANNAS, 1996; STEVENS, 1998; BARSAM et al., 2003; ARAÚJO, 2005).

Já os materiais, ditos sintéticos, normalmente são obtidos através de moléculas com baixo peso, sendo que tanto esses como o comprimento de cadeias, podem ser manipulados no processamento. Também vale acrescentar que a variação das linhagens celulares utilizadas, o tecido a ser substituído e o tempo de degradação podem levar a uma variação no material. Ressalta-se ainda, o controle durante o preparo desses materiais, possibilita alterar o tempo de absorção, condição considerada crucial na engenharia de tecidos (LUCAS et al., 2001; RATHBONE et al., 2009).

O êxito no desenvolvimento e organização dos tecidos são decorrentes dessas propriedades, já que elas podem, eventualmente, ditar a adesão, diferenciação, viabilidade celular, transporte de nutrientes e resíduos, e, ainda, a síntese e organização da matriz

extracelular. Além disso, o ajuste da estrutura química do biomaterial e a técnica de processamento oportunizam a formação de matrizes extremamente complexas. Assim, é necessário que a seleção de ambos seja realizada com precisão, com o propósito de obter um *scaffold* com atributos ideais para o uso a que se destina (BRAGHIROLI, 2012).

3.4 Blenda polimérica de poli (ácido láctico-*co*-glicólico) e poli (isopreno) epox

As blendas poliméricas conferem uma mistura física entre dois tipos distintos de polímeros ou copolímeros, ligados covalentemente. Seu intuito é formar novas características através dessa combinação (MANO, 1991; WARD; HADLEY, 1995; STEVENS, 1998; KADLA; KUBO, 2004).

Dentre os diversos polímeros utilizados recentemente na medicina, o poli (ácido láctico-*co*-glicólico) (PLGA), pertencente à classe dos poli (α -hidríxi-ácidos), se destaca por ser um poliéster alifático sintético, biocompatível, biodegradável, atóxico e com facilidade de processamento. Devido às suas características, apresenta padrões excelentes para aplicação como *scaffolds*, fios de sutura, placas de fixação, *stents*. Entretanto, trata-se de um polímero frágil, com deformação plástica reduzida. Sendo assim, aplicá-lo como órtese/prótese e conjugado a tecidos moles, é inviável devido aos riscos que podem ser desencadeados durante o tratamento (ISOTALO et al., 2005; PANDEY et al., 2008; MAKADIA; SIEGEL, 2011).

A despeito da fragilidade do PLGA, há a necessidade de associá-lo com outro polímero para uso em alguns tipos de afecções. Desta forma, o látex tornou-se uma opção. Atualmente, numerosas espécies botânicas sintetizam látex, porém a *Hevea brasiliensis* (Seringueira) é a única que gera borracha de qualidade e economicamente acessível. Após a extração, o látex torna-se uma dispersão coloidal de partículas do poli (isopreno). Tal dispersão é uma solução, contendo polímeros hidrofílicos, eletrólitos, compostos tensoativos e resíduos de iniciadores (RIPPEL; GALEMBECK, 2009; AMNUAYPORNTRI; SAKDAPIPANICH; TANAKA, 2010; GALIANI, 2010; CORNISH; XIE, 2012). O látex possui propriedades interessantes na biomedicina, como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, elasticidade, tensão máxima de tração, ductilidade, tenacidade, leveza, ser indolor à aplicação e remoção, impermeabilidade a

micro-organismos, permeabilidade ao oxigênio e ao vapor d'água e facilidade de processamento (CHEN; LIANG; THOUAS, 2013; GALIANO et al., 2018).

Todavia, a borracha natural apresentam baixa estabilidade ao calor, à luz solar e à elevada solubilidade, devido à estrutura cis-1,4-poliisopreno. Como forma de sanar esses entraves, a modificação interna da estrutura química tem sido proposta por meio da epoxidação, pois é um método simples e eficaz para a inserção de um novo grupo reativo na cadeia, aumentando assim, a aplicabilidade do polímero (YOKSAN, 2008; SANTIN et al., 2012; ZAKARIA et al., 2013; COSME et al., 2016). O processo de epoxidação consiste na formação de um éter cíclico de três membros (epóxido) a partir da reação de perácidos com olefinas. O referido grupo epóxido aumenta a compatibilidade entre a carga e o polímero ou em misturas físicas, além de aumentar a hidrofiliabilidade e por consequência melhorar a adesão (JORGE et al., 2009; GUERRA et al., 2018).

Através da solubilização dos polímeros, em solvente orgânico (clorofórmio), seguido de volatilização subsequente, foi obtida a blenda de poli (ácido láctico-*co*-glicólico) e poli (isopreno). Essa blenda foi registrada como Cellprene®, com patente solicitada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em 2011, (MARQUES et al., 2011; UFRGS, 2013) e a blenda PLGA/PI *epox* combinada com células e fatores bioativos, teve seu pedido solicitado pela mesma instituição em 2018 (BR102018016252-7). A partir dessa combinação, Marques (2011) constatou mutação do comportamento frágil para dúctil, com transformação plástica importante, podendo ser considerado para uso em procedimentos ortopédicos e em alterações que envolvam tecidos moles.

Em relação ao seu comportamento *in vitro*, a associação de PLGA/PI demonstrou ser atóxica, quando células HepG2 foram semeadas ao biomaterial (MARQUES et al., 2013). Da mesma forma, ao fazer a associação de PLGA/PI com hidroxiapatita, Oliveira et al. (2019) comprovaram atoxicidade em células de linhagem VERO. Henckes et al. (2019) observaram que ADSCs e HMV-II são capazes de estabelecer adesão sem sofrer alteração morfológica ao serem cultivadas juntamente com PLGA/PI *epox*. Ademais, descrevem capacidade de expansão e função celular quando associadas ao *scaffold*.

O primeiro estudo *in vivo*, fazendo uso do Cellprene® foi realizado por Marques et al. (2013), testando com *stent* traqueal, em coelhos Nova Zelândia. Após o procedimento cirúrgico de inserção do biomaterial, foi possível averiguar que o mesmo

se manteve em posição, sem formação de granulomas, infecção, obstrução respiratória ou enfisema. O Cellprene® também foi utilizado no intuito de tratar criossinostose, fazendo uso de espaçadores de biopolímeros. A partir do uso em ratos Wistar, constatou-se boa integração da blenda PLGA/PI com os tecidos formadores da calota craniana. Além do mais, áreas adjacentes de intensa neovascularização foram observadas, levando a crer que o Cellprene® é viável para uso em ambientes ósseos (KIM et al., 2014).

Diante desses resultados, sugere-se a aplicação dessa blenda entre PLGA/PI na engenharia de tecidos, aprofundando os conhecimentos e utilizando novos métodos de processamento, de forma a atender as exigências da aplicação. Suas características relacionadas às propriedades mecânicas, sugerem aplicações condizentes à tecidos moles (MARQUES, 2015).

3.5 Centrifugal spinning

Após selecionar o biomaterial, faz-se necessário escolher a técnica de processamento adequada. Atualmente, há uma ampla diversidade em relação à fabricação dos arcabouços para a engenharia de tecidos, como pode ser observado através da evaporação de solvente, separação de fases, *electrospinning*, liofilização, formação de espumas, moldagem por injeção, *centrifugal spinning*, entre outras. Cada técnica dispõe de uma estrutura interna específica, com suas vantagens e desvantagens, mas todas visando a um espaçamento satisfatório à proliferação celular, em ambiente tridimensional durante a cultura (RODRÍGUEZ, 2015).

A primeira patente proposta, para que as fibras fossem fabricadas de forma centrífuga, foi apresentada em 1924, nos EUA (HOOPER, 1924). A partir disso, a fiação centrífuga foi aprimorada por outras patentes na Europa e nos EUA. Badrossamay, McIlwee, Goss (2010) observaram que, através da fiação a jato rotativo, era possível adquirir fibras mais finas. Quando a rotação aumentava, o diâmetro das fibras reduzia, sendo que as fibras eram mais homogêneas quanto ao diâmetro quando a concentração do polímero era constante. A partir disso, Huttunen e Kellomäki (2011), por meio do aquecimento do polímero de fiação, fabricaram fibras mais finas pelo princípio da máquina de algodão doce (*centrifugal spinning*).

O princípio da fabricação de nanofibras, através do método *centrifugal spinning*, usa força centrífuga em vez da elétrica. A solução é injetada no recipiente de fiação e após é ejetada. Afirma-se que tanto os materiais condutivos como os não condutivos podem ser usados na fabricação de nanofibras. Outrossim, não há a necessidade de adicionar solventes condutores, fato que faz com que a produção seja limpa (BADROSSAMAY; MCILWEE; GOSS, 2010; VALIPOURI; RAVANDI; PISHEVAR, 2013).

O método de confecção pode ser dividido em três fases. A primeira consiste em adicionar o polímero ou a blenda ao recipiente. Ao girar, o material é exposto à força viscosa, à gravidade, à tensão superficial e à força centrífuga. Quando o material é ejetado, o segundo estágio se inicia. Nessa fase, o jato do material é exposto à tensão superficial, à força de inércia e à resistência ao ar. O jato irá seguir uma curva e será esticado pela força resultante. Também, é nessa etapa que o solvente evapora, gradualmente, e as fibras são formadas. É no terceiro estágio que a matriz será formada e atingirá o dispositivo de coleta (DECENT, KING; SIMMONS, 2009; RIAHI, 2017; NATARAJAN; BHARGAVA, 2018; ZHANG et al., 2019).

No entanto, a morfologia das fibras será influenciada por diversos fatores envolvidos no processo do *centrifugal spinning*. Essa variância compete tanto às características do polímero como aos parâmetros do equipamento (velocidade angular do bocal, distância do mesmo ao dispositivo de coleta e diâmetro do bocal). Da mesma forma, as propriedades da solução de fiação (tensão, viscosidade e concentração), também, são preponderantes. Essas características envolvidas irão moldar a matriz, implicando no seu uso prático (PADRON; FUENTES; ARUNTU, 2013; LOORDHUSWAMY; KRISHNASWAMY; KORRAPATI, 2014).

4 MANUSCRITO

Interação entre células mesenquimais adipoderivadas e *scaffold* de PLGA/PI *epox* para uso na engenharia de tecidos: estudo *in vitro*

Emanuelle Bortolotto Degregori¹⁻², Nicole Andrea Corbellini Henckes¹, Nathalia Franco¹⁻², Henrique Luz³, Francieli Rohden⁴, Mariana Alves², Jéferson Luís Rigon², Bruna Gomes dos Santos¹, Cristiana Palma Kuhl¹, Luis Alberto Loureiro dos Santos³, Paula Barros Terraciano¹, Fernanda dos Santos Oliveira¹, Emerson Antonio Contesini²

¹ Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Ramiro Barcelos, 2350, Santa Cecília, 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

² Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Laboratório de Biomateriais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Agronomia, 90650-001, Porto Alegre, RS, Brasil

⁴ Laboratório de Injúria Cerebral e Neuroproteção, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2600, Santa Cecília, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

4.1 RESUMO

A engenharia de tecidos compreende o uso de células tronco mesenquimais associadas com biomateriais, tendo como finalidade o reparo, regeneração e restauração de tecidos lesados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre células mesenquimais adipoderivadas de humanos com *scaffold* de PLGA/PI *epox*, confeccionado através da técnica de *centrifugal spinning*. Preconizou-se o estabelecimento da melhor densidade de plaqueamento entre $0,325 \times 10^5$, $0,65 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^5$ e melhor tempo de cultivo entre 24, 48 ou 72 horas. A partir de características fibroblastóides, aderência a garrafas plásticas de cultivo celular, diferenciação em linhagens adipogênicas e osteogênicas e imunofenotipagem positiva para CD90 e CD105 e negativa para CD34 e CD45, as células utilizadas neste estudo foram consideradas tronco mesenquimais. A integração das células na matriz fibrosa foi observada por meio de microscopia eletrônica de varredura, onde foi possível evidenciar a emissão de pseudópodes celulares. As fibras confeccionadas pela técnica de *centrifugal spinning* apresentaram-se fibrosas e porosas, com diâmetro médio de $3,61 \pm 2,81 \mu\text{m}$, tendo uma maior representatividade de fibras com $1 \mu\text{m}$ ($n=113$). A atividade metabólica das células cultivadas junto ao biomaterial foi similar aos seus respectivos controles (células aderidas no fundo da placa, padrão ouro) ($p > 0,05$). A exceção evidenciada entre os grupos testes e controle, perante ao teste de MTT, foi notória no cultivo de $1,3 \times 10^5$ em 72 horas, onde as células cultivadas junto ao *scaffold* mostraram-se metabolicamente mais ativas que o controle ($2,87 \pm 0,30$; $2,18 \pm 0,15$, $p > 0,05$), demonstrando a não interferência do biomaterial na viabilidade celular. A menor absorvância foi no grupo de $0,325 \times 10^5$ ADSCs ($0,69 \pm 0,19$; $1,27 \pm 0,46$; $1,25 \pm 0,43$, diferindo em todos os tempos de avaliação em relação ao grupo de $1,3 \times 10^5$ células ($1,96 \pm 0,53$; $2,45 \pm 0,26$; $2,87 \pm 0,30$, $p < 0,05$), porém foi homogênea ao plaqueamento de $0,65 \times 10^5$ ($1,02 \pm 0,24$; $2,07 \pm 0,71$; $1,77 \pm 0,56$, $p > 0,05$). Esse último, apresentou menor absorvância quando contrastado ao grupo de maior densidade nas

avaliações de 24 e 72 horas ($p < 0,05$). Perante a coloração do citoesqueleto celular, não foram demonstradas alterações quando as células foram cultivadas junto as matrizes fibrosas, independente do tempo de incubação e densidade. A contagem celular foi realizada por meio da coloração nuclear com DAPI, onde a maior média obtida por campo foi no plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ células, durante 24 horas ($529 \pm 81,70$). Porém, há uma tendência ao descolamento celular com o passar das horas, podendo se justificar pelas forças moleculares atuantes entre o scaffold e as células e por ter um número alto de células aderidas inicialmente. Porém, as células retornam a proliferar em 72 horas de avaliações. Fundamentado nos achados descritos acima, constatamos que o plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ por 24 horas foi o mais eficaz. Ademais, o uso do biomaterial junto ao cultivo durante três dias de avaliações, não interferiu na viabilidade e morfologia das células. Segundo esses resultados, associação entre PLGA/PI *epox* e células mesenquimais adipoderivadas podem ser consideradas para futuros estudos *in vivo* na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: biomaterial, células estromais mesenquimais, *centrifugal spinning*, engenharia de tecidos, integração celular, MTT.

4.2 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos (ET) tem ganhado ênfase nos últimos anos, por se tratar de uma abordagem promissora no tratamento de afecções não responsivas às terapias convencionais. É uma área interdisciplinar, que correlaciona os princípios de medicina, engenharia e biotecnologia, com a finalidade de reconstruir ou substituir órgãos ou tecidos lesionados¹. A terapêutica da ET compreende estratégias regenerativas, fazendo uso de Células Tronco Mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*) associadas à biomateriais. Subsequentemente, essa fusão é transferida ao paciente, aspirando a formação e o ajuste de um microambiente que emita resposta celular adequada^{2,3}.

As características promissoras das MSCs tornam-nas pertinentes ao uso na regeneração tecidual. Esse tipo celular possui atributos que estimulam e auxiliam a regeneração, como a multipotencialidade de diferenciação em uma variedade de tecidos, ação imunomodulatória e anti-inflamatória, secreção de moléculas e fatores bioativos⁴⁻¹¹. Contudo, apesar da terapia celular ser promissora, algumas pesquisas revelaram que,

quando administradas em suspensão, as células são rapidamente eliminadas pelo sistema imunológico, devido à ausência de uma matriz extracelular¹²⁻¹⁶.

Como método de sanar a rápida absorção celular, os biomateriais são capazes de fornecer suporte para a manutenção local dessas células, arquitetando nichos microambientais que irão fomentar a restauração endógena^{17,18}. Os biomateriais devem atender a algumas exigências tanto biológicas, mecânicas e físicas quanto específicas celulares¹⁹⁻²¹. Suprir esses requisitos é extremamente importante, pois são essas propriedades que irão estabelecer adesão, diferenciação e viabilidade celular, permitindo o transporte de nutrientes e resíduos, além da síntese e organização da matriz extracelular²².

Atualmente, uma infinidade de polímeros podem ser empregados na produção de andaimes^{21,23}. A blenda de PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico) / PI (poli(isopreno) foi surgido devido a fragilidade e dificuldade de deformação plástica pertencente ao PLGA, sendo inviável para aplicação como órtese/prótese e conjugado a tecidos moles²⁴⁻²⁶. A partir da associação com o PI, constatou-se mutação do comportamento frágil para dúctil, com transformação plástica²⁷. A patente foi solicitada pela UFRGS em 2011, e registrada como Cellprene®. Posteriormente, a superfície da blenda foi modificada através da epoxidação do poli(isopreno), objetivando características versáteis e propriedades avançadas²⁸. A solicitação da blenda PLGA/PI epoxidada, combinada com células e fatores bioativos, foi solicitada em 2018 (BR102018016252-7). Alguns estudos *in vitro* já foram realizados, assegurando propriedades promissoras para uso *in vivo*. Marques et al. (2013)²⁹ demonstraram caráter atóxico em cultivos de HepG2. Henckes et al. (2019)³⁰ observaram o estabelecimento de adesão celular, sem alteração morfológica, capacidade de expansão e manutenção da função celular.

Sequencialmente a escolha dos polímeros, faz-se necessário optar pelo método de produção das matrizes. Existe uma diversidade de técnicas, cada uma com suas particularidades, vantagens e desvantagens. O método de confecção de fibras, por meio de *centrifugal spinning*, usa força centrífuga em alta rotatividade, e é considerado um recurso de alta produtividade e barato, além de ser uma possibilidade de substituição de outras técnicas³¹.

Baseado nisso, o objetivo deste estudo é avaliar a interação entre células mesenquimais adipoderivadas (ADSCs – *Adipose Derived Stem Cells*) humanas com *scaffold* de PLGA/PI *epox*, processado através da técnica de *centrifugal spinning*, avaliando citotoxicidade/viabilidade, proliferação, adesão e morfologia celular quando em contato com a matriz. Da mesma forma, priorizamos estabelecer uma densidade e período de cultivo, aspirando máxima performance biomaterial-células para posterior translação à pacientes com feridas cutâneas.

4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

4.3.1 Blenda de PLGA/PI epox

Para a fabricação da blenda polimérica, o PLGA (Corbion Purac®, Netherlands) foi adquirido purificado, na proporção de 85 mol% de comonômero L-lactide e 15 mol% de glicolide. O PI (Muang Mai Guthrie PCL®; Epoxyrenes 50, THA) foi neutralizado com ácido clorídrico (Synth®, BR). O mesmo já foi adquirido epoxidado, na faixa de 50-52%, segundo fornecedor, dispensando essa fase do processamento. Posteriormente, foi realizada a purificação com dissolução em clorofórmio (99,8%) (Synth®, BR) (15:1). Após a completa diluição, o mesmo foi precipitado em metanol (99,8%) (Synth®, BR).

O processo foi repetido três vezes, sendo que ao final de cada ciclo, o PI foi submetido à secagem em estufa a 40°C, durante 24 horas.

A blenda foi preparada com uma proporção mássica de 60% PLGA / 40% PI, no intuito de melhorar as características mecânicas. A mistura foi reservada por 24 horas, de modo a permitir máxima interação entre os polímeros. Passado esse período, a combinação foi colocada num recipiente, permitindo evaporação do clorofórmio em temperatura ambiente.

4.3.2 Produção das fibras por *centrifugal spinning*

A máquina de *centrifugal spinning* foi desenvolvida pelo Laboratório de Biomateriais (LABIOMAT) da UFRGS, com velocidade máxima de rotação do eixo central de 25.000rpm. Para a confecção da matriz, uma bomba de infusão (Samtronic®, BR) foi utilizada, a fim de padronizar o gotejamento da mistura polimérica no cilindro central da máquina. O cilindro possui dois orifícios (Figura 1A, seta amarela), locais esses onde o polímero é direcionado a passar, através da força centrífuga. A partir disso, a blenda dissolvida é alongada e ejetada para fora, onde há um anteparo circular horizontal (Figura 1B). Durante esse processo, o solvente evapora, precipitando a matriz fibrosa (Figura 1C).

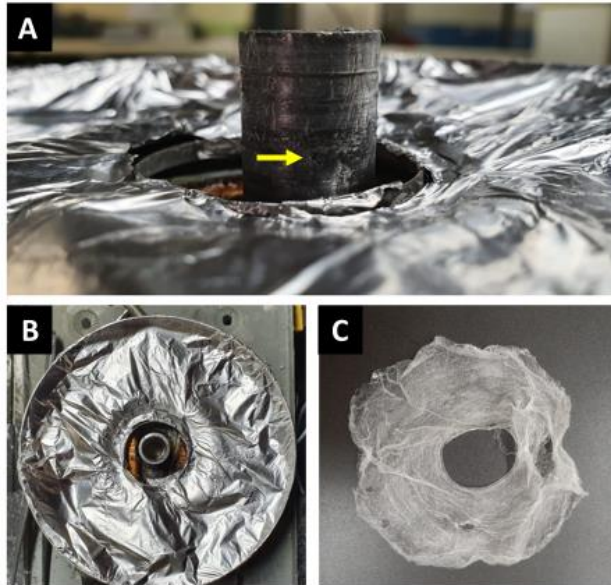


Figura 1 - Em evidência (seta amarela), cilindro com orifícios da saída da blenda de PLGA/PI epox (A), anteparo circular horizontal (B), exemplar do *scaffold* utilizado para cultivo celular.

4.3.3 Células mesenquimais adipoderivadas (ADSCs) de humanos

4.3.3.1 Isolamento celular

As amostras biológicas de tecido adiposo foram obtidas a partir de cirurgias de lipoaspiração de duas pacientes, do sexo feminino, hígdas, cuja idade era de 28 e 54 anos. As mesmas foram operadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brasil. Este trabalho obteve anuência do Comitê de Bioética do HCPA (2019-0136) e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Plataforma Brasil. Com base no parecer do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE), o projeto está inscrito sob o número 94521618.4.0000.532727. As pacientes se voluntariaram a doar o material biológico com prévia assinatura de termo de consentimento, juntamente com esclarecimentos/informações sobre os objetivos e estratégias de uso do material.

Posteriormente a coleta, o material biológico foi degradado enzimaticamente em solução de colagenase tipo I (Gibco®, USA) (1mg/mL) e a suspensão celular obtida foi centrifugada e ressuspensa em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco®, USA), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco®, BR), e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) (Gibco®, USA). As células foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular onde permaneceram em estufa a temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade. Quando a cultura atingiu confluência entre 80-90%, as células foram desaderidas com auxílio de solução de tripsina-EDTA 0,025% (Gibco®, CA) e expandidas para novas garrafas.

4.3.3.2 Imunofenotipagem celular

O perfil imunofenotípico das MSCs foi realizado com a incubação de anticorpos monoclonais específicos. As células foram coradas com CD90 (PE Mouse Anti-Human, BD Pharmingen®), CD105 (Human R-PE Conjugate, Invitrogen®), CD45 (Human FITC Conjugate, Invitrogen®) e CD34 (FITC Mouse Anti-Human, BD Pharmingen®). Posteriormente à incubação por quatro horas, em temperatura ambiente, a análise foi realizada com auxílio de citometria de fluxo (Attune; Applied Biosystem®).

4.3.3.3 Diferenciação celular

A diferenciação adipogênica e osteogênica foi realizada conforme descrito por Markarian et al. (2014)³². Nos grupos controles, as células foram cultivadas nas mesmas condições que as tratadas, sem o uso dos meios indutores de diferenciação. Após 21 dias de cultivo, com trocas periódicas a cada três dias, as culturas foram fixadas e coradas

adequadamente, juntamente com seus respectivos controles. A detecção da diferenciação adipogênica foi evidenciada por coloração com *Oil Red O* (Sigma Aldrich®, USA), corando os vacúolos de gordura, tipicamente encontrados nos adipócitos e para a detecção da diferenciação osteogênica foi realizada coloração com *Alizarin Red S* (Sigma Aldrich®, CHN) corando os depósitos de cálcio presentes na matriz extracelular. As imagens foram capturadas por microscopia invertida (Olympus®;IX71).

4.4 Cultivo celular nos *scaffolds*

As densidades escolhidas para o plaqueamento no biomaterial foram pré-determinadas baseadas no estudo realizado por Henckes et al. (2019)³⁰, fazendo jus ao diâmetro útil do biomaterial. As amostras do biomaterial foram moldadas e, posteriormente, foram esterilizadas sob luz ultravioleta (UV). Um prazo de 24 horas antes do plaqueamento, as amostras foram hidratadas com tampão fosfato.

Após contagem celular em Câmara de Neubauer, as células foram semeadas no *scaffold*, em placas de 24 poços, em três concentrações diferentes, compreendendo: $0,325 \times 10^5$, $0,65 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^5$. Células cultivadas diretamente no poço, foram utilizadas como controles. Todas as análises foram realizadas em três tempos diferentes, incluindo 24, 48 e 72 horas.

4.6 Viabilidade Celular (ensaio de MTT)

O teste de MTT, foi empregado conforme descrito por Marins et al. (2017)³³ para verificar a viabilidade celular, bem como, indiretamente, a citotoxicidade. Utilizou-se

reagente *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (Sigma Aldrich®, USA) na concentração de 0,5 mg/mL. Após duas horas em contato com a cultura, em estufa de cultivo celular, o sobrenadante foi descartado e sulfóxido de metila (DMSO) (Sigma Aldrich®, FR) foi adicionado. A absorvância foi mensurada a 570nm e 630nm pelo espectrofotômetro SpectraMax M3®.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Características microscópicas das fibras de PLGA/PI *epox* e a presença de células aderidas às fibras, foram analisadas através de MEV (JSM 6060; Jeol®) conforme descrito por Maurmann et al. (2017)³⁴. Após cultivo celular, as amostras foram fixadas, lavadas e desidratadas com sequência crescente de concentrações de álcool etílico (60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com permanência de 10 minutos em cada concentração. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem em temperatura ambiente, seguidas de metalização em ouro. A mensuração do diâmetro das fibras foi realizada através do *software* ImageJ®, a partir de imagens referentes a quatro amostras. As imagens obtidas apresentaram tensão de aceleração de 10kV e ampliação de 500 a 2.300x

4.9 Integração celular

A avaliação e contagem das células integradas à matriz fibrosa, foi realizada através da coloração nuclear com DAPI (*Fluoroshield with DAPI*; Sigma Aldrich®, USA), com auxílio do *software* ImageJ®. Após cultivo, as células foram fixadas e o reagente foi mantido em incubação à cultura. Cinco campos similares de cada amostra foram fotografados com auxílio de microscopia invertida.

4.7 Morfologia celular

A morfologia celular sobre as matrizes, foi observada através de imunofluorescência e microscopia confocal (TCS SP5; Leica®, DEU), conforme descrito por Henckes et al. (2019)³¹. Para isso, amostras contendo ADSCs cultivadas nos *scaffolds* foram fixadas e bloqueadas com albumina sérica bovina a 3% (Sigma Aldrich®, DEU). Anticorpo primário anti-citoqueratina (AE1/AE3; Abcam®, UK) (1:50), foi incubado *overnight* a 4°C. Posteriormente, o anticorpo secundário anti-IgG PE-Cys anti-rato conjugado (Santa Cruz Biotechnology®, EUA) (1:4000) foi incubado por uma hora. Meio de montagem DAPI, foi adicionado às amostras para facilitar a visualização celular.

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram expressos com a média e o desvio padrão e avaliados por ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças significativas foram estabelecidas quando $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada pelo programa *IBM SPSS Statistics 2.1*.

4.4 RESULTADOS

Cerca de 10mL de material biológico de cada uma das duas doadoras, proveniente de lipoaspiração abdominal, foram suficientes para a expansão celular das ADSC. Isso possibilitou o uso celular em todos os experimentos *in vitro* de avaliação da interação com o biomaterial, bem como diferenciação e imunofenotipagem. As células exibiram confluência, aderência ao plástico e morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos (Figura 2A).

Ensaio de diferenciação celular foi realizado com células da quinta passagem, as quais manifestaram-se aptas a diferenciarem-se em linhagens adipogênicas e osteogênicas. Após 21 dias em meio indutor de diferenciação, foi possível observar, através da coloração com *Oil Red O*, a presença de depósitos de lipídios (Figura 2B). Em igual período, após a pigmentação com *Alizarin Red S*, depósitos de cálcio foram notados (Figura 2C).

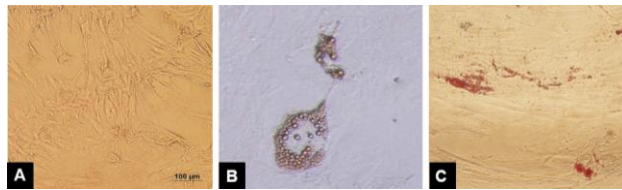


Figura 2 - Ensaio de diferenciação *in vitro* das ADSCs após 21 dias de cultivo. Fotomicroscopia das ADSCs no estágio de indiferenciação (40x) (A), submetidas à diferenciação adipogênica com coloração *Oil Red O* (20x) (B), e osteogênica com coloração *Alizarin Red S* (20x) (C).

A imunofenotipagem mostrou expressão dos marcadores de superfície CD105 e CD90 e não expressão para os marcadores CD34 e CD45. Observou-se que as células utilizadas como controle não expressaram marcação para nenhum dos anticorpos utilizados (Figura 3B, C). A figura 3D, equivale ao total de eventos analisados (30,22%) para averiguar a expressão de CD45 e CD90. É possível notar a negatividade para CD45, com 3,57% dos eventos marcados (Figura 3E), e a positividade para CD90 com 91,06% das células marcadas (Figura. 3F). O gráfico representado pela figura 3G, demonstra que 29,64% do total dos eventos foram analisados. Destes, 1,95% de células foram positivas para CD34 (Figura 3H), e 84,75% deslocaram-se para direita, expressando marcação para CD105 (Figura 3I).

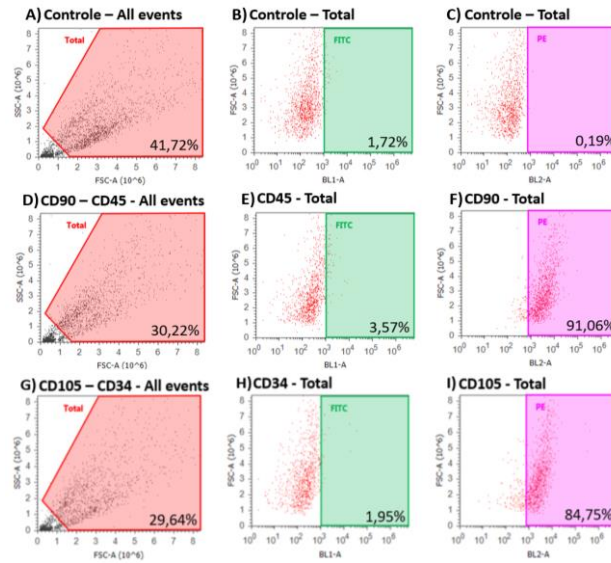


Figura 3 – Demonstração gráfica dos marcadores de superfície celular, quando realizado ensaio de imunofenotipagem. Os gráficos A, D e G demonstram todos os eventos detectados por citometria (vermelho), para avaliação da expressão dos marcadores. O mesmo mostra no eixo Y a complexidade das células e no eixo X a população total a ser analisada. Os gráficos B, E e H representam as células que são negativas (verde) para os marcadores de superfície (CD34 e CD45). Os gráficos C, F, e I retratam as células marcadas (rosa) para CD90 e CD105.

Aspectos pertinentes às fibras, como a direção, porosidade e diâmetro foram passíveis de constatação por meio de MEV. Na figura 4 é possível observar que as fibras se apresentam distribuídas de maneira aleatória e estão interconectadas entre si, porém, sem um padrão de direção uniforme. As imagens exibiram estruturas fibrosas e porosas.

O diâmetro de 407 fibras de PLGA/PI *epox* foram mensurados, apresentando uma média de $3,61 \pm 2,81 \mu\text{m}$. A figura 5 ilustra a distribuição do diâmetro das fibras em relação à frequência (número de fibras por grupo), onde a maioria conferiu diâmetro de $1 \mu\text{m}$ ($n=113$). Fibras mais espessas foram evidenciadas, porém com uma menor periodicidade. A frequência de nanofibras foi baixa ($n=37$), sendo o menor diâmetro encontrado de 350nm , e o maior $15,99 \mu\text{m}$.

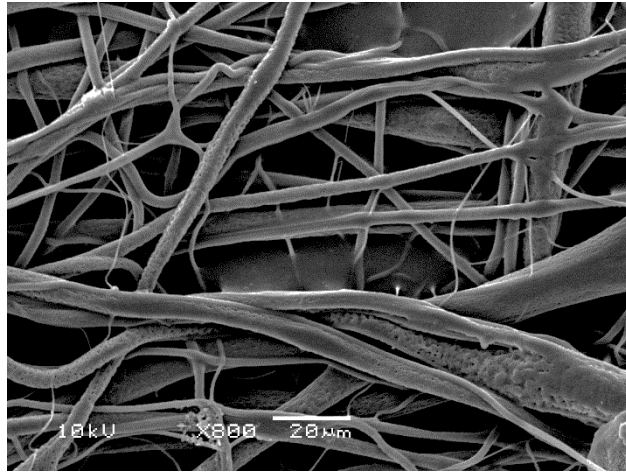


Figura 4 - Imagem capturada por MEV, demonstrando o aspecto poroso e fibroso do *scaffold* de PLGA/PI epox, confeccionadas pela técnica de *centrifugal spinning* (800x).

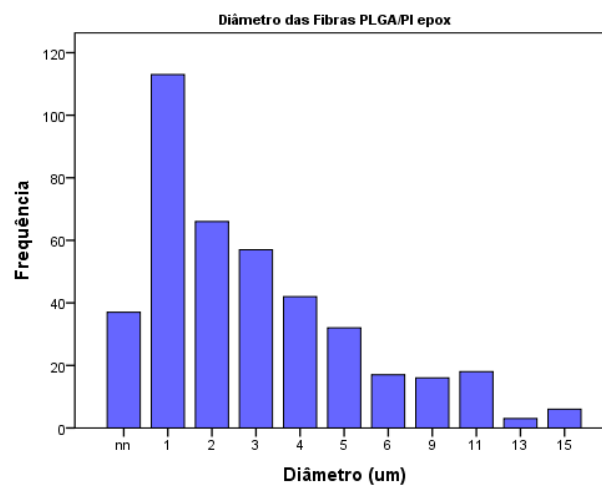


Figura 5 – Imagem representativa da regularidade do diâmetro das fibras do *scaffold* de PLGA/PI epox, fabricado por *centrifugal spinning*. nm: nanofibras.

As ADSCs apresentaram-se totalmente integradas às fibras da matriz (Figura 6), com vários pontos de contato de adesão ao biomaterial, formando pontes entre as fibras. A adesão celular ocorreu tanto nas fibras mais espessas, quanto nas mais finas, não evidenciando preferência. As células apresentaram-se bem espalhadas e com morfologia fibroblastóide. Na figura 6C (seta amarela) é possível notar a integração celular, com a emissão de pseudópodes celulares às fibras. Diferenças entre as concentrações e tempo não foram notórias.

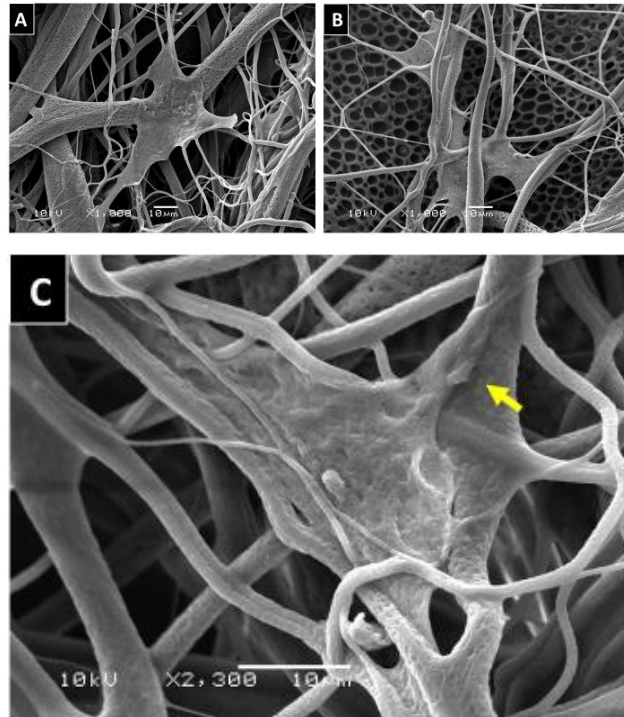


Figura 6 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, comprovando a adesão celular às fibras. Notar pseudópode (seta amarela) (C).

A tabela 1, demonstra os resultados obtidos a partir do teste de MTT dos grupos tratados com biomaterial e seus respectivos controles. O grupo contendo biomaterial que recebeu $0,325 \times 10^5$ ADSCs, apresentou-se metabolicamente menos ativo (absorbância de $0,69 \pm 0,19$; $1,27 \pm 0,46$; $1,25 \pm 0,43$, em 24h, 48h e 72h, respectivamente) em todos os tempos das avaliações, em comparação ao que recebeu $1,30 \times 10^5$ células ($1,96 \pm 0,53$; $2,45 \pm 0,26$; $2,87 \pm 0,30$) ($p < 0,05$), porém foi considerado igual àquele com $0,65 \times 10^5$ células ($1,02 \pm 0,24$; $2,07 \pm 0,71$; $1,77 \pm 0,56$) ($p > 0,05$). Quando $0,65 \times 10^5$ células foram plaqueadas nas avaliações de 24 e 72, a taxa de absorbância foi menor em relação ao grupo com maior densidade ($p < 0,05$). No entanto, quando a comparação foi realizada nos grupos que receberam biomaterial, com a mesma concentração, porém em tempos diferentes, embora ela tenha sido crescente ao passar do tempo, foram similares na absorbância ($p > 0,05$). Neste caso, houve apenas a exceção do plaqueamento de $0,65 \times 10^5$,

quando as células foram deixadas em cultura por 24 e 72 horas, apresentaram diferenças significativas ($p=0,011$). Ao correlacionar os grupos testados e controles, as células dos grupos que receberam biomaterial, foram tão viáveis quanto àquelas dos seus respectivos controles (mesma concentração e tempo), não interferindo na taxa de viabilidade celular ($p>0,05$). A exceção, diz respeito ao plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ fazendo uso de biomaterial, na incubação de três dias. Esse, mostrou-se metabolicamente mais ativo em relação ao seu controle ($2,87 \pm 0,30$; $2,18 \pm 0,15$) ($p<0,05$).

Tabela 1 - Comparação do efeito de tempo e de incubação e concentração celular em relação a viabilidade celular das ADSCs, a partir do teste colorimétrico de MTT.

Concentração	Média 24h \pm (DP)	Média 48h \pm (DP)	Média 72h \pm (DP)
CT $0,325 \times 10^5$	0,52 \pm (0,10) ^I	1,00 \pm (0,43) ^I	1,32 \pm (0,88) ^I
CT $0,65 \times 10^5$	1,27 \pm (0,32) ^I	1,86 \pm (0,36) ^I	1,80 \pm (0,45) ^I
CT $1,3 \times 10^5$	2,16 \pm (0,18) ^I	2,27 \pm (0,07) ^I	2,18 \pm (0,15) ^I
BC $0,325 \times 10^5$	0,69 \pm (0,19) ^{a,*^I}	1,27 \pm (0,46) ^{a,*^I}	1,25 \pm (0,43) ^{a,*^I}
BC $0,65 \times 10^5$	1,02 \pm (0,24) ^{a,*^I}	2,07 \pm (0,71) ^{b,*^o^I}	1,77 \pm (0,56) ^{a,b,*^I}
BC $1,3 \times 10^5$	1,96 \pm (0,53) ^{a,b,^o^I}	2,45 \pm (0,26) ^{a,^o^I}	2,87 \pm (0,30) ^{a,^o^{II}}

Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão da absorbância celular através da análise de MTT. CT: grupo controle; BC: biomaterial com células; DP: desvio padrão. As comparações foram realizadas através de modelos lineares generalizados com ajuste pelo teste de Bonferroni, com 5% de significância ($p<0,05$). Médias seguidas da mesma letra, símbolos ou números romanos, não diferem estatisticamente. Comparação em linha: compara a mesma concentração nos diferentes tempos (letras latinas). Comparação em coluna: compara diferentes concentrações no tempo fixo (símbolos *, °). Comparação entre grupo controle e grupo tratamento (CTxBC) no tempo e concentração fixa (números romanos, I, II).

A interação das ADSCs junto ao *scaffold* foi observada a partir da coloração nuclear, através de microscopia de fluorescência (Figura 7). Por meio desta análise, foi realizada a contagem celular, onde cinco campos aleatórios (igualmente para todas as amostras) foram capturados. A integração foi notória em todas as camadas das fibras,

porém maior quantidade de células apresentavam-se aderidas no centro das amostras, em relação às bordas (dados não mostrados). Considerando as concentrações, nos períodos de incubação, a tabela 2 demonstra a contagem média de células por campo, seguidas do desvio padrão.

Quando a concentração celular foi comparada de forma fixa com variação temporal, o grupo com $0,325 \times 10^5$ células apresentou-se homogêneo nas avaliações de 24 e 48 horas ($466 \pm 74,44$; $431 \pm 39,29$, $p > 0,05$), mas diferiram na avaliação de 72 horas, tendo menor número de células aderidas ($220 \pm 14,97$, $p < 0,05$). No plaqueamento de $0,65 \times 10^5$, a única distinção encontrada foi entre a análise de 24 horas contraposta a 72 horas ($307 \pm 69,10$; $427 \pm 18,70$, respectivamente, $p = 0,014$). O cultivo de $1,3 \times 10^5$, foi uniforme nas três avaliações temporais ($529 \pm 81,70$; $299 \pm 129,25$; $314 \pm 143,69$, $p > 0,05$) (Tabela 2).

Ao contrastar as concentrações em horários fixos, a média dos grupos $0,325 \times 10^5$ e $1,3 \times 10^5$ em 24 horas mostraram-se similares ($466 \pm 47,44$; $529 \pm 81,70$, $p > 0,05$), divergindo do plaqueamento de $0,65 \times 10^5$ ($307 \pm 69,10$, $p < 0,05$). Em 48 horas de avaliação, todas as amostras foram estatisticamente iguais entre si ($431 \pm 39,29$; $342 \pm 103,10$; $299 \pm 129,25$, $p > 0,05$). No último período de avaliação, a média encontrada na cultura de $0,325 \times 10^5$ células foi similar à $1,3 \times 10^5$ células ($220 \pm 14,97$; $314 \pm 143,69$, $p > 0,05$). A maior média foi observada no plaqueamento de $0,65 \times 10^5$ células sobre os *scaffolds* ($427 \pm 18,70$), diferindo apenas da densidade de $0,325 \times 10^5$ ($p < 0,05$), mas igual ao cultivo de $1,3 \times 10^5$ células ($p > 0,05$).

Tabela 2 - Contagem por meio de coloração nuclear com DAPI das células aderidas ao biomaterial em relação a concentração e tempo de cultivo celular.

Concentração	Média 24h ± (DP)	Média 48h ± (DP)	Média 72h ± (DP)
$0,325 \times 10^5$	466 ± (47,44) ^{a,*}	431 ± (39,29) ^{a,*}	220 ± (14,97) ^{b,*}
$0,65 \times 10^5$	307 ± (69,10) ^{a,°}	342 ± (103,10) ^{a,b,*}	427 ± (18,70) ^{b,°}
$1,3 \times 10^5$	529 ± (81,70) ^{a,*}	299 ± (129,25) ^{a,*}	314 ± (143,69) ^{a,*°,°}

Os dados estão expressos em média±desvio padrão da contagem celular por coloração nuclear com DAPI e posterior avaliação por microscopia de imunofluorescência (10x). DP: desvio padrão; $0,325 \times 10^5$: 32.500 células; $0,65 \times 10^5$: 65.000 células; $1,3 \times 10^5$: 130.000 células. As comparações foram realizadas através de modelos lineares generalizados com ajuste pelo teste de Bonferroni, com 5% de significância ($p < 0,05$). Médias seguidas da mesma letra ou mesmo símbolo não diferem estatisticamente. Comparação em linha: compara concentrações nos diferentes tempos (letras latinas para diferenças significativas). Comparação em coluna: compara diferentes concentrações no tempo fixo (símbolos *, °).

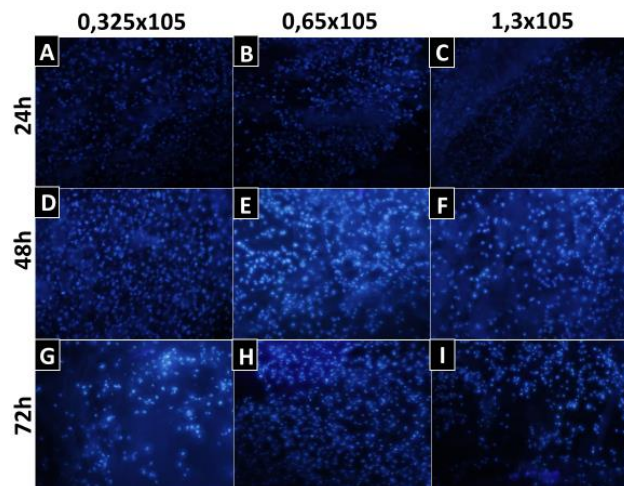


Figura 7 – Imagens feitas através de imunofluorescência com corante nuclear DAPI, para avaliação da contagem celular a partir da adesão às fibras de PLGA/PI *epox*. Plaqueamento de $0,325 \times 10^5$ em 24 horas (A), $0,65 \times 10^5$ em 24 horas (B), $1,3 \times 10^5$ em 24 horas (C), $0,325 \times 10^5$ em 48 horas (D), $0,65 \times 10^5$ em 48 horas (E), $1,3 \times 10^5$ em 48 horas (F), $0,325 \times 10^5$ em 72 horas (G), $0,65 \times 10^5$ em 72 horas (H), $1,3 \times 10^5$ em 72 horas (I) (10X).

A preservação da morfologia das ADSCs, quando em cultivo junto ao biomaterial, foi constatada pela expressão das moléculas do citoesqueleto, podendo destacar que, a

partir do cultivo celular junto aos *scaffolds* de PLGA/PI *epox*, independente do tempo e concentração, a aparência morfológica típica das MSCs foi preservada (Figura 8).

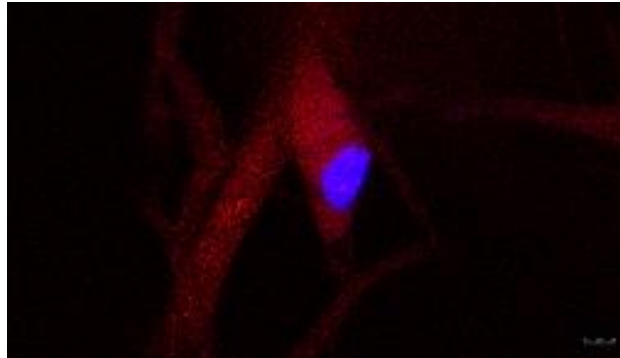


Figura 8 – Imagem capturada por microscopia confocal, demonstrando morfologia do citoesqueleto das ADSCs após cultivo junto aos andaimos de PLGA/PI *epox* (63x).

4.5 DISCUSSÃO

As propriedades observadas no cultivo celular, como a capacidade de aderência ao plástico de cultura, morfologia fibroblastóide, capacidade de diferenciação celular em adipócitos e osteócitos, além da marcação evidente para CD90 e CD105 e a expressão insignificante de CD45 e CD34, estão em consonância com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, a qual afirma que o conceito de células-tronco envolve o suprimento de tais características¹¹.

Segundo o que fora mencionado por Ishikawa et al. (2010)³⁵ e Fathi e Farahzadi (2016)³⁶, o tecido adiposo coletado através da técnica de lipoaspiração em ambas pacientes, demonstrou ser um método de obtenção minimamente invasivo, sem gerar morbidade às doadoras. Além disso, consideramos uma fonte vantajosa para extração celular, pois além de ser um tecido em abundância, com pouca quantidade do material biológico, todos os testes puderam ser realizados.

A exigência do campo industrial em produzir nanofibras, é uma realidade e muito se tem pesquisado por métodos simples, baratos e ecologicamente corretos. Além desses princípios, sabe-se que em tecidos nativos, a MEC apresenta fibras com diâmetro entre 50 e 500nm³⁷, indo de encontro com o ponto básico do processo de fabricação dos andaimes, que é a compatibilidade estrutural das matrizes com a MEC natural³⁸. O método de fabricação das fibras de PLGA/PI epox por *centrifugal spinning*, não foi eficiente em produzir apenas nanofibras, tendo em vista que a maioria delas obteve 1µm ou mais, tendo um “n” pequeno de nanofibras (n=37). Da mesma forma, Hou et al. (2017)³⁹, ao usar o método de fiação centrífuga, encontraram diâmetros que variam entre 2-4µm.

Acreditamos que devido à existência de muitos parâmetros que influenciam no diâmetro e em outras características, há a necessidade de otimizar tais propriedades nessa técnica de fabricação. Velocidade de rotação, concentração dos polímeros, comprimento e diâmetro do “*nozzle*” precisam ser testados para a obtenção máxima de nanofibras. Embora o referido método represente uma tecnologia promissora, tendo perspectivas atraentes para a substituição do *electrospinning*, ainda é imaturo e necessita de modificações. Pesquisas recentes não progrediram teórica e tecnicamente, fazendo-se necessário maiores estudos para que ocorra a padronização⁴⁰. Apesar de não conseguir estabelecer nanofibras, alguns estudos afirmam que, arcabouços de microfibras são considerados substratos adequados para o crescimento celular, além de favorecer à adesão e à disseminação celular⁴¹⁻⁴³. Isso pôde ser observado nesse trabalho, pois independente do diâmetro das fibras, houve boa interação biomaterial-células, sem demonstrar preferência de adesão em relação aos diâmetros maiores ou menores.

Ao testarmos a viabilidade das células em relação ao controle (células aderidas no poço), evidenciamos que o biomaterial não interferiu na viabilidade celular, mantendo

seu potencial metabólico. Por se tratar de um teste de viabilidade, vale ressaltar que optamos por avaliar o poço como um todo, pois se houvesse algum nível de toxicidade nos grupos onde as células foram cultivadas junto às matrizes fibrosas, observaríamos interferência na taxa de proliferação celular, devido ao dano mitocondrial. O teste de MTT é um ensaio quantitativo e colorimétrico da atividade mitocondrial que determina a interrupção da função bioquímica crítica⁴⁴. É, também, considerado um método padrão para a avaliação da citotoxicidade celular⁴⁵. Testes que avaliam o efeito tóxico de biomateriais, devem ser elaborados, primeiramente, em ensaios *in vitro*. Desse modo, é possível selecionar materiais adequados para aplicações *in vivo*⁴⁶. Guerra et al. (2018)⁴⁷ e Henckes et al. (2019)³⁰, ao testarem a blenda PLGA/PI epoxidada por *electrospinning*, também não observaram efeitos citotóxicos às células, estando em concordância com o que fora observado nesse estudo. Evidenciamos maior número de células metabolicamente ativas, em relação ao controle, quando $1,3 \times 10^5$ células foram incubadas por 72 horas. Acreditamos que, como havia dois planos para a multiplicação celular nos grupos testados (biomaterial e poço), em relação ao controle (apenas poço), a proliferação celular foi maior. Isso denota novamente, a não interferência na taxa de proliferação e viabilidade celular.

A adesão celular é um processo dinâmico resultante da comunicação entre moléculas da superfície celular com seus ligantes⁴⁸. Esses eventos envolvidos na adesão celular e por consequência na interação célula-célula ditarão a viabilidade e a diferenciação quando modelos de arcabouços são considerados, pois a proliferação celular iniciar-se-á após a adesão e a expansão na estrutura⁴⁹⁻⁵⁰. Um dos objetivos desse trabalho foi constatar o melhor período de incubação em relação à densidade celular a ser plaqueada, levando em consideração as células aderidas às fibras. Os resultados obtidos a partir da contagem celular por imunofluorescência, nos levam a crer que, ao escolher

uma densidade, deve-se preconizar por um menor período de incubação (entre 24 e 48 horas), pois a partir desse período há uma tendência ao descolamento celular. Tais constatações corroboram com Soletti et al. (2006)⁵¹, pois pregam que em culturas associadas com arcabouços, é desejável que o tempo de semeadura seja curto. Além disso, a maior taxa de adesão celular foi obtida no plaqueamento de $1,3 \times 10^5$ células, sendo o mais recomendado para este tipo de biomaterial. Esse valor, proporcionalmente, está de acordo com o sugerido por Henckes et al. (2019)³⁰. Porém esses autores notaram maior adesão de HMV-II entre 48 e 72 horas, mas, também optaram por menor tempo de incubação, devido à posterior translação aos pacientes. A diminuição na taxa de adesão, independente do grupo, observada com o passar das avaliações, pode ser justificada pela atuação das forças moleculares. Há uma propensão à ligação das moléculas adsorvidas das células por essas forças, fazendo com que as células se desaderirem-se ao passar das horas, principalmente, quando há alto índice de adesão celular inicial⁵⁰.

Com base nas imagens obtidas por MEV, podemos constatar a interação celular ao biomaterial, com a emissão de pseudópodes celulares às fibras. Todos os grupos apresentaram-se homogêneos entre si, perante este teste. Esse fato, pode ser fundamentado no fato de se tratar de um biomaterial em 3D, em que a maioria das células não permanecem aderidas à superfície, e sim, à camada mais interna do *scaffold*. Além disso, por se tratar de uma análise superficial, a percepção profunda é perdida. Em contrapartida, Buizer et al. (2013)⁵² observaram efeito contrário, constataram maior número de células na camada exterior dos biomateriais. Um dos fatos que poderiam contribuir refere-se à porosidade do material utilizado. Estruturas pouco porosas tendem a levar maior propagação celular na superfície externa, ao passo que as porosas, contribuem para o crescimento na superfície interno⁵³⁻⁵⁴. A adesão celular é o principal fator que irá ditar a boa interação célula-biomaterial. Dessa forma, faz-se necessário a

promoção e a manutenção, por parte dos arcabouços, à adesão celular. A falha em manter esse contato, afeta diretamente a sobrevivência celular, levando a morte programada⁵⁵.

A morfologia e a estrutura do citoesqueleto celular estão diretamente relacionadas aos papéis reguladores, sendo associados com a adesão ao substrato e a consequente morfologia das colônias⁵⁶. Henckes et al. (2019)³⁰ destaca que a função celular é mantida após a avaliação por imunofluorescência. Em concordância, notamos que o padrão morfológico celular permanece o mesmo em qualquer tempo de avaliação, ou seja, as células integradas às matrizes fibrosas, seguem expressando proteínas estruturais típicas e proliferando normalmente. Essas propriedades são necessárias no reparo, substituição e regeneração de tecidos⁵⁷.

Os *scaffolds*, usados na engenharia de tecidos, devem ser aptos em atender alguns parâmetros. Devem, também, ser biodegradáveis e biocompatíveis, permitindo tanto a adesão celular como a multiplicação. Faz-se necessário que os suportes sejam tridimensionais, a fim de simular a MEC⁵⁸⁻⁶⁰. Fundamentado nessas características, os resultados obtidos permitem a continuidade desse trabalho, com posterior aplicação *in vivo*. Permite-se afirmar que as fibras de PLGA/PI *epox* confeccionadas a partir de *centrifugal spinning*, podem ser consideradas para uso na medicina regenerativa.

4.6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados, o *scaffold* composto de PLGA/PI *epox*, acrescido com células mesenquimais adipoderivadas, pode ser considerado para uso na engenharia de tecidos, partindo para posteriores estudos *in vivo*, pois o mesmo não interferiu na viabilidade celular, quando em cultura com ADSCs, permitiu integração às fibras e, também, não alterou a morfologia celular. Ademais, pelo fato de ter uma queda

no número de células aderidas com o passar das avaliações, consideramos que o cultivo de $1,3 \times 10^5$ células em 24 horas, se sobressaiu aos demais. Apesar do bom desempenho, em relação a interação entre células-biomaterial, faz-se necessário maiores estudos para a produção de nanofibras através do *centrifugal spinning*.

4.7. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

4.8 REFERÊNCIAS

- (1) Rodrigues, I.C.P.; Kaasi, A.; Rubens, M.R.; Jardini, A.L.; Gabriel, L.P. Engenharia de tecidos cardíacos: atual estado da arte a respeito de materiais, células e formação tecidual. *Einstein (São Paulo) [online]* **2018**, *16* (3), 1-9. DOI: 10.1590 / s1679-45082018rb4538.
- (2) Barbanti, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros [online]* **2004**, *15* (1), 13-21. DOI: 10.1590 / S0104-14282005000100006.
- (3) Santos Jr., A. R.; Ferreira, B.M.P.; Duek, E.A.R.; Dolder, H.; Wada, M.L.F. Use of blends of bioabsorbable poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate- co-hydroxyvalerate) as surfaces for Vero cell culture. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2005**, *38* (11), 1623-1632. DOI:10.1590 / S0100-879X2005001100009.
- (4) Meirelles, L.S.; Chagastelles, P.C.; Nardi, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **2006**, *119* (11), 2204–2213. DOI: 10.1242 / jcs.02932.
- (5) Nardi, N.; Meirelles, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *174*, 249-282. DOI: 10.1007 / 978-3-540-77855-4_11.

- (6) Bydlowsky, S. P. Debes, A.A.; Maselli, L.M.F.; Janz, F.J. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2009**, *31* (1), 25-35. DOI: 10.1590 / S1516-84842009005000038.
- (7) Cheng, K.-H.; Kuo, T.-L.; Kuo K.-K. Hsiao, C.-C. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic Med., Biomarkers, Health Sci.* **2011**, *3* (2), 53–62. DOI: 10.1016 / j.gmbhs.2011.08.003.
- (8) Amorin, B.; Valim, V.S.; Lemos, N.E.; Júnior, L.M.; Da Silva, A.M.P.; Da Silva, M.A.L.; Silla, L. Immunological properties and clinical applications. *Revista HCPA* **2012**, *32* (1), 71–81.
- (9) Lavoie, J.R.; Rosu-Myles, M. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cell. *Biochimie* **2013**, *95* (12), 2212-2221. DOI: 10.1016 / j.biochi.2013.06.017.
- (10) Paul, G.; Anisimovc S.V. The secreto-me of mesenchymal stem cells: potential implications for neuroregeneration. *Biochimie* **2013**, *95* (12), 2246-2256. DOI: 10.1016 / j.biochi.2013.07.013.
- (11) Kobolak, J.; Dinnyes, A.; Memic, A.; Khademhosseini, A.; Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* **2016**, *99*, 62-68. DOI: 10.1016 / j.ymeth.2015.09.016.
- (12) McLaughlin, M.M.; Marra, K.G. The use of adipose-derived stem cells as sheets for wound healing. *Organogenesis* **2013**, *9* (2), 79–81. DOI: 10.4161 / org.24946.
- (13) Hiwatashi, N.; Hirano, S.; Mizuta, H.; Tateya, I.; Kanemaru ,S.; Nakamura, T.; Ito, J. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope* **2014**, *124* (12), 461–469. DOI: 10.1002 / lary.24816.
- (14) Kokai, L.E.; Marra, K.; Rubin, J.P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl. Res.* **2014**, *163* (4), 399–408. DOI: 10.1016 / j.trsl.2013.11.009.
- (15) Park, I.S.; Chung, P.S.; Ahn, J.C. Enhanced angiogenic effect of adipose-derived stromal cell spheroid with low-level light therapy in hind limb ischemia mice. *Biomaterials* **2014**, *35* (34), 9280–9289. DOI: 10.1016 / j.biomaterials.2014.07.061.
- (16) Tsuji, W., Rubin, J.P., Marra, K.G. Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. *World J. Stem Cells* **2014**, *6* (3), 312–321. DOI: 10.4252 / wjsc.v6.i3.312.
- (17) Wagers A.J. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell* **2012**, *10* (4), 362-369, 2012. DOI: 10.1016 / j.stem.2012.02.018.
- (18) McCarthy, M.E.; Brown, T.A.; Bukowska, J.; Bunnell, B.A.; Frazier, T.; Wu, X; Gimble, J.M. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. *Curr. Stem Cell Rep.* **2018**, *4*, 127–137. DOI: 10.1007 / s40778-018-0125-9.

- (19) Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Pol. Sci.* **2007**, *6* (8-9), 762-798. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
- (20) Dhandayuthapani, B.; Yoshida, Y.; MAaekawa, T.; Kumar, D. S. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, *2011*, 1-19. DOI: 10.1155/2011/290602.
- (21) Kramschuster, A.; Turng, L. In: *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, 1^ªed.; Ebnasajjd, S.; William Andrew, **2013**, 427-446.
- (22) Braghirolli, D. I. *Produção de scaffolds contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bio-electrospraying*. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2012**.
- (23) Ulery, B.D.; Nair, L.S.; Laurencin, C.T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J. Polym. Sci. B. Polym. Phys.* **2011**, *49*(12), 832-864. DOI: 10.1002/polb.22259.
- (24) Isotalo, T.M.; Nuutinen, J.P.; Vaananen, A.; Martikainen, P.M.; Laurila, M.; Törmälä, P.; Talja, M.; Tammela, T.L. Biocompatibility properties of a new braided biodegradable urethral stent: a comparison with a biodegradable spiral and a braided metallic stent in the rabbit urethra. *BJU Int.* **2006**, *97*(4), 869-859. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06000.x
- (25) Pandey, A.; Pandey, G. C.; Aswath, P. B. Synthesis Of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Blends Using Microwave Radiation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2008**, *1*(3), 227-233. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2007.12.001.
- (26) Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)* **2011**, *3*(3), 1377-1397. DOI:10.3390/polym3031377
- (27) Marques, D. R. *Obtenção e Caracterização de Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2011**.
- (28) Jorge, R.M.; Ferreira, M.T.; Pacciani, P.H.S.; Gomes, A.S.; Nunes, R.C.R. Caracterização físico-mecânica de filmes de borracha natural epoxidada curáveis em temperatura ambiente. *Polímeros*. **2009**, *19*(4), 329-335. DOI: 10.1590/S0104-14282009000400013.
- (29) Marques, D. R.; Santos, L.A.; Schopf, L.F.; Fraga, J.C. Analysis of Poly (Lactic-co-Glycolic Acid)/Poly(Isoprene) polymeric blend for application as biomaterial. *Polímeros [online]* **2013**, *23* (5), 579-584. DOI: 10.4322 / polimeros.2013.099.
- (30) Henckes, N.A.C.; Festa, J.C.D.; Faleiro, D.; Medeiros, H.R.; Guerra, N.B.; Dos Santos, L.A.L.; Terraciano, P.B.; Passos, E.P.; De Oliveira, F.S.; Cirne-Lima, E.O. Tissue-engineering solution containing cells and biomaterials-na in vitro study: A

perspective as a novel therapeutic application. *Int. J. Artif. Org.* **2019**, *42* (6), 307-314. DOI:10.1177 / 0391398819833383 .

(31) Badrossamay, M.R.; McIlwee, H.A.; Goss, J.A. Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. *Nano Lett.* **2010**, *10* (6), 2257–2261. DOI: 10.1021 / nl101355x.

(32) Markarian, C.F.; Frey, G.Z.; Silveira, M.D.; Chem, E.M.; Milani, A.R.; Ely, P.B.; Horn, A.P.; Nardi, N.B.; Camassola, M. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among diferente methods. *Biotechnol. Lett.* **2014**, *36*(4), 693-702. DOI: 10.1007/s10529-013-1425-x.

(33) Marins, F.C.; Ranconi, C.T.; Saavedra, F.M.; Lima, A.B.M.; Zaia, A.A.; Moreira, E.J.L.; Da Silva, E.J.N.L. Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos à base de MTA: um estudo in vitro. *Rev. Bras. Odontol.* **2017**, *74*(1),27-30. DOI: 10.18363/rbo.v74n1.p.27.

(34) Maurmann, N.; Pereira, D.P.; Burguez, D.; Pereira, F.D.A.S.; Neto, P.I.; Rezende, R.A.; Gamba, D.; Silva, J.V.L.; Pranke, P. Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. *Biomed., Phys., Eng. Express.* **2017**, *3*(4), 045005. DOI: 10.1088/2057-1976/aa6308

(35) Ishikawa, T.; Banas, U.; Hagiwara, K.; Iwaguro, H.; Ochiya, T. Stem cells for hepatic regeneration : the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2010**, *2511* (4800), 182-189. DOI: 10.2174 / 157488810791268636.

(36) Fathi, E.; Farahzadi, R. Isolation, culturing, characterization and aging of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a brief overview. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, **2016**, *59*, 1-9. DOI: 10.1590 / 1678-4324-2016150383.

(37) Ao, C.; Niu, Y.; Zhang, X.; He, X.; Zhang, W.; Lu, C. Fabrication and charecterization of electrospun cellulose/nano-hydroxyapatite nanofibers for boné tissue engineering. *Inter. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *97*, 568-573. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.12.091.

(38) Zhou, M.; Smith, A.M.; Das, A.K.; Hodson, N.W.; Collins, R.F.; Ulijn, R.V.; Gough, J.E. Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. *Biomaterials*, **2009**, *30* (13), 2523-2530. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.010.

(39) Hou, T.; Li, X.; Lu, Y.; Yang, B. Highly porous fibers prepared by centrifugal spinning. *Materials and Design* **2017**, *144*, 303-311. DOI: 10.1016/j.matdes.2016.11.019

(40) Zhang, Z.M.; Duan, Y.S.; Qiao, X.; Zhang, B. A review on nanofiber fabrication with the effect of high-speed centrifugal force field. *J. Eng. Fib. Fabr.* **2019**, *14*, 1-7. DOI: 10.1177 / 1558925019867517.

(41) Zanatta, G.; Steffens, D.; Braghirolli, D.I.; Fernandes, R.A.; Netto, C.A.; Pranke, P. Viability of mesenchymal stem cells during electrospinning. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2012**, *45* (2), 125–130. DOI: 10.1590 / s0100-879x2011007500163.

- (42) Hsia, H.C.; Nair, M.R.; Mintz, R.C.; Corbett, S.A. The fiber diameter of synthetic bioresorbable extracellular matrix influences human fibroblast morphology and fibronectin matrix assembly. *Plast. Reconstr. Surg.* **2011**, *127* (6), 2312–2320. DOI:10.1097 / PRS.0b013e3182139fa4.
- (43) Zanatta, G.; Rudisile, M.; Camassola, M.; Wendorff, J.; Nardi, N.; Gottfried, C.; Pranke, P.; Netto, C.A. Mesenchymal stem cell adherence on poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanofibers scaffold is integrin-beta 1 receptor dependent. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2012**, *8* (2), 211–218. DOI: 10.1166 / jbn.2012.1382.
- (44) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1- 2), 55-63. DOI:10.1016 / 0022-1759(83)90303-4.
- (45) Tang LL, Liu H, Wang YL, Xian, C.Y.; Su, A.H. Evaluation of biocompatibility of acellular porcine dermis. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces.* **2007**, *57* (2), 215-218. DOI: 10.1016 / j.colsurfb.2007.02.009.
- (46) Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D mammalian cell culture: a starting guide for laboratory practice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 623-636. DOI: 10.1007 / s00253-014-6253-y.
- (47) Guerra, N.B.; Cassel, J.B.; Henckes, N.A.C.; Oliveira, F.S.; Cirne-Lima, E.O.; Dos Santos, L.A.L. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical application. *J. Polym. Res.* **2018**, *25* (8), 1-9. DOI: 10.1007 / s10965-018-1542-2.
- (48) Lotfi, M.; Nejib, M.; Naceur, M. Cell adhesion to biomaterials: concept of biocompatibility. *Adv. Biomater. Sci. Biomed. Appl.* **2013**, *8*, 208-240. DOI:10.5772/53542.
- (49) Zhang, N.; Kohn, D.H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. *Birth Defects Res. C Embryo Today*, **2012**, *96* (1), 63-81. DOI: 10.1002 / bdrc.21003.
- (50) Bacakova, L.; Filova, E.; Parizek, M.; Ruml, T.; Svorcik, V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (6), 739-767. DOI: 10.1016 / j.biotechadv.2011.06.004.
- (51) Soletti L, Nieponice A, Guan J, Stankus, J.J.; Wagner, W.R.; Vorp, D.A. A seeding device for tissue engineered tubular structures. *Biomaterials* **2006**, *27* (28), 4863–4870. DOI: 10.1016 / j.biomaterials.2006.04.042.
- (52) Buizer, A.T.; Veldhuizen, A.G.; Bulstra, S.K.; Kuijer, R. Static versus vacuum cell seeding on high and low porosity ceramic scaffolds. *J. Biomater. Appl.* **2013**, *29* (1), 3-13. DOI: 10.1177 / 0885328213512171.
- (53) Kim, S.J.; Jang, D.H.; Park, W.H.; Min, B. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds. *Polymer* **2010**, *51*, 1320-1327. DOI: 10.1016 / j.polymer.2010.01.025.

- (54) Stankus, J.J.; Guan, J.; Fujimoto, K.; Wagner, W.R. Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix. *Biomaterials* **2006**, *27* (5), 735–744. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.020.
- (55) Streuli, C.H. Integrins and cell-fate determination. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 171–177. DOI: 10.1242/jcs.018945.
- (56) Murray, P.; Prewitz, M.; Hopp, I.; Wells, N.; Zhang, H.; Cooper, A.; Parry, K.L.; Robert Short, R.; Antoine, D.J.; Edgar, D. The self-renewal of mouse embryonic stem cells is regulated by cell–substratum adhesion and cell spreading. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 2698–2705. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.07.001.
- (57) Krishnamoorthy, N.; Tseng, Y.T.; Gajendrarao, P.; Sarathchandra, P.; McCormack, A.; Carubelli, I.; Sohler, J.; Latif, N.; Chester, A.H.; Yacoub, M.H. A strategy to enhance secretion of extracellular matrix components by stem cells: relevance to tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **2018**, *24* (1–2), 145–156. DOI: 10.1089/ten.TEA.2017.0060.
- (58) Zhao, S.; Zhao, J.; Dong, S.; Huangfu, X.; Li, B.; Yang, H.; Zhao, J.; Cui, W. Biological augmentation of rotator cuff repair using bFGF-loaded electrospun poly(lactide-co-glycolide) fibrous membranes. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 2173–2185. DOI: 10.2147/IJN.S59536.
- (59) Gandhimathi, C.; Venugopal, J.R.; Bhaaathy, V.; Ramakrishna, S.; Kumar, S.D. Biocomposite nanofibrous strategies for the controlled release of biomolecules for skin tissue regeneration. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9*, 4709–4722. DOI: 10.2147/IJN.S65335.
- (60) Zhang, H.; Jia, X.; Han, F.; Zhao, J.; Zhao, Y.; Fan, Y.; Yuan, X. Dual-delivery of VEGF and PDGF by double-layered electrospun membranes for blood vessel regeneration. *Biomaterials* **2013**, *34* (9), 2202–2212. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.12.005.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Devido ao aumento na expectativa de vida da população, a ocorrência de afecções de caráter crônico, tem aumentado proporcionalmente. Isso faz com que haja uma busca incessante por métodos terapêuticos que visem à substituição ou regeneração de órgãos e tecidos. Nesse sentido, a engenharia de tecidos, a qual faz associação entre terapia celular com células tronco e polímeros, tem desenvolvido diversos métodos para sanar ou reduzir esse tipo de problema.

Nas condições em que os experimentos foram conduzidos, é possível afirmar que a associação entre ADSCs e *scaffold* de PLGA/PI *epox*, confeccionado pela técnica de centrifugal spinning, é uma terapia promissora para ser usado na engenharia de tecidos. Testes *in vivo* devem ser considerados, no intuito de avaliar a resposta individual de cada paciente com relação a essa terapia.

A partir do teste de MTT, observamos o caráter atóxico das fibras frente ao cultivo celular. Nota-se através de MEV, a adesão celular com emissão de pseudópodes celulares aos andaimes. Essa mesma análise, possibilitou averiguar as características dos arcabouços. Também, é importante destacar que, através do teste de coloração nuclear com DAPI, foi possível fazer a contagem celular, permitindo verificar o espalhamento celular em relação ao biomaterial.

Com base nesses testes realizados, pôde-se constatar que manter esse substrato em contato com as células, durante um curto período (24 horas), mostra-se ser mais eficiente, prezando pela maior adesão celular. Ademais, a densidade a ser plaqueada de $1,3 \times 10^5$ demonstra ser superior as demais, sendo indicativa para plaqueamento neste exemplar.

Apesar da técnica de *centrifugal spinning* ser considerada promissora e uma possível substituta para o *electrospinning*, maiores estudos para padronização são necessários, pois ela ainda é imatura e há divergência na literatura. Preconiza-se encontrar um meio de alcançar a produção de nanofibras, tendo em vista a compatibilidade com a MEC natural.

Como mencionado, as lamínulas não são eficazes em propiciar o crescimento celular apenas nos *scaffolds*. Devido a isso, novo modelo deve ser elaborado, no intuito

de evitar esse problema. Provavelmente, no momento da confecção das fibras, as lamínulas devam ser incorporadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALT, E.U. et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.8, n.2. p. 215-225, 2012
- AMNUAYPORNTRI, S.; SAKDAPIPANICH, J.; TANAKA, Y. Highly purified natural rubber by saponification of latex: analysis of green and cured properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v.118, n.6, p. 3524-3531, 2010.
- AMORIN, B. et al. Immunological properties and clinical applications. **Revista HCPA**, v. 32, n. 1, p. 71–81, 2012.
- ARAÚJO, Maria Alberta Pereira das Neves da Fonseca. **Avaliação do processo de degradação de misturas termoplásticas à base de amido de milho**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Escola de Engenharia, Universidade de Minho, Braga, 2005
- BADIAVAS, E. V; FALANGA, V. Treatment of chronic wounds with bone marrow-derived cells. **Archives Dermatology**, v. 139, n. 4, p. 510–516, 2003.
- BADROSSAMAY, M.R.; MCILWEE, H.A.; GOSS, J.A. Nanofiber assembly by rotary jet-spinning. **Nano Letters**, 10 (6), 2257–2261, 2010.
- BARSAM, M. F. et al. Reação tecidual induzida pelos implantes de silicone e de polímero da mamona usados como espaçadores de tendão: estudo experimental comparativo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.38, n.5, p.291-300, 2003.
- BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v.30, n.1, p.42-48, 2002.
- BHUMIRATANA, S. et al. Principles of bioreactor design for tissue engineering. principles of tissue engineering. **Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)**, v. 1., p. 261–278, 2014.
- BRAGHIROLI, Daikelly Iglesias. **Produção de scaffolds contendo células-tronco para uso na engenharia de tecidos através da associação das técnicas de electrospinning e bio-electrospraying**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- BYDLOWSKY, S. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p.25-35, 2009.
- CHEN, H.; HU, Y. Bioreactors for tissue engineering. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 28, n. 18, p. 1415–1423, 2006
- CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v.38, n.3-4, p.584-671, 2013.

CHENG, K., et al. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v.3, n.2, p.53–62, 2011.

CORNISH, K.; XIE, W. Natural rubber biosynthesis in plants: rubber transferase. **Methods in Enzymology**, v.515, p.63-82, 2012.

COSME, J. G. L., et al. Development of biobased Poly(lactic acid)/epoxidized natural rubber blends processed by electrospinning: morphological, structural and thermal properties. **Materials Sciences and Applications**, v.7, n.4, p.210-219, 2016.

CRONK, S.M. et al. Adipose-derived stem cells from diabetic mice show impaired vascular stabilization in a murine model of diabetic retinopathy. **Stem Cells Translational Medicine**, v.4, n.5, p.459–467, 2015

CUKIERMAN, E. et al. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. **Science**, v. 294, n.5547, p. 1708-1712, 2001.

DECENT, S.P.; KING, A.C.; SIMMONS, M.J.H. The trajectory and stability of a spiralling liquid jet: viscous theory. **Applied Mathematical Modelling**, v.33, n.12, p.4283–4302, 2009.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DUSCHER, D. et al. Aging disrupts cell subpopulation dynamics and diminishes the function of mesenchymal stem cells. **Scientific Reports**, v.4, n.1. p.7144-7152, 2014.

FEINBERG, A.W. Engineered tissue grafts: opportunities and challenges in regenerative medicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 4, n.2, p. 207-220, 2012.

FENG, J. et al. An injectable non-cross-linked hyaluronic-acid gel containing therapeutic spheroids of human adipose-derived stem cells. **Scientific Reports**, v. 7, n.1, p.1548-1555, 2017.

FRASER, J.K. et al. Fat tissue: na underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 24, n.4, p. 150-154, 2006

GALIANI, Patrini Danielle. **Avaliação e caracterização da borracha natural de diferentes clones de seringueira cultivados nos estados de Mato Grosso e Bahia**. 2010. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

GALIANO, F. et al. Advances in biopolymer-based membrane preparation and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 564, n. May, p.562–586, 2018.

GEBLER, A.; ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in Molecular Medicine**, v.18, n.2, p.128-134, 2012.

GILPIN, A.; YANG, Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. **BioMed Research International**, v.2017, p.1-13, 2017.

GINANI, F., SOARES, D.M.; BARBOZA, C.A.G. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.27, n.3, p.359-363, 2012

GOMILLION, C.T.; BURG, K.J.L. Stem cells and adipose tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, n.36, p.6052-6062, 2006.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering- current challenges and expanding opportunities. **Science**, v.295, n.5557, p.1009-1114, 2002.

GUERRA, N.B. et al. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical application. **Journal of Polymer Research**, v.25, n.8, p.1-9, 2018.

HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 22, n. 3, p. 313–25, 2014.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials Selection. In: WISE, D. L. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part A**. Dekker, Marcel Inc. 1995, pp. 2759.

HENCKES, N.A.C. et al. Tissue-engineering solution containing cells and biomaterials-na in vitro study: A perspective as a novel therapeutic application. **The Internation Journal of Artificial Organs**, v.42, n.6, p. 307-314, 2019.

HIWATASHI, N. et al. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. **Laryngoscope**, v.124, n.12, p.461–469, 2014.

HOLLISTER, S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature Materials**, v.4, n.7, p.518–524, 2005.

HOOPER, J.P. Centrifugal spinneret. **Patent US1500931**, USA, 1924.

HOSSEINKHANI, M. et al. Tissue engineering scaffolds in regenerative medicine. **World Journal of Plastic Surgery**, v.3, n.1, p.3-7, 2014.

HUTTUNEN, M.; KELLOMÄKI, M. A. simple and high production rate manufacturing method for submicron polymer fibres. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.5, n.8, p.e239–e243, 2011.

ISOTALO, T.M. et al. Biocompatibility properties of a new braided biodegradable urethral stent: a comparison with a biodegradable spiral and a braile metallis stent in the rabbit urethra. **British Journal of Urology Internacional**. v.97, n.4, p. 856-859, 2005.

JORGE, R. M. et al. Caracterização físico-mecânica de filmes de borracha natural epoxidada curáveis em temperatura ambiente. **Polímeros: Ciência E Tecnologia**, v.19, n.4, p.329-335, 2009.

KADLA, J.; KUBO, S. Lignin-based polymer blends: analysis of intermolecular interaction in lignin-synthetic polymer blends. **Composites: Part A**, v.35, p.395-400, 2004.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact of dentistry. **Journal of Dental Education**, v.65, p.456-462, 2001.

KEANE, T.J.; BADYLAK, S.F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v.23, n.3, p.112-118, 2014.

KIM, B.S.; MOONEY, D.J. Engineering smooth muscle tissue with a predefined structure. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.41, n.2, p.322-332, 1998.

KIM, J.O. et al. Experimental Comparative Study of the Histotoxicity of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) copolymer and Poly(Lactico-Glycolic Acid)-Poly(Isoprene) Blend. **Polímeros**, v.24, n.5, p.529-535, 2014.

KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v.99, p.62-68, 2016.

KOKAI, L.E.; MARRA, K.; RUBIN, J.P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Translational Research**, v.163, n.4, p.399-408, 2014.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells, Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, n.1, p.204-213, 2007

KRAMSCHUSTER, A.; TURNG, L. Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. In: EBNESAJJAD, S. **Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics**. 1ed. William Andrew, 2013, cap. 17, p. 427-446.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-926, 1993.

LOORDHUSWAMY, A.M.; KRISHNASWAMY, V.R.; KORRAPATI, P.S. Fabrication of highly aligned fibrous scaffolds for tissue regeneration by centrifugal spinning technology. **Materials Science and Engineering**, v.42, p.799-807, 2014.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. 1 ed. Rio de Janeiro: e-Papers Serviços Editoriais, 2011, p. 540.

MAKADIA, H.K.; SIEGEL, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v.3, n.3, p.1377-1397, 2011.

MANO, E. B. **Polímeros como Materiais de Engenharia**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1991, p.218.

MARQUES, D.R. et al. *In vivo* tissue engineering of musculoskeletal tissues. **Current Opinion in Biotechnology**. v.22, p.715-720, 2011.

MARQUES, Douglas Marques. **Obtenção e Caracterização de Blendas Poliméricas de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico) e Poliisopreno para Aplicação como Biomaterial**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MARQUES, D. R., et al. Analysis of Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)/Poly(Isoprene) polymeric blend for application as biomaterial. **Polímeros**, v.23, n.5, p 579-584, 2013.

MARQUES, Douglas Marques. **Fibras de Poli (Ácido Láctico-co-Glicólico)/Poliisopreno para aplicação em engenharia de tecidos**. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MCCARTHY M.E. et al. Therapeutic applications for adipose-derived stem cells in wound healing and tissue engineering. **Current Stem Cell Reports**, v.4, p.127–137, 2018.

MCLAUGHLIN, M.M.; MARRA, K.G. The use of adipose-derived stem cells as sheets for wound healing. **Organogenesis**, v.9, n.2, p.79–81, 2013.

MEIRELLES, L. DA S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n.11, p. 2204–2213, 2006

MIKOS, A.G. et al. Engineering complex tissues. **Tissue Engineering**, v.12, n.12, p.3307-3339, 2006.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v.6, n.8-9, p.762-798, 2007.

NAKAGAMI, H. et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.13, n.2, p.77-81, 2006.

NAMBU, M. et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Annals of Plastic Surgery**, v. 62, n. 3, p. 317–21, mar. 2009.

NARDI, N.; MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.174, p.249-282, 2006.

- NATARAJAN, T.S.; BHARGAVA, P. Influence of spinning parameters on synthesis of alumina fibres by centrifugal spinning. **Ceramics International**, v.40, n.10, 11644–11649, 2018.
- NAUTA, A.J. et al. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, v.108, n.6, p.2114-1020, 2006.
- OLIVEIRA, P.S. Obtenção de scaffolds bioabsorvíveis a partir de blenda de PLGA e IR com adição de hidroxiapatita. **Matéria**, v.24, n.3, 2019.
- OTTO, W. R.; WRIGHT, N. A. Mesenchymal Stem Cells: From Experiment to Clinic. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2011.
- PADRON, S.; FUENTES, A.C.; ARUNTU, D. Experimental study of nanofiber production through forcespinning. **Journal of Applied Physics**, v.113, n.2, p.024318-1-024318-9, 2013
- PANDEY, A.; PANDEY, G. C.; ASWATH, P. B. Synthesis Of Polylactic Acid–Polyglycolic Acid Blends Using Microwave Radiation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v.1, n.3, p. 227-233, 2008
- PARK, I.S.; CHUNG, P.S.; AHN, J.C. Enhanced angiogenic effect of adipose-derived stromal cell spheroid with low-level light therapy in hind limb ischemia mice. **Biomaterials**, v. 35, n.34, p 9280–9289, 2014.
- PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateruaus: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v.38, n.7, p. 957-971, 2015.
- RATHBONE, S. et al. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v.93, n.4, p.1391-1403, 2009.
- RIAHI, D.N. Modeling and computation of nonlinear rotating polymeric jets during forcespinning process. **International Journal of Non-Linear Mechanics**, v.92, p.1–7, 2017.
- RIGOTTI, G. et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.119, n.5, p. 1409-1422, 2007
- RIPPEL, M. M.; GALEMBECK F. Nanostructures and adhesion in natural rubber: new era for a classic. **Journal of the Brazilian Chemycal Society**, v.20, n.6, p.1024-1030, 2009.
- RODRIGUES, I.C. et al Engenharia de tecidos cardíacos: atual estado da arte a respeito de materiais, células e formação tecidual. **Einstein**, v.16, n.3, p.1-9, 2018.

SACHOLS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work: review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v.30, n.5, p.29-40, 2003.

SANTIN, C. K.; PINTO, G.C.; JACOBI, M.M. Epoxidação “*in situ*” aplicada ao látex de borracha natural. **Polímeros**, v.22, n.2, p.193-199, 2012.

SANTOS JR, A. R. et al. Use of blends of bioabsorbable Poly(L-Lactic Acid)/Poly(Hydroxybutirate-co-Hydroxyvalerate) as Surfaces for Vero Cell Culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.11, p.1623-1632, 2005.

SCHIPANI, E.; KRONENBERG, H.M. Adult mesenchymal stem cells. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute, 2008

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering**, v.34, n.4-5, p.147-230, 2001

SEONG, J. et al. Stem Cells in bone tissue engineering. **Biomedical Materials**, v.6, n.5, p.99-110, 2010.

SOUZA, C.F. et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.18, n.3, p.344-353, 2010.

STEFFENS, D. et al. Update on the main use of biomaterials and techniques associated with tissue engineering. **Drug Discovery Today**, v.23, n.8, p.1474-1488, 2018.

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry: An Introduction**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1998, p. 576.

SUN, M. et al. Adipose extracellular matrix/stromal vascular fraction gel secretes Angiogenic factors and enhances skin wound healing in a murine model. **BioMed Research International**, p.1–11, 2017

TSUJI, W., RUBIN, J.P., MARRA, K.G. Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. **World Journal of Stem Cells**, v.6, n.3, p.312–321, 2014

VALIPOURI, A.; RAVANDI, S.A.H.; PISHEVAR, A.R. A novel method for manufacturing nanofibers. **Fibers and Polymers**, v.14, n.6, p.941–949, 2013.

WANG, Y. et al. Future application of hair follicle stem cells: Capable in differentiation into sweat gland cells. **Chinese Medical Journal**, v. 126, n. 18, p. 3545–3552, 2013.

WARD, I. M.; HADLEY, D. W. **Mechanical Properties of Solid Polymers**. West Sussex: John Wiley & Sons, 1995, p. 480.

WILLIAMS, D.F. The biomaterials conundrum in tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.7-8, p.1129–1131, 2014.

WU, W., NIKLASON, L., STEINBACHER, D.M. The effect of age on human adipose-derived stem cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.131, n.1, p.27-37, 2013.

YANG, M. et al. Stem cell therapy for lower extremity diabetic ulcers: where do we stand? **BioMed Research International**, v.2013, p.1-8, 2013.

YANNAS, I. V. Natural Materials. In: RATNER, D. B. (ed.) *Biomaterials Science*. San Diego: Academic Press, 1996.

YOKSAN, R. Epoxidized Natural Rubber For Adhesive Applications. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, v. 42, p.325-332, 2008.

ZAGO, A.; COVAS, T. **Células-tronco – A fronteira da medicina**. Atheneu, São Paulo, 2006, 245p.

ZAKARIA, Z., et al. Mechanical properties and morphological characterization of PLA/Chitosan/Epoxidized Natural Rubber composites. **Advances in Materials Science And Engineering**, v.2013, p.1-7. 2013.

ZHANG, Y. et al. Chronic label-free volumetric photoacoustic microscopy of melanoma cells in three-dimensional porous scaffolds. **Biomaterials**, v.31, n.33, p.8651-8658, 2010

ZHANG, Z.M. et al. A review on nanofiber fabrication with the effect of high-speed centrifugal force field. **Journal of Engineering Fibers and Fabrics**, v.14, p.1-7, 2019.

ZHOU, M. et al. Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells. **Biomaterials**, v.30, n.13, p.2523-2530, 2009.

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n.2, p.4279–4295, 2002.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

ANEXO 1

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Interação entre células mesenquimais e scaffold de Poli(ácido láctico-co-glicólico) e Poli(isopreno): estudo in vitro

Pesquisador: Fernanda dos Santos de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03936918.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.134.979

Apresentação do Projeto:

A busca por cicatrizes mínimas ou imperceptíveis é uma constante na área de medicina humana, bem como em veterinária. A forma como feridas são tratadas afeta diretamente a taxa de cura, o tempo de cicatrização, o retorno a função normal e a aparência cosmética final. Há danos que promovem diferentes graus de perdas de tecidos e estruturas. Frente a isto, o propósito da medicina regenerativa é rever eventos embrionários dentro de um espaço produzido por materiais artificiais, ou seja, os biomateriais, para que os processos de reparo possam ser desencadeados usando o reservatório de células-tronco presente nos tecidos (SHASTRI et al., 2010; LEE et al., 2011). Neste sentido, a medicina regenerativa propõe que a terapia celular combinada a biomateriais, forneça abordagem promissora para o tratamento de doenças. É preciso levar em consideração a superfície do biomaterial, quando associada às células, pois pode afetar diretamente a resposta celular e, até mesmo, a regeneração do tecido. Assim existe uma tentativa incessante para melhorar a eficácia dos biomateriais frente às células epiteliais (TROHATOU et al., 2017; MA, 2008).

O objetivo do projeto "Interação entre células tronco mesenquimais com scaffold de Poli(ácido láctico-co-glicólico) e Poli(isopreno): estudo in vitro" é avaliar a interação in vitro entre células tronco mesenquimais de origem adipogênica (ADSCs) de humanos com a blenda polimérica de Poli(ácido láctico-co-glicólico) e Poli(isopreno) (PLGA/PI), confeccionada através da técnica de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.134.979

centrifugal spinning. Para isso, ADSCs de humanos serão coletadas através de lipoaspiração. Posteriormente a isto, serão isoladas, cultivadas e submetidas a testes que comprovem características mesenquimais. Em seguida, serão realizados testes in vitro, referentes a interação com o biomaterial de PLGA/PI, avaliando a adesão celular, morfologia, proliferação, viabilidade, citotoxicidade e biodegradabilidade. Neste sentido, resultados significativos e positivos, em relação à interação das ADSCs com o biomaterial, são esperados. A partir desta análise, almeja-se futuras aplicações desta associação na medicina regenerativa in vivo, com enfoque, principalmente, em cicatrização de tecidos moles. O desenvolvimento do projeto ocorrerá no Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular e na Unidade de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Células mesenquimais adipoderivadas do projeto CAAE 94521618.4.0000.532727 serão utilizadas nesse estudo (material biológico de 5 pacientes), com anuência do Comitê de Bioética do HCPA. O biomaterial será disponibilizado pelo grupo do Professor Luis Alberto dos Santos, do LABIOMAT – Localizado no Departamento de Engenharia de Materiais na Escola de Engenharia da UFRGS.

Objetivo da Pesquisa:

Geral

Avaliar a interação in vitro entre células tronco mesenquimais adipoderivadas de humanos com a matriz de PLGA/PI por Centrifugal Spinning.

Específicos

Avaliar a porosidade e diâmetro das fibras do biomaterial através de microscopia eletrônica por varredura;

Avaliar proliferação e viabilidade celular em associação ao biomaterial através de ensaios de MTT, contagem celular e avaliação live/dead;

Avaliar adesão celular à matriz através de microscopia eletrônica por varredura (MEV);

Avaliar morfologia celular após adesão ao biomaterial através de microscopia confocal;

Avaliar citotoxicidade pelo biomaterial através de dosagem de enzima lactato desidrogenase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não são conhecidos riscos.

Benefícios:

Desenvolver um tipo de curativo que auxilie no processo de cicatrização de tecidos moles utilizando-se a associação entre células tronco mesenquimais e biomateriais.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-003
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cex@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.134.979

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto interessante. Utilizará material biológico armazenado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto inclui resumo, introdução, justificativa, fundamentação teórica, objetivos, metodologia, análises estatísticas, cronograma de atividades e referências bibliográficas. Apresentam o Formulário de Delegação de Funções, o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas e o TCLE. Apresentam também o TCLE de origem da coleta das amostras, CAAE 94521618.4.0000.532727. No formulário da Plataforma Brasil foi incluído o tamanho amostral, os riscos e benefícios e o orçamento.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.101.819 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 23/01/2019. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto de 23/01/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de material biológico de 05 participantes de projeto anterior (CAAE 94521618.4.0000.5327) no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
 Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-003
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



Continuação do Parecer: 3.134.979

Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1246922.pdf	23/01/2019 23:13:22		Aceito
Outros	Pendencias_cep.pdf	23/01/2019 20:17:43	Emanuelle Bortolotto Degregori	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_brochuras.pdf	23/01/2019 20:17:03	Emanuelle Bortolotto Degregori	Aceito
Outros	Delegacao_funcao.pdf	03/12/2018 21:37:45	Emanuelle Bortolotto Degregori	Aceito
Outros	Termo_compromisso.pdf	28/11/2018 19:36:43	Emanuelle Bortolotto Degregori	Aceito
Outros	jaque.pdf	09/11/2018 14:30:09	Fernanda dos Santos de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termodeconsentimento.pdf	09/11/2018 13:29:44	Fernanda dos Santos de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	jpg2pdf.pdf	08/11/2018 22:14:33	Emanuelle Bortolotto Degregori	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 06 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Rubrica do participante _____ Rubrica do pesquisador _____ Página 1 de 2
CPE – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (___/___/____)

Título do Projeto: **Interação entre células tronco adipoderivadas e *scaffold* de poli (ácido láctico-co-glicólico) e poli (isopreno) *epox* confeccionado a partir de *centrifugal spinning*: estudo *in vitro***

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é analisar as células tronco presentes na gordura e sua interação com um tipo de biomaterial. O objetivo desse estudo é tentar fazer um tipo de curativo com células. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Se você aceitar participar da pesquisa, suas células que já estão armazenadas no laboratório de pesquisa, serão usadas. Este material encontra-se, atualmente, armazenado em laboratório. Alguns dados contidos em seu prontuário também serão utilizados, como idade, peso e altura. A sua identidade e o registro dos seus dados serão mantidos em sigilo e não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa.

Este material, ou seja, as suas células, além de serem utilizadas neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para concordar novamente com o uso do material. Como essas células já estão armazenadas, esse estudo não trará riscos adicionais a você. Esse estudo não trará nenhum benefício a você, mas no futuro pessoas com determinadas patologias poderão ser beneficiadas, caso este estudo apresente bons resultados.

Sua participação na pesquisa é voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber no HCPA. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos pacientes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fernanda de Oliveira, pelo telefone (51) 33597745, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Com relação às amostras biológicas armazenadas:

- () Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
 () Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do Participante

Assinatura

Telefone:

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Assinatura

Local e data: