

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS E BIOMATERIAIS PARA
DESENVOLVIMENTO DE NEOVAGINA: ENSAIOS *IN VITRO*

Nicole Andréa Corbellini Henckes

Porto Alegre, 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS E BIOMATERIAIS PARA
DESENVOLVIMENTO DE NEOVAGINA: ENSAIOS *IN VITRO*

Nicole Andréa Corbellini Henckes

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Obino
Cirne-Lima

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de
Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Henckes, Nicole Andréa Corbellini

Interação entre células e biomateriais para
desenvolvimento de neovagina: ensaios in vitro /
Nicole Andréa Corbellini Henckes. -- 2017.

63 f.

Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Biomateriais. 2. Síndrome MRKH. 3. células-
tronco mesenquimais. 4. linhagem celular HMV-II. I.
Cirne-Lima, Elizabeth Obino, orient. II. Título.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.” (Guimarães Rosa).

DEDICATÓRIA

Ao meu amor **Henrique André Heinen**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incertezas, muito comum para quem tenta trilhar novos caminhos. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus amados: mãe **Jaqueline** (*in memoriam*) pelo grande exemplo que foste para mim, pai **Pedro** por ser o mais generoso de todos os pais, minha irmã **Aislin** (e **Andy**) pelo incentivo direto ou indireto, e a **Tia Lu** que me manteve firme por muitas vezes, vocês dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da honestidade e persistência.

Aos amigos **Gabriela e Josemir, Verônica, Rafaela e Bianca Souza, Fe Kasper**, vocês são diamantes para toda vida.

Com vocês queridos, divido a alegria desta experiência, pois ninguém vence sozinho!

AGRADECIMENTOS

Idealizar e produzir uma dissertação de mestrado exige-nos bastante curiosidade, dedicação, disciplina e concentração. Feliz aquele que caminha pelas trilhas de um mestrado e sabe que do princípio ao fim dessa jornada precisará do apoio e da compreensão de muitas pessoas. E são a elas que, neste momento, dedico algumas palavras de carinho.

Em primeiro lugar, à minha orientadora Professora Doutora **Elizabeth Obino Cirne Lima**. Sua orientação, suas recomendações e sua cordialidade com que sempre me recebeu foram essenciais para meu crescimento, uma vez que sempre a idealizei. Fostes o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me principalmente a pensar e acreditar na construção deste trabalho. Foi, e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus modestos sucessos.

À Dra. **Fernanda dos Santos de Oliveira**, que participou desta minha sonhada formação, gostaria de demonstrar um pouquinho de toda importância que tu tiveste, obrigada pela grande parceria desta jornada que fizemos juntas.

Ao Professor Doutor **Luis Alberto dos Santos**, pelas colaborações materiais e por estar conosco nessa parceria que deu tão certo.

Ao Professor Doutor **Eduardo Pandolfi Passos**, que indicou as parcerias do sucesso deste trabalho.

À minha parceira **Helouise Medeiros**, incentivadora diária de persistência, de confiança e principalmente do potencial que levei comigo. Eu jamais esquecerei de tudo que compartilhamos e aprendemos uma com a outra. Minha fiel escudeira.

Às gurias do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, que sempre ajudaram nas atividades, experimentos, suporte emocional e na divisão de conhecimentos.

À Rosmeri Herdina, pela dedicação na revisão de todos os textos, e acreditar sempre na minha conquista.

A todos vocês, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações	18
Regenerative medicine x scaffold	19
2.2 Mapa Conceitual	20
2.3 Medicina regenerativa.....	20
2.4 Uso de células-tronco mesenquimais na Medicina Regenerativa.....	24
2.5 Síndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH).....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	33
4.HIPÓTESES	34
4.1 Hipótese alternativa	34
4.2 Hipótese nula	34

5.OBJETIVOS.....	35
5.1 Principal.....	35
5.2 Secundários.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
ARTIGO em inglês.....	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
PERSPECTIVAS.....	43
ANEXOS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

MRKH	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser
MSC	células-tronco mesenquimais
hADSCs	células-tronco adipoderivadas de humanos
PAS	ácido periódico de Shiff
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PLGA	<i>poly (lactic-co-glycolic acid)</i>
PI	<i>poly (isoprene)</i>
FDA	Food and Drug Administration
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
°C	graus Celsius
µL	microlitro
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
IgG	Imunoglobulina G

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

EUA Estados Unidos da América

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características essenciais na associação entre células x biomaterial	22
Figura 2. Número de pessoas (milhões) nos EUA que sofrem de doenças que podem ser curadas através do aumento das pesquisas com células-tronco humanas	25
Figura 3. Aderência da célula-tronco mesenquimal ao biomaterial	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Busca de referências bibliográficas nas bases de dados PUBMED, LILACS, SCIELO e Periódicos CAPES.....	19
---	----

RESUMO

A síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) caracteriza-se pela aplasia congênita dos ductos Mullerianos. Devido a algumas características peculiares, as células-tronco mesenquimais estão sendo vistas como uma nova alternativa de tratamento em pacientes acometidos pela síndrome de MRKH. Considerando que alguns biomateriais servem como suporte estrutural e interferem positivamente na regeneração tecidual, a associação da linhagem celular de mucosa vaginal HMV-II e das MSC derivadas de tecido adiposo humano com biomateriais apresenta uma nova possibilidade na criação de neovagina. Nesta perspectiva, foram cultivadas células HMV-II com diferentes biomateriais (Membracel, Biofilme, Cellprene, PLGA PI quimicamente modificado) a fim de selecionar o melhor material alternativo. Ambas as células, associadas ao biomaterial selecionado, foram submetidas à análise morfológica, coloração ácido periódico-Schiff (PAS), expressão de marcadores epiteliais específicos por imunofluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células que interagiram com o biomaterial apresentaram marcadores epiteliais específicos e características morfológicas epiteliais. Estes resultados indicam que a interação do biomaterial com ambas as células testadas tem potencial capacidade para uma epitelização eficiente da neovagina. O crescimento das MSC com o biomaterial selecionado para implantação subsequente em pacientes com síndrome de MRKH pode representar uma alternativa válida e promissora para a reconstrução vaginal.

Palavras-chave: Biomateriais; síndrome MRKH; células-tronco mesenquimais, linhagem celular HMV-II.

ABSTRACT

The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome is characterized by congenital aplasia of the Mullerian ducts. Because mesenchymal stem cells (MSCs) secrete paracrine factors, they have been seen as a new treatment option for several diseases. Considering that some biomaterials can be used as scaffolds and interfere positively in tissue regeneration, the association of human vaginal mucosa (HMV-II) cell line and MSCs with biomaterials appears as a new option for the creation of neovagina. In this study we cultured HMV-II cells with different biomaterials (Membracel, Biofilm, Cellprene, chemically modified PLGA PI) to select the best alternative material. For that both cells were cultured with the selected biomaterial and evaluated by morphological analysis, periodic acid-Schiff (PAS) staining, expression of epithelial markers by immunofluorescence and scanning electron microscopy (SEM). The analysis of the *in vitro* cell-biomaterial interactions showed specific epithelial markers and epithelial morphological features for both cells. These results indicate that the interaction of the biomaterial with the two tested cells has the potential capacity for an efficient epithelialization of the neovagina. Therefore, growth of MSCs with the selected biomaterial for subsequent implantation in patients with MRKH syndrome may represent a valid and promising alternative for vaginal reconstruction.

Keywords: Biomaterials; MRKH syndrome; mesenchymal stem cells; HMV-II cell line.

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) caracteriza-se como a aplasia congênita dos ductos Mullerianos da vagina que ocorre durante a embriogênese dos órgãos genitais femininos. Sua incidência acomete cerca de 1:4500 nascimentos do sexo feminino. Estas anomalias Mullerianas variam de discretas alterações anatômicas até total aplasia, chegando este caso a ser diagnosticado em 90% das mulheres afetadas. O principal tratamento para a síndrome MRKH é o procedimento cirúrgico, que foi estabelecido há quase 200 anos. Este procedimento consiste na criação de uma cavidade neovaginal. Porém existem diferentes técnicas para a correção da agenesia vaginal e não há senso comum sobre o material que deve ser utilizado para o revestimento adequado da parede do canal vaginal (MORCEL *et al.*, 2007; REZENDE *et al.*, 2013; PANICI *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, observaram-se frequentes descrições sobre a reconstrução bem-sucedida de diversos órgãos com a aplicação de técnicas de engenharia de tecidos. Em busca de novas alternativas, os biomateriais, que são caracterizados como sólidos tridimensionais, podem ser enquadrados em associação às células epiteliais para realizar algumas funções como: promover interações célula-biomaterial, favorecer adesão celular, permitir o transporte suficiente de gases, nutrientes e fatores reguladores para possibilitar a sobrevivência celular, proliferação e diferenciação que se aproxima da regeneração tecidual nas condições de cultura de interesse e provocar um grau mínimo de inflamação ou toxicidade *in vivo*. 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. (SEGUNDO *et al.*, 2012; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; ZHU *et al.*, 2013).

Trohatou e colaboradores (2017), utilizando células-tronco mesenquimais para terapia de regeneração de tecidos, demonstraram nos resultados obtidos em experimentos *in vitro* e *in vivo*, que este tipo celular apresenta importante papel no estímulo da remodelação tecidual através da secreção de citocinas (TROHATOU, *et al.*, 2017). Os métodos utilizados para o isolamento das MSC são baseados na sua capacidade de aderência ao plástico, proliferação *in vitro* e capacidade de diferenciarem-se em osteócitos, adipócitos e condrócitos (MENDES, *et al.*, 2017).

Nesta perspectiva, acrescenta-se também uso na pesquisa científica de, diferentes tipos de células epiteliais, como a linhagem celular de mucosa vaginal HMV-II, uma vez que a linhagem celular possui a característica de manter-se em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias), e mantém grande parte das características originais (ALVES, *et al.*, 2010). Em busca de uma estratégia para o tratamento em lesões de tecidos ou órgãos, a terapia celular utilizando células epiteliais em associação a biomateriais é uma alternativa terapêutica promissora, devido a características celulares peculiares amplia-se as possibilidades de utilização clínica, tanto em humanos, quanto em animais (SOUZA, *et al.*, 2010).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

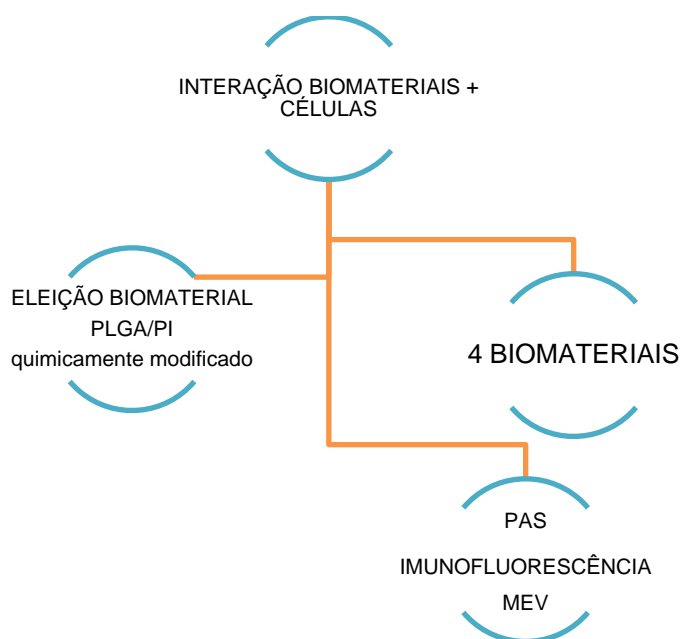
A revisão da literatura centrou-se nas seguintes palavras-chave: “Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome”, “*mesenchymal stem cells*”, “*Vaginal Reconstruction*”, “*engineering tissue*”, “*Regenerative medicine*” e “*scaffold*”. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PUBMED (MEDLINE), LILACS, SCIELO e CAPES. Em relação ao termo “síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser” foram encontrados 493 artigos no PUBMED, 27 artigos no LILACS, 17 artigos no SCIELO e 1.832 artigos no Periódicos CAPES; já em relação ao termo “*mesenchymal stem cells*” foram encontrados 48.440 artigos no PUBMED, 241 no SCIELO, 232.737 no Periódicos CAPES e 415 no LILACS. Utilizando o termo “*Vaginal Reconstruction*” foram encontrados 2.990 artigos no PUBMED, 2371 artigos no LILACS, 20 artigos no SCIELO e 16850 artigos no Periódicos CAPES, *engineering tissue* foram encontrados 91.877 artigos no PUBMED, 283 no SCIELO, 934;505 no Periódicos CAPES e 54.697 no LILACS; para o termo “*Regenerative medicine*” foram encontrados 40.466 artigos no PUBMED, 15.189 artigos no LILACS, 157 artigos no SCIELO e 18.1271 artigos no Periódicos CAPES, com o termo “*scaffold*” foram encontrados 45.370 artigos no PUBMED, 53.952 artigos no LILACS, 155 artigos no SCIELO e 363.654 artigos no Periódicos CAPES. Ao cruzar os termos “Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser e *mesenchymal stem cells*” foram encontrados 0 artigos no PUBMED, 0 no LILACS, 0 no SCIELO e no Periódicos CAPES 23. Ao cruzar “*Vaginal Reconstruction* e *engineering tissue*” foram encontrados 30 artigos no PUBMED, 24 no LILACS, no SCIELO 0 e no Periódicos

CAPES 1133. Cruzando os termos “*Regenerative medicine e scaffold*” foram encontrados artigos 194 no PUBMED, 0 no LILACS, no SCIELO 4 e no Periódicos CAPES 18296, “Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser e *scaffold*” foram encontrados 0 artigos no PUBMED, 2 no LILACS, no SCIELO 0 e no Periódicos CAPES 19, conforme tabela 1.

Tabela 1 Resultado de busca de referências bibliográficas nas bases de dados PUBMED, LILACS, SCIELO e Periódicos CAPES.

Palavras-chave	PUBMED	LILACS	SCIELO	Periódicos CAPES
Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser	493	27	17	1832
Mesenchymal stem cells	48440	415	241	232737
Vaginal reconstruction	2990	2371	20	16850
Enginering tissue	91877	54697	283	934505
Regenerative medicine	40466	15189	157	181271
Scaffold	45370	53952	155	363654
Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser x mesenchymal stem cells	0	0	0	23
Vaginal reconstruction x enginering tissue	30	2	0	1133
Regenerative medicine x scaffold	194	0	4	18296
Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser x scaffold	0	2	0	19

2.2 Mapa Conceitual



Analisou-se em um estudo piloto a capacidade de interação das células HMV-II e MSC associadas aos biomateriais, com a finalidade de eleger a melhor associação célula/biomaterial. Após obter a escolha do biomaterial que proporcionou melhor interação com as células, foram realizados ensaios de Imunofluorescência e coloração por PAS e ainda as células associadas ao biomaterial foram submetidas a análise por microscopia eletrônica de varredura.

2.3 Medicina regenerativa

A medicina regenerativa, igualmente conhecida como engenharia de tecidos, combina os campos das ciências da vida e da engenharia visando adaptar a regeneração do corpo, controlando especificamente o meio biológico. Dentre as inúmeras definições, ainda convém destacar, que a engenharia de tecidos utiliza

combinações específicas de células, e muito se discute sobre a importância de suas aplicações, as quais começaram a se estender além dos implantes terapêuticos para a criação de modelos fisiológicos de tecido humano *in vitro* (GRIFFITH, 2002; LEE, *et al.*, 2011).

De fato, existem danos que levam a diferentes graus de perdas de tecidos e estruturas. Frente a isto, observa-se que a ausência de sinais biológicos limita a capacidade de regeneração tecidual. Tendo consciência desta complexidade, 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, representa um pilar da saúde e fornece uma abordagem promissora para o tratamento de doenças. É preciso considerar também que a superfície do biomaterial torna-se importante quando associada às células, pois ela 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).

Tais considerações apontam que dependendo do biomaterial, uma variedade de parâmetros biofísicos pode ser modulada, tal como porosidade e degradação, onde cada variável pode influenciar significativamente as propriedades do biomaterial e, em última instância, as diferentes possibilidades de interações com células (KOBOLAK, *et al.*, 2016; SHASTRI, *et al.*, 2010).

Em razão destas situações, o biomaterial (figura 1) possui características como, propriedade mecânica entre outras, que permitem sua interação com o sistema biológico, possibilitando assim, a biocompatibilidade. Diante disto, o biomaterial, está sendo modificado quimicamente em relação a sua composição e estrutura a fim de melhorar a resposta celular (quando associado às células epiteliais) e conseqüentemente melhorar a interação com o sistema biológico (FURTH *et al.*, 2007; KIKUCHI, *et al.*, 2005).

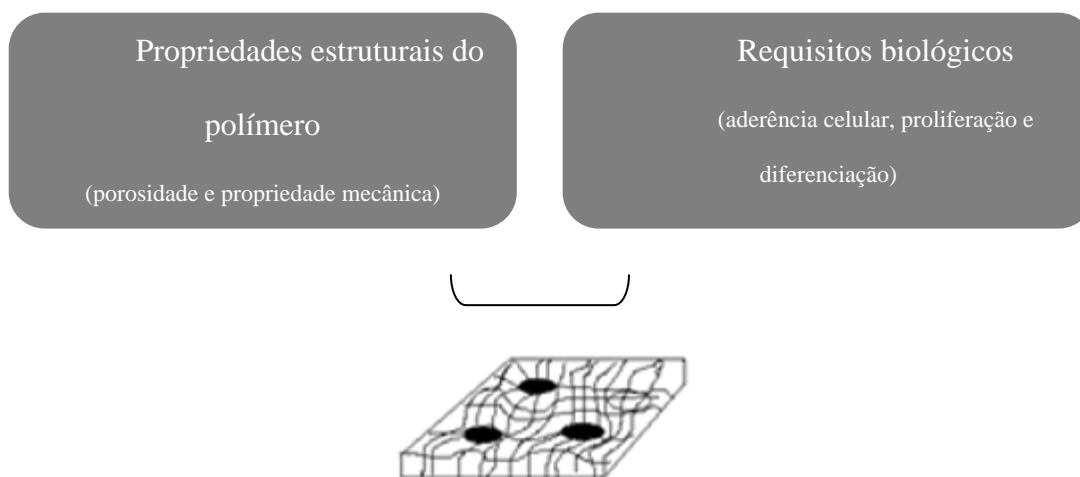


Figura 1. Características essenciais na associação entre células x biomaterial

Fonte: Autor (2017)

Nesta abordagem, percebe-se que um dos princípios da terapia celular na medicina regenerativa, envolve o uso de uma fonte celular apropriada e um material biocompatível, a fim de reproduzir (de forma estrutural e funcional) o tecido lesado. Assim, um biomaterial ideal deve ser capaz de suportar diferentes tipos de células, e em vista disso, otimizar sua aplicação continua sendo uma questão importante (LI 2005; MCKEE *et al.*, 2017; CIMA *et al.*, 1991).

É diante deste contexto que o biomaterial comumente utilizado na medicina regenerativa é o poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), que é biodegradável, e

tem apresentado resultados satisfatórios. Este biomaterial é certificado junto ao *Food and Drug Administration* (FDA, Estados Unidos), para uso em humanos. O sucesso deste polímero deve-se à capacidade de produzir uma estrutura fibrosa, com alta porosidade, proporcionando mais espaço estrutural para o alongamento das células, tornando a troca de nutrientes e resíduos metabólicos mais eficientes. Atualmente tem-se procurado modificar quimicamente o polímero PLGA, a fim de torna-lo hidrofílico, aumentando sua capacidade de interação com sistemas biológicos (LI *et al.*, 2002).

Certamente a aproximação cada vez mais intensa entre a engenharia e a biologia oferece a perspectiva de desenvolvimento de modelos que reproduzem melhor os processos fisiológicos, como aqueles que utilizam diferentes técnicas em sistemas *in vitro* que podem ser implementados em diferentes tecidos humanos. Essas ferramentas, em última instância, poderão permitir grandes avanços em prevenção, diagnóstico e tratamentos de doenças atualmente consideradas como alvos potenciais para engenharia de tecidos. Assim, a associação de células com biomateriais pode auxiliarno tratamento de diferentes doenças, como traumas e anomalias congênitas (GRIFFITH, *et al.*, 2002).

Em face disto, a ciência que se dedica aos estudos com biomateriais associados ao sistema biológico vem mostrando resultados mais promissores na engenharia de tecidos, e tem oferecido uma solução alternativa para determinadas patologias, tornando a criação exitosa de órgãos pré-fabricados *in vitro* associados às células (SADRI-ARDEKANI, *et al.*, 2015; ATALA, 2006).

2.4 Uso de células-tronco mesenquimais na Medicina Regenerativa

Recentemente tem se discutido muito sobre o cultivo e aplicação das células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa, as quais geraram uma onda de entusiasmo na comunidade científica devido à suas perspectivas terapêuticas (MA *et al.*, 2015). Desde a década de 1970, tem sido descrito a forma e a função celular, e utilizando estas descrições na pesquisa de células/biomateriais vários estudos conseguiram elucidar o impacto das forças mecânicas e químicas da superfície do biomaterial frente à função celular (SOUTO *et al.*, 2006; ULUDAG *et al.*, 2000).

Neste âmbito, cientistas no campo da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa aplicam princípios de transplante de diversos tipos de células, ciência de materiais e bioengenharia na construção de substitutos biológicos que podem restaurar e manter a função normal em tecidos lesados (VARKEY, *et al.*, 2011; RINGE, *et al.*, 2002).

Portanto, o potencial das MSC de serem capazes de diferenciar-se e de sofrerem uma extensa replicação tornam as células-tronco mesenquimais promissoras para o reparo do tecido. Outro fator relevante é que mais de 100 milhões de americanos que sofrem de doenças podem se beneficiar de aplicações de engenharia de tecidos com base em células-tronco (Figura 2) conforme o *Patients Coalition for Urgent Research*, EUA, Washington, D.C (RINGE, *et al.*, 2002).

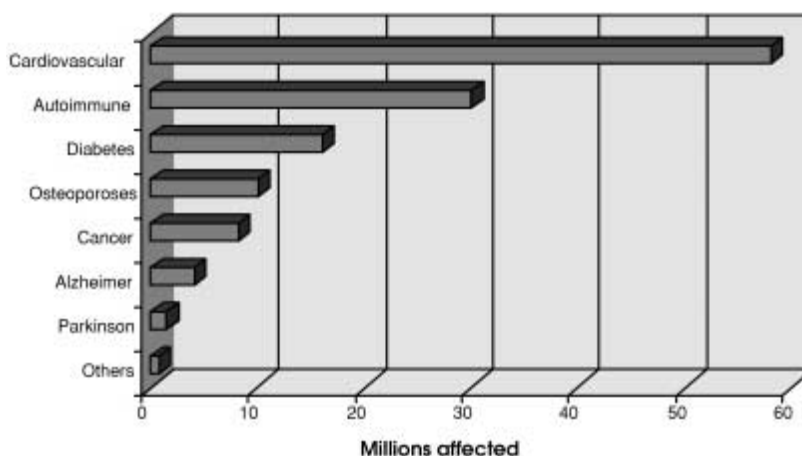


Figura 2. Número de pessoas (milhões) nos EUA que sofrem de doenças que podem ser beneficiadas pelas pesquisas com células-tronco humanas

Fonte: Ringe, *et al.*, 2002

Dentre os inúmeros motivos que levaram os biomateriais a serem utilizados clinicamente por muitos anos, a medicina regenerativa inspirou uma mudança para aumentar a atividade biológica e a interação imunológica destes materiais. Para isto, além do fato de que a resposta das células aos biomateriais pode ser testada *in vitro* e *in vivo*, o ambiente inclui diversos outros tipos celulares que interagem e se comunicam conjuntamente para adaptar à resposta imune. Desta maneira, existem várias estratégias para incorporar estímulos biológicos em um biomaterial a fim de melhorar a funcionalidade do tecido quando cultivado *in vitro* e, mais importante ainda, quando implantado *in vivo* (CHUNG, *et al.*, 2017; SUNDELACRUZ, *et al.*, 2009).

Em busca de reproduzir a cavidade vaginal, muitos tipos de tecidos têm sido utilizados, como malhas de biomateriais, membranas amnióticas, camadas peritoneais, derme artificial recombinante, malhas de pele, tecido intestinal, entre outros. Devido a características estruturais específicas de cada biomaterial, o

comportamento celular é influenciado por interações que ocorrem nas interfaces célula-biomaterial e, por isto, inclui-se o uso de células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa, tornando esses estudos promissores para futuras aplicações clínicas (ZHANG, *et al.*, 2017; BORGES, *et al.*, 2017; GUNAY, *et al.*, 2017).

Diante disto, as células-tronco mesenquimais (MSC), que são definidas como células pluripotentes presentes em diversos tecidos (medula óssea, gordura, músculo, sangue do cordão umbilical e outros), são de fácil obtenção e podem ser expandidas *in vitro* sem perda da sua multipotencialidade, sendo capazes de se diferenciar *in vitro* em células gordurosas, musculares, ósseas e condrocitárias. Além disso, também possuem como característica a expressão de um grande número de moléculas bioativas (moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento), permitindo interações com demais células, suprindo as células danificadas. A partir dessa supressão tecidual ocorre um estímulo para que as MSC sejam ativadas e possam proliferar-se, elevando o número de moléculas bioativas secretadas, migrando para o local da lesão exercendo efeitos parácrinos. Em paralelo a isso, também ocorre a expressão de receptores para citocinas e fatores de crescimento, dessa maneira, quanto mais vascularizada a região afetada, mais intensa é a sinalização e mais efetiva será a resposta das MSC (ZAGO, *et al.*, 2004; MONTEIRO, *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2010).

É diante deste contexto que tem se utilizado células-tronco mesenquimais adipoderivadas de humanos (hADSCs) que são de fácil obtenção, isolamento e cultivo, assim, quando comparadas à outros tipos celulares, estas demonstram maior capacidade de proliferação e diferenciação *in vitro* e devido a isto, são

consideradas as células-tronco mesenquimais mais promissoras (CALABRESE, *et al.*, 2017).

Outro ponto a considerar é a adesão celular à superfície, pois esta torna-se essencial em diversos fenômenos, devido à resposta imune, cicatrização e integração do tecido com o biomaterial. Em virtude disto, a aderência e a disseminação de células pertencem à primeira fase das interações que ocorrem na interface de célula/biomaterial, e conhecer a atividade que as MSC exercem sobre o biomaterial, incluindo o desenvolvimento de eventos celulares e a sensibilidade das células a estímulos bioquímicos e mecânicos, pode elucidar melhor como ocorre esta interação célula/biomaterial (SUNDELACRUZ, *et al.*, 2009; RAJZER, *et al.*, 2017; NAIR, *et al.*, 2017).

Neste tipo de situação, a estrutura do polímero (biomaterial) afetará diretamente as células (MSC) influenciando a secreção do fator de crescimento celular e a sinalização (LEE, *et al.*, 2011; GRIFFITH, 2002).

De fato, há uma diversidade de fontes para a obtenção de células-tronco mesenquimais, levando em consideração os diversos métodos de isolamento e expansão descritos na literatura. Isto denota o quão tem-se discutido sobre o uso das MSC, uma vez que apresentam características indispensáveis, que incluem a aderência ao plástico e potencial de diferenciação, e capacidade de serem expandidas *ex vivo* além de se diferenciarem em diferentes tipos celulares (HECK 2012; ZIMMERMANN *et al.*, 2016; ALMADA 2013). Considerando estas habilidades das MSC de modularem diversos componentes, ZIMMERMANN e colaboradores (2016) cultivaram MSC em biomateriais, demonstrando que esta combinação fornece

um meio de concentração e manutenção local de citocinas para potencializarem a atividade imunomodulatória das MSC.

Devido às considerações já mencionadas, a combinação da associação de células/biomateriais (figura 3) tem sido utilizada no reparo/regeneração de tecido, isto sendo possível devido ao microambiente produzido pelo biomaterial (WAHL, *et al.*, 2015; KOBOLAK, *et al.*, 2016; HECK, 2012).

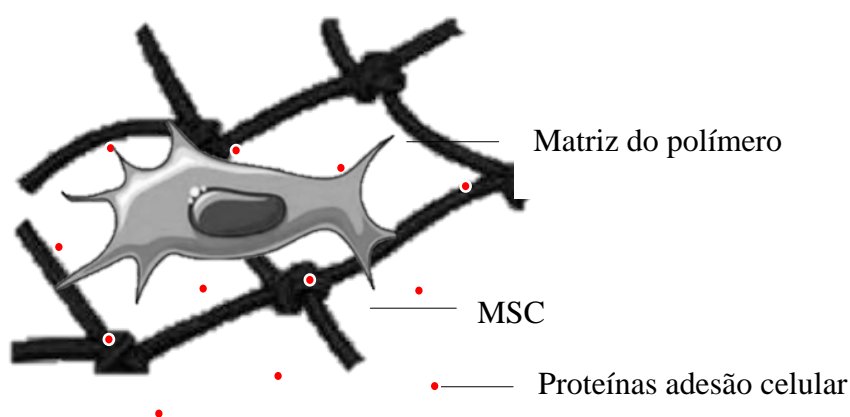


Figura 3. Aderência da célula-tronco mesenquimal ao biomaterial

Fonte: Autor (2017)

Em 2017 uma pesquisa realizada em animais por SU e colaboradores, revelaram efeitos parácrinos produzidos pelas MSC no tecido lesado. Compreender a função parácrina das células tem implicações profundas para entender como as células transplantadas *in vivo* podem facilitar os processos de reparação / regeneração de tecidos, o que, assim, pode esclarecer o princípio da utilização dos biomateriais (SU, *et al.*, 2017). Em busca disso, a terapia celular utilizando MSC associadas à biomateriais é uma alternativa terapêutica promissora, pois a capacidade destas diferenciarem-se amplia as possibilidades de utilização clínica, tanto em humanos, quanto em animais (SOUZA, *et al.*, 2010).

2.5 Síndrome Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH)

A agenesia vaginal é uma anomalia congênita do trato genital feminino, podendo apresentar-se como um defeito de desenvolvimento isolado ou dentro de um complexo de anomalias mais extensas. O mais comum é associado à síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH), com prevalência estimada em aproximadamente 1 em 4.500 nascidos vivos. Foi descrita pela primeira vez pelo anatomista alemão Mayer em 1829. A técnica mais conhecida utilizando métodos cirúrgicos é a de Abbe-McIndoe, que consiste na criação de um canal vaginal coberto com enxerto, sendo que este tecido substituído pode levar a uma função de regeneração adequada do epitélio. Se a dilatação falhar, ou caso o defeito seja grave, podem ser necessários tecidos extravaginais para a criação de novos tecidos vaginais. Assim, após a reconstrução cirúrgica, é necessário um uso prolongado de *stent* vaginal para manter a largura e a profundidade vaginal e prevenir a contração (RATHEE, *et al.*, 2014; RAYA-RIVERA, *et al.*, 2014; WANG, *et al.*, 2017; VATSA, *et al.*, 2017; NODALE, *et al.*, 2014).

Entretanto, o procedimento não cirúrgico mais utilizado é o método dilatador de Franck, o qual envolve a aplicação de dilatadores vaginais. Estes dilatadores são colocados na cavidade perineal por pelo menos 20 minutos por dia. Por conta desta abordagem não ser invasiva e muitas vezes ser bem-sucedida, é recomendada como terapia de primeira linha (MORCEL, *et al.*, 2007). Por outro lado, o uso de dilatadores tem criado problemas especiais, pois na epitelização, as células da uretra podem crescer sobre o dilatador, dificultando ou mesmo evitando sua remoção (Atala, Anthony. U.S. Patent Application No. 10/258,771).

Ao considerar esta perspectiva, é importante ter compreensão de que a malformação congênita tem profunda implicação clínica ginecológica para o paciente. Devido a isto, atualmente tem-se procurado um método eficiente e adequado de um biomaterial, uma vez que nas últimas décadas, os tratamentos de primeira linha para a síndrome de MRKH, como a malha de pele e técnicas de dilatação, sempre resultam em altas incidências de encolhimento, falta de lubrificação e dispareunia. Visando corrigir estes defeitos das técnicas, o tratamento da agenesia vaginal objetiva permitir que mulheres tenham uma vida sexual satisfatória, desenvolvendo uma vagina funcionalmente normal. Idealmente, o procedimento deve ser permanente, exigir o uso mínimo de dilatadores e ser minimamente invasivo sem deixar cicatrizes visíveis (ZHANG, *et al.*, 2017; PANICI, *et al.*, 2015).

Em busca de melhorar a qualidade do biomaterial enxertado, Nodale e colaboradores (2014), realizaram um estudo piloto no qual utilizaram tecido vaginal autólogo como material de enxerto para criar uma neovagina. Foi descoberto que o epitélio formado se assemelhava às células originais, incluindo a capacidade de produzir muco para lubrificação.

Pode-se mencionar também o estudo de Zhu e colaboradores (2013), os quais avaliaram enxertos a partir da aplicação de biomateriais na reconstrução vaginal, sugerindo e demonstrando que esta técnica de engenharia de tecidos na criação de neovagina é ideal, sendo um procedimento seguro, eficaz e minimamente invasivo, proporcionando uma função sexual quase normal para pacientes acometidas com a anomalia.

Devido ao sucesso do método não cirúrgico utilizando dilatadores flexíveis para a criação de uma neovagina, este é recomendado como uma abordagem terapêutica inicial para a maioria das pacientes. Em caso de falha, aconselha-se a realização da cirurgia, sendo que as pacientes devem estar familiarizadas com dilatadores, também necessários no pós-operatório. Ainda de acordo com Choussein, e colaboradores (2017), os resultados desta técnica não cirúrgica foram satisfatórios, com sucesso anatômico e funcional em mais de 90% das pacientes com MRKH e as mulheres descrevem esse método como confortável e relativamente fácil.

Panici e colaboradores realizaram um estudo selecionando pacientes com a síndrome de MRKH, onde prepararam cultura primária através de células de mucosa vaginal. As pacientes submetidas à criação do canal vaginal pela técnica de Abbe-McIndoe obtiveram sucesso na epitelização com uso do dilatador (gaze com células fixada ao dilatador), sugerindo que este se deve pela utilização tecido autólogo transplantado. Por outro lado, as desvantagens se devem às terapias baseadas em células que só podem ser realizadas em condições de cultura apropriadas, o que requer centros que tenham sofisticados laboratórios de cultura de tecidos (PANICI, *et al.*, 2015).

Contudo, a pesquisa realizada por Morcel e colaboradores, comparando procedimentos não cirúrgicos e cirúrgicos para a criação de neovagina em mulheres acometidas pela síndrome de MRKH demonstrou que o procedimento não cirúrgico pelo método de Frank deve ser proposto como a primeira linha de terapia, conforme recomendado pelo *American College of Obstetrics and Gynecology*.

Por isso, a ideia de regeneração de tecidos através do processo de cultivo celular autólogo é um paradigma atrativo a ser explorado. Assim, a reconstrução vaginal em pacientes acometidas pela MRKH pode ser realizada usando um biomaterial associado com células do paciente através da engenharia de tecidos (PANICI, *et al.*, 2015; ZHANG, *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICATIVA

A utilização de células-tronco mesenquimais na regeneração de tecidos gerou uma onda de entusiasmo na comunidade científica, devido à suas perspectivas terapêuticas (MA *et al.*, 2015). Como a malformação congênita decorrente da síndrome MRKH tem profunda implicação clínica, tem-se procurado métodos reparadores mais eficientes e adequados com uso de diferentes biomateriais. Nas últimas décadas, os tratamentos de primeira linha para a síndrome de MRKH, como a malha da pele e técnicas de dilatação resultaram em altas incidências de encolhimento, falta de lubrificação e dispereunia, apesar do objetivo do tratamento da agenesia vaginal permitir que mulheres tenham uma vida sexual satisfatória, atingindo vagina anatomicamente e funcionalmente normal. Idealmente, o procedimento deve gerar solução definitiva, exigindo o uso mínimo de dilatadores e ser minimamente invasivo, evitando cicatrizes visíveis (ZHANG, *et al.*, 2017; PANICI, *et al.*, 2015).

Neste âmbito, os resultados da presente pesquisa oferecem um método alternativo como o uso de um biomaterial (PLGA/PI quimicamente modificado) em associação às MSC para a reconstrução tecidual do epitélio vaginal.

4.HIPÓTESES

4.1 Hipótese alternativa

O biomaterial escolhido como mais apropriado, possui uma estrutura adequada para suportar o cultivo e a proliferação das células HMV-II e das células-tronco mesenquimais de forma eficiente.

4.2 Hipótese nula

O biomaterial escolhido como mais apropriado, conforme definido previamente, não possui uma estrutura adequada para suportar o cultivo e proliferação das HMV-II e das células-tronco mesenquimais de forma eficiente.

5.OBJETIVOS

5.1 Principal

O presente estudo propõe avaliar a capacidade de interação *in vitro* entre células epiteliais e biomateriais, para posterior criação de neovagina com células-tronco mesenquimais autólogas, apresentando como método terapêutico alternativo.

5.2 Secundários

- Avaliar por coloração de HARRIS em qual dos biomateriais houve maior crescimento celular
- Escolha do biomaterial onde houve maior proliferação celular
- Avaliar o melhor tempo de crescimento celular em associação ao biomaterial (cinética de crescimento)
- Avaliar se há uma melhora com a hidratação prévia ou não do biomaterial
- Avaliar a integridade do núcleo celular por coloração de DAPI
- Avaliar a capacidade das células produzirem muco, quando associadas ao biomaterial através da coloração PAS.
- Avaliar a morfologia celular quando associada ao biomaterial por microscopia eletrônica de varredura.

REFERÊNCIAS

Almada, Bruno Vinicius Pimenta de. *Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução à regeneração óssea*. Diss. Universidade de São Paulo.

Alves, Emanuele Amorim, and Anna Christina Rosa Guimarães. "Cultivo celular." EPSJV, 2010.

Atala, Anthony, and James J. Yoo. "Tissue engineered uterus." U.S. Patent No. 7,049,057. 23 May 2006.

Atala, Anthony. "Tissue engineered stents." U.S. Patent Application No. 10/258,771.

Borges, Fernanda T., and Nestor Schor. "Regenerative medicine in kidney disease: where we stand and where to go." *Pediatric Nephrology* (2017): 1-9.

Calabrese, Giovanna, et al. "Human adipose-derived mesenchymal stem cells seeded into a collagen-hydroxyapatite scaffold promote bone augmentation after implantation in the mouse." *Scientific Reports* 7 (2017).

Choussein, Souza, et al. "Mullerian dysgenesis: a critical review of the literature." *Archives of Gynecology and Obstetrics* (2017): 1-13.

Chung, Eun Ji, Matthew J. Sugimoto, Jason L. Koh and Guillermo A. Ameer. A biodegradable tri-component graft for anterior cruciate ligament reconstruction. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. MAR 2017 | DOI: 10.1002/term.2429.

Cima, L. G., et al. "Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates." *Journal of biomechanical engineering* 113.2 (1991): 143-151.

Dhandayuthapani, Brahatheeswaran, et al. "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review." *International Journal of Polymer Science* 2011 (2011).

Furth, Mark E., Anthony Atala, and Mark E. Van Dyke. "Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine." *Biomaterials* 28.34 (2007): 5068-5073.

Griffith, Linda G., and Gail Naughton. "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." *Science* 295.5557 (2002): 1009-1014.

Gunay, Gokhan, et al. "Three-Dimensional Laminin Mimetic Peptide Nanofiber Gels for in vitro Neural Differentiation." *Biotechnology journal* (2017).

Heck, Diana. "Avaliação da associação células-tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana." (2012).

Kikuchi, Akihiko, and Teruo Okano. "Nanostructured designs of biomedical materials: applications of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs." *Journal of Controlled Release* 101.1 (2005): 69-84.

Kobolak, Julianna, et al. "Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche." *Methods* 99 (2016): 62-68.

Lee, Kangwon, Eduardo A. Silva, and David J. Mooney. "Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments." *Journal of the Royal Society Interface* 8.55 (2011): 153-170.

Li, Wan-Ju, et al. "Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 60.4 (2002): 613-621.

Li, Wan-Ju, et al. "Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold." *Biomaterials* 26.25 (2005): 5158-5166.

Ma, Peter X. "Biomimetic materials for tissue engineering." *Advanced drug delivery reviews* 60.2 (2008): 184-198.

McKee, Christina, and G. Rasul Chaudhry. "Advances and challenges in stem cell culture." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2017).

Mendes Junior, Dario, et al. "Study of mesenchymal stem cells cultured on a poly (lactic-co-glycolic acid) scaffold containing simvastatin for bone healing." *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials* 15.2 (2017).

Monteiro, Betânia Souza, et al. "Mesenchymal stem cell." *Ciência Rural* 40.1 (2010): 238-245.

Morcel, Karine, Laure Camborieux, and Daniel Guerrier. "Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome." *Orphanet journal of rare diseases* 2.1 (2007): 13.

Nair, Ashwin, and Liping Tang. "Influence of scaffold design on host immune and stem cell responses." *Seminars in Immunology*. Academic Press, 2017.

Nodale C, Vescarelli E, D'Amici S, Maffucci D, Ceccarelli S, Monti M, et al. Characterization of human vaginal mucosa cells for autologous in vitro cultured vaginal tissue transplantation in patients with MRKH syndrome. *Biomed Res Int* 2014;2014:201518.

Panici, Pierluigi Benedetti, et al. "Vaginoplasty using autologous in vitro cultured vaginal tissue in a patient with Mayer-von-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *Human Reproduction* 22.7 (2007): 2025-2028.

Panici, Pierluigi Benedetti, et al. "Autologous in vitro cultured vaginal tissue for vaginoplasty in women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: anatomic and functional results." *Journal of Minimally Invasive Gynecology* 22.2 (2015): 205-211.

Rajzer, Izabella, Elżbieta Menaszek, and Oscar Castano. "Electrospun polymer scaffolds modified with drugs for tissue engineering." *Materials Science and Engineering: C* 77 (2017): 493-499.

Rathee, Manu, Priyanka Boora, and Renu Kundu. "Custom fabricated acrylic vaginal stent as an adjunct to surgical creation of neovagina for a young female with isolated vaginal agenesis." *Journal of human reproductive sciences* 7.4 (2014): 272.

Raya-Rivera, Atlántida M., et al. "Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study." *The Lancet* 384.9940 (2014): 329-336.

Rezende, Diego Fraga, et al. "Síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser: uma revisão da literatura." *Revista de Medicina e Saúde de Brasília* 2.2 (2013).

Ringe, Jochen, et al. "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs." *Naturwissenschaften* 89.8 (2002): 338-351.

Sadri-Ardekani, Hooman, and Anthony Atala. "Regenerative medicine for the treatment of reproductive system disorders: current and potential options." *Advanced drug delivery reviews* 82 (2015): 145-152.

Segundo, Airton Vieira Leite, and Belmiro Cavalcanti do Egito Vasconcelos. "Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia." *Revista de Ciências Médicas-ISSNe* 2318-0897 16.1 (2012).

Shastri, V. Prasad, and Andreas Lendlein. Engineering materials for regenerative medicine. *MRS bulletin* 35.8 (2010): 571-577.

Souto, Manuela R., and Teresa Margarida Cunha. "Malformações Uterinas: Revisão Clínica e Imagiológica." *Acta Radiológica Portuguesa*, Vol.XVIII, nº 71, pág. 89-93, Jul.-Set., 2006.

Souza, Cristiano Freitas de, et al. "Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca?." *Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva* (2010).

Su, Ni, et al. "Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction." *Biomaterials* 141 (2017): 74-85.

Sundelacruz, Sarah, and David L. Kaplan. "Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine." *Seminars in cell & developmental biology*. Vol. 20. No. 6. Academic Press, 2009.

Trohatou, Ourania, and Maria G. Roubelakis. "Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Regenerative Medicine: Past, Present, and Future." *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")* (2017).

Uludag, Hasan, Paul De Vos, and Patrick A. Tresco. "Technology of mammalian cell encapsulation." *Advanced drug delivery reviews* 42.1 (2000): 29-64.

Varkey, M., Atala, Anthony. From Tissue to Organ Engineering. *Comprehensive Biomaterials, Volume 5, 2011, Pages 547-562*.

Vatsa, Richa, et al. "Evaluation of amnion in creation of neovagina in women with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome." *Fertility and Sterility*(2017).

Wahl, Elizabeth A., et al. "In vitro evaluation of scaffolds for the delivery of mesenchymal stem cells to wounds." *BioMed research international* 2015 (2015).

Wang, Yue, et al. "Evaluation of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome with magnetic resonance imaging: Three patterns of uterine remnants and related anatomical features and clinical settings." *European Radiology* (2017): 1-10.

Zago, Marco A., and Dimas T. Covas. "Pesquisas com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais." *Seminário Instituto Fernando Henrique Cardoso* 1 (2004): 1-20.

Zhang, Xiaoli, et al. "The clinical outcomes of vaginoplasty using tissue-engineered biomaterial mesh in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome." *International Journal of Surgery* (2017).

Zhu, Lan, et al. "Anatomic and sexual outcomes after vaginoplasty using tissue-engineered biomaterial graft in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: A new minimally invasive and effective surgery." *The journal of sexual medicine* 10.6 (2013): 1652-1658.

Zimmermann, Joshua A. *Engineering Mesenchymal Stromal Cell Constructs to Enhance Immunomodulation*. Diss. Georgia Institute of Technology, 2016.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados indicam que a expansão da linhagem celular HMV-II e das células-tronco mesenquimais é totalmente suportada quando associadas ao biomaterial PLGA PI quimicamente modificado. Este é o primeiro estudo a relatar o uso de células-tronco adipoderivadas de humanos (hADSCs) co-cultivadas à blenda polimérica (PLGA/PI) quimicamente modificada. Portanto, supondo que a utilização de células da mucosa vaginal autólogas e que a via de desenvolvimento e sinais de regulação das MSC para o tecido maduro seguirão sendo estudadas, a formação *ex vivo* de tecidos tridimensionais complexos para o tratamento de doenças e danos parece ser possível, e é diante deste contexto que a engenharia de tecidos têm um grande potencial para avançar os esforços quanto ao seu uso na medicina regenerativa, abordando a necessidade clínica atual de substituição de tecidos e fornecendo plataformas para investigar estratégias de tratamento para estimular a regeneração de tecidos.

PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos nesta pesquisa foi possível iniciar o registro de uma propriedade intelectual, a qual encontra-se já descrita, porém em processo de revisão, apresentando como alternativa de tratamento o uso de células epiteliais associadas a blenda polimérica (PLGA/PI) quimicamente modificada.

ANEXOS

Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 160527

Data da Versão do Projeto: 11/10/2016

Pesquisadores:

ELIZABETH OBINO CIRNE LIMA

MARTINA CAROLINE STAPENHORST

NICOLE ANDRÉA CORBELLINI HENCKES

LUÍS ALBERTO DOS SANTOS

Título: ESTUDO IN VITRO SOBRE A INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS DIFERENCIADAS OU NÃO COM BIOMATERIAIS, PARA O DESENVOLVIMENTO DE NEOVAGINA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 24 de novembro de 2016.

Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA