

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
IMUNOLOGIA

**ALESSANDRA ARCOVERDE CAVALCANTI ZONARI**

**Utilização do polímero natural polihidroxitirato-co-  
hidroxivalerato para auxiliar a vascularização e  
regeneração da pele a partir de princípios da  
engenharia de tecidos.**

Belo Horizonte

2013

# **Alessandra Arcoverde Cavalcanti Zonari**

**Utilização do polímero natural polihidroxibutirato-co-hidroxicvalerato para auxiliar a vascularização e regeneração da pele a partir de princípios da engenharia de tecidos.**

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

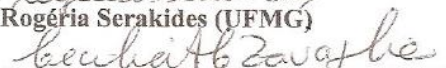
2013




ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ALESSANDRA ARCOVERDE CAVALCANTI ZONARI. Aos vinte dias do mês de dezembro de 2013 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Utilização do polímero natural polihidroxibutirato-co- hidroxivalerato para auxiliar a vascularização e regeneração da pele a partir de princípios da engenharia de tecidos", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Alfredo Miranda de Góes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rodrigo Ribeiro Resende (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rogéria Serakides (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia (Universidade de Campinas), aprovada; Dr. Maria Beatriz Puzzi (Universidade de Campinas), aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2013.

  
Dr. Rodrigo Ribeiro Resende (UFMG)

  
Dr. Rogéria Serakides (UFMG)

  
Dr. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia (Universidade de Campinas)

  
Dr. Maria Beatriz Puzzi (Universidade de Campinas)

  
Dr. Alfredo Miranda de Góes - Orientador (UFMG)

**Dedico essa tese à minha família**

*"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende."  
(Leonardo da Vinci)*

## **Agradecimentos**

Mais uma etapa está a ser concluída e a única certeza que tenho é que não chegaria aqui sem a ajuda de pessoas tão especiais. É difícil encontrar as palavras certas para expressar toda a minha gratidão a todos aqueles que dedicaram parte do seu tempo e atenção para a realização do meu sonho.

Ao Prof. Dr. Alfredo M. Góes, meu querido Chefe, agradeço pela orientação e introdução ao mundo das células-tronco e engenharia de tecidos. Pelo exemplo de dedicação, humildade e profissionalismo na pesquisa e por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Rui L. Reis agradeço pela oportunidade de realizar parte do meu trabalho em seu grupo de pesquisa e vivenciar a experiência de estar em um grupo de excelência internacional. Agradeço imensamente e, com todo meu carinho ao Dr. Vítor M. Correlo e Dra. Alexandra P. Marques, por acompanharem o meu trabalho, por todos os ensinamentos e por toda dedicação que tiveram comigo.

A Dra. Silviene Novikoff pela dedicação e contribuição na realização desse projeto. Por todos os conselhos e pela sua amizade.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular por mostrarem que o espírito de cooperação e união fazem a força. Por tornarem o ambiente de trabalho um local de alegria e realização: Elis, Cíntia, Carol Reis, Alexandra, Cris, Naira, Marina, Ana Carol, Carol Andrade, Andrea, Carol Melo, Jerusa, Natássia, Eliza, Mariana, Lílian, Maira, Dani, Arthur, Pedro, Pablo, Michele, Estefânia, Vivi, Ludmila, Priscila e Junnia. Agradeço ao Prof. Dawidson Gomes por todos os ensinamentos e disposição em ajudar. A Ju Lott pelas inúmeras discussões e trocas de ideias que foram sempre importantes para escolher o melhor caminho. A Natch e a Vivi por dividirem comigo o início da jornada na Europa. Agradeço imensamente a Ana e a Thaís que estiveram ao meu lado em todos os momentos e contribuíram imensamente para a realização desse trabalho, principalmente na fase final. A ajuda e amizade de vocês foram essenciais. Não poderia deixar de agradecer a nossa amada Betinha por todo carinho com que cuida de nós, do lab e do biotério.

A todos do Grupo 3B's, investigadores, colegas, técnicos e equipe administrativa por me receberem tão bem no grupo e estarem sempre

dispostos a me ajudar quando foi preciso. Agradeço imensamente a Mariana T. Cerqueira, Lucília Silva, Silvina Samy e Ana Regina Martins por toda a ajuda na realização do trabalho experimental e, especialmente aos meus queridos amigos pelos momentos inesquecíveis: Isabel Neto, Margarida, Silvia Mihaila, Diana Ribeiro, Dennis, Praveen, Nevena, Wojciech, Fernanda e Léo. Ao João Requicha, Zé Vitor e Helena pela grande amizade, um cheiro!

A PHBISA pelo fornecimento do polímero e a toda equipe e pacientes do Núcleo de Cirurgia Plástica em Belo Horizonte e Hospital da Prelada no Porto pelo fornecimento das amostras biológicas.

A Profa. Dra. Gerluzia Aparecida Borges Silva por disponibilizar o Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e, especialmente ao técnico Francisco e a aluna Cris pelo auxílio na inclusão e na confecção das lâminas histológicas.

A Profa. Dra. Jankerle Boeloni pelo auxílio na análise das lâminas histológicas.

A Profa. Dra. Rogéria Serakides por sempre disponibilizar o Laboratório de Patologia Veterinária e ao aluno Juneo pelo auxílio na morfometria.

Aos Professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica e Imunologia.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado (141775/2010-6/141787/2012) e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (PDEE0046/11-6).

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida, especialmente a Tramontina e o eterno CBX.

Ao Pedro por ser um grande companheiro e ter dividido comigo todos os bons e maus momentos dessa jornada. Pelo seu carinho e cuidado comigo e por fazer de Portugal um novo lar na minha vida.

A minha família, Daddy, Mãe, Sylvia e Bominha por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Por compreenderem a minha ausência e terem sempre uma palavra de conforto e incentivo quando precisei.

A todos vocês, o meu mais sincero MUITO OBRIGADA!!!

## Resumo

A engenharia de tecidos é um campo da medicina regenerativa que se baseia no cultivo de células em matrizes estruturais associadas à incorporação de moléculas sinalizadoras, visando a regeneração tecidual. Apesar do enorme potencial e dos avanços já alcançados apenas produtos desenvolvidos para a pele e cartilagem encontram-se disponíveis para aplicações clínicas. Entretanto, esses produtos ainda apresentam limitações. A utilização de compostos de origem alogênica e também a falta de vascularização comprometem a eficácia dos produtos destinados a regeneração da pele. Nesse sentido, a primeira parte desse trabalho destinou-se a promoção da diferenciação endotelial a partir de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC) semeadas em membranas de microfibras de poli(3-hidroxiбутirato) (PHB) e seu copolímero poli(3-hidroxiбутirato-co-3-hidroxi valerato) (PHB-HV ou PHBV) na proporção 30:70, respectivamente. Utilizando a técnica de *electrospinning* foi possível obter membranas formadas por fibras com diâmetros entre 300nm e 1.3µm. A morfologia dessas membranas favoreceu a adesão e proliferação de ASC. Quando induzidas à diferenciação endotelial, as células passaram a expressar marcadores específicos e se reorganizaram em estruturas circulares semelhantes à capilares. Na segunda etapa, foi desenvolvida e caracterizada uma matriz bicamada de PHBV que mimetiza a estrutura física da pele. A partir das técnicas de evaporação do solvente e liofilização foi possível obter uma membrana com nanoporidade e uma matriz tridimensional altamente porosa semelhante à estrutura da epiderme e derme da pele. A combinação dessas estruturas permitiu formar uma matriz com alta capacidade de retenção de água e propriedades mecânicas adequadas susceptíveis a degradação enzimática. Após 8 semanas, a matriz encontrou-se completamente degradada na presença de lipase e lisozima em concentrações fisiológicas. Essas estruturas permitiram a adesão e proliferação de queratinócitos na camada composta pela membrana e fibroblastos na porção tridimensional. Quando co-cultivados, sob condições definidas, os queratinócitos foram capazes de se reorganizarem em múltiplas camadas com células proliferativas (expressam Ki-67) na camada basal e células que expressam o marcador de diferenciação terminal, involucrina, dos



queratinócitos na camada superior, assemelhando a organização da epiderme. Esses resultados indicam que a matriz bicamada de PHBV possui propriedades adequadas para suportar a formação de análogos da derme e epiderme. Diante disso, a última etapa dessa tese consistiu na avaliação *in vivo* da associação das propriedades angiogênicas das ASC e o aspecto morfológico funcional da matriz de PHBV para promover uma melhor regeneração tecidual da pele utilizando um modelo de excisão no dorso de ratos. A partir de análises histológicas e pela quantificação de transcritos gênicos foi possível demonstrar que a matriz bicamada de PHBV possui propriedades adequadas para a promoção da regeneração da pele com menor tendência a formação de tecido cicatricial. Além disso, a associação com ASC proporcionou um ambiente ainda mais favorável levando a formação de um novo tecido semelhante à pele normal. Em geral, nossos resultados demonstram o potencial da utilização do polímero PHBV para o desenvolvimento de matrizes de suporte a partir de diferentes técnicas de processamento que podem favorecer tanto a formação de novos vasos quanto a regeneração tecidual da pele.

**Palavras-chave:** engenharia de tecidos, células-tronco, poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), vascularização, regeneração da pele.

## Abstract

Tissue engineering is based on the association of cultured cells with structural matrices and the incorporation of signaling molecules to induce tissue regeneration. Despite its enormous potential and current achievements, up to this day, only products developed for skin and cartilage are available for clinical applications. However, these products still face some limitations. The use of allogenic compounds and also the lack of vascularization undermine the effectiveness of skin regeneration within these products. In this sense, the first part of this work aimed to promote endothelial differentiation from adipose-derived stem cells (ASC) seeded on electrospun fiber mesh made of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV or PHB-HV) in the ratio 30:70 respectively. Using the electrospinning technique it was possible to obtain membranes formed by fibers with diameters between 300nm and 1.3 $\mu$ m. The morphology of these membranes increased adhesion and proliferation of ASCs. When induced to endothelial differentiation, the cells expressed specific markers and reorganized forming capillary-like structures. In the second stage, PHBV bilayer structures that mimic the physical structure of skin were designed and produced by assembling a solvent cast membrane and a 3D freeze dried scaffold. The combination of the distinct qualities of the two systems such as susceptibility to enzymatic degradation, high water retention capability and stiff character, allowed achieving an improved system expected to contribute to a better wound healing. The bilayer structures design and associated properties favored human fibroblasts and keratinocytes performance under defined heterotypic culture conditions forming biologically interactive dermal and epidermal analogs that lead to the particular rearrangement of keratinocytes into multiple layers resembling epidermis-like organization. These results demonstrate that the proposed PHBV-based bilayer structure has potential to be used as an improved skin graft. Therefore, the last step of this thesis was to evaluate *in vivo* the association of the angiogenic properties of ASCs and functional morphology of PHBV bilayer structure to promote better tissue regeneration of the skin using an excision rat model. From the histological analysis and gene transcripts quantification it was possible to determine that the PHBV bilayer

structure has suitable properties to promote skin regeneration with lower propensity to form scar tissue. Moreover, the association with ASCs provided an even more favorable environment that led to the formation of a new tissue more similar to the normal skin. In general, our results demonstrate that PHBV is a potential polymer to be used in the development of new scaffolds based on different processing techniques that can favor the vascularization and skin tissue regeneration.

**Keywords:** tissue engineering, stem cells, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), vascularization, skin regeneration.

## Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	v
<b>Resumo</b> .....	vii
<b>Abstract</b> .....	ix
<b>Índice</b> .....	xi
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xvi
<b>Lista de Figuras</b> .....	xvii
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b> .....	xx
<b>Lista de Símbolos</b> .....	xxii
<b>1. Introdução e justificativa</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	5
2.1 Objetivo geral .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
<b>Capítulo I</b> .....	6
Revisão da literatura .....	6
I.1 Engenharia de Tecidos – biomateriais e fontes de células .....	7
I.2 Vascularização na Engenharia de Tecidos .....	11
I.3 Engenharia de tecidos para regeneração da pele.....	16
<b>Capítulo II</b> .....	21
Desenvolvimento de uma membrana de microfibras de PHB/PHBV para auxiliar a vascularização na engenharia de tecidos .....	21
I.1 Introdução .....	22
II.2 Materiais e métodos.....	23
II.2.1 Desenvolvimento da membrana de microfibras pela técnica de <i>electrospinning</i> .....	23
II.2.2 Meio de cultura basal.....	24
II.2.3 Meio de cultura para diferenciação endotelial .....	24
II.2.4 Isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano .....	25
II.2.5 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo .....	26
II.2.6 Colonização <i>in vitro</i> da membrana de microfibras por células hASC .....	27

II.2.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	27
II.2.8 Avaliação da viabilidade e proliferação celular	28
II.2.9 Morfologia e distribuição celular	29
II.2.10 Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais por imunofluorescência	29
II.2.11 Avaliação da expressão de transcrito gênico pela reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
II.2.11.1 Extração de RNA	31
II.2.11.2 Síntese de cDNA	31
II.2.11.3 PCR	32
II.2.12 Análise Estatística	32
II.3 Resultados	33
II.3.1 Avaliação morfológica das membranas de microfibras de PHB/PHBV	33
II.3.2 Isolamento e caracterização das hASC	33
II.3.3 Caracterização morfológica das hASC aderidas na membrana de PHB/PHBV	35
II.3.4 Proliferação e viabilidade celular	36
II.3.5 Diferenciação endotelial	38
II.4 Discussão	40
II.5 Conclusões	45
<b>Capítulo III</b>	46
Desenvolvimento e caracterização de uma matriz bicamada de PHBV semelhante à estrutura da pele	46
III.1 Introdução	47
III.2 Materiais e métodos	49
III.2.1 Preparo da matriz bicamada de PHBV	49
III.2.2 Caracterização da matriz bicamada de PHBV	50
III.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
III.2.2.2 Microtomografia computadorizada por raio X	50
III.2.2.3 Ensaio de absorção de água	51
III.2.2.4 Propriedades mecânicas	51
III.2.2.5 Ensaio de degradação in vitro	51

III.2.3 Ensaio biológico	52
III.2.3.1 Isolamento de queratinócitos e fibroblastos a partir da pele humana	52
III.2.3.2 Culturas homotípicas	53
III.2.3.3 Co-cultura	54
III.2.3.4 Citometria de fluxo	54
III.2.3.5 Análise da adesão e morfologia celular por MEV	55
III.2.3.6 Análise da viabilidade celular pelo ensaio de Calceína-AM (calcein acetoxymehylester)	55
III.2.3.7 Análise da proliferação celular pela quantificação de DNA	56
III.2.3.8 Imunofluorescência	56
III.2.4 Análise estatística	57
III.3 Resultados	58
III.3.1 Caracterização da matriz bicamada de PHBV	58
III.3.1.1 Avaliação morfológica da matriz bicamada de PHBV por MEV e micro-CT	58
III.3.1.2 Capacidade de absorção de água	59
III.3.1.3 Ensaio mecânico	60
III.3.1.4 Ensaio de degradação in vitro	62
III.3.2 Extração e cultivo de queratinócitos e fibroblastos	64
III.3.3 Avaliação da adesão, viabilidade e proliferação dos queratinócitos à membrana de PHBV	64
III.3.4 Avaliação da adesão, viabilidade e proliferação dos fibroblastos à matriz tridimensional de PHBV	66
III.3.5 Co-cultura	69
III.4 Discussão	74
III.5 Conclusões	78
<b>Capítulo IV</b>	<b>79</b>
Avaliação do potencial de regeneração tecidual da pele utilizando a matriz bicamada de PHBV associada com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	79
IV.1 Introdução	80
IV.2 Materiais e métodos	81
IV.2.1 Animais	81

IV.2.2 Meio de cultura basal .....	82
IV.2.3 Isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo .....	82
IV.2.4 Caracterização fenotípica por imunocitoquímica .....	83
IV.2.5 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo.....	84
IV.2.6 Diferenciação osteogênica .....	84
IV.2.7 Diferenciação adipogênica .....	85
IV.2.8 Colonização <i>in vitro</i> da matriz bicamada de PHBV por ASC.....	85
IV.2.9 Análise da adesão e morfologia celular através de imunofluorescência.....	86
IV.2.10 Procedimento cirúrgico.....	87
IV.2.11 Avaliação do tamanho da ferida .....	88
IV.2.12 Análise histológica.....	88
IV.2.13 Avaliação da presença de células EGFP por imunofluorescência .....	89
IV.2.14 Quantificação relativa de transcritos gênicos .....	90
IV.2.14.1 Extração de RNA .....	90
IV.2.14.2 Síntese do DNA complementar .....	91
IV.2.14.3 Elaboração de oligonucleotídeos (primers).....	91
IV.2.14.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.....	93
IV.2.14.5 Determinação da eficiência de amplificação dos primers ..	93
IV.2.14.6 Especificidade da amplificação.....	94
IV.2.14.7 Reações.....	96
IV.2.14.8 Análise dos dados .....	96
IV.3 Resultados.....	96
IV.3.1 Isolamento e caracterização das ASC .....	96
IV.3.2 Avaliação da adesão das ASC à matriz bicamada de PHBV ....	100
IV.3.3 Avaliação <i>in vivo</i> .....	101
IV.3.3.1 Análise macroscópica.....	101
IV.3.3.2 Análise histológica .....	102
IV.3.3.3 Avaliação de células EGFP <i>in vivo</i> .....	113
IV.3. Quantificação relativa dos transcritos gênicos .....	114
IV.4 Discussão .....	117
IV.5 Conclusões .....	122

<b>3- Considerações finais</b> .....	123
<b>4. Perspectivas</b> .....	125
<b>5. Referências Bibliográficas</b> .....	126
<b>Anexos</b> .....	157
1. Publicações .....	158
1.1 Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese.....	158
1.2 Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese ...	158
2. Apresentações em Congressos .....	159
3. Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG .....	160
4. Acordo de Cooperação entre o Hospital da Prelada e Grupo de Investigação 3B's.....	161
5. Certificado da Comissão de ética no uso de animais .....	162
6. Artigo publicado .....	163



## Lista de Tabelas

<b>Tabela II. 1:</b> Anticorpos primários utilizados para a caracterização fenotípica das hASC. ....	27
<b>Tabela II. 2:</b> Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência .....	30
<b>Tabela II. 3:</b> Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR .....	32
<b>Tabela III. 1:</b> Anticorpos primários utilizados para Citometria de Fluxo. ....	55
<b>Tabela III. 2:</b> Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência. ....	57
<b>Tabela III. 3:</b> Propriedades mecânicas da membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada de PHBV antes e após imersão em PBS. ....	61
<b>Tabela IV. 1:</b> Anticorpos primários utilizados para a caracterização fenotípica das ASC. ....	84
<b>Tabela IV. 2:</b> Grupos Experimentais .....	88
<b>Tabela IV. 3:</b> Sequências dos oligonucleotídeos (primers) utilizados nas reações de PCR em Tempo Real.....	92

## Lista de Figuras

<b>Figura I. 1:</b> Estrutura química do PHB.....	8
<b>Figura I. 2:</b> Esquema ilustrativo da anatomia da pele. ....	16
<b>Figura II. 1:</b> Representação esquemática do equipamento necessário para a técnica de <i>electrospinning</i> .....	23
<b>Figura II. 2:</b> Análise morfológica da membrana de microfibras de PHB/PHBV. ....	33
<b>Figura II. 3:</b> Aspecto morfológico das hASC na 4 <sup>a</sup> passagem. ....	34
<b>Figura II. 4:</b> Perfil fenotípico das hASC. ....	35
<b>Figura II. 5:</b> Análise morfológica das hASC aderidas à membrana de microfibras de PHB/PHBV.....	36
<b>Figura II. 6:</b> Avaliação da proliferação e viabilidade das hASC cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV.....	37
<b>Figura II. 7:</b> Análise da expressão de proteínas específicas durante a diferenciação endotelial.....	39
<b>Figura II. 8:</b> Análise da amplificação do transcrito gênico para VEGFR2. ....	40
<b>Figura III. 1:</b> Representação esquemática da produção da matriz bicamada de PHBV .....	49
<b>Figura III. 2:</b> Caracterização morfológica da matriz bicamada de PHBV.....	59
<b>Figura III. 3:</b> Porcentagem de água absorvida ao longo do tempo. ....	60
<b>Figura III. 4:</b> Degradação enzimática da matriz de PHBV. ....	63
<b>Figura III. 5:</b> Aspecto morfológico dos queratinócitos (A) e fibroblastos (B) isolados a partir da pele humana. ....	64
<b>Figura III. 6:</b> Avaliação da adesão celular dos queratinócitos à membrana de PHBV por microscopia eletrônica de varredura.....	65
<b>Figura III. 7:</b> Viabilidade dos queratinócitos cultivados em diferentes concentrações na membrana de PHBV. ....	65
<b>Figura III. 8:</b> Representação gráfica da proliferação dos queratinócitos cultivados na membrana de PHBV.....	66
<b>Figura III. 9:</b> Avaliação da adesão celular dos fibroblastos à matriz tridimensional de PHBV por microscopia eletrônica de varredura.....	67

<b>Figura III. 10:</b> Viabilidade dos fibroblastos cultivados na matriz tridimensional de PHBV.....	68
<b>Figura III. 11:</b> Representação gráfica da proliferação dos fibroblastos cultivados na matriz tridimensional de PHBV.....	68
<b>Figura III. 12:</b> Análise da viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos em co-cultura. ....	69
<b>Figura III. 13:</b> Representação gráfica da proliferação dos queratinócitos e fibroblastos cultivados em co-cultura na matriz bicamada de PHBV.....	70
<b>Figura III. 14:</b> Análise por imunofluorescência da expressão do marcador Ki-67 pelos queratinócitos .....	71
<b>Figura III. 15:</b> Análise fenotípica dos queratinócitos por citometria de fluxo. ...	72
<b>Figura III. 16:</b> Análise por imunofluorescência da expressão dos marcadores K14, K10 e involucrina. ....	73
<b>Figura IV. 1:</b> Representação do procedimento cirúrgico.. ....	88
<b>Figura IV. 2:</b> Exemplo da padronização das reações de PCR em tempo real. ....	95
<b>Figura IV. 3:</b> Aspecto morfológico das ASC. ....	97
<b>Figura IV. 4:</b> Análise fenotípica das ASC por imunocitoquímica.....	98
<b>Figura IV. 5:</b> Análise fenotípica das ASC por citometria de fluxo. ....	99
<b>Figura IV. 6:</b> Avaliação do potencial de diferenciação das ASC.....	100
<b>Figura IV. 7:</b> Microscopia Confocal das ASC aderidas na matriz bicamada de PHBV. ....	101
<b>Figura IV. 8:</b> Efeito da matriz PHBV na regeneração da ferida. ....	102
<b>Figura IV. 9:</b> Imagens histológicas coradas com H&E com visão panorâmica do local da excisão demonstrando a progressão da regeneração tecidual ao longo do tempo. ....	103
<b>Figura IV. 10:</b> Análise da região da lesão após 7 dias. ....	105
<b>Figura IV. 11:</b> Análise da região da lesão após 14 dias.. ....	107
<b>Figura IV. 12:</b> Análise da região da lesão após 21 dias. ....	109
<b>Figura IV. 13:</b> Análise da região da lesão após 28 dias. ....	111
<b>Figura IV. 14:</b> Avaliação da pele neoformada. espessura da pele neoformada .....	112
<b>Figura IV. 15:</b> Avaliação da presença de células EGFP <i>in vivo</i> .....	114

<b>Figura IV. 16:</b> Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para VEGF (A) e bFGF (B).....	115
<b>Figura IV. 17:</b> Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para TGF- $\beta$ 1 (A), TGF- $\beta$ 3 (B) e $\alpha$ -SMA(C).....	116
<b>Figura IV. 18:</b> Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para Colágeno I (A) e Colágeno III (B).....	117

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional
<b>ANG1</b>	Angiopietina 1
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ASC</b>	Células-tronco derivadas do tecido adiposo
<b>bFGF</b>	Fator de crescimento básico de fibroblastos
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CDTN</b>	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DEMET</b>	Departamento de Metalurgia
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>DP</b>	Desvio-padrão
<b>EDTA</b>	Ácido Tetracético Etilenodiamidina
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal
<b>EGFP</b>	Enhanced Green Fluorescent Protein
<b>FITC</b>	Fluoresceína isotiocianato
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>K10</b>	Queratina 10
<b>K14</b>	Queratina 14
<b>K5</b>	Queratina 5
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>KFSM</b>	<i>Keratinocyte Serum Free Medium</i>
<b>MEM</b>	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato disódico
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio

<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de sódio
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PHA</b>	Poli(hidroxi)alcanoato
<b>PHB</b>	Poli(3-hidroxi)butirato
<b>PHB-HV ou PHBV</b>	Poli(3-hidroxi)butirato-co-3-hidroxi)valerato
<b>PHBISA</b>	PHB Industrial S.A
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROI</b>	Região de interesse
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformador beta
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>u.a</b>	Unidade arbitrária
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular
<b>VEGFR2</b>	Receptor 2 do VEGF
<b>vWF</b>	Fator de Von Willebrand
<b>α-SMA</b>	Proteína α-actina de músculo liso

## Lista de Símbolos

<b>%</b>	Porcentagem
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>μA</b>	Microampère
<b>μg, ng</b>	Micrograma, nanograma
<b>cm, mm, μm, nm</b>	Centímetro, milímetro, micrómetro, nanômetro
<b>cm<sup>2</sup>, cm<sup>3</sup></b>	Centímetro quadrado, centímetro cúbico
<b>h</b>	Hora
<b>KGy</b>	Quilo gray
<b>kV</b>	Quilovolt
<b>M, mM</b>	Molar, milimolar
<b>mL, μl</b>	Mililitro, microlitro
<b>ms</b>	Milisegundo
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b>pmoles</b>	Picomoles
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>U</b>	Unidade

# 1. Introdução e justificativa

O corpo humano possui propriedades intrínsecas de regeneração para quando algum tecido é lesado. No entanto, esse potencial de regeneração varia entre os diferentes tecidos e pode ser comprometido pela extensão e grau de severidade da lesão. Além disso, o avanço na expectativa de vida da população eleva o número de pacientes com doenças crônicas e degenerativas e, em muitos casos, o transplante de órgãos continua a ser a única alternativa.

No Brasil, na última década, o número de transplantes aumentou em 118%, saltando de 12.722 cirurgias, em 2002, para 24.473, em 2012 e o investimento público está na ordem de R\$ 1.4 bilhões. Apesar da redução de 40% na fila de espera para transplante, essa ainda conta com 38.759 pessoas em 2013. Os casos de queimaduras representam um agravo significativo à Saúde Pública. Em 2011, foram 1.437 internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) de Queimados e a taxa de óbito foi de 17.95% (258) das internações (Saúde, 2013). Diante desse cenário, novas terapias na área da medicina regenerativa estão sendo investigadas para auxiliar a regeneração de tecidos e órgãos lesados por trauma, doenças ou senescência (Arosarena, 2005).

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que associa o desenvolvimento de matrizes de suporte com células e moléculas sinalizadoras com o intuito de criar tecidos e/ou órgãos *in vitro* para a substituição de um tecido não funcional *in vivo* (Langer e Vacanti, 1993).

O desenvolvimento de matrizes de suporte é fundamental nesta estratégia de engenharia de tecidos, uma vez que são estas que permitem a manutenção das células no local do implante, além de permitir a proliferação e diferenciação das mesmas favorecendo a regeneração do tecido lesado.

O tipo de biomaterial utilizado para a fabricação de matrizes de suporte, bem como a forma de processamento dessas matrizes e a escolha do tipo ideal de células, são fundamentais para o desenvolvimento de um substituto temporário de um tecido que permita, gradativamente, a regeneração do mesmo (Kim, B. S., Baez, C. E. e Atala, A., 2000).



Dentre os biomateriais utilizados destacam-se os polímeros por serem facilmente manipulados e permitirem a adequação das suas propriedades físicas e mecânicas de forma a corresponderem às dos diferentes tecidos do organismo (Nair e Laurencin, 2006). O polímero natural poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato**) (PHB-HV ou PHBV) é um copolímero do poli(3-hidroxi-*butirato*) (PHB). O PHB apresenta uma estrutura cristalina e a adição de grupos hidroxi-*valeratos* diminui a sua cristalinidade e o torna mais flexível. Além disso, o PHBV possui características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, termoplasticidade e piezoelectricidade que o tornam particularmente atrativo para aplicações na área da engenharia de tecidos. Dependendo da sua aplicação, o PHBV pode ser associado ao PHB ou a outros biomateriais para se alcançar propriedades físicas, mecânicas e de degradação adequadas (Kuppan, P. *et al.*, 2011; Chen e Tong, 2012; De Paula *et al.*, 2013).

Além da escolha do tipo de biomaterial para o processamento de matrizes de suporte é importante utilizar células que possam ser facilmente obtidas e expandidas *in vitro* e que, quando implantadas, exerçam sua função sem causar rejeição imunológica (Jain *et al.*, 2005a). Células-tronco mesenquimais constituem uma população de células multipotentes que podem ser facilmente isoladas de diversos tecidos do indivíduo adulto, incluindo o tecido adiposo, com elevada taxa de proliferação e potencial para aplicações clínicas (Da Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006). Além do potencial de diferenciação em múltiplas linhagens essas células apresentam propriedades imunorreguladoras e podem, a partir de efeitos parácrinos, modular a regeneração tecidual (Kode *et al.*, 2009; Maxson *et al.*, 2012).

Muitos avanços já ocorreram desde que Langer e Vacanti em 1993 descreveram os princípios da engenharia de tecidos. No entanto, a utilização clínica de produtos da engenharia de tecidos ainda é limitada. Apesar de já serem comercializados produtos de engenharia de tecidos, com ou sem componente celular, para a regeneração da pele, esses substitutos ainda estão associados com vários problemas incluindo excessiva contração, formação de cicatriz, vascularização ineficiente, dentre outros. De acordo com revisões recentes, ainda não existem modelos que restituam completamente a

anatomia, fisiologia, estabilidade biológica e natureza estética da pele (Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010; Widgerow, 2012).

Ainda hoje, um dos grandes desafios para o sucesso da engenharia de tecidos é a manutenção da viabilidade das células no interior das matrizes de suporte após o implante *in vivo*. A falta de vascularização dos implantes compromete a sua eficiência. Diante disso, diversas abordagens para solucionar esse problema estão sendo desenvolvidas e a utilização de células endoteliais *in vitro* para promover uma pré-vascularização tem sido amplamente investigada (Asakawa *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013). No entanto, células endoteliais por serem terminalmente diferenciadas apresentam baixa taxa de proliferação, e até ao momento, ainda não foi desenvolvido um método realmente eficaz para solucionar a falta de vascularização na engenharia de tecidos (Post, Rahimi e Caolo, 2013).

A possibilidade de promover a vascularização de biomateriais a partir de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC) abre perspectivas promissoras em diversas áreas da bioengenharia. Nesse contexto, foi proposto em uma primeira etapa dessa tese, a diferenciação de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo em células endoteliais semeadas em uma membrana de microfibras derivada de PHB/PHBV, com o intuito de rentabilizar/aproveitar uma nova fonte de células endoteliais que possa ser utilizada na formação de novos vasos (Capítulo II). Os resultados desse trabalho foram publicados na revista Plos One (Anexo 6) (Zonari *et al.*, 2012).

A utilização de compostos de origem alogênica e também a falta de vascularização comprometem a eficácia dos produtos já comercializados para a pele. Dessa forma, a segunda etapa dessa tese teve por objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma matriz bicamada de PHBV co-cultivada com fibroblastos e queratinócitos, que mimetiza a estrutura física da pele (Capítulo III). Esse capítulo foi desenvolvido durante o doutorado sanduíche (BEX 0046/11-6, fevereiro 2011 – março 2012) no *3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics*, sede do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa situado em Guimarães, Portugal e coordenado pelo Prof. Dr. Rui. L. Reis.

Por fim, a última etapa dessa tese consta da avaliação *in vivo* da associação das propriedades angiogênicas das ASC e o aspecto morfológico

funcional da matriz de PHBV de forma a promover uma melhor regeneração tecidual da pele utilizando um modelo de excisão no dorso de ratos (Capítulo IV).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver novas estratégias que possam auxiliar a vascularização e a regeneração da pele através de princípios da engenharia de tecidos, utilizando matrizes produzidas a partir do PHBV.

### 2.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de humanos (hASC) e ratos (rASC).
- Desenvolver uma membrana de microfibras com estrutura semelhante a matriz extracelular a partir da combinação do PHBV e PHB.
- Avaliar a adesão, viabilidade e proliferação de hASC cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV.
- Promover a diferenciação de hASC em células endoteliais semeadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV.
- Desenvolver uma matriz bicamada de PHBV que mimetize a estrutura da pele.
- Avaliar os aspectos morfológicos, propriedades físicas, mecânicas e degradação *in vitro* da matriz bicamada de PHBV.
- Estabelecer o cultivo de queratinócitos e fibroblastos derivados da pele humana.
- Avaliar a adesão, viabilidade e proliferação de queratinócitos e fibroblastos cultivados, individualmente, na matriz bicamada de PHBV.
- Promover a co-cultura de queratinócitos e fibroblastos na matriz bicamada de PHBV.
- Avaliar o potencial de regeneração da pele utilizando a matriz bicamada de PHBV cultivada ou não com rASC em modelo de excisão de pele produzido no dorso de ratos.

# **Capítulo I**

## **Revisão da literatura**

## I.1 Engenharia de Tecidos – biomateriais e fontes de células

A engenharia de tecidos representa um campo interdisciplinar de conhecimento que consiste na aplicação de princípios e métodos da engenharia e das ciências da vida no sentido de perceber as relações estrutura-função dos tecidos e de desenvolver substitutos biológicos para a reparação ou regeneração de tecidos e órgãos (Langer e Vacanti, 1993). Embora ainda no seu início, a engenharia de tecidos tem tido um progresso significativo no domínio da regeneração de tecidos através da utilização de matrizes de suporte (*scaffolds*) produzidas a partir de biomateriais biocompatíveis e biodegradáveis que servem como suporte estrutural para acomodar e estimular o crescimento de células e a formação de um novo tecido (Hutmacher, 2000). Essas matrizes de suporte além de estimularem a regeneração de tecidos devem ainda ajustar-se aos defeitos anatômicos e desempenhar um importante papel de elemento estrutural (Leong, Cheah e Chua, 2003; Tabata, 2009).

Diversos biomateriais estão sendo utilizados para o desenvolvimento de matrizes de suporte para a engenharia de tecidos. O termo biomaterial compreende qualquer substância destinada a interagir com sistema biológicos, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento do novo tecido (Williams, 1999). Os biomateriais poliméricos devido a flexibilidade inerente em sintetizar ou modificar sua estrutura podem se ajustar a diferentes propriedades físicas e mecânicas de vários tecidos biológicos. Devido a isso, os polímeros têm sido amplamente estudados para aplicações em engenharia de tecidos (Seal, Otero e Panitch, 2001; Nair e Laurencin, 2006).

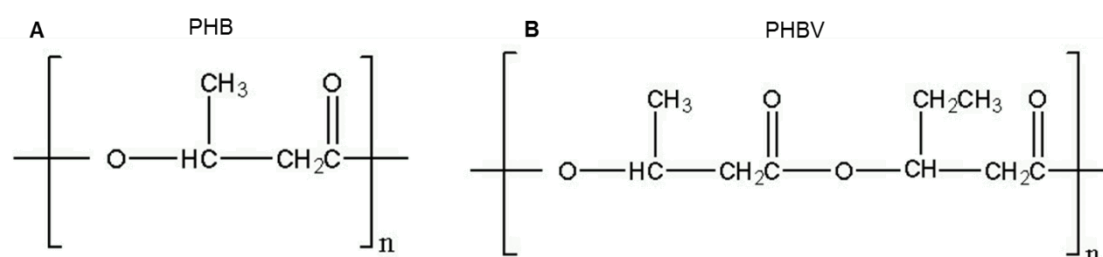
Uma classe de biomateriais poliméricos são os biorreabsorvíveis, compostos que se degradam tanto *in vitro* quanto *in vivo* e são reabsorvidos pelo organismo. São empregados em tecidos que necessitam de um suporte temporário para sua recomposição tecidual (Kim, B.-S., Baez, C. E. e Atala, A., 2000).

Dentre os vários polímeros biodegradáveis, destacam-se os membros da família dos polihidroxicanoatos (PHAs), poliésteres de ácidos

hidroxialcanóicos biodegradáveis produzidos através da fermentação de substratos de carbono por bactérias (*Alcaligenes sp.*) e estocados em grânulos citoplasmáticos de 0.2-0.5 µm de diâmetro como reserva energética (Lee, 1996b).

Os PHAs são considerados biocompatíveis pelo fato de seu produto de degradação, o ácido 3-hidroxibutírico, ser encontrado normalmente no plasma sanguíneo em concentrações entre 0.3 – 1.3mM (Choi *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006a). Dessa forma, a sua degradação *in vivo* não resulta em produtos tóxicos para as células. Essa característica possibilita a utilização dos PHAs para várias aplicações médicas como confecção de fios de suturas cirúrgicas, curativos, sistema de liberação de drogas e matrizes estruturais para engenharia de tecidos (Chen e Wu, 2005; Wu, Wang e Chen, 2009).

Nas últimas três décadas, inúmeros polímeros membros da família do PHA foram descritos incluindo o poli(3-hidroxibutirato) (PHB) e o seu copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHB-HV ou PHBV) (Figura I.1). O PHB e seu copolímero PHBV podem ser empregados em um amplo campo de aplicação principalmente naqueles setores em que características como biodegradabilidade e biocompatibilidade são necessárias (Zhao *et al.*, 2003; Chen e Wu, 2005).



**Figura I. 1:** Estrutura química do PHB (A) e PHBV (B). Adaptado de Lee (1996).

Embora o PHB seja biocompatível e biodegradável, sua utilização para aplicações biomédicas é limitada devido a algumas características como rigidez, elevada fragilidade cristalina e baixas propriedades mecânicas (Engelberg e Kohn, 1991; Misra *et al.*, 2006). Já o copolímero PHBV é menos cristalino e mais flexível. A utilização do PHBV ou a combinação entre o PHB e PHBV pode fornecer materiais adequados para a regeneração de tecidos

(Sombatmankhong, K. *et al.*, 2006; Gogotov *et al.*, 2010; Kuppan, Purushothaman *et al.*, 2011; Kuppan, P. *et al.*, 2011; Veleirinho *et al.*, 2012).

Uma interessante característica desses polímeros é a piezoelectricidade. Por serem piezoelétricos, esses polímeros são capazes de transformar estímulos mecânicos em carga elétrica (Fukada e Ando, 1986; Chen e Wu, 2005; Ke *et al.*, 2009), e esse fator pode modular processos celulares específicos, tais como migração, proliferação e diferenciação (Feng, Yuan e Zhang, 1997; Kotwal e Schmidt, 2001; Weber *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012).

O Brasil, através da integração da produção desses polímeros à produção de açúcar e álcool em usinas de processamento de cana-de-açúcar, é o maior produtor e exportador mundial de PHB e PHBV, o que implica em baixo custo de produção, grande disponibilidade, completa biodegradabilidade, ausência de necessidade de importação, além de ser produzido sem impacto ambiental (Squio e Aragão, 2004).

O PHB e o PHBV estão sendo utilizados com sucesso no desenvolvimento de matrizes de suporte com o intuito de promover a regeneração de diferentes tecidos como a pele (Kuppan, P. *et al.*, 2011; Veleirinho *et al.*, 2012), o tecido ósseo (De Paula *et al.*, 2013; Lu, L. X. *et al.*, 2013) sistema nervoso (Genchi *et al.*, 2012; Ribeiro-Samy *et al.*, 2013) e o tecido cartilaginoso (Ye *et al.*, 2009; Wu, J. *et al.*, 2013).

À medida que a utilização de produtos da engenharia de tecidos se aproxima das aplicações clínicas, um grande desafio se estabelece para a obtenção de quantidades suficientes de células para o uso clínico. Uma célula ideal deve possuir algumas características como: estar disponível em quantidades suficientes, ser capaz de exercer a função destinada a ela, ser isolada com mínima morbidade da área doadora e ser compatível com o sistema imunológico do receptor (Jain *et al.*, 2005a). Dessa forma, a fonte de células tem uma enorme influência sobre o sucesso da engenharia de tecidos.

As células aplicáveis à engenharia de tecidos podem ser classificadas como autogênicas (do próprio paciente), alogênicas (célula de diferentes pacientes, mas da mesma espécie) e xenogênica (origem animal). As células autólogas são as mais apropriadas para a engenharia de tecidos uma vez que,



as células alogênicas e xenogênicas são imunogênicas tornando-se necessária a utilização de terapias com imunossupressores (Ikada, 2006).

Além disso, células diferenciadas possuem baixa taxa de proliferação, não sendo facilmente expandidas *in vitro*. Nesse contexto, destacam-se as células-tronco por serem células indiferenciadas e possuírem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares. As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto (Brignier e Gewirtz, 2010).

Um tipo de célula-tronco bastante atraente são as células-tronco adultas. Essas células são consideradas multipotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares, mas não em todos derivados dos três folhetos embrionários. Podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical e vários tecidos do indivíduo adulto (Fauza, 2004; Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006; De Coppi *et al.*, 2007).

Inicialmente, acreditava-se que as células-tronco adultas só se diferenciavam em linhagens celulares do tecido ao qual residem. No entanto, sob condições especiais, estas células podem se transdiferenciar, ou seja, uma célula-tronco de um tecido pode gerar um tipo celular especializado de outro tecido ou de outro folheto germinativo (Ringe *et al.*, 2002; Riekstina *et al.*, 2009; Jin, Prabhakaran e Ramakrishna, 2011). Além disso, apresentam características imunorreguladoras, representando assim, uma possível fonte compatível de células alogênicas (Koc *et al.*, 2002; Yi e Song, 2012).

As células-tronco adultas mais bem estudadas e caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Hipp e Atala, 2008).

Inicialmente, denominou-se como células-tronco mesenquimais uma população de células presentes no estroma da medula óssea, capazes de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Caplan e Bruder, 2001).

Atualmente, células com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea foram isoladas de quase todos os tecidos de um organismo adulto (Da Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006) incluindo tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001a), pele (Toma *et al.*, 2001), pulmões (Sabatini *et al.*, 2005) e líquido amniótico (De Coppi *et al.*, 2007).

A porcentagem de células-tronco existente em tecidos adultos é bastante baixa e, dependendo do tecido, isolar essas células para a utilização na medicina regenerativa se torna bastante complicado. Sendo assim, as células-tronco adultas mais utilizadas para estudos nessa área são as células extraídas da medula óssea e do tecido adiposo (Romanov *et al.*, 2005).

O tecido adiposo apresenta algumas vantagens em relação à medula óssea. Esse tecido pode ser facilmente extraído em grandes quantidades através da lipoaspiração. Além disso, a frequência e a taxa de proliferação das células-tronco no tecido adiposo são maiores do que na medula óssea, sendo considerado a fonte mais abundante e acessível de células-tronco adultas (Strem *et al.*, 2005; Mizuno, 2009).

Células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC – *adipose-derived stem cells*) foram primeiramente isoladas de tecidos humanos por Zuk e colaboradores em 2001. Esse grupo isolou células a partir da fração estromal do tecido adiposo, capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos, e com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea (Zuk *et al.*, 2001a).

Já foi demonstrado o potencial de diferenciação dessas células em células endoteliais (Planat-Benard *et al.*, 2004; Zonari *et al.*, 2012), cardiomiócitos (Guo *et al.*, 2011), células pancreáticas (Timper *et al.*, 2006), neurônios (Krampera *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2011) e hepatócitos (Aurich *et al.*, 2009).

Além do potencial de diferenciação, as células-tronco mesenquimais podem através de efeitos parácrinos modular a inflamação, promover a angiogênese, prevenir apoptose, recrutar células do hospedeiro e, dessa forma, auxiliar no processo de regeneração tecidual (Rehman *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; Khubutiya *et al.*, 2013). Diante das várias vantagens das células-tronco do tecido adiposo, estas se tornaram uma atraente fonte de células para a engenharia de tecidos.

## **I.2 Vascularização na Engenharia de Tecidos**

A engenharia de tecidos tem sido uma área ativa de pesquisa nas últimas décadas. Um obstáculo crítico da engenharia de tecidos baseada em

cultivo *in vitro* de constructos (matrizes de suporte semeadas com células), anterior a implantação, é a capacidade de essas células manterem-se viáveis após a transferência desses constructos para o hospedeiro (Nomi *et al.*, 2002; Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011).

*In vivo*, a maioria das células está a menos de 100 µm de distância de uma zona de capilaridade. Esses capilares fornecem oxigênio e nutrientes, além de remover os resíduos e transportar sinais bioquímicos (Vunjak-Novakovic e Freed, 1998).

No caso de implantes na engenharia de tecidos, o fornecimento de oxigênio e nutrientes é muitas vezes limitado ao processo de difusão que só pode suprir células distantes a 100-200µm do próximo capilar (Helmlinger *et al.*, 1997). Sendo assim, para que enxertos de células/matrizes de tamanhos maiores possam sobreviver, é necessário que ocorra a vascularização desse implante (Jain *et al.*, 2005a; Kannan *et al.*, 2005).

Durante o cultivo *in vitro*, o fornecimento de oxigênio e nutrientes para o interior de grandes matrizes pode ocorrer, com sucesso, através da utilização de biorreatores (Portner *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2006). No entanto, após a implantação dessas matrizes, o processo de difusão permanece limitado à distância entre os capilares.

Após a implantação do constructo célula/matriz, os vasos sanguíneos do hospedeiro, geralmente começam a penetrar no implante para formação de uma rede de capilares. Isso ocorre como uma resposta à reação inflamatória causada pelo procedimento cirúrgico e, também, devido ao fato de que no interior do implante é gerado um estado de hipóxia, o que faz com que as células do local secretem fatores angiogênicos (Laschke *et al.*, 2006). No entanto, essa infiltração é limitada a alguns décimos de micrômetros por dia, o que significa, que o tempo necessário para a vascularização completa de um implante de vários milímetros é da ordem de semanas. Durante esse período, a vascularização insuficiente resulta na morte celular por hipóxia e consequente insucesso do implante (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008; Tilkorn *et al.*, 2010).

Sendo assim, estratégias que favoreçam a angiogênese são essenciais para se garantir o desenvolvimento de novos tecidos a partir da engenharia de tecidos. Várias abordagens têm surgido para tentar solucionar a falta de

vascularização, tais como a moldagem da matriz estrutural, inclusão de fatores angiogênicos, pré-vascularização *in vivo* e pré-vascularização *in vitro* (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008; Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011).

A moldagem da matriz estrutural tem um profundo efeito no grau de vascularização após a implantação. O tamanho do poro é um determinante crítico para a penetração de vasos sanguíneos. Poros acima de 150µm favorecem a vascularização (Druecke *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006). No entanto, não é apenas o tamanho dos poros que é importante, a interconectividade desses é essencial para a migração dos vasos. Mesmo com tamanhos de poros ideais, se não houver interconectividade entre eles, a vascularização não será eficiente (Yang *et al.*, 2001).

Embora o tamanho dos poros e a interconectividade auxiliem na vascularização, ainda assim, levar-se-iam dias a semanas para que o interior do implante fosse vascularizado. Nesse contexto, outra abordagem está relacionada à liberação de fatores angiogênicos. É bem conhecido que a adição de fatores angiogênicos em constructos na engenharia de tecidos pode aumentar a vascularização após o implante. Diversas estratégias para a entrega de fatores angiogênicos têm sido desenvolvidas e, incluem a adição de proteínas e genes recombinantes aos biomateriais e a utilização de células geneticamente modificadas para expressarem os fatores de interesse (Zisch, Lutolf e Hubbell, 2003; Santos *et al.*, 2013).

Fatores angiogênicos podem ser utilizados para estimular diferentes estágios de formação de vasos sanguíneos, como por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), os quais estimulam o recrutamento de células progenitoras e endoteliais e, portanto, aceleram o início da angiogênese (Davies *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013). Embora a presença desses fatores resulte no aumento da angiogênese, muitas vezes os vasos formados são desorganizados, possuem rupturas e são hemorrágicos (Levenberg, 2005). Além disso, a quantidade do fator administrado deve ser controlada, pois foi demonstrado que altos níveis de VEGF podem causar extravasamento vascular com formação de edemas e hipotensão (Vajanto *et al.*, 2002; Santos e Reis, 2010).

É importante que os vasos recém-formados sejam estáveis. Exceto para pequenos capilares, a maturação e a estabilidade dos novos vasos envolvem a migração de células musculares lisas e periócitos e a produção de lâmina basal. Fatores de crescimento que são importantes nessa etapa incluem o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e angiopoietina 1 (ANG1). Dessa forma, a utilização conjunta de fatores que estimulem a formação e a maturação de novos vasos pode ser necessária para melhorar a vascularização de constructos para engenharia de tecidos (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008). De fato, foi demonstrado que a associação de VEGF e PDGF em matrizes de poli(láctico-co-glicólico) resultou na formação de maior número de vasos maduros, em modelo de camundongos com isquemia do membro posterior (Chen *et al.*, 2007).

A utilização da liberação de fatores angiogênicos é bastante promissora, no entanto, os principais obstáculos dessa terapia consistem em encontrar o número mínimo de moléculas necessárias e uma forma de liberação ótima que favoreça o desenvolvimento de novos vasos (Jain *et al.*, 2005b; Santos e Reis, 2010).

Outra estratégia consiste na pré-vascularização *in vivo*. Este método envolve duas fases distintas. Na primeira fase, o constructo é implantado em um local de rica vascularização, como o músculo, ou envolvido por uma artéria. Dessa forma, em algumas semanas, uma rede de capilares é formada. Após esta etapa inicial, o constructo é retirado com a rede de capilares e, em seguida, reimplantado no local a ser regenerado. A rede de capilares é então conectada a vascularização local através de microcirurgia vascular (Laschke *et al.*, 2008). A vantagem desta técnica é que após a implantação no local final, o constructo torna-se imediatamente vascularizado devido à anastomose cirúrgica. Contudo, suas desvantagens consistem na necessidade de três cirurgias separadas (o implante da matriz sem células, a retirada desse implante e o implante da matriz pré-vascularizada) e na remoção de um eixo vascular no local da implantação inicial (Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011).

Diante desses obstáculos, uma estratégia que ganhou interesse dos pesquisadores foi a pré-vascularização *in vitro*. Essa abordagem é baseada na observação de que células endoteliais são capazes de formar estruturas

vasculares *in vitro* quando cultivadas em condições adequadas. Dessa forma, células endoteliais são incluídas no tecido que está sendo formado *in vitro* resultando na formação de uma rede vascular (Asakawa *et al.*, 2010). Após a implantação, essa rede pode se conectar espontaneamente com a rede vascular adjacente ao implante, através de um processo chamado anastomose (Tremblay *et al.*, 2005). O interior do constructo já estará com uma rede de capilares estabelecida e os vasos adjacentes só precisarão penetrar na região mais externa do constructo, reduzindo assim, o tempo necessário para a vascularização completa (Unger *et al.*, 2010; Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011). A conexão entre os microvasos do implante e do hospedeiro é limitante para o sucesso da técnica, uma vez que a ligação por microcirurgia não é possível.

Recentemente, a descelularização de órgãos tem atraído a atenção dos pesquisadores. A partir dessa técnica é possível remover todo o componente celular do órgão e manter sua arquitetura tridimensional e a composição bioquímica. Além disso, a rede de capilares é preservada, facilitando a manutenção *in vitro* por meio da perfusão com biorreatores, assim como *in vivo* pois a rede vascular pode ser imediatamente ligada ao sistema circulatório do hospedeiro (Ott *et al.*, 2008; Lu, T. Y. *et al.*, 2013; Nichols *et al.*, 2013).

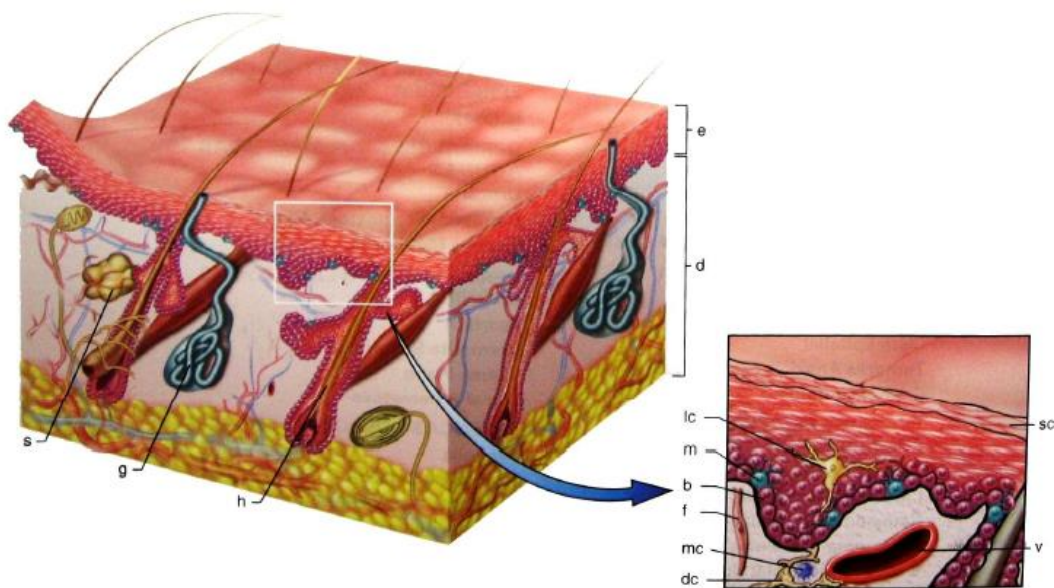
De um modo geral, abordagens de pré-vascularização *in vitro* combinam células endoteliais com outros tipos de células para a formação de um tecido precursor juntamente com uma rede vascular.

Um aspecto crucial da vascularização de implantes é a origem das células endoteliais que serão utilizadas para a formação da rede de capilares. Células endoteliais podem ser isoladas de vários tecidos como pele, cordão umbilical e veia safena. No entanto, a baixa disponibilidade e capacidade proliferativa são os principais inconvenientes para utilização dessas células. Além disso, essas células apresentam-se em estado senescente o que diminui o potencial de formação de novos vasos para fins terapêuticos (Levenberg, 2005; Santos e Reis, 2010; Novosel, Kleinhans e Kluger, 2011). Sendo assim, células progenitoras endoteliais e células-tronco se apresentam como fontes de células mais atraentes para a pré-vascularização *in vitro*.

### I.3 Engenharia de tecidos para regeneração da pele

A pele é o maior órgão dos vertebrados e constitui uma barreira de proteção do organismo contra agentes externos (microorganismos, agentes físicos e químicos). Além disso, possui outras diversas funções como regulação térmica, defesa imunológica e percepção sensorial. Dessa forma, danos acometidos a esse tecido como traumas, doenças ou queimaduras podem alcançar consequências dramáticas (Metcalf e Ferguson, 2007).

A pele é composta da epiderme, camada superficial da pele, que fornece uma barreira contra infecção e perda de líquidos, sendo o queratinócito o tipo celular mais frequente, e, da camada mais profunda, a derme, que é responsável pela integridade elástica e mecânica da pele, nesse caso os fibroblastos são as células mais encontradas nessa camada. A epiderme e a derme estão separadas pela membrana basal e fixadas em uma camada composta por tecido adiposo, a hipoderme (Figura I.1) (Metcalf e Ferguson, 2007).



**Figura I. 2:** Esquema ilustrativo da anatomia da pele. (e) Epiderme, (d) Derme, (h) folículo piloso, (g) glândula sudorípara, (s) glândula sebácea. A projeção representa uma área ampliada da epiderme e derme, demonstrando: (b) células basais, (sc) estrato córneo, (m) melanócitos, (lc) células de Langerhans, (v) vaso sanguíneo, (f) fibroblastos, (mc) mastócito e (dc) dendrócito. Adaptado de (Robbins, 2005).

A epiderme é composta das seguintes camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. Sua espessura varia entre 0.05mm e 0.15mm na

maior parte do corpo, podendo atingir 0.8mm na palma das mãos e 1.5mm na planta dos pés. A camada basal contém células-tronco e células transitórias que são responsáveis pela renovação da epiderme e possuem morfologia cubóide. Os queratinócitos migram da camada basal à camada córnea e se diferenciam adquirindo gradualmente quantidades crescentes de proteína fibrosa e queratina e tornam-se mais achatados. Quando atingem a superfície, os queratinócitos transformam-se num invólucro morto de queratina, formando a camada córnea. Esse processo resulta na transformação em células planas e anucleadas formadas no seu interior de queratina e circundadas por um envelope celular composto de proteínas com ligação cruzada (envelope córneo). Essa camada confere à epiderme a função de barreira entre o organismo e o ambiente (Eckert e Rorke, 1989; Denning, 2004; Bragulla e Homberger, 2009).

A proliferação celular está presente somente na camada basal da epiderme, enquanto a diferenciação dos queratinócitos pós-mitose ocorre progressivamente em direção ao estrato córneo. Os queratinócitos presentes em cada camada da epiderme expressam diferentes marcadores bioquímicos do processo de diferenciação. Nos queratinócitos basais são expressos, predominantemente, os marcadores queratina 5 (K5) e 14 (K14). Nas células espinhosas são sintetizados dois marcadores do processo de diferenciação, queratina 1 (K1) e 10 (K10). Nos queratinócitos da camada granular são expressas proteínas associadas com os estágios posteriores da diferenciação, como as profilagrinas, filagrina, transglutaminase-I e precursores do envelope de cornificação como a involucrina e loricina (Eckert e Rorke, 1989; Bragulla e Homberger, 2009).

Além dos queratinócitos, encontram-se também na epiderme os melanócitos, que produzem o pigmento que confere coloração a pele (melanina), células de defesa imunológica (células de Langerhans) e células sensoriais (células de Merkel) (Kanitakis, 2002).

A derme é formada por tecido conjuntivo que confere elasticidade à pele. Sua espessura varia entre 0.6mm e 3mm. Na derme estão localizados os vasos sanguíneos e linfáticos, assim como as estruturas anexas (glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e folículo piloso). Além disso, ainda encontra-se células do sistema imune como mastócitos e dendrócitos. (Kanitakis, 2002).



Danos acometidos à pele podem comprometer os mecanismos fisiológicos de reparação como no caso de grande perda tecidual (trauma ou queimadura), úlceras diabéticas ou doenças genéticas (Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010).

No caso de lesões de espessura total (em que a epiderme e derme foram totalmente comprometidas) o tratamento padrão ouro é o enxerto de pele de regiões sadias do próprio paciente, apesar da criação de um foco secundário de lesão (Stanton e Billmire, 2002; Shevchenko, Rostislav V., James, Stuart L. e James, S. Elizabeth, 2010). Entretanto, dependendo da extensão da lesão e do estado do paciente, esse tratamento não é viável e opta-se pelo enxerto de pele alogênica que pode desencadear uma resposta imunológica de rejeição (Mann e Heimbach, 1996).

A reparação de lesões na pele é um processo biológico complexo que envolve interações coordenadas entre células da derme, células da epiderme e matriz extracelular, além da formação de novos vasos sanguíneos. Esses eventos são controlados e regulados por várias citocinas e moléculas sinalizadoras (Harding, Morris e Patel, 2002).

A reparação pode ocorrer por cicatrização ou regeneração. Na cicatrização ocorre a formação de tecido conjuntivo fibroso e não há substituição funcional do tecido, enquanto a regeneração envolve a substituição das células mortas ou lesadas por novas células, idênticas às originais, promovendo a restituição da integridade anatômica e funcional do tecido (Gurtner *et al.*, 2008).

O processo de cicatrização envolve três fases, a inflamatória, a proliferativa e a de remodelação (Chen, Przyborowski e Berthiaume, 2009). A fase inflamatória começa imediatamente após a lesão e envolve fenômenos vasculares, coagulação sanguínea, migração de células inflamatórias e liberação de fatores de crescimento. Neutrófilos e macrófagos são responsáveis pela fagocitose e remoção da matriz extracelular danificada e restos celulares. Além disso, os macrófagos secretam numerosas citocinas como fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator de crescimento transformador (TGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) que são responsáveis pelo recrutamento de células endoteliais, fibroblastos e células-tronco progredindo assim à fase proliferativa (Dipietro, 1995). A fase

proliferativa consiste, principalmente, na formação de tecido de granulação, reepitelização e contração da ferida. Nessa fase, ocorre angiogênese e o aumento no número de fibroblastos que começam a secretar os componentes da nova matriz extracelular, principalmente colágeno tipo I e III. A contração da ferida é mediada pela diferenciação dos fibroblastos em células contráteis, os miofibroblastos (expressam a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso,  $\alpha$ -SMA) (Hinz *et al.*, 2001). Esse processo é influenciado pela presença de TGF- $\beta$ 1 e o excesso desse fator leva ao acúmulo de miofibroblastos e está relacionado com a formação de cicatriz hipertrófica e quelóide (Chalmers, 2011). A fase de remodelação persiste por meses após a reepitelização e consiste na remodelação das fibras de colágeno com o intuito de restaurar a forma e a função do tecido lesado. Há diminuição de todos os elementos celulares e regressão endotelial com diminuição progressiva dos vasos neoformados (Chen, Przyborowski e Berthiaume, 2009).

O desenvolvimento de substitutos de pele através da engenharia de tecidos representa uma potencial fonte de terapia avançada para promover a regeneração da pele e evitar a formação de tecido cicatricial (Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010).

O desenvolvimento de matrizes bicamada para promover a regeneração da pele tem o intuito de mimetizar a estrutura da pele, dividida em epiderme e derme e fornecer vantagens estruturais e funcionais. Dessa forma, a matriz bicamada é composta de uma camada superior densa e de uma camada inferior porosa. A camada superior, densa, é importante para cobrir a ferida e prevenir a perda de fluidos, bem como evitar a infecção por patógenos. Pequenos poros nessa superfície são importantes para permitir trocas gasosas e a comunicação entre as células cultivadas nessa camada com as células da camada inferior. A camada inferior é mais espessa e deve ser porosa para permitir a vascularização do tecido e o processo de regeneração (Wang *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2013). Diferentes materiais já foram utilizados para a produção de matrizes bicamada que mimetizam a estrutura da pele, como quitosana (Ma *et al.*, 2001), quitosana e gelatina (Mao *et al.*, 2003), gelatina/condroitina/ácido hialurônico (Wang *et al.*, 2007), fibrina (Mazlyzam *et al.*, 2007) e policaprolactona/ poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (Franco *et al.*, 2011).

Além disso, substitutos bicamada de pele já são comercializados há alguns anos e já existem análogos com componentes celulares, como a Apligraf® e Orcel®. No entanto, um dos principais obstáculos é o alto custo de produção além de baixo desempenho na diferenciação dos queratinócitos e atraso na vascularização. Além disso, são produzidos a partir de células adultas alogênicas o que pode induzir a rejeição (Kearney, 2001; Shevchenko, Rostislav V., James, Stuart L. e James, S. Elizabeth, 2010).

A utilização de células-tronco na regeneração da pele pode contribuir de forma ativa para superar algumas das limitações dos métodos atuais. Já foi demonstrado que células-tronco mesenquimais podem migrar da medula óssea para o local da ferida e contribuir no processo de reparo (Sasaki *et al.*, 2008). As células-tronco mesenquimais podem influenciar o processo de regeneração a partir de quatro mecanismos, supressão da inflamação, promoção da angiogênese, atração de novas células e diferenciação (Altman *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012; Maxson *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2013).

Dessa forma, a associação das células-tronco nos produtos de engenharia de tecidos para pele pode fornecer a interação necessária com o tecido adjacente. Os efeitos Parácrinos das células-tronco mesenquimais bem como sua plasticidade podem fornecer a chave para a regeneração tecidual da pele, induzindo a regeneração de um tecido funcional, no lugar de um tecido cicatricial fibroso (Cerqueira, Marques e Reis, 2012; Wong *et al.*, 2012).

Sendo assim, para promover a regeneração tecidual da pele, produtos da engenharia de tecidos devem possuir algumas características: adaptar-se ao local da ferida, permitir a vascularização, integrar-se ao tecido adjacente, não induzir resposta imunogênica, permitir a regeneração com a mínima formação de tecido cicatricial e o mínimo desconforto ao paciente e, também, ser produzido com uma boa razão custo-benefício (Macneil, 2007).

## **Capítulo II**

**Desenvolvimento de uma membrana de microfibras de PHB/PHBV para auxiliar a vascularização na engenharia de tecidos**

## I.1 Introdução

Para se tornarem amplamente utilizados na prática clínica, os produtos da engenharia de tecidos devem superar uma série de desafios, sendo o completo fornecimento de nutrientes e metabólitos a partir da vascularização, um dos mais importantes (Rouwkema, Rivron e Van Blitterswijk, 2008; Gloria, De Santis e Ambrosio, 2010; Ravindran, Song e George, 2010).

Devido a limitações no processo de difusão de oxigênio (Helmlinger *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 2005a; Kannan *et al.*, 2005), diversas abordagens têm sido propostas para aumentar a vascularização na engenharia de tecidos (Nomi *et al.*, 2002; Aguirre, Planell e Engel, 2010; Unger *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013).

Nos vasos sanguíneos, as células endoteliais estão organizadas em monocamada ligadas a uma membrana basal formada de fibras de colágeno tipo IV e laminina. Esta matriz extracelular é crítica para a adesão do endotélio vascular, mantendo a organização das células endoteliais e a integridade dos vasos sanguíneos (Mettouchi, 2012).

A técnica de processamento por *electrospinning* permite produzir fibras com diâmetros na gama de nanômetros a micrômetros que são fisicamente comparáveis às fibras de colágeno encontradas na matriz extracelular (Sombatmankhong, Korakot *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). Por esse motivo, esse tipo de processamento tem sido extensivamente utilizado em estratégias de engenharia de tecidos (Martins *et al.*, 2010; Toyokawa *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010; Kuppan, P. *et al.*, 2011).

Nesse trabalho, foi proposto o desenvolvimento, utilizando a técnica de *electrospinning*, de uma membrana de microfibras produzida pela combinação do PHB e seu copolímero PHBV e sua utilização como suporte para a diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano em células endotélias. Dessa forma, pretende-se criar uma plataforma que possa favorecer a vascularização após o implante de produtos da engenharia de tecidos.

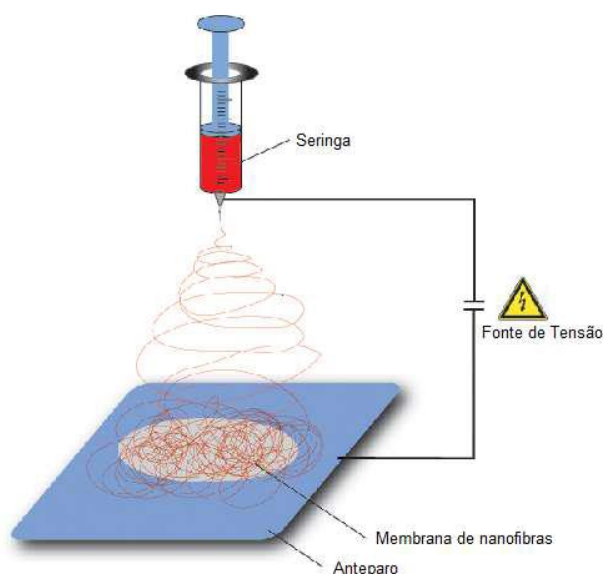
## II.2 Materiais e métodos

### II.2.1 Desenvolvimento da membrana de microfibras pela técnica de *electrospinning*

A membrana de microfibras foi produzida utilizando os polímeros PHB e seu copolímero PHBV obtidos a partir da fermentação da cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Alcaligenes*. Esses polímeros biodegradáveis foram produzidos e fornecidos pela PHB Industrial S.A. (PHBISA), Usina da Pedra, Serrana-SP, Brasil.

As membranas foram confeccionadas pelo Grupo “3B’s Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics”- Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecido e Medicina Regenerativa em Portugal.

Para a confecção de uma membrana de microfibras foi utilizada a técnica de *electrospinning*. Nessa técnica, uma solução polimérica é submetida a um campo elétrico de alta tensão. Para isso, são necessários: uma fonte de alta tensão, uma bomba de seringa e um anteparo metálico, como representado na Figura II.1 (Martins *et al.*, 2007)



**Figura II. 1:** Representação esquemática do equipamento necessário para a técnica de *electrospinning*.

Os polímeros foram dissolvidos em clorofórmio/dimetilformamida na proporção 30PHB:70PHBV e concentração final de 5% (p/v). A solução polimérica foi colocada em uma seringa de 5mL com uma agulha metálica com diâmetro interno de 0.8mm. A seringa foi conectada a uma bomba (*Syringe pump*, KDS100, KD Scientific) para o controle do fluxo. Uma folha de alumínio foi utilizada como coletor. Em seguida, um eletrodo positivo foi colocado em contato com a seringa e foi aplicada uma voltagem de 9kV para geração de um campo eletrostático. A distância entre a seringa e o coletor foi de 15cm e o fluxo do material foi de 1mL/h.

As condições para o procedimento de confecção por *electrospinning* foram otimizadas para obtenção de um processo contínuo e uma morfologia reprodutível das fibras. Todas as membranas produzidas foram esterilizadas por irradiação, a 15 Kgy, por 30 minutos. A irradiação foi realizada no CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - UFMG).

### **II.2.2 Meio de cultura basal**

Foi utilizado como meio de cultura basal o meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0.25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco).

O pH do meio foi ajustado para 7.2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0.22µm (Millipore).

### **II.2.3 Meio de cultura para diferenciação endotelial**

Foi utilizado como meio para promover a diferenciação endotelial o meio DMEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de Sódio (Merck), 2% de soro fetal bovino (Gibco), 50ng/mL de VEGF (Invitrogen), 10ng/mL de bFGF (Invitrogen), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0.25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco) (Cao, Sun *et al.*, 2005).

O pH do meio foi ajustado para 7.2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0.22 $\mu$ m (Millipore).

#### **II.2.4 Isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano**

As células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hASC) foram obtidas do produto de lipoaspiração de pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração na Clínica de Cirurgia Plástica coordenada pelo Dr. Luiz Lamana dos Santos em Belo Horizonte, Minas Gerais. O fornecimento do produto de lipoaspiração estava de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer: ETIC 344/07, anexo 3).

O isolamento e o cultivo das hASC foram realizados baseado no descrito por Zuk *et al.*, 2001. O produto de lipoaspiração de diferentes partes do corpo (flancos esquerdo e direito, regiões supra e infraumbilical) foi acondicionado em seringas de 20 mL estéreis e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular - UFMG. Em capela de fluxo laminar, esse conteúdo foi transferido para tubos de polietileno de 50 mL para lavagem com PBS (tampão fosfato de sódio 0.15M pH 7.2) e posterior centrifugação por 10 minutos a 1400rpm e 10°C. Após a centrifugação, formou-se uma solução bifásica, cuja fase inferior continha hemácias enquanto a fase superior, o tecido adiposo. A fração adipocitária foi aspirada, transferida para um novo tubo de polietileno de 50 mL e tratada com colagenase tipo I (0.15% em PBS) na proporção de 1:1 por 1 hora, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No decorrer deste período, a cada 15 minutos, os tubos foram vigorosamente agitados. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1400rpm e 10°C, para separar a fração adipocitária e a fração estromal vascular do tecido adiposo. A fração superior adipocitária foi desprezada e a fração estromal vascular foi suspensa em meio de cultura basal, distribuída em frascos de cultura T-25 e mantida em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após dois dias, o conteúdo dos frascos T-25 foi transferido para tubos de polietileno e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado formado foi novamente suspenso em meio basal e acondicionado em novos frascos de cultura, enquanto o sobrenadante foi descartado.



A cada dois dias o meio de cultura foi trocado e as células foram lavadas com PBS, para a remoção das células não aderentes. Quando as células atingiram a confluência, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 1.5 mL de 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) por 10 minutos. A ação da tripsina foi inativada com 8mL de meio basal e essa suspensão foi dividida em dois novos frascos de cultura. As células foram utilizadas para a realização dos experimentos na 4ª passagem.

### **II.2.5 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo**

As hASC foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise da presença de moléculas de superfície celular específicas.

As hASC na densidade de  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com anticorpos primários, Tabela II.1, por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário policlonal de cabra anti IgG de camundongo conjugado com FITC (fluoresceína isotiocianato) (Calbiochen) por 30 minutos a 4°C. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. As células foram novamente lavadas com PBS e depois fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulidade para estabelecer a população a ser analisada. A obtenção dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) utilizando-se o programa CELLQuest. Foram adquiridos 15.000 eventos e os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

**Tabela II. 1: Anticorpos primários utilizados para a caracterização fenotípica das hASC.**

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD29</b>	monoclonal	camundongo	-	Santa Cruz	1:25
<b>CD34</b>	monoclonal	camundongo	-	Abcam	1:16
<b>CD44</b>	monoclonal	camundongo	-	Santa Cruz	1:16
<b>CD45</b>	monoclonal	camundongo	-	BD Bioscience	1:25
<b>CD73</b>	monoclonal	camundongo	PE	BD Bioscience	1:10
<b>HLA-ABC</b>	monoclonal	camundongo	FITC	Abcam	1:10
<b>HLA-DR</b>	monoclonal	camundongo	FITC	Abcam	1:10

### **II.2.6 Colonização *in vitro* da membrana de microfibras por células hASC**

As membranas de PHB/PHBV foram distribuídas em placas de 24 poços, sendo uma membrana por poço. Em seguida,  $1 \times 10^5$  células foram semeadas sobre a membrana. A placa foi incubada por 1 hora em estufa a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>, para que ocorresse a adesão celular na membrana. Após a incubação, acrescentou-se a cada poço, 1mL de meio de cultura basal e manteve as células em estufa a 37°C e 5%CO<sub>2</sub>.

### **II.2.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Após colonização das células na membrana, em placas de 24 poços, esta foi mantida em cultivo com meio de cultura basal por 7 dias em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Primeiramente, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas com glutaraldeído 2.5 % em tampão Cacodilato de sódio 0.1M por um período de 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado Tetróxido de Ósmio 1% por 2 horas à 4°C, sempre protegidos da luz. Ao término deste período, os poços foram lavados 5 vezes com água destilada. Terminado o processo de fixação as amostras foram desidratadas através de imersão em álcool etílico em diferentes concentrações (30%, 40% 50%,60%, 70%, 80%, 90%, 95%) por 15 minutos cada, e álcool absoluto por 1 hora. Finalizada a desidratação, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Balzers, CPD-020). A secagem em ponto crítico é o processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO<sub>2</sub>, evitando dano à

célula causado pela tensão superficial durante o processo da evaporação natural. Após a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>, as amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização em ouro. A metalização e a obtenção das imagens foram realizadas no serviço de microscopia eletrônica do Departamento de Metalurgia, DEMET, da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

### **II.2.8 Avaliação da viabilidade e proliferação celular**

O ensaio de MTT (Mosmann, 1983) é um método colorimétrico sensível que mensura a viabilidade e proliferação celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade óptica pode ser determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

As hASC foram semeadas em placas de 24 poços (NUNC) na densidade de  $1 \times 10^5$  células/ mL/ poços em dois grupos: 1- células cultivadas na placa de cultura (controle) e 2- células cultivadas na membrana de PHB/PHBV. Os grupos foram cultivados em meio de cultura basal e meio de diferenciação endotelial por 7, 14 e 21 dias. Após cada período, o meio de cultura foi retirado e 210 µL de meio de cultura basal foram adicionados. Em seguida, foram acrescentados 170 µL da solução de MTT (Sigma), 5 mg/mL, e a placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram solubilizados através da adição a cada poço de 210 µL de SDS10%-HCl e incubação em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 18 horas. Após esse período, retirou-se 100 µL de cada poço e a leitura dos valores de absorbância da solução resultante foi realizada no espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram feitas em triplicatas. Como controle da interferência da membrana no processo de colorimetria do MTT, as membranas foram incubadas em meio de cultura basal, sem células, pelos mesmos períodos e todos os processos repetidos nas mesmas condições experimentais.

Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade com o objetivo de proteger a sua reatividade.

Os resultados obtidos foram plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa GraphPad Prism© 5.

### **II.2.9 Morfologia e distribuição celular**

Para confirmar a viabilidade e avaliar a distribuição celular após 21 dias de cultura, foi realizado o ensaio de Calceína-AM (*Calcein Acetoxymethylester*) nas células cultivadas na membrana de PHBV em meio basal e meio de diferenciação endotelial. A Calceína-AM é um composto não-fluorescente e permeável à membrana celular que, uma vez dentro de células viáveis é hidrolisado por esterases intracelulares em um composto fluorescente e impermeável à membrana. Após 21 dias, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas por 20 min com Tampão Hepes enriquecido (140 mM NaCl, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.9 mM KCl, 10 mM Hepes, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucose, pH 7.4) contendo 0.1 mM Calceína-AM. Em seguida as amostras foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510*©.

### **II.2.10 Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais por imunofluorescência**

As células foram induzidas à diferenciação endotelial quando cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV ou em lamínulas (controle). A comprovação da diferenciação endotelial se fez após 21 dias através da detecção da expressão de moléculas específicas de células endoteliais, fator de Von Willebrand (vWF) e VE-caderina, utilizando-se a técnica de imunofluorescência.

As células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi feita a permeabilização da membrana plasmática utilizando-se PBS/Triton-100X 0.1%, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram

novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min) e foi feito o bloqueio da reação com PBS/BSA 1% e soro fetal de cabra 5%, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas, *overnight*, com anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1%, tabela II.2.

Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min), e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de camundongo, Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) diluído em PBS/BSA 1%, 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o anticorpo secundário. Posteriormente, as células foram incubadas com a sonda Hoechst, 0.2 µg/mL, por 20 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS (3 vezes/10min) e a montagem das lâminas com *Hydromount*.

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss LSM 510 Meta) utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510*©. A intensidade de fluorescência foi calculada medindo a intensidade dos pixels utilizando o programa ImageJ. As imagens foram analisadas apenas no canal verde. Utilizando o gestor de ROI, uma região foi desenhada em torno de cada célula a ser medida, e outra região sem fluorescência foi desenhada para ser usada como branco. A média da intensidade dos pixels de cada célula foi subtraída da média do branco e plotada em um gráfico, utilizando GraphPad Prism 5.0. Cada barra representa uma média de 3 experimentos independentes em que 15 células em três regiões distintas foram analisadas.

**Tabela II. 2: Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência**

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>vWF</b>	monoclonal	Camundongo	-	Abcam	1:200
<b>VE-caderina</b>	policlonal	Coelho	FITC	Abcam	1:20

## **II.2.11 Avaliação da expressão de transcrito gênicos pela reação em cadeia da polimerase (PCR)**

As hASC foram cultivadas na membrana de PHB/PHBV e na placa de cultura (controle), em meio basal e de diferenciação endotelial por 7, 14 e 21 dias. Após cada período foi realizada a extração do RNA e, em seguida, foi sintetizado o cDNA e realizada a PCR para verificar a amplificação do seguimento gênico referente ao o receptor 2 do VEGF (VEGFR2).

### **II.2.11.1 Extração de RNA**

O RNA total foi isolado utilizando-se o reagente Trizol (Gibco). Após incubação por 5 minutos com o Trizol, a solução formada foi centrifugada por 15 minutos a 4°C e 13000rpm. A fase superior foi coletada e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico (Merck) por 10 minutos. Em seguida, foi feita uma nova centrifugação a 4°C e 13000rpm por 10 minutos e lavagem com etanol 75% (Merck), seguida de centrifugação de 10 minutos a 4°C e 7500rpm. O RNA foi diluído em água destilada DNase e RNase free (Gibco). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm.

### **II.2.11.2 Síntese de cDNA**

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA total, utilizando-se o RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0.5 µg de oligo (dT)18, a 70°C por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram incubadas no gelo. Logo após, foi adicionado 5X *reaction buffer*, 20 unidades *Ribolock™ Ribonuclease inhibitor*, 10mM dNTP mix, e foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima *RevertAid™ H Minus M-MuLV RT* (Fermentas) e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42°C. A reação

foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos. O cDNA resultante foi utilizado nas reações de PCR descritas a seguir.

### II.2.11.3 PCR

O cDNA sintetizado foi utilizado na reação de amplificação dos genes que codificam o VEGFR2. Como controle positivo da reação também foi amplificado o segmento gênico que codifica a gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima expressa constitutivamente por todas as células. Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela II.3. As reações de amplificação foram realizadas com um aquecimento inicial de 94°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e 72°C por 10 minutos, utilizando-se o termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio para a sua visualização.

**Tabela II. 3: Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR**

	<b>Fita senso (5'- 3')</b>	<b>Fita antisenso (5'- 3')</b>	<b>pb</b>
<b>VEGFR2</b>	GGAATACCCCTTGAGTCC	CCTCCAAGTCCAATACC	289
<b>GAPDH</b>	TGGTATCGTGGAAGGACTC ATGAC	ATGCCAGTGAGCTTCCCG TTCAGC	226

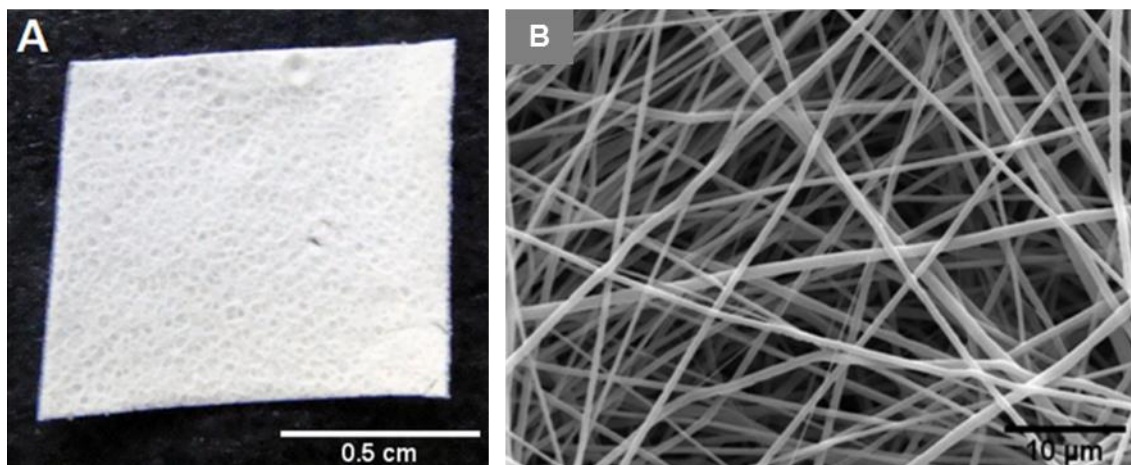
### II.2.12 Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados três vezes em triplicata e os dados apresentados representam a média ± desvio padrão (DP). Os grupos de dados foram comparados utilizando-se *two-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni, sendo considerada diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

## II.3 Resultados

### II.3.1 Avaliação morfológica das membranas de microfibras de PHB/PHBV

A metodologia de *electrospinning* permitiu a obtenção de membranas de microfibras à base de PHB e PHBV. A figura II.2A representa a imagem macroscópica da membrana. Análises de imagens obtidas por MEV confirmam que foi possível produzir uma membrana de 100 $\mu$ m de espessura e com fibras organizadas aleatoriamente com diâmetro entre 300nm e 1.3 $\mu$ m e média de  $770 \pm 250$ nm. Essa estrutura assemelha-se com a matriz extracelular.

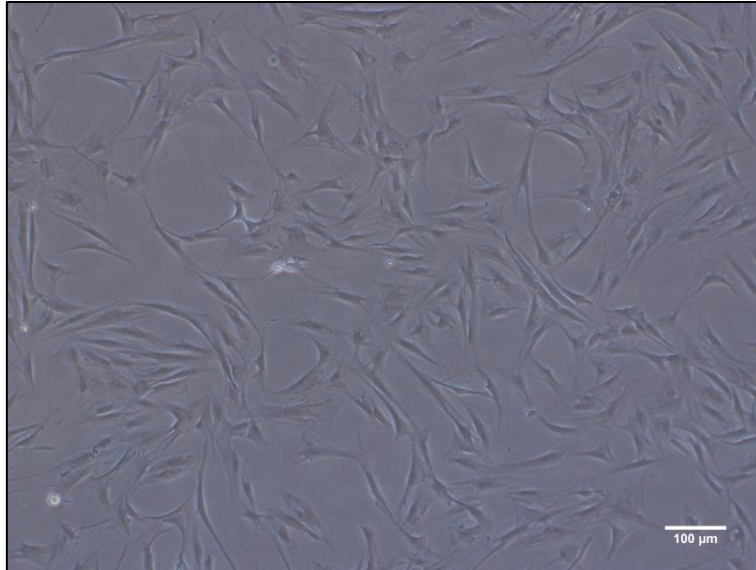


**Figura II. 2:** Análise morfológica da membrana de microfibras de PHB/PHBV. (A) Imagem macroscópica da membrana. (B) Imagem de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a deposição das fibras.

### II.3.2 Isolamento e caracterização das hASC

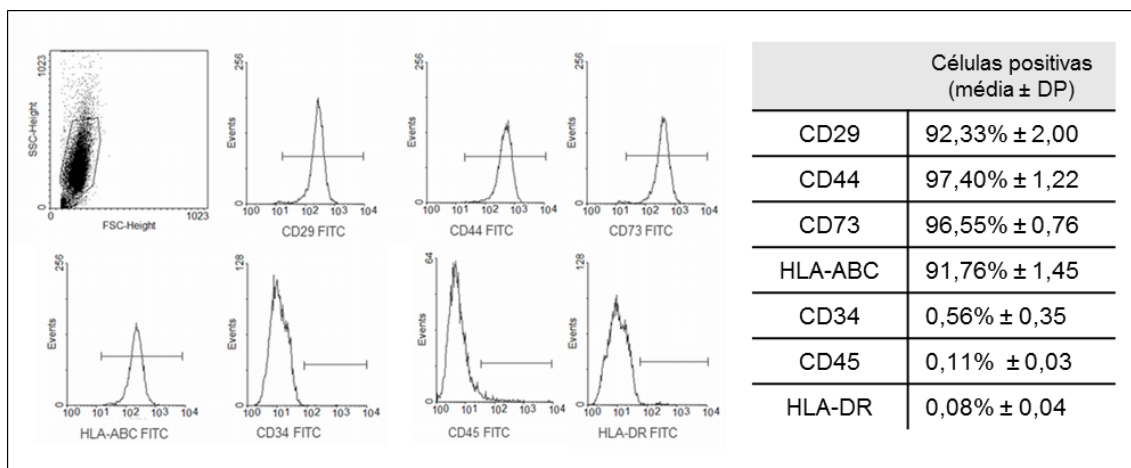
Células-tronco foram isoladas da fração estromal do tecido adiposo por digestão enzimática e centrifugação. As células isoladas apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide (Figura II.3).





**Figura II. 3:** Aspecto morfológico das hASC na 4<sup>a</sup> passagem. As hASC apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide.

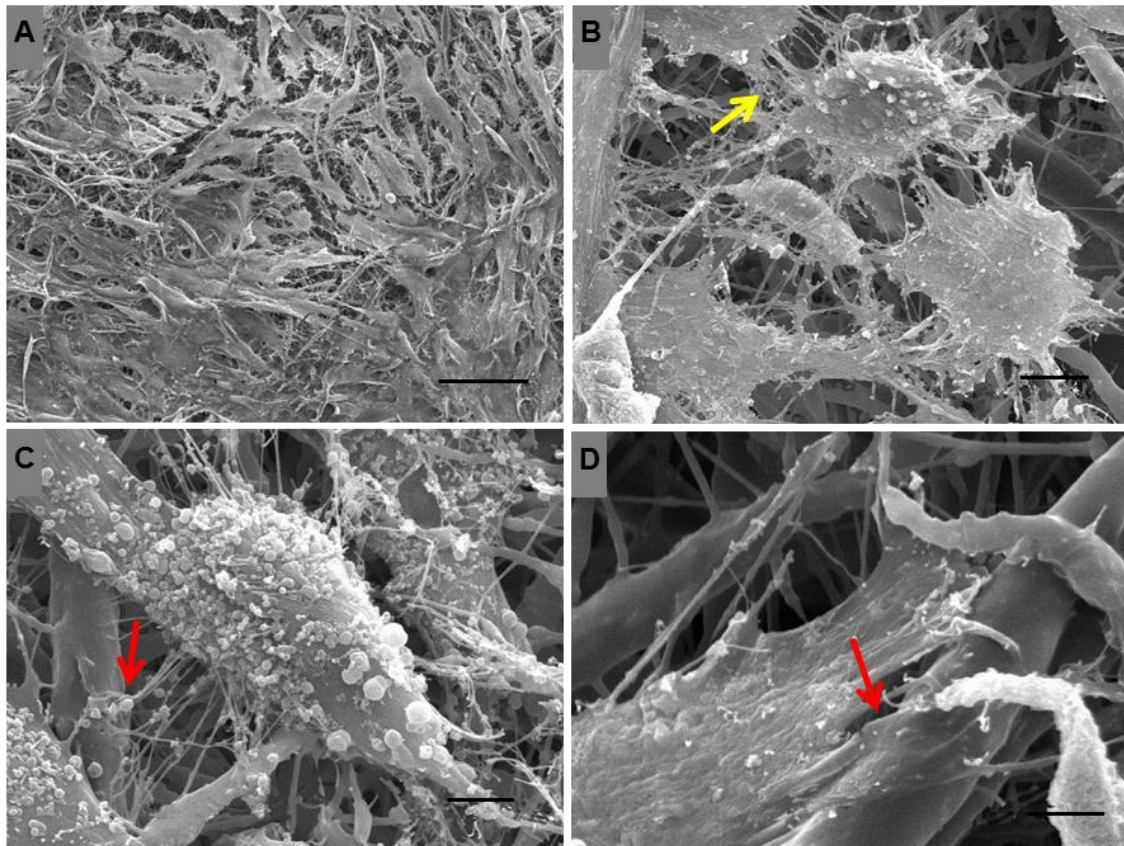
As hASC foram expandidas até a 4<sup>a</sup> passagem e seu fenótipo foi determinado por citometria de fluxo. Essa análise é importante para assegurar a pureza da população a ser trabalhada. As análises indicaram que a população de células em cultivo expressava os marcadores de células-tronco mesenquimais CD29, CD44, CD73 e HLA-ABC e não havia contaminação com células-tronco hematopoiéticas, menos de 1% das células expressavam CD34 e CD45. Além disso, as células não expressaram o marcador HLA-DR (Figura II.4). Esse perfil fenotípico confirma que a população isolada é de células-tronco mesenquimais.



**Figura II. 4:** Perfil fenotípico das hASC. O padrão de expressão de marcadores específicos de superfície das hASC está demonstrado por histogramas representativos de cada marcador. A população celular expressa CD29, CD44, CD73 e HLA-ABC e não expressa CD34, CD45 e HLA-DR.

### II.3.3 Caracterização morfológica das hASC aderidas na membrana de PHB/PHBV

As hASC foram cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV por 7 dias e analisadas por MEV. As imagens obtidas revelaram uma alta densidade celular demonstrando que as células foram capazes de aderir às fibras da membrana. Além disso, as hASC encontravam-se com morfologia achatada e fibroblastóide com diversos pontos de adesão a outras células (Figura II.5).

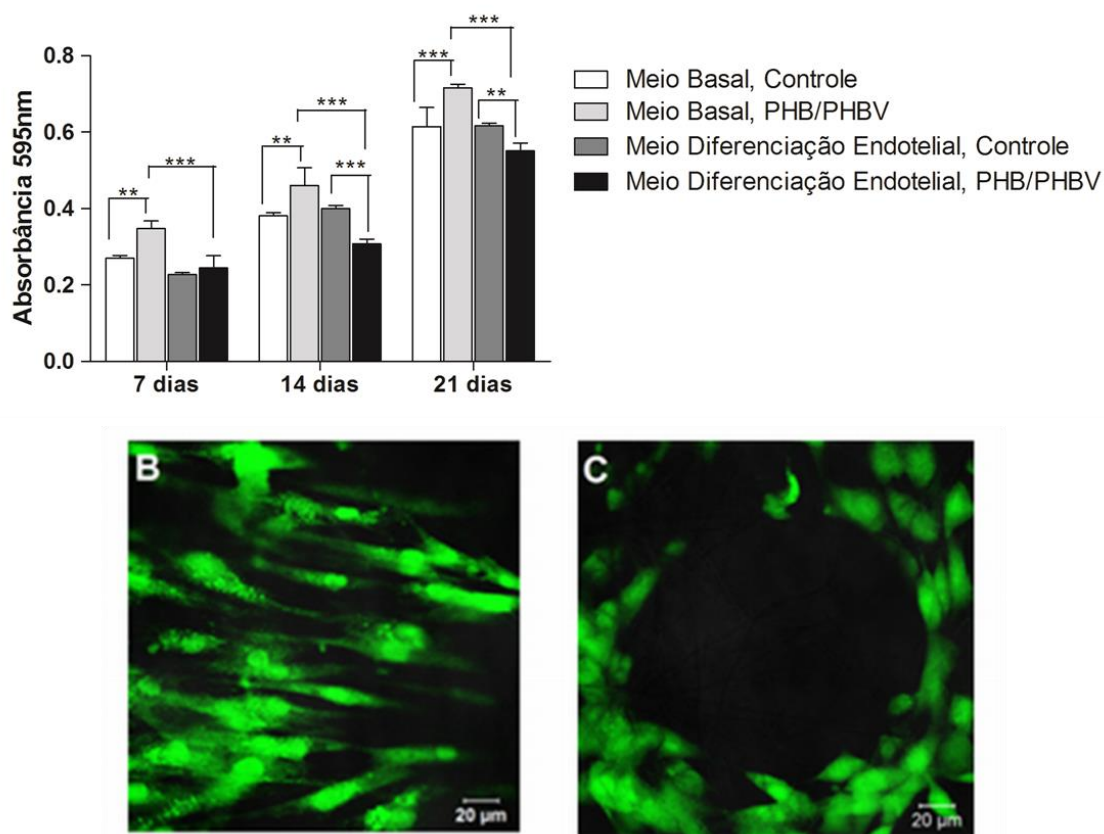


**Figura II. 5:** Análise morfológica das hASC aderidas à membrana de microfibras de PHB/PHBV. (A) Imagem panorâmica da distribuição das células na membrana. (B) Interação entre as células indicada pela seta amarela. (C-D) Interação das células com as fibras da membrana indicadas pelas setas vermelhas. Barra de escala: 5µm.

### II.3.4 Proliferação e viabilidade celular

Foi realizado o ensaio de avaliação da atividade metabólica (MTT) em diferentes tempos para determinar a viabilidade e proliferação celular quando as hASC foram cultivadas em meio basal e meio de diferenciação endotelial. Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT indicam que as hASC foram capazes de proliferar nos dois tipos de meio de cultura uma vez que o valor da absorbância aumentou de 7 para 21 dias (Figura II.6A). Quando cultivadas em meio basal, a proliferação foi maior nas hASC semeadas na membrana de PHB/PHBV comparado com o controle (placa de cultura celular). Durante a diferenciação endotelial, as células semeadas na membrana de PHB/PHBV proliferaram menos em relação ao controle e as células em meio basal. Quando cultivadas em condição controle, não houve diferença na proliferação das células em meio basal e meio de diferenciação endotelial. A viabilidade e a

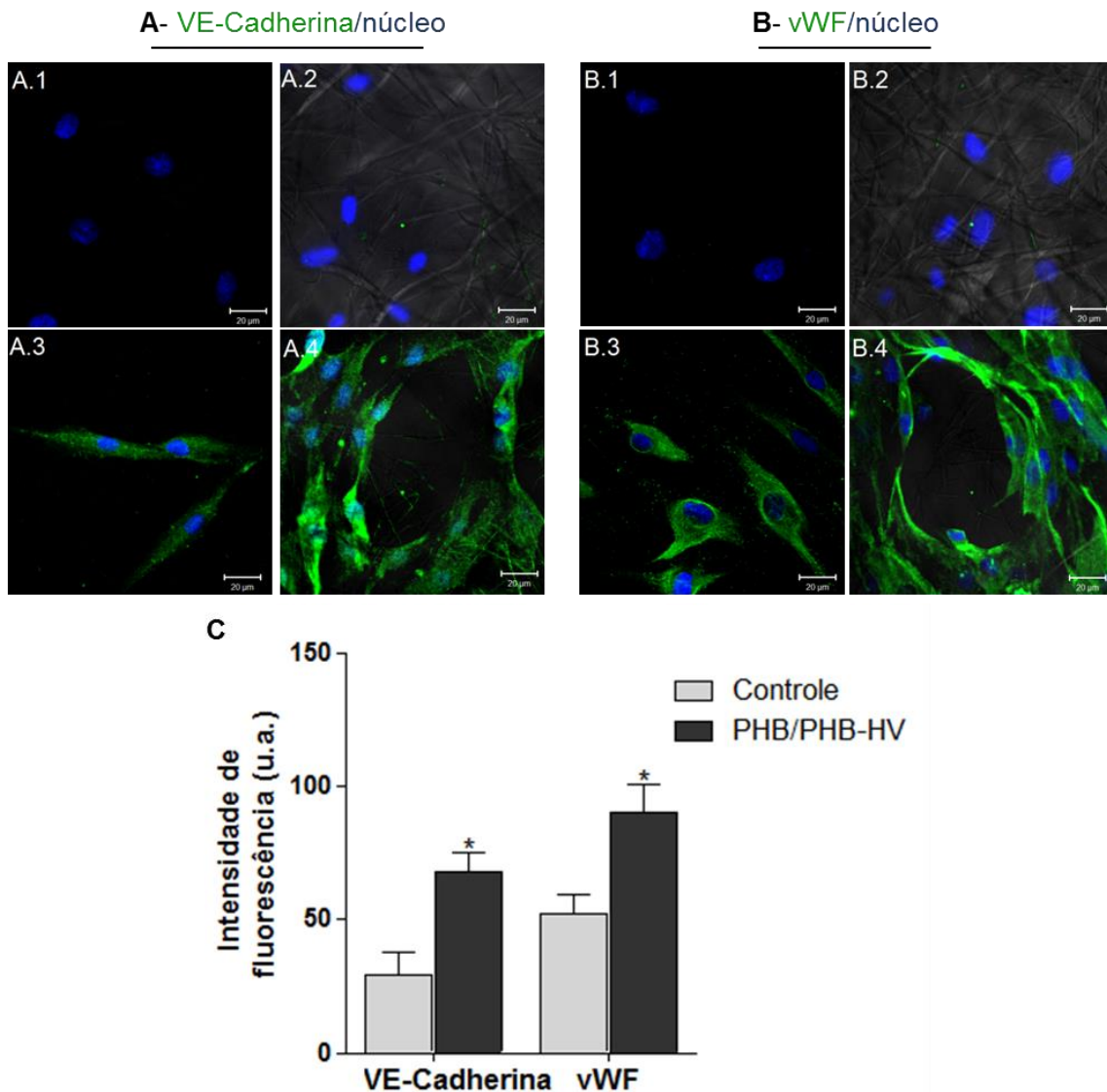
distribuição das células na membrana de microfibras de PHB/PHBV foi confirmada pelo ensaio de Calceína-AM. Esse resultado demonstra que as células cultivadas na membrana com meio basal estavam bem distribuídas pela superfície da membrana (Figura II.6B). Por outro lado, após a diferenciação endotelial, as células reorganizaram formando estruturas em círculos que são características de células endoteliais, mimetizando a organização tubular dos capilares sanguíneos (Figura II.6C).



**Figura II. 6:** Avaliação da proliferação e viabilidade das hASC cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV. (A) Análise do ensaio de MTT após 7,14 e 21 dias de cultivo em meio basal e meio de diferenciação endotelial. \* indica diferença significativa entre os grupos com  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ . (B e C) Imagens de microscopia confocal da viabilidade e distribuição das hASC cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV após 21 dias em meio basal (B) e meio de diferenciação endotelial (C).

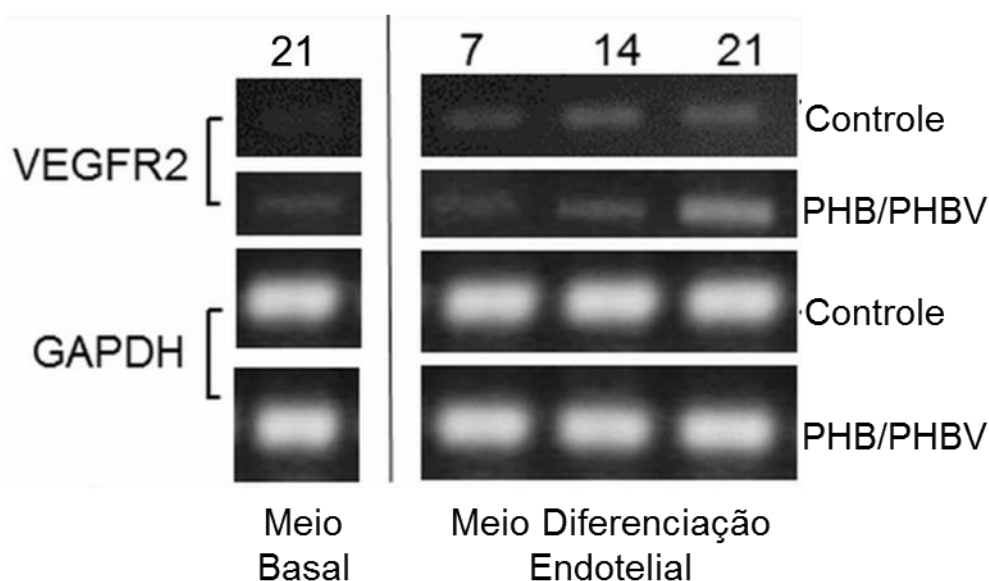
### **II.3.5 Diferenciação endotelial**

Para analisar se as células foram capazes de se diferenciarem e adquirirem o fenótipo endotelial foi realizado o ensaio de imunofluorescência para avaliação da expressão de marcadores endoteliais. Quando cultivadas em meio basal na condição controle e na membrana de microfibras de PHB/PHBV não foi indentificada a expressão de VE-Caderina (Figura II.7 A.1e A.2) e vWF (Figura II.7 B.1 e B.2). Após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação endotelial, as hASC passaram a expressar Ve-Caderina e vWF na condição controle (Figura II.7 A.3 e B.3) e na membrana de PHB/PHBV (Figura II.7 A.4 e B.4). Novamente, estruturas semelhantes a capilares foram observadas nas células diferenciadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV. Essas estruturas não foram formadas quando as hASC foram induzidas à diferenciação endotelial em condição controle. Além disso, as células diferenciadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV apresentaram maior intensidade de fluorescência para os dois marcadores comparado com as células diferenciadas na condição controle (Figura II.7C).



**Figura II. 7:** Análise da expressão de proteínas específicas durante a diferenciação endotelial. Imagens de microscopia confocal da expressão de VE-Cadherina (A) e vWF (B) após 21 dias. A.1 e B.1: hASC cultivadas em meio basal, controle. A.2 e B.2: hASC cultivadas em meio basal na membrana de PHB/PHBV. A.3 e B.3: hASC cultivadas em de diferenciação endotelial, controle. A.4 e B.4: hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial na membrana de PHB/PHBV. Barra de escala: 20µm. (C) Intensidade de fluorescência da expressão de VE-Cadherina e vWF nas células diferenciadas em condição controle e na membrana de microfibras de PHB/PHBV. \* indica diferença significativa com  $p < 0.05$ . (u.a): unidade arbitrária.

Para maior evidência da diferenciação endotelial, a expressão de transcritos gênicos para o VEGFR2 foi realizada por PCR e o resultado visualizado em gel de agarose. Os resultados indicam expressão de transcritos gênicos para VEGFR2 nas células cultivadas em meio basal. Entretanto, a expressão foi aumentada após 21 dias de diferenciação endotelial sendo mais evidente nas células cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV comparado com a condição controle (Figura II.7).



**Figura II. 8:** Análise da amplificação do transcrito gênico para VEGFR2. Células cultivadas na condição controle e na membrana de microfibras de PHB/PHBV em meio basal e meio de diferenciação endotelial.

#### II.4 Discussão

A medicina regenerativa baseia-se na possibilidade de reparar tecidos danificados por doença, traumatismo ou senescência. Nas abordagens de engenharia de tecidos, a regeneração tecidual pode ser alcançada pela combinação dos princípios da engenharia e das ciências da vida para a criação de um produto que pode substituir temporariamente a função mecânica do tecido, enquanto promove o crescimento celular e vai sendo gradativamente degradado (Langer e Vacanti, 1993). Além disso, no caso dos tecidos metabolicamente ativos, a vascularização do implante é crucial para a sobrevivência celular e a formação do novo tecido (Rouwkema, Rivron e Van

Blitterswijk, 2008). Sendo assim, a capacidade de promover a vascularização dos implantes de uma forma clinicamente relevante pode expandir a utilização de produtos da engenharia de tecidos.

No presente estudo, foi desenvolvida uma membrana de microfibras pela combinação do PHB e de PHBV utilizando a técnica de *electrospinning*. Estes polímeros demonstraram ser úteis para engenharia de tecidos, devido a suas características como biocompatibilidade e biodegradabilidade (Chen e Wu, 2005).

Diferentes matrizes de suporte para aplicações na engenharia de tecidos foram produzidas a partir do PHB e/ou PHBV e têm demonstrado promover a adesão e proliferação de diferentes tipos celulares (Kose *et al.*, 2005; Suwantong *et al.*, 2007; Ma *et al.*, 2010; Rathbone *et al.*, 2010). A técnica de *electrospinning* tem sido proposta como uma promissora abordagem para a produção de membranas formadas por fibras com diâmetros que vão de poucos micrômetros à escala nanométrica (Martins *et al.*, 2007). Sombatmankhong e colaboradores produziram e caracterizaram com êxito fibras de PHB/PHBV com diferentes concentrações poliméricas (Sombatmankhong, Korakot *et al.*, 2006). Diferente das membranas produzidas nesse trabalho que possuem fibras com diâmetros entre 300nm e 1.3µm, as estruturas obtidas por Sombatmankhong e colaboradores apresentavam fibras com diâmetro variando entre 1.1µm e 4.0µm. A matriz extracelular é constituída por fibras de colágeno de escala nanométrica orientadas aleatoriamente semelhante ao que foi obtido. Essa organização favorece a adesão, proliferação e diferenciação celular (Kusuma, Zhao e Gerech, 2012).

Células-tronco mesenquimais constituem uma população de células multipotentes que podem ser facilmente isoladas de diversos tecidos do indivíduo adulto com elevado potencial para aplicações clínicas (Da Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006). Células foram isoladas da fração estromal do tecido adiposo humano e caracterizadas por citometria de fluxo. A caracterização comprovou se tratar de uma população homogênea com perfil de células-tronco mesenquimais, denominadas células-tronco derivadas do tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001b; Zhu *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2011). Essas células foram utilizadas para avaliar a biocompatibilidade da membrana de microfibras de PHB/PHBV.



As imagens obtidas por MEV indicaram que as hASC aderiram e se espalharam pela membrana. As células interagiram com as fibras da membrana e mantiveram conexões com células vizinhas.

O ensaio de MTT é utilizado para avaliar a citotoxicidade de vários biomateriais aplicados na engenharia de tecidos, e o valor de absorbância pode fornecer indícios da proliferação celular (Shafiee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Hajiabbas *et al.*, 2013). Quando cultivadas em meio basal, as hASC proliferam mais na membrana de microfibras de PHB/PHBV comparado com as células em placa de cultura. Esse resultado confirma que a membrana promove a proliferação celular sem um efeito citotóxico fornecendo um melhor ambiente para as células.

A viabilidade das células foi confirmada pelo ensaio de Calceína-AM. Após 21 dias, as células aderidas na membrana de microfibras de PHB/PHBV eram viáveis e apresentavam membranas citoplasmáticas íntegras. Esse resultado corrobora outro estudo que também demonstrou que a morfologia das membranas produzidas por *electrospinning* favorece a adesão e proliferação de hASC (McCullen *et al.*, 2007). Além de membranas de *electrospinning*, as hASC tem demonstrado boa aderência e proliferação a diferentes tipos de biomateriais (Haimi *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2011). Além disso, estas células possuem alta taxa de proliferação e capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens sob condições específicas de cultura (Zhu *et al.*, 2008). Mais ainda, são derivadas de uma fonte abundante, facilmente acessível com mínima morbidade e facilmente expandidas *in vitro*. Estas características são importantes uma vez que células progenitoras ou terminalmente diferenciadas são de difícil obtenção e possuem limitada capacidade de proliferação (Arosarena, 2005). Sendo assim, as hASC podem ser consideradas um bom tipo celular para aplicações em engenharia de tecidos.

As hASC cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV foram induzidas a diferenciação na linhagem endotelial com o propósito de se obter células endoteliais para auxiliar a vascularização na engenharia de tecidos. O potencial de diferenciação dessas células foi descrito anteriormente (Cao *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009). A indução da diferenciação se fez através de um meio de cultura específico contendo VEGF e bFGF e o ensaio de MTT foi

realizado para determinar se as células mantinham-se viáveis e proliferativas durante esse processo. Os resultados indicaram que as células cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV proliferaram na presença do meio de diferenciação endotelial. Entretanto, o cultivo em meio basal foi significativamente mais eficaz em estimular a proliferação celular. Estudos têm demonstrado que a capacidade de auto-renovação é exclusiva das células-tronco, e, com a progressão da diferenciação, o potencial proliferativo diminui (Breyner *et al.*, 2010). As células terminalmente diferenciadas não são proliferativas, no entanto, a maioria das linhagens possui uma fase progenitora em que a proliferação e diferenciação estão equilibradas (Muschler, Midura e Nakamoto, 2003; Mountford, 2008). Quando cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV e induzidas à diferenciação endotelial, houve menor proliferação comparado com as células cultivadas em placas de cultura, esse resultado sugere que a morfologia da membrana foi estímulo adicional que auxiliou no comprometimento das células à diferenciação. Embora tenha havido uma redução na absorvância do ensaio de MTT nas células induzidas a diferenciação comparado com o meio basal, as células que estavam aderidas à membrana de microfibras de PHB/PHBV após 21 dias de diferenciação eram viáveis, como comprovado pelo ensaio de calceína-AM.

A utilização do meio indutor contendo VEGF e bFGF levou a expressão de marcadores endoteliais pelas hASC, tais como o vWF e VE-Caderina (Oswald *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2005). A expressão desses marcadores foi intensificada nas células cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV. A expressão dessas moléculas é fundamental para a manutenção das funções das células endoteliais. O fator vWF é importante na manutenção da hemostasia, atuando na adesão de plaquetas à parede de vasos que sofreram lesão e sendo a proteína transportadora e estabilizadora do fator VIII, essencial no processo de coagulação. Além disso, o vWF pode auxiliar no ancoramento de células endoteliais à matriz extracelular (Sadler, 2009). VE-caderina é uma molécula específica de adesão endotelial estritamente localizada nas junções entre as células endoteliais e desempenha um papel importante na manutenção e controle das interações entre as células endoteliais que permite a formação de uma rede vascular madura e estável (Gory-Faure *et al.*, 1999).

Além disso, as células cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV, quando induzidas a diferenciação endotelial, se reorganizaram aleatoriamente formando agregados interligados com espaços circulares delineados, semelhante a estrutura tubular dos capilares. Essa organização ocorre quando células endoteliais são cultivadas em condições que assemelham a estrutura da matriz extracelular, como em gel de colágeno I suplementado com laminina (Kubota *et al.*, 1988), gel de fibrina (Chalupowicz *et al.*, 1995; Vailhe *et al.*, 1997) e sistemas de membranas organotípicas (Salerno *et al.*, 2011). Esses estudos demonstram que a organização das células endoteliais em capilares é dependente das interações entre as células e a matriz. Nesse sentido, confirma-se que a estrutura da membrana de microfibras de PHB/PHBV por ser semelhante à membrana extracelular serviu como um estímulo adicional para as células, favorecendo a diferenciação endotelial.

Além disso, a presença de VEGF durante a diferenciação regulou positivamente a expressão do VEGFR2. A expressão desse receptor é importante para a promoção da angiogênese *in vivo* (Oswald *et al.*, 2004). Mesmo em meio basal, houve um aumento na expressão do VEGFR2 quando as hASC foram cultivadas na membrana de microfibras de PHB/PHBV o que pode favorecer a diferenciação dessas células *in vivo*.

Em resumo, os resultados desse trabalho indicam que a associação da membrana de microfibras de PHB/PHBV com os fatores de crescimento VEGF e bFGF favoreceram a diferenciação endotelial das hASC. A utilização da técnica de *electrospinning* para o desenvolvimento de estruturas vasculares tem sido relatado. Diferentes biomateriais incluindo o poli (L-lactídio-co- $\epsilon$ -caprolactona), policaprolactona e a seda foram processados por essa técnica e demonstraram boas propriedades para suportar a adesão de diferentes fontes de células endoteliais (Mo *et al.*, 2004; Ku e Park, 2010; Wu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Xiang *et al.*, 2011). No entanto, esses trabalhos utilizam apenas células endoteliais maduras e o presente estudo demonstra a possibilidade de induzir células-tronco mesenquimais à diferenciação endotelial. Dessa forma, possibilita a utilização de uma fonte de célula autóloga e proliferativa.

## II.5 Conclusões

Este estudo demonstrou que a membrana de microfibras de PHB/PHBV possui morfologia adequada para a utilização com células endoteliais diferenciadas, favorecendo a formação de estruturas circulares semelhantes a estrutura tubular dos capilares. Além disso, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo demonstraram potencial de diferenciação endotelial o que pode favorecer a sua utilização *in vivo*. A combinação dessas metodologias pode ser empregada com o intuito de auxiliar a vascularização de implantes baseados na engenharia de tecidos.

## **Capítulo III**

**Desenvolvimento e caracterização de uma matriz bicamada de PHBV semelhante à estrutura da pele**

### III.1 Introdução

A pele é considerada o maior órgão dos humanos e é responsável por proteger o organismo de agentes externos, manter a homeostase e pela detecção sensorial (Macneil, 2007). No entanto, quando feridas de espessura total são maiores que 4cm em diâmetro, a regeneração completa da pele só é possível com o auxílio de um enxerto (Herndon *et al.*, 1989), a homeostase corporal fica comprometida (Patenaude *et al.*, 2005) e o risco de infecções é elevado (Appelgren *et al.*, 2002; Church *et al.*, 2006).

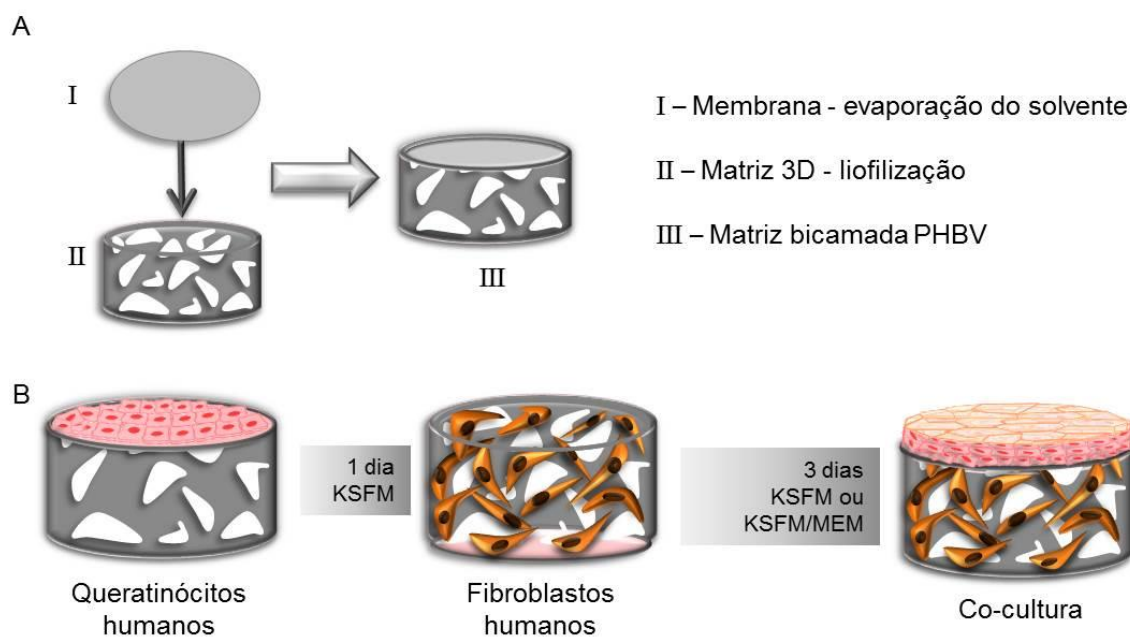
Até o momento, o tratamento padrão ouro para grandes feridas é o enxerto de pele de regiões sadias do próprio paciente ou de um doador (Brusselaers *et al.*, 2010; Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010). Substitutos de pele já estão clinicamente disponíveis desde o início dos anos 80 (Burke *et al.*, 1981; Gallico *et al.*, 1984), mas embora tenham ocorrido avanços ao longo dos anos, esses substitutos ainda estão associados com vários problemas incluindo excessiva contração, formação de cicatriz, vascularização ineficiente, dentre outros (Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010; Widgerow, 2012).

A fim de se buscar atingir a regeneração total da pele, diferentes biomateriais naturais e sintéticos estão sendo investigados com o intuito de se alcançar a melhor combinação de design da matriz, propriedades mecânicas, taxa de degradação e estímulo à regeneração (Kuppan, P. *et al.*, 2011; Balaji *et al.*, 2012; Yun *et al.*, 2012).

O PHBV é um polímero natural membro da família dos Polihidroxicanoatos (PHA) (Lee, 1996a). Esse polímero é considerado particularmente atrativo para aplicações em engenharia de tecidos devido às suas propriedades, tais como, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, termoplasticidade e piezoelectricidade (Lee, 1996a; Chen e Wu, 2005). Além disso, já foi demonstrado que o produto de degradação do PHBV *in vivo* é capaz de promover a proliferação de fibroblastos e queratinócitos prevenindo a morte celular por apoptose e necrose e estimulando o aumento no influxo de íons de cálcio citosólico (Cheng *et al.*, 2006b; Sun *et al.*, 2007; Ji, Li e Chen, 2008).

Apesar do PHBV já estar sendo utilizado em diferentes abordagens para promover a regeneração de diferentes tecidos (Liu *et al.*, 2010; Chen e Tong, 2012; Zonari *et al.*, 2012; De Paula *et al.*, 2013; Ribeiro-Samy *et al.*, 2013), apenas alguns trabalhos foram realizados no intuito de promover a regeneração da pele. Kuppan e colaboradores demonstraram a influência das propriedades mecânicas de membranas de PHBV produzidas por *electrospinning* e evaporação do solvente na expressão de proteínas da matriz extracelular e, conseqüentemente, na reepitelização e taxa de regeneração (Kuppan, P. *et al.*, 2011). Recentemente, foi demonstrado que a adesão e proliferação de fibroblastos *in vitro*, bem como os níveis de inflamação e regeneração *in vivo* são influenciados pela taxa de PHBV em relação a quitosana (Veleirinho *et al.*, 2012) e pode ser também beneficiada pela incorporação de queratina em membranas de PHBV produzidas por *electrospinning* (Yuan *et al.*, 2012). Em outra abordagem, membranas de PHBV cultivadas com células dérmicas e epiteliais da raiz folicular demonstraram melhores taxas de regeneração comparado à membrana sem células. Além disso, essas membranas cultivadas *in vitro* por 3-5 dias foram capazes de manter a umidade no local da ferida e forneceram resistência mecânica suficiente para o processo de regeneração (Han *et al.*, 2007).

Dessa forma, até o momento, a utilização do PHBV para produzir substitutos de pele, está restrita ao desenvolvimento de membranas por *electrospinning*. Sendo assim, esse trabalho propõe o desenvolvimento de uma matriz bicamada de PHBV que mimetize a estrutura da pele dividida em duas camadas, epiderme e derme. A estrutura bicamada combina uma camada superior formada por uma membrana bidimensional (2D) com nanoporosidade e uma camada inferior tridimensional (3D) composta de uma matriz altamente porosa, para dessa forma, suportar respectivamente, o crescimento de queratinócitos e fibroblastos e, assegurar a comunicação entre as camadas a partir dos poros (Figura III.1).



**Figura III. 1:** Representação esquemática da produção da matriz bicamada de PHBV (A) e a estratégia para co-cultura (B). KSFM – meio de cultura para queratinócitos (*keratinocyte serum free medium*); MEM – meio mínimo essencial (*minimum essential medium*).

## III.2 Materiais e métodos

### III.2.1 Preparo da matriz bicamada de PHBV

A matriz bicamada foi produzida a partir do polímero natural PHBV, fornecido pela PHB Industrial S.A (PHBISA), Usina da Pedra, Serrana-SP, Brasil.

Tendo em consideração a estratificação da pele em duas camadas: epiderme e derme, uma matriz bicamada foi desenvolvida com o intuito de mimetizar a estrutura original da pele. Dessa forma, a matriz bicamada consiste de uma membrana que mimetiza a estrutura da epiderme associada a uma matriz tridimensional referente à porção dérmica da pele.

A membrana para a epiderme produzida a partir do PHBV foi desenvolvida utilizando a técnica evaporação do solvente (*solvent casting*). O polímero foi dissolvido em clorofórmio (2.5% p/v) por 20 minutos à 60°C, sob agitação. Em seguida, 10mL da solução foi vertida em placas de petri de 72mm de diâmetro e mantidas na capela de exaustão até completa evaporação do solvente.



Para a fração representante da derme, foi utilizada a técnica de liofilização para produzir uma matriz tridimensional. O polímero, PHBV, foi dissolvido em clorofórmio por 20 minutos à 60°C, sob agitação. Em seguida, o mesmo volume de ácido acético foi acrescentado para se formar uma emulsão com concentração final do polímero de 2.5% p/v. A emulsão foi agitada por mais 20 minutos à 60°C. A emulsão foi então dispensada em placas de petri de 72mm de diâmetro (40mL/placa) e, imediatamente, congeladas à -80°C por no mínimo, 24 horas. Antes da liofilização, a membrana de PHBV foi associada à matriz tridimensional utilizando o polímero dissolvido em clorofórmio (2.5% p/v) para fazer a união das duas camadas. Em seguida, a matriz bicamada foi liofilizada por 4 dias para completa remoção do solvente.

Depois de liofilizada, a matriz bicamada foi cortada em fragmentos de 6mm de diâmetro e 3mm de espessura que foram esterelizados com óxido de etileno e utilizados nos ensaios de caracterização e ensaios biológicos.

### **III.2.2 Caracterização da matriz bicamada de PHBV**

#### **III.2.2.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A caracterização morfológica da matriz bicamada de PHBV foi realizada pela microscopia eletrônica de varredura, MEV. As amostras foram revestidas com 20nm de ouro/paládio (80:20) e analisadas no MEV (Nova NanoSEM 200) à 5.00 kV.

#### **III.2.2.2 Microtomografia computadorizada por raio X**

A avaliação do interior da matriz incluindo porosidade e interconectividade dos poros foi realizada utilizando o equipamento SkyScan 1072. As matrizes foram analisadas utilizando o modo de alta resolução de 6.9  $\mu\text{m}$  x/y/z e tempo de exposição de 1792 ms. Os parâmetros de energia definidos para o escaneamento foram 50kV e 185  $\mu\text{A}$ . Após o escaneamento, os dados obtidos foram convertidos em imagens binárias utilizando Nrecon e CT-Na. Um limite basal (para distinguir o material polimérico de espaços vazios) de 60-225 foi determinado e mantido constante para todas as amostras

analisadas. O software, CT Vol® image foi utilizado para a reconstrução tridimensional da matriz.

### **III.2.2.3 Ensaio de absorção de água**

A capacidade de absorção de água da membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada de PHBV foi determinada utilizando um método gravimétrico. As amostras (n=5) foram inicialmente pesadas e imersas em tampão salina fosfato (PBS) 0.01M, pH 7.4, à 37°C sob agitação (60 rpm) por 15min, 30min, 1, 2, 3, 6, 12, 24, e 48 horas. Após os períodos determinados, as amostras foram removidas da solução de PBS, rapidamente secas com papel de filtro para retirar a água superficial, e imediatamente pesadas. A quantidade de água absorvida foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de água absorvida} = \frac{\text{massa final} - \text{massa inicial}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

### **III.2.2.4 Propriedades mecânicas**

As propriedades mecânicas da membrana, matriz tridimensional, e matriz bicamada foram determinadas utilizando um equipamento universal de ensaios mecânicos (Instron 540, USA). Para os ensaios de tração, a membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada foram produzidas com as seguintes dimensões: 5mm de largura, 30mm de comprimento e aproximadamente 0.04mm de espessura para a membrana e 3mm para a matriz tridimensional e matriz bicamada. As amostras (n=5) foram testadas à velocidade de 5mm/min à temperatura ambiente. A resistência à tração foi determinada utilizando amostras secas e previamente imersas em PBS por 3 horas.

### **III.2.2.5 Ensaio de degradação in vitro**

As matrizes tridimensionais (n=5) foram incubadas em soluções de PBS contendo Lipase (150U/L, Sigma) e/ou Lisozima (13mg/L, Sigma) em

concentrações semelhantes às encontradas no soro humano (Hankiewicz e Swierczek, 1974; Tietz e Shuey, 1993). Amostras imersas em apenas PBS foram utilizadas como controle. As amostras foram mantidas à 37°C, sob agitação (60rpm) por 1, 2, 4 e 8 semanas. As soluções foram trocadas a cada 3-4 dias. Ao final de cada tempo determinado, as amostras foram lavadas com água destilada, secadas e pesadas. Para se determinar a porcentagem de massa perdida, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Massa perdida (\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

Modificações morfológicas na superfície das amostras após o ensaio de degradação foram analisadas por MEV. As amostras foram revestidas com 20nm de ouro/paládio (80:20) e analisadas no MEV (Nova NanoSEM 200) à 5.00 kV.

### **III.2.3 Ensaio biológicos**

#### **III.2.3.1 Isolamento de queratinócitos e fibroblastos a partir da pele humana**

Queratinócitos e fibroblastos foram isolados a partir de amostras de pele humana de pacientes saudáveis que passaram por cirurgia plástica de abdominoplastia no Hospital Prelada, Porto, Portugal (Anexo 4). As amostras foram obtidas após consentimento prévio dos pacientes e sob um acordo de cooperação estabelecido entre o Hospital Prelada e o Grupo de Pesquisa 3B's. Primeiramente, foi removido todo o tecido adiposo adjacente à pele e fragmentou a pele em pequenos fragmentos de aproximadamente 0.5 cm<sup>2</sup> que foram incubados com dispase II (2.4U/ml) à 4°C por 12 horas. Em seguida, com ajuda de duas pinças, separou a derme da epiderme.

- **Isolamento de queratinócitos a partir da epiderme**

Para isolar os queratinócitos da epiderme, a epiderme foi incubada com 0.05% tripsina-EDTA por 5-7 min a 37°C. A ação da tripsina foi interrompida

utilizando o mesmo volume de meio. Em seguida, com auxílio de um removedor de células (*cell scraper*) friccionou a epiderme para liberação dos queratinócitos. O processo foi repetido com o auxílio de uma pipeta. Em seguida, passou a epiderme por um filtro de 100µm, para separar as células do tecido remanescente. O material filtrado foi centrifugado por 5 min à 290g e as células foram colocadas em cultura na densidade 100.000 células/cm<sup>2</sup> em meio específico para queratinócitos, *Keratinocyte Serum Free Medium* (KSFM, Gibco). O meio foi trocado a cada 2-3 dias.

- **Isolamento de fibroblastos a partir da derme**

Para isolar fibroblastos a partir da derme, a derme foi incubada com colagenase do tipo I (250U/mL) por 3 horas a 37°C. Em seguida, passou o tecido por um filtro de 100µm friccionando vagarosamente com o auxílio de uma pipeta. O material filtrado foi centrifugado por 5 min à 290g. Em seguida, as células centrifugadas foram colocadas em cultura, na densidade 50.000 células/cm<sup>2</sup> em meio α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias.

### **III.2.3.2 Culturas homotípicas**

A capacidade da membrana e da matriz tridimensional de suportar respectivamente a adesão de queratinócitos e fibroblastos foi avaliada separadamente em culturas independentes (homotípicas).

As matrizes bicamada de PHBV foram distribuídas em placas de 48 poços, sendo uma matriz por poço. Os queratinócitos foram semeados no lado da matriz constituído pela membrana. Para isso, queratinócitos nas densidades 1.75 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> e 3.5 x 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> foram semeados sobre a membrana e incubados por 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, acrescentou-se a cada poço, 1mL de meio KSFM.

Os fibroblastos foram semeados no lado da matriz formado pela matriz tridimensional. Fibroblastos na densidade de 3x10<sup>6</sup> células/cm<sup>3</sup> foram colocados sobre a matriz tridimensional e incubados por 2 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, acrescentou-se a cada poço, 1mL de α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico.

As culturas foram mantidas por 7 dias em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias.

### **III.2.3.3 Co-cultura**

Para se obter culturas heterotípicas que se assemelhem a estrutura de epiderme/derme da pele, queratinócitos e fibroblastos foram cultivados simultaneamente na matriz bicamada de PHBV. Primeiramente, queratinócitos foram semeados no lado correspondente à membrana na concentração de  $3.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> e cultivados em meio KSFM por um dia. Em seguida, fibroblastos na concentração de  $3 \times 10^6$  células/cm<sup>3</sup> foram semeados no lado da matriz tridimensional e co-cultivados por mais 3 dias em meio KSFM ou em uma mistura de KSFM e α-MEM 10% soro fetal bovino na proporção de 1:1 (KSFM/MEM) (Figura III.1B).

### **III.2.3.4 Citometria de fluxo**

O fenótipo dos queratinócitos antes de serem semeados na membrana foi determinado por citometria de fluxo. Queratinócitos na densidade de  $5 \times 10^5$  células foram incubados com os anticorpos primários queratina 10 (K10), queratina 14 (K14) e involucrina por 1 hora à temperatura ambiente na concentração sugerida pelo fabricante (Tabela II.1). Após incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), 1:500, por 1 hora a 4°C. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. As células foram novamente lavadas com PBS e depois fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada. Foram adquiridos 15.000 eventos e a obtenção e análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa CellQuest.

**Tabela III. 1: Anticorpos primários utilizados para Citometria de Fluxo.**

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Clone</b>	<b>Espécie</b>	<b>Conjugado</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>K10</b>	monoclonal	DE-K10	Camundongo	-	Abcam	1:100
<b>K14</b>	monoclonal	LL02	Camundongo	FITC	AbD Serotec	1:25
<b>Involucrina</b>	monoclonal	SY5	Camundongo	-	Imgenex	1:100

### **III.2.3.5 Análise da adesão e morfologia celular por MEV**

Para verificar a adesão e morfologia dos queratinócitos e fibroblastos à matriz bicamada de PHBV foi realizada uma análise por MEV. A adesão e morfologia dos queratinócitos foi avaliada após 1, 3, 5 e 7 dias de cultura, já os fibroblastos foram avaliados após 1, 3 e 7 dias. Após cada tempo determinado, as amostras foram lavadas com PBS e fixadas com 1mL de 2.5% glutaraldeído por, pelo menos, 1 hora a 4°C. Após fixadas, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e desidratadas através de imersão em álcool etílico em diferentes concentrações (50%, 70%, 90% e 100%) por 2 vezes de 15 min cada. Em seguida, as amostras foram secadas em ponto crítico (Autosamdri-815, Tousimis). Após a secagem, as amostras foram montadas em suporte de alumínio padrão e submetidas ao processo de metalização em ouro/paládio (80:20) e analisadas no MEV (Nova NanoSEM 200) à 5.00 kV.

### **III.2.3.6 Análise da viabilidade celular pelo ensaio de Calceína-AM (calcein acetoxymehylester)**

A avaliação da viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos cultivados na matriz bicamada de PHBV em culturas homotípicas e co-culturas foi realizada através do ensaio de Calceína-AM. A Calceína-AM é um composto não-fluorescente e permeável à membrana celular que, uma vez dentro de células viáveis é hidrolisado por esterases intracelulares em um composto fluorescente e impermeável à membrana. Após tempos pré determinados, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas por 20 min em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> com 0.1mM de Calceína em meio sem soro fetal bovino e sem fenol-vermelho. Em seguida, as amostras foram fixadas com 10% formalina por 30 minutos e os núcleos das células foram marcados com DAPI (Sigma) por 5min. As

amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Axioplan Imager Z1, Zeiss) e as imagens foram adquiridas e processadas utilizando o programa AxioVision V.4.8 (Zeiss).

### **III.2.3.7 Análise da proliferação celular pela quantificação de DNA**

Para avaliar a proliferação dos queratinócitos e fibroblastos cultivados na matriz bicamada de PHBV em culturas homotípicas e co-culturas foi realizada a quantificação do DNA total em tempos de cultura determinados, utilizando o Kit de quantificação de DNA com PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen dsDNA assay kit, Molecular Probes). Após cada tempo determinado, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com 1mL de água ultra-pura por 1 hora a 37°C. Em seguida, para a liberação do DNA, foram imediatamente congeladas e mantidas a -80°C. Antes da quantificação do DNA, as amostras foram descongeladas e sonicadas por 15 min. A curva padrão foi preparada com concentrações entre 0 e 2mg/mL. Em uma placa opaca de 96 poços foi adicionado 28,7µl da amostra ou padrão, 71,3µl da solução de PicoGreen e 100µl do tampão Tris-EDTA. A placa foi incubada por 10 min, protegida da luz e a fluorescência foi medida utilizando um microleitor de placas com comprimento de onda de excitação de 480nm e comprimento de onda de emissão de 528nm (Synergie HT microplate reader, Bio-Tek).

### **III.2.3.8 Imunofluorescência**

Após 3 dias de co-cultura, os queratinócitos foram analisados para a expressão de marcadores associados a proliferação (Ki-67) e diferentes estágios de maturação/diferenciação (queratina 14 (K14), queratina 10 (K10) e involucrin). As células foram fixadas em 10% formalina por 30min à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi feita a permeabilização da membrana plasmática utilizando-se 0.2% Triton-100X (Sigma), por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS e foi feito o bloqueio da reação com 3% PBS/BSA, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células

foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com os anticorpos primários diluídos em 1% PBS/BSA, tabela II.2.

Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/10min), e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) diluído em 1% PBS/BSA, 1:500, e com a sonda faloidina conjugada com rodamina (Sigma), 1:200, por 1 hora em câmara húmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com 10µM DAPI, por 5 minutos para marcação do núcleo. As amostras foram observadas em microscópio confocal (FluoView 1000, Olympus) e analisadas utilizando o programa FluoView10-ASW 3.1 viewer (Olympus).

Para a quantificação das células positivas para o marcador Ki-67 em relação ao número total de núcleos, três diferentes imagens no aumento de 20X foram capturadas para cada amostra (n=3) (Dong *et al.*, 2005). As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ.

**Tabela III. 2: Anticorpos primários utilizados para Imunofluorescência.**

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Clone</b>	<b>Espécie</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>Ki-67</b>	monoclonal	SP6	Coelho	Abcam	1:50
<b>K10</b>	monoclonal	DE-K10	Camundongo	Abcam	1:100
<b>K14</b>	monoclonal	-	Coelho	Covance	1:600
<b>Involucrina</b>	monoclonal	SY5	Camundongo	Imgenex	1:200

#### **III.2.4 Análise estatística**

Todos os dados quantitativos apresentados estão representados pela média ± desvio padrão. Os resultados dos ensaios biológicos foram obtidos a partir de três ensaios independentes, em triplicata.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.00. Todos os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA (quantificação de DNA dos fibroblastos), *two-way* ANOVA (absorção de água, quantificação de DNA dos queratinócitos e co-cultura e expressão do Ki-67) e teste-t (propriedades mecânicas). Para *one-way* ANOVA e *two-way* ANOVA, foi



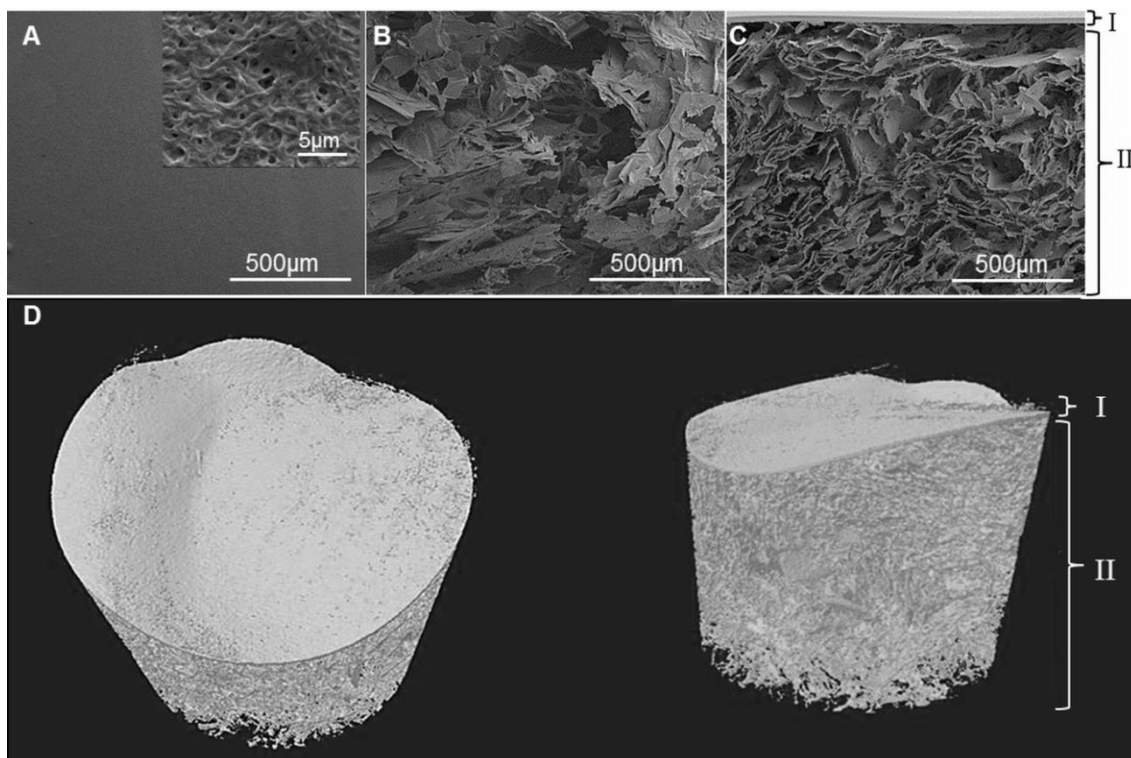
realizado o pós-teste de Bonferroni, sendo considerada diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

### **III.3 Resultados**

#### **III.3.1 Caracterização da matriz bicamada de PHBV**

##### **III.3.1.1 Avaliação morfológica da matriz bicamada de PHBV por MEV e micro-CT**

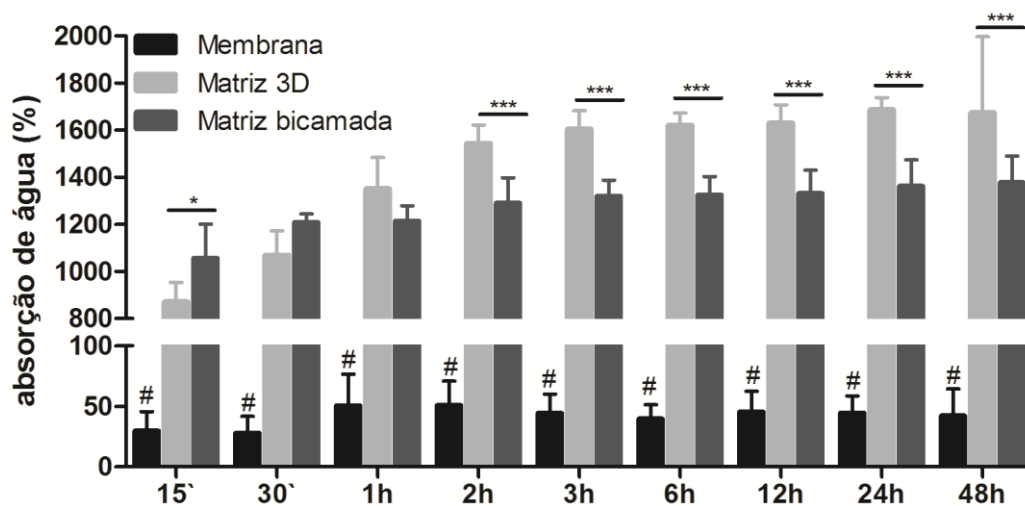
A partir da associação das técnicas de evaporação do solvente e liofilização, foi possível obter uma matriz bicamada constituída de uma fina membrana e uma matriz tridimensional porosa, mimetizado assim, a estrutura original da pele composta por epiderme e derme. Análises por MEV revelaram que a membrana possui uma espessura de  $28.48\mu\text{m} \pm 7.13\mu\text{m}$  e é composta por nanoporos de  $75\text{nm} \pm 19\text{nm}$  (Figura III.2A e C). Por outro lado, a matriz tridimensional é formada por uma estrutura altamente porosa (Figura III.2B). A análise por micro-CT revelou que a matriz tridimensional possui  $82.2\% \pm 0.5\%$  de porosidade e tamanho médio dos poros de  $122.4\mu\text{m} \pm 58.1\mu\text{m}$  (Figura III.2D).



**Figura III. 2:** Caracterização morfológica da matriz bicamada de PHBV. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da membrana (A), matriz tridimensional (B) e corte transversal da matriz bicamada (C), indicando I- membrana e II- matriz tridimensional. Imagem no canto superior direito de (A) representa uma área ampliada destacando a topografia e nanoporosidade da membrana. (D) Reconstrução tridimensional da matriz bicamada de PHBV obtida por micro-CT.

### III.3.1.2 Capacidade de absorção de água

A capacidade de absorção de água da membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada de PHBV foi determinada pelo método gravimétrico (Figura III.3). A membrana apresentou baixa capacidade de absorção de água representada por um aumento de 45% da massa inicial após as primeiras horas de imersão em PBS que se manteve por 48 horas. Ao contrário, a matriz tridimensional e matriz bicamada apresentaram alta capacidade de absorção de água com um aumento na massa inicial de 870% e 1050% nos primeiros 15 minutos de imersão, respectivamente. Entretanto, a matriz bicamada obteve o equilíbrio após 1-2 horas, enquanto que a matriz tridimensional foi capaz de absorver até 1670% da sua massa inicial após 3 horas de imersão.



**Figura III. 3:** Porcentagem de água absorvida ao longo do tempo. # representa diferença significativa entre a membrana e a matriz bicamada e matriz tridimensional no mesmo período de tempo. \* Indica diferença significativa entre a matriz tridimensional e a matriz bicamada. \*  $p < 0.05$ , \*\*\* e #  $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

### III.3.1.3 Ensaio mecânicos

As propriedades mecânicas da membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada foram determinadas com as estruturas secas e imersas em PBS por 3 horas e os resultados estão sumarizados na Tabela II.3. A combinação da membrana com a matriz tridimensional levou à formação de uma estrutura bicamada com maior módulo de elasticidade e tensão máxima e menor limite de ruptura comparado com a matriz tridimensional sozinha. A imersão em PBS não interferiu nas propriedades mecânicas da membrana, e no limite de ruptura da matriz tridimensional e matriz bicamada. Entretanto, após imersão em PBS, a matriz tridimensional reduziu o módulo de elasticidade e tensão máxima, enquanto que a matriz bicamada apenas demonstrou redução no módulo de elasticidade.

**Tabela III. 3: Propriedades mecânicas da membrana, matriz tridimensional e matriz bicamada de PHBV antes e após imersão em PBS.**

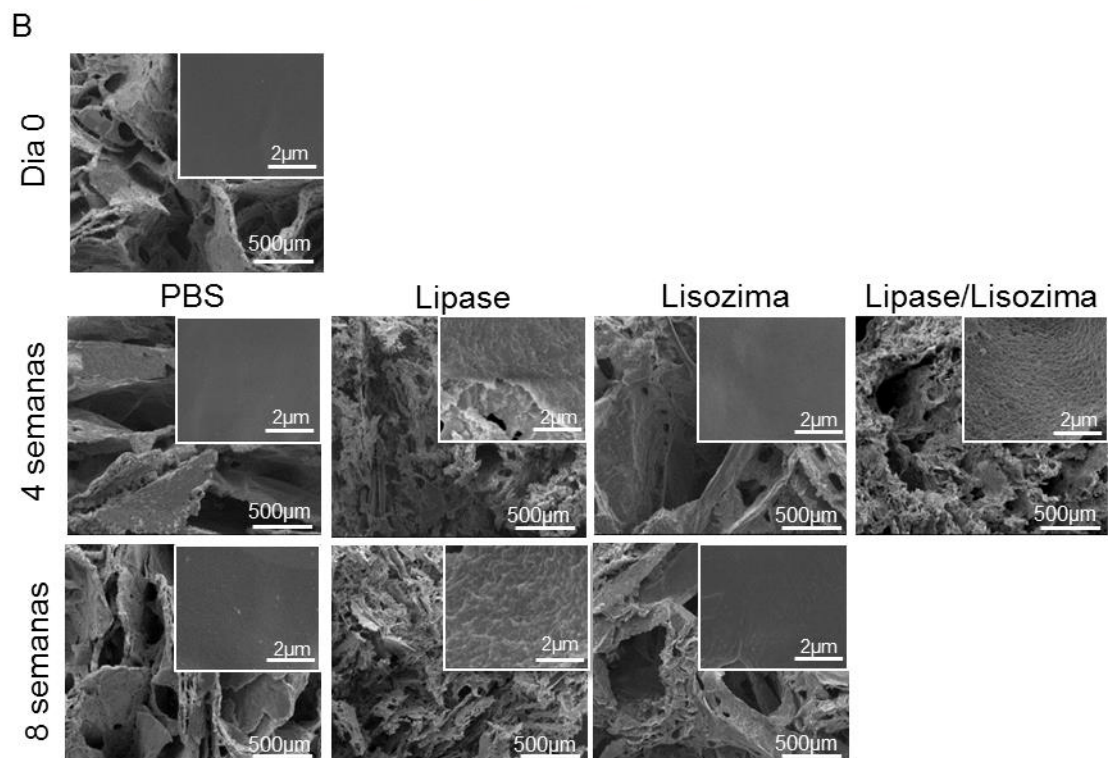
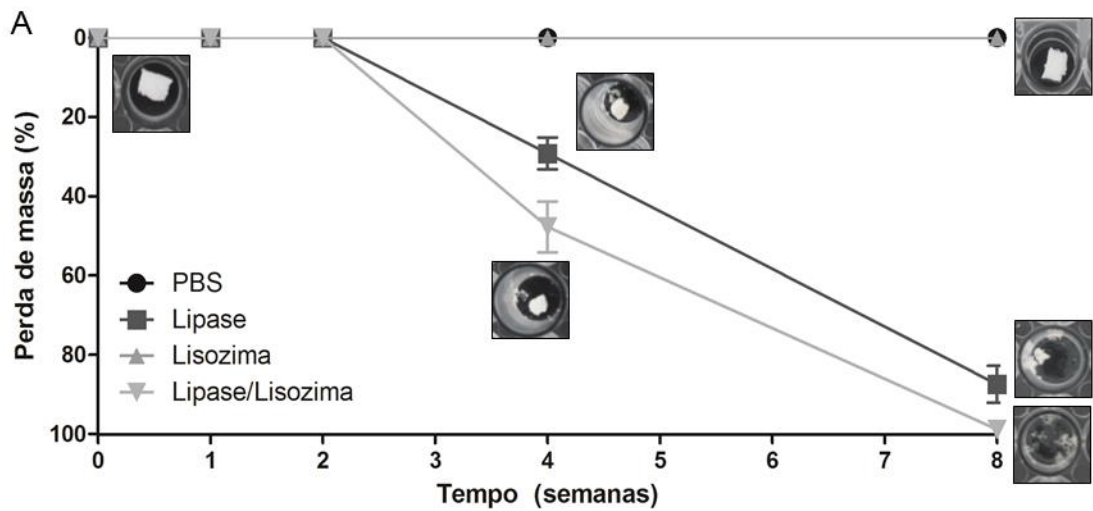
		<b>Módulo de elasticidade (MPa)</b>	<b>Tensão máxima (MPa)</b>	<b>Limite de ruptura (%)</b>
Membrana	Seca	1188 ± 160	22.33 ± 1.23	6.17 ± 1.58
	PBS	1159 ± 217	21.73 ± 5.76	4.79 ± 0.93
Matriz tridimensional	Seca	0.69 ± 0.27 ** $\phi$	0.017 ± 0.003 *** $\phi$	7.93 ± 2.48
	PBS	0.19 ± 0.09 ###	0.007 ± 0.001##	10.70 ± 2.20 #
Matriz bicamada	Seca	10.26 ± 3.00 *	0.23 ± 0.05	4.93 ± 1.84
	PBS	6.01 ± 1.34	0.17 ± 0.08	7.37 ± 1.72

\* Indica diferença significativa na mesma amostra antes e depois da imersão em PBS.

$\phi$  Indica diferença significativa entre a matriz tridimensional e matriz bicamada antes da imersão em PBS. # Indica diferença significativa entre a matriz tridimensional e a matriz bicamada após imersão em PBS. \*, # p<0.05, \*\*,## p<0.01 and \*\*\*, $\phi$ ,### p<0.001, Teste-t.

#### **III.3.1.4 Ensaios de degradação in vitro**

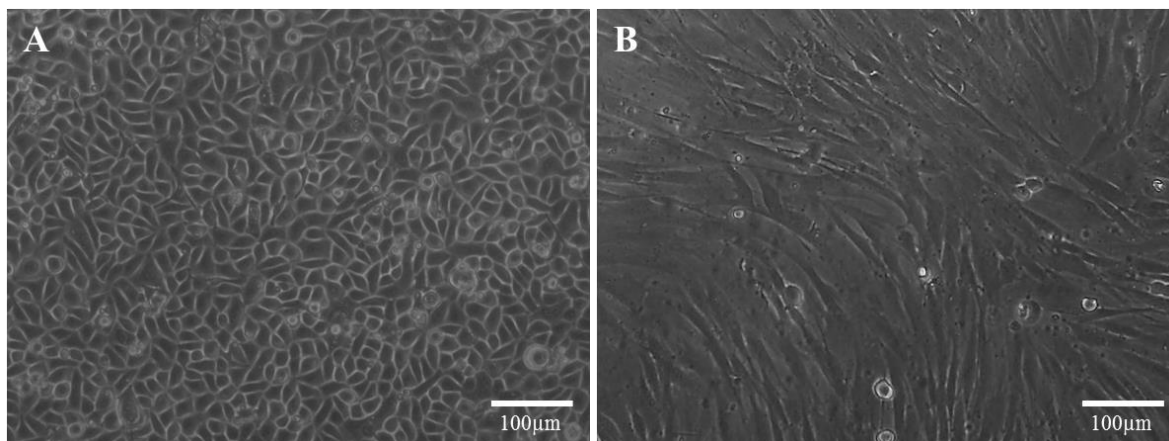
A capacidade da matriz tridimensional de PHBV de sofrer degradação enzimática foi avaliada na presença de lipase e/ou lisozima em concentrações fisiológicas. A porcentagem de massa perdida em diferentes soluções ao longo do tempo está demonstrado na Figura III.4A. Independente da solução, nenhuma variação na massa foi detectada nas primeiras 2 semanas. Após 4 semanas, houve uma redução de 30% da massa inicial nas amostras imersas em lipase e por volta de 50% nas amostras que estavam imersas em lipase/lisozima. Ao final de 8 semanas, as amostras que estavam imersas em lipase/lisozima encontravam-se 100% degradadas e as amostras imersas em apenas lipase tiveram uma redução de 87% da massa inicial. Entretanto, as amostras imersas em solução contendo apenas lisozima ou somente PBS não mostraram nenhuma variação da massa ao longo do experimento. As alterações morfológicas provocadas pela degradação foram investigadas por MEV (Figura III.4B). Modificações morfológicas na superfície da parede dos poros foram observadas nas amostras que estavam imersas em lipase e lipase/lisozima, condições em que foram observadas variação na massa inicial das amostras. Até 2 semanas, nenhuma alteração significativa foi observada em todas as condições. Entretanto, após 4 e 8 semanas, as amostras que foram imersas em lipase apresentaram tamanho de poro reduzido e maior rugosidade na superfície da parede dos poros. O mesmo foi observado nas amostras imersas em lipase/lisozima, mas apenas para 4 semanas uma vez que ao fim de 8 semanas o material encontrava-se completamente degradado, restando apenas pequenos fragmentos da amostra.



**Figura III. 4:** Degradação enzimática da matriz de PHBV. (A) Porcentagem de massa perdida ao longo do tempo. Imagens macroscópicas representam a aparência da matriz em diferentes condições e tempos específicos. (B) Imagens de MEV da superfície da matriz após 4 e 8 semanas imersas em diferentes soluções. Imagens no canto superior direito representam uma área ampliada destacando a topografia da superfície da parede dos poros. Amostras imersas em Lipase/Lisozima após 8 semanas encontravam-se completamente degradadas e por essa razão, não há imagem correspondente à essa condição.

### III 3.2 Extração e cultivo de queratinócitos e fibroblastos

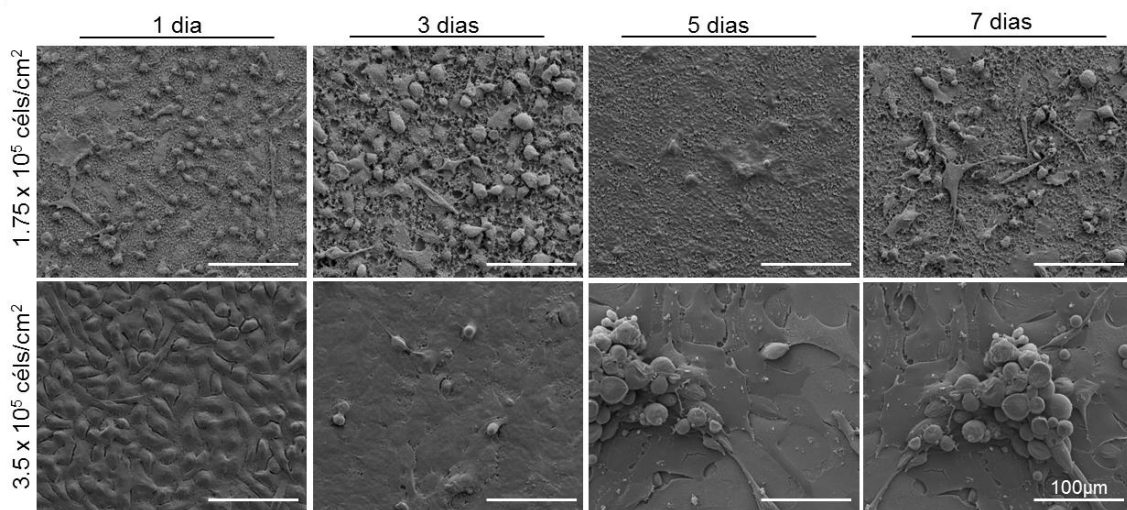
Queratinócitos e fibroblastos foram isolados a partir de amostras de pele humana, epiderme e derme respectivamente. Os queratinócitos apresentaram morfologia poligonal com núcleo central e os fibroblastos apresentaram morfologia fusiforme (Figura III.5).



**Figura III. 5:** Aspecto morfológico dos queratinócitos (A) e fibroblastos (B) isolados a partir da pele humana.

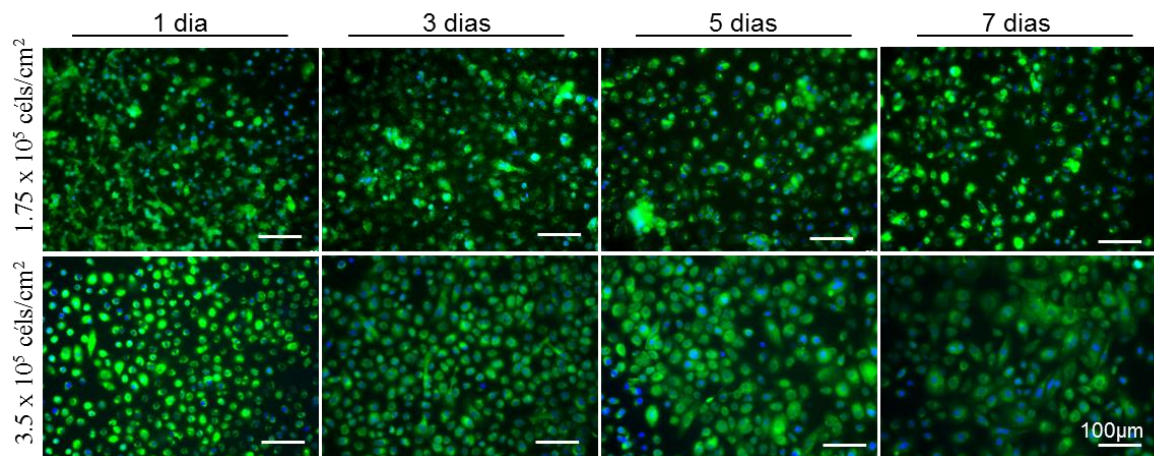
### III.3.3 Avaliação da adesão, viabilidade e proliferação dos queratinócitos à membrana de PHBV

Duas diferentes concentrações de células foram utilizadas para determinar a densidade ótima de queratinócitos para se obter uma monocamada confluenta de células ao final de 3 dias de cultura. Independente do número inicial de células, os queratinócitos foram capazes de aderir à membrana de PHBV após 1 dia (Figura III.6). Quando os queratinócitos foram semeados na concentração de  $3.5 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, uma monocamada de células formou-se após 3 dias de cultura enquanto que na concentração de  $1.75 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> a monocamada formou-se após 5 dias de cultura.



**Figura III. 6:** Avaliação da adesão celular dos queratinócitos à membrana de PHBV por microscopia eletrônica de varredura.

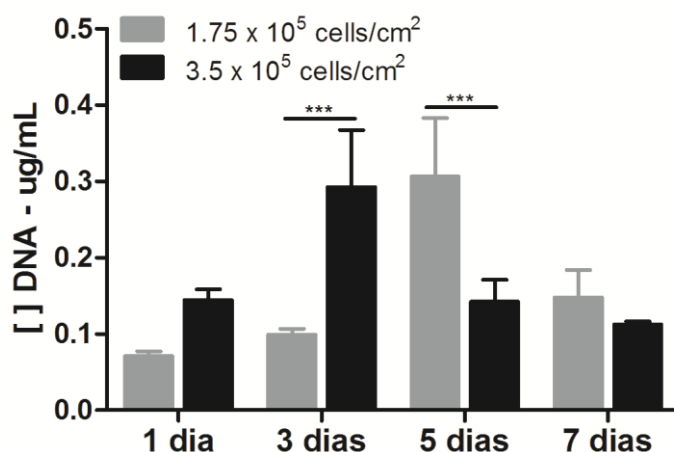
A partir do ensaio de Calceína AM, foi possível demonstrar que os queratinócitos que se encontravam aderidos à membrana de PHBV apresentavam-se viáveis, uma vez que apresentaram a emissão de fluorescência resultante da metabolização do composto Calceína (Figura III.7).



**Figura III. 7:** Viabilidade dos queratinócitos cultivados em diferentes concentrações na membrana de PHBV. Imagens de microscopia de fluorescência, verde: calceína AM, azul: núcleo (DAPI).



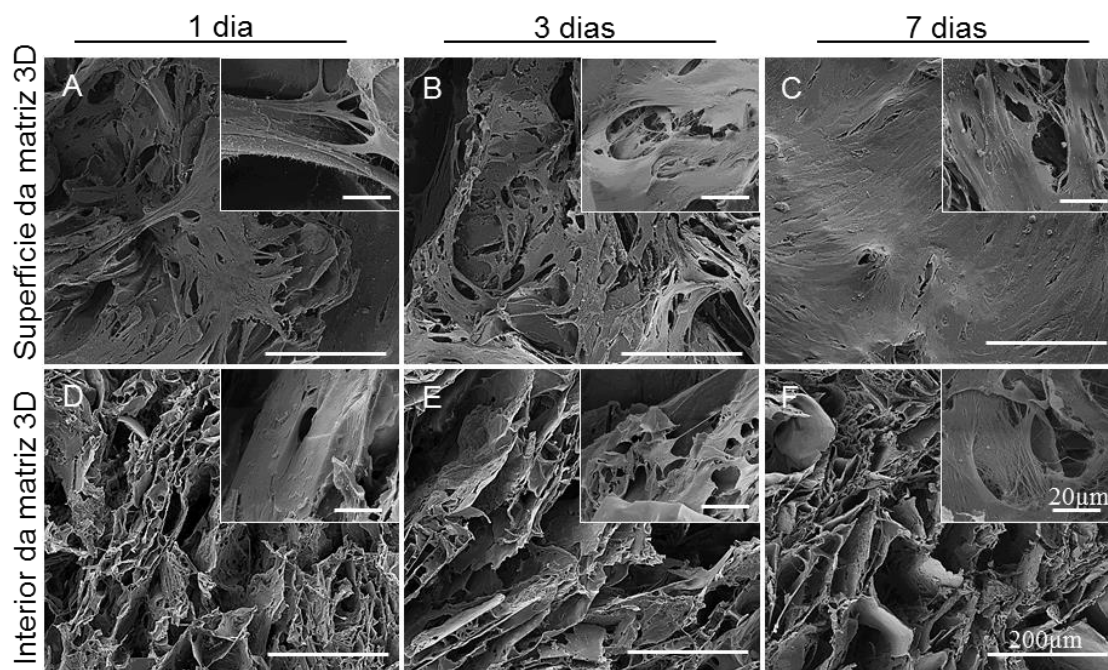
O ensaio de proliferação obtido a partir da quantificação do DNA total confirmou que quando as células foram cultivadas na densidade maior, essas foram capazes de proliferar até 3 dias de cultura (Figura III.8). Entretanto, na concentração menor, as células proliferaram até 5 dia de cultura.



**Figura III. 8:** Representação gráfica da proliferação dos queratinócitos cultivados na membrana de PHBV. \*\*\*  $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

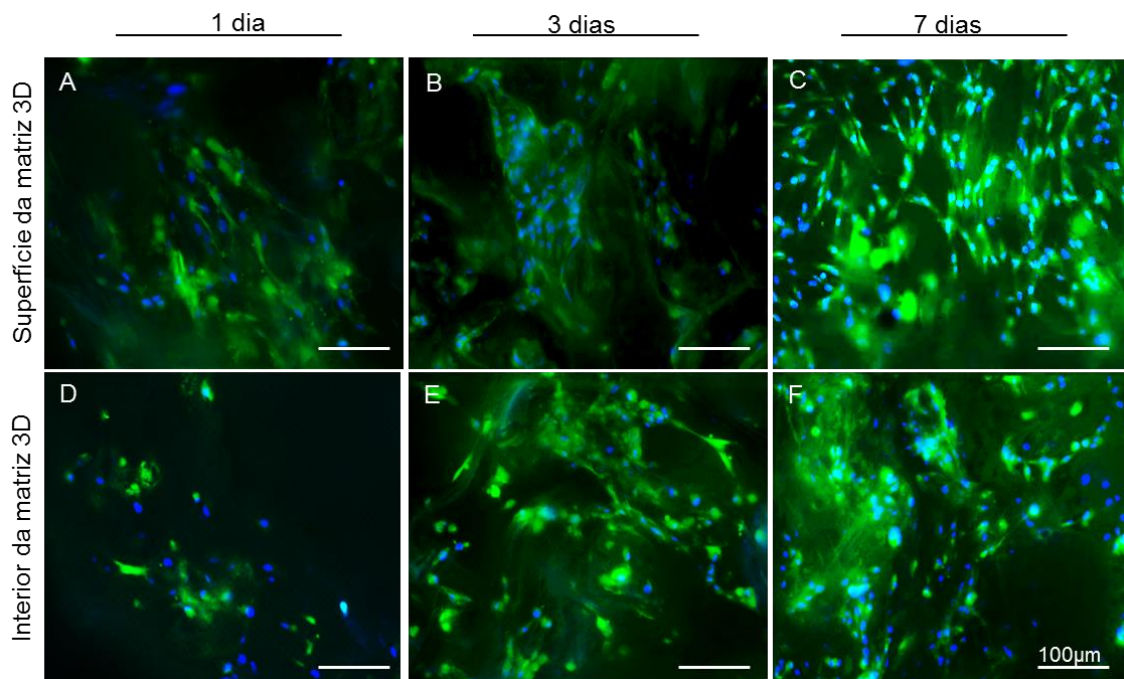
### III.3.4 Avaliação da adesão, viabilidade e proliferação dos fibroblastos à matriz tridimensional de PHBV

A partir das imagens obtidas por MEV, pode-se observar a presença de fibroblastos com morfologia típica aderidos à superfície da matriz tridimensional, a partir de 1 dia de cultivo. Os fibroblastos migraram para o interior da matriz e a partir do terceiro dia de cultivo é possível visualizar células em cortes transversais da matriz. Os fibroblastos permaneceram aderidos à superfície e no interior da matriz tridimensional após 7 dias de cultivo (Figura III.9).



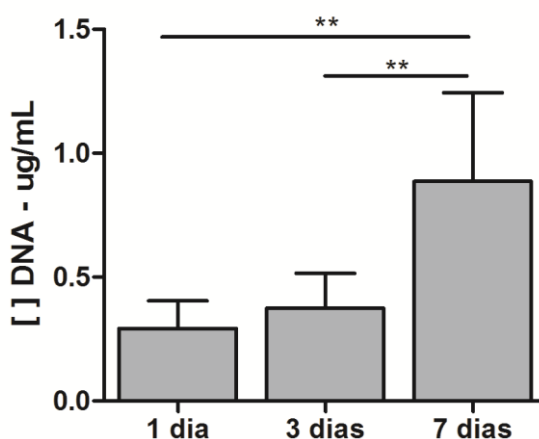
**Figura III. 9:** Avaliação da adesão celular dos fibroblastos à matriz tridimensional de PHBV por microscopia eletrônica de varredura. (A-C) Imagens da superfície da matriz tridimensional. (D-F) Imagens de corte transversal mostrando o interior da matriz tridimensional. (A e D) 1 dia de cultivo, (B e E) 3 dias de cultivo e (C e F) 7 dias de cultivo. Imagens no canto superior direito representam áreas ampliadas destacando a morfologia dos fibroblastos.

A viabilidade dos fibroblastos aderidos à matriz tridimensional de PHBV foi avaliada através do ensaio de Calceína AM tanto para as células aderidas à superfície quanto no interior da matriz. As imagens de fluorescência mostram que as células permaneceram viáveis até 7 dias de cultivo (Figura III.10).



**Figura III. 10:** Viabilidade dos fibroblastos cultivados na matriz tridimensional de PHBV. (A-C) Imagens de microscopia de fluorescência da superfície da matriz tridimensional. (D-F) Imagens de microscopia de fluorescência de corte transversal mostrando o interior da matriz tridimensional. (A e D) 1 dia de cultivo, (B e E) 3 dias de cultivo e (C e F) 7 dias de cultivo. (A-C) Verde: calceína AM, azul: núcleo (DAPI).

A proliferação dos fibroblastos foi comprovada pela quantificação do DNA total nas amostras. Os resultados demonstram um aumento significativo na quantidade de DNA após 7 dias de cultivo (Figura III.11).



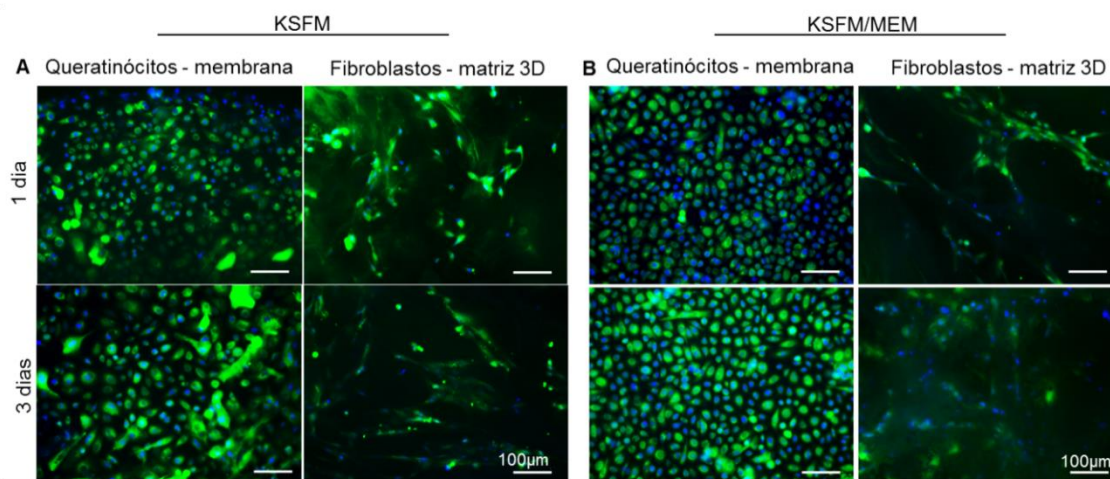
**Figura III. 11:** Representação gráfica da proliferação dos fibroblastos cultivados na matriz tridimensional de PHBV. \*\* p < 0.01, one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

### III.3.5 Co-cultura

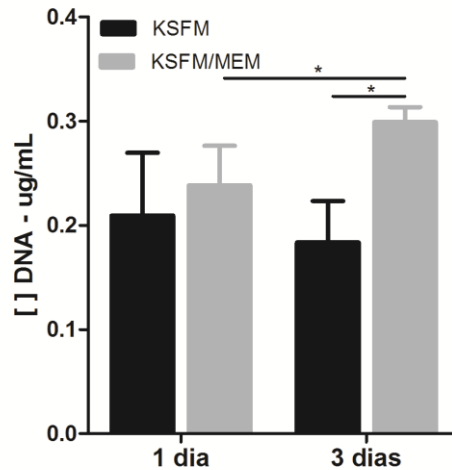
Os dados obtidos com as culturas homotípicas foram utilizados para definir as condições necessárias para desenvolver um modelo de co-cultura que se assemelhe a estrutura da pele (Figura III.1B).

Inicialmente, os queratinócitos foram semeados na membrana e cultivados com meio KSFM, considerado como meio ideal para o cultivo de queratinócitos e que não possui soro na sua composição. Considerando que a ausência de soro poderia ser crítico para a proliferação dos fibroblastos, dois diferentes meios foram testados na co-cultura, KSFM e KSFM/MEM.

Independente do meio de cultura, queratinócitos e fibroblastos foram capazes de aderir às respectivas camadas da matriz bicamada e mantiveram-se viáveis ao longo da cultura, como demonstrado nas imagens obtidas pelo ensaio de Calceína AM (Figura III.12). Os resultados obtidos a partir da quantificação do DNA demonstram que não houve variação na quantidade de DNA das amostras cultivadas após 1 e 3 dias em meio KSFM. Entretanto, as células foram capazes de proliferar no meio KSFM/MEM, confirmado pelo aumento significativo na quantidade de DNA após 3 dias (Figura III.13).

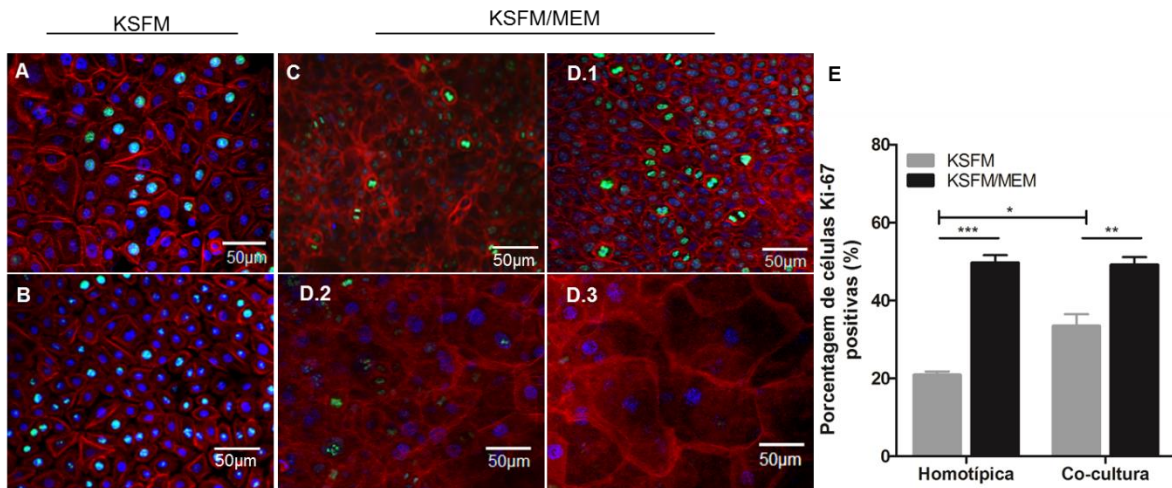


**Figura III. 12:** Análise da viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos em co-cultura. Viabilidade dos queratinócitos e fibroblastos cultivados em meio KSFM (A) e KSFM/MEM (B). Verde: calcéina AM, azul: núcleo (DAPI).



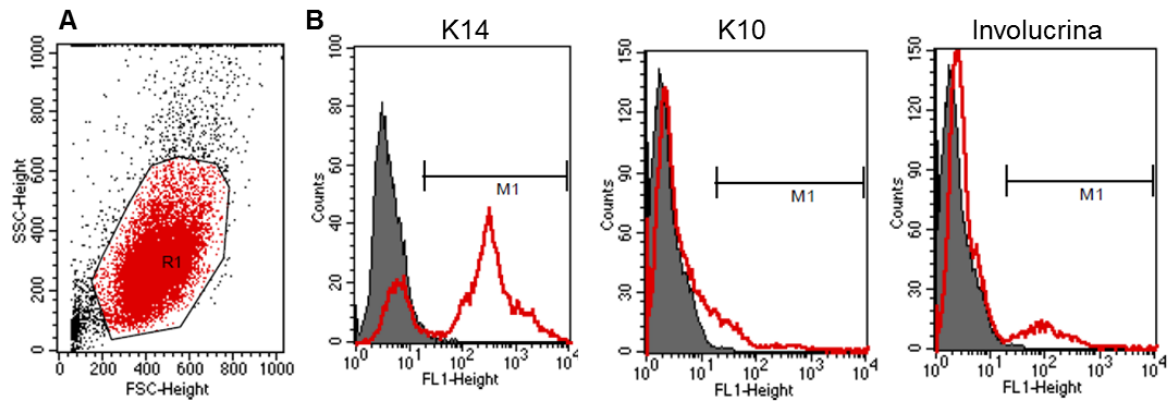
**Figura III. 13:** Representação gráfica da proliferação dos queratinócitos e fibroblastos cultivados em co-cultura na matriz bicamada de PHBV. \*  $p < 0.05$ , *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

A análise do comportamento dos queratinócitos em culturas homotípicas e co-cultura utilizando os diferentes meios demonstrou que embora em ambos os meios ocorra a formação de uma camada confluyente de células, o número total de células e o número de células proliferativas (expressam Ki-67), variou. Quando o meio KSFM foi utilizado, os queratinócitos proliferaram formando uma monocamada em ambas as culturas, homotípica e co-cultura (Figura III.14A e B), mas uma porcentagem significativamente maior de células proliferativas foi encontrada na co-cultura,  $32.76 \pm 4.17\%$  comparando com culturas homotípicas,  $22.18 \pm 3.61\%$  (Figura III.14E). A porcentagem de células proliferativas foi ainda maior quando os queratinócitos foram cultivados em meio KSFM/MEM tanto em cultura homotípicas quanto co-cultura (Figura III.14E). Além disso, os queratinócitos em cultura homotípica continuaram em monocamada enquanto que em co-cultura, os queratinócitos organizaram-se em múltiplas camadas formando uma estrutura semelhante à epiderme (Figura III.14C e D). Um número maior de células apresentando morfologia pequena e cubóide foi observado na camada basal (Figura III.14D.1), enquanto nas camadas superiores as células se tornaram maiores e achatadas (Figura III.14D.3 e D.4). Além disso, praticamente todas as células Ki-67 positivas,  $49.12 \pm 3.48\%$  encontravam-se na camada basal (Figura III.14D.1). Nenhuma célula expressando Ki-67 foi detectada na camada mais superior.



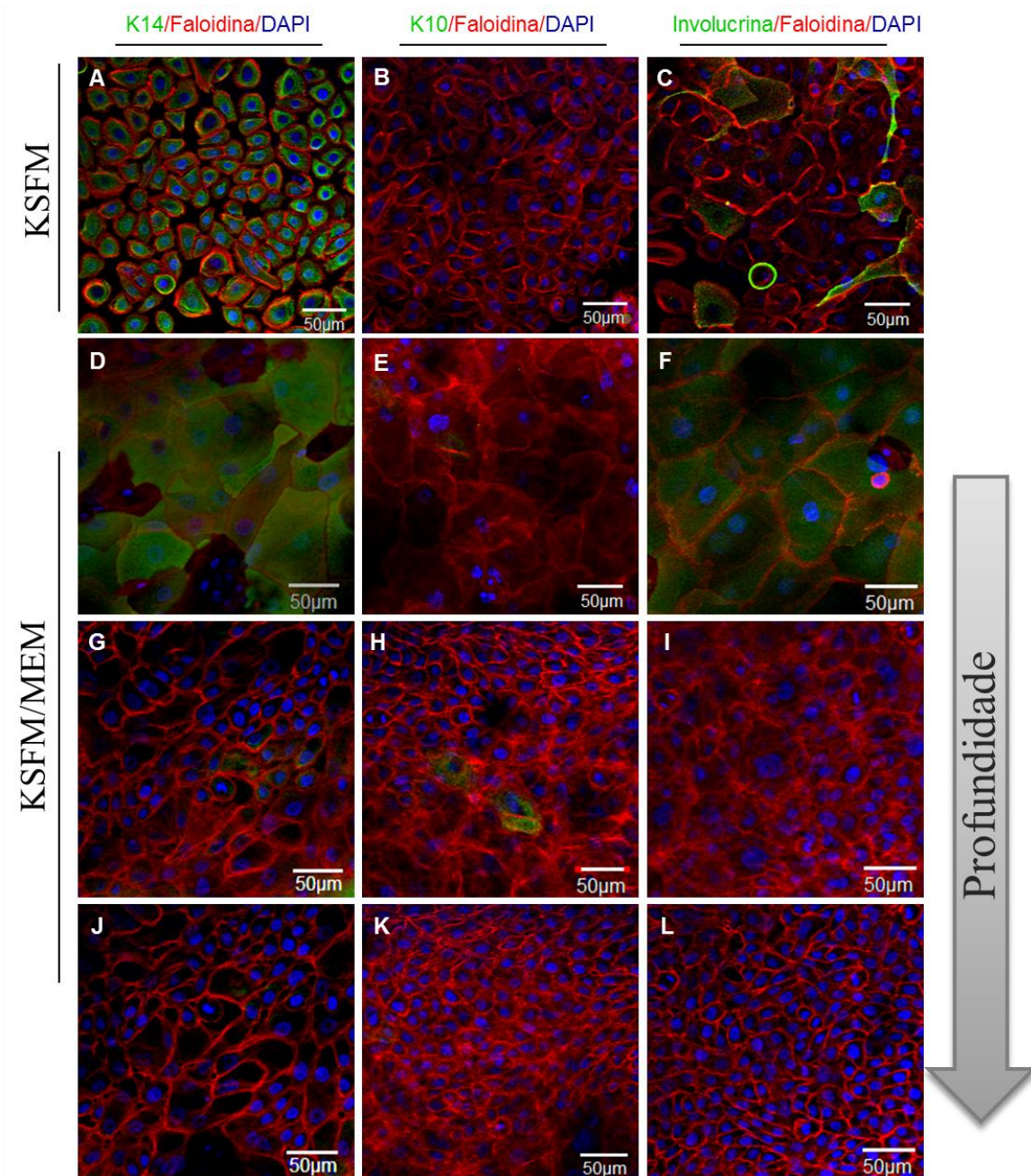
**Figura III. 14:** Análise por imunofluorescência da expressão do marcador Ki-67 pelos queratinócitos após 3 dias de cultivo em diferentes meios e em cultura homotípica e co-cultura. Queratinócitos em cultura homotípica (A) e co-cultura (B) em meio KSFM. Queratinócitos em cultura homotípica (C) e co-cultura (D) em meio KSFM/MEM. Imagens Z-scan da expressão de Ki-67 na camada basal (D.1), subrabasal (D.2) e camada superior (D.3). Verde: Ki-67, vermelho: filamentos de actina (faloidina) e azul: núcleos (DAPI). (E) Representação gráfica da porcentagem de células que expressam Ki-67 em diferentes condições de cultivo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

Levando em consideração a proliferação dos queratinócitos em diferentes camadas com morfologias distintas, a expressão de marcadores referentes à diferenciação dos queratinócitos foi analisada. Análises por citometria de fluxo revelou que a população de queratinócitos utilizada nos ensaios era composta na maioria por células que expressavam K14 ( $54.59 \pm 14.65\%$ ) apenas algumas células expressavam K10 ( $1.03 \pm 0.59\%$ ) e involucrina ( $7.62 \pm 5.75\%$ ) (Figura III.15).



**Figura III. 15:** Análise fenotípica dos queratinócitos por citometria de fluxo. (A) Gráfico de tamanho versus granulosidade, R1 é a população escolhida para análise dos marcadores. (B) Histogramas representativos da expressão dos marcadores. A curva cinza indica o controle negativo da fluorescência e a linha vermelha, apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita indica a existência da marcação.

Após a co-cultura, análises de imunomarcacão das células revelou que quando cultivadas em meio KSFM, a maioria das células continuam expressando K14, nenhuma célula expressa K10 e apenas poucas células expressam involucrina (Figura III.16A-C). Quando cultivados em meio KSFM/MEM, a expressão de K14 e involucrina ficou restrita à camada superior e apenas algumas células expressando K10 foram encontradas na camada suprabasal (Figura III.16D-L).



**Figura III. 16:** Análise por imunofluorescência da expressão dos marcadores K14, K10 e involucrina. Queratinócitos cultivados em co-cultura após 3 dias no meio KSFM (A-C) e KSFM/MEM (D-L). (A, D, G, J) Expressão de K14. (B, E, H, K) Expressão de K10. (C, F, I, L) Expressão de Involucrina. (D-L) Imagens Z-scan mostrando a organização dos queratinócitos em diferentes camadas, (D-F) camada superior, (G-I) camada suprabasal e (J-L) camada basal. Verde: Expressão dos marcadores (K14, K10 e involucrina), vermelho: filamentos de actina (faloidina) e azul: núcleos (DAPI).



### III.4 Discussão

Substitutos de pele produzidos a partir de princípios da engenharia de tecidos representam uma abordagem promissora no combate de feridas agudas e crônicas como queimaduras e úlceras diabéticas (Macneil, 2007). Substitutos bicamada exploram a interação entre os componentes da derme e epiderme no intuito de promover uma resposta funcional durante o processo de regeneração tecidual. Levando isso em consideração, uma matriz bicamada de PHBV composta por uma fina membrana com nanoporos na camada superior e uma matriz altamente porosa na camada inferior foi desenvolvida para recriar análogos da epiderme e derme pela combinação das técnicas de processamento, evaporação do solvente e liofilização. Essa estrutura foi projetada para obter propriedades específicas que são esperadas para não somente modular o comportamento de queratinócitos e fibroblastos através da comunicação entre as camadas, mas também para contribuir na retenção da umidade no local da ferida e para suportar as tensões mecânicas diminuindo a contração da ferida.

A membrana, onde os queratinócitos foram cultivados, apresenta superfície rugosa e composta de nanoporos de tamanho médio de  $75\pm 19\text{nm}$ . Esses poros são importantes para fisicamente separar as células das diferentes camadas, mas permitindo a difusão de nutrientes e comunicação entre fibroblastos e queratinócitos. De fato, a troca de citocinas e fatores de crescimento produzidos por fibroblastos e queratinócitos é crucial para a proliferação e diferenciação de queratinócitos e para a deposição de várias proteínas da membrana basal e hemidesmossomos que controlam a homeostase da epiderme (El Ghalbzouri e Ponec, 2004; El Ghalbzouri *et al.*, 2005).

Por outro lado, a matriz tridimensional produzida por liofilização foi desenvolvida para formar uma estrutura altamente porosa que favoreça a mobilidade dos fibroblastos para o seu interior e subsequente deposição e organização da matriz extracelular. Além disso, é esperado que essa morfologia favoreça a absorção de água, contribuindo significativamente na manutenção da umidade da ferida. A matriz tridimensional demonstrou alta capacidade de absorção de água, com um aumento na massa inicial de 900%

após 15 minutos chegando a 1600% após 2 horas de imersão em PBS. Apesar da baixa capacidade de absorção de água da membrana, e seu impacto sobre a porcentagem total de absorção de água pela matriz bicamada, podemos considerar que a estrutura bicamada possui um alto grau de retenção de água suficiente para manter o ambiente da lesão úmido e favorecer a regeneração (Franco, Nguyen e Lee, 2011). A combinação da rígida membrana com a matriz tridimensional também teve impacto nas propriedades mecânicas da matriz bicamada. Contudo, o caráter mais duro e menos dúctil da matriz bicamada em relação à matriz tridimensional é considerado positivo, uma vez que espera-se que a matriz bicamada resista às tensões mecânicas que ocorrem durante a deposição de tecido fibrótico, diminuindo assim, a contração da ferida (Balaji *et al.*, 2012).

Uma das maiores limitações do uso do PHBV, particularmente para aplicações em engenharia de tecidos é sua lenta degradação hidrolítica (Zhu, Wang e Tong, 2009; Ke *et al.*, 2011; Veleirinho, Ribeiro-Do-Valle e Lopes-Da-Silva, 2011). De fato, não foi constatada nenhuma perda de massa quando as matrizes de PHBV foram imersas em PBS ou lisozima após 8 semanas. Entretanto, a imersão em solução contendo lipase resultou na degradação da estrutura a partir de 2 semanas levando a uma redução de 87% da massa inicial após 8 semanas. A degradação causada pela lipase possivelmente expôs sítios de ligação para lisozima, e quando ambas enzimas foram utilizadas a matriz estava completamente degradada ao fim de 8 semanas. Lipase e lisozima são enzimas presentes tanto em pele saudáveis quanto na fase inflamatória do processo de regeneração (Papini *et al.*, 1982; Jimenez-Acosta, Planas e Penneys, 1990). Em feridas profundas, tais como queimaduras, que causam a inflamação ou necrose do tecido adiposo adjacente à pele, a lipase pode ser secretada por fagócitos mononucleares para facilitar a digestão e eliminação do material lipídico liberado pelos adipócitos danificados (Jimenez-Acosta, Planas e Penneys, 1990). Leucócitos polimorfonucleares também são responsáveis pela liberação de lisozima que possui uma importante ação antimicrobiana na ferida (Niyonsaba e Ogawa, 2005; Charernsriwilaiwat *et al.*, 2012). Os ensaios de degradação *in vitro* foram realizados na presença dessas duas enzimas em concentrações fisiológicas (Hankiewicz e Swierczek, 1974; Tietz e Shuey, 1993). Sendo assim,

considerando que ocorra um processo inflamatório resultante da lesão do tecido, a concentração de ambas as enzimas pode estar elevada e espera-se que a degradação *in vivo* inicie precocemente.

O principal objetivo desse trabalho foi obter um análogo de pele que possa ser utilizado como um modelo de pele *in vitro* ou como um substituto autólogo. Do ponto de vista clínico, uma das principais limitações dos substitutos de pele celulares consiste no tempo necessário para se expandir as células do próprio paciente (Elliott e Vandervord, 2002) que é agravado pelo tempo adicional necessário para se obter análogos da epiderme e derme *in vitro*. Tendo isso em vista, propomos uma estratégia de co-cultura que permite a cobertura completa da membrana por queratinócitos e a colonização parcial da matriz tridimensional por fibroblastos após 4 dias de cultivo. A membrana de PHBV demonstrou ter adequadas propriedades para suportar a adesão e proliferação de queratinócitos, corroborando estudos anteriores (Ji, Li e Chen, 2008), e a partir disso foi possível determinar uma concentração ótima de 350.000 células por  $\text{cm}^2$  para se obter uma camada confluenta de células após 3 dias em culturas homotípicas e 4 dias em co-cultura. A partir de uma biópsia de pele de  $1\text{cm}^2$ , é possível recuperar 1 milhão de queratinócitos após 1 semana em cultura (Morimoto *et al.*, 2001; Souto *et al.*, 2006). Diversos estudos utilizando matrizes bicamada, reportam a necessidade de se utilizar 1 milhão de queratinócitos por  $\text{cm}^2$  para se obter uma estrutura estratificada semelhante à epiderme após 14-21 dias de cultura (Powell e Boyce, 2009; Kempf *et al.*, 2011; Ng e Ikeda, 2011). Entretanto, utilizando a matriz bicamada de PHBV foi possível diminuir o número de células necessárias e, conseqüentemente, aumentar o rendimento das amostras de biópsia de pele.

A presença de fibroblastos na matriz tridimensional proporcionou aos queratinócitos da camada superior, para além do meio de cultura, os sinais bioquímicos necessários para manter as células em um estado altamente proliferativo. Além disso, os queratinócitos em co-cultura foram capazes de diferenciar e organizar em estruturas semelhantes à epiderme, o que não foi observado em culturas homotípicas. Já foi demonstrado que os fibroblastos possuem um papel essencial no crescimento e diferenciação de queratinócitos (Sawicki *et al.*, 2005; Boehnke *et al.*, 2007) e que a presença de soro, cálcio ou ambos, também pode induzir esse processo (Riva *et al.*, 2007; Metallo *et al.*,

2010; Tu e Bikle, 2013). Essas observações estão de acordo com os resultados obtidos que mostram claramente um rearranjo e variação na expressão fenotípica dos queratinócitos dependente da presença de fibroblastos e soro estabelecido pela co-cultura em meio KSFM/MEM. Nessa condição, os queratinócitos se organizaram morfológicamente, células menores e cubóides estavam presente na camada basal enquanto nas camadas superiores as células se tornaram maiores e achatadas. A medida que os queratinócitos migram da camada basal essas células perdem a capacidade de divisão celular e se tornam terminalmente diferenciadas (Powell e Boyce, 2009). Em nosso sistema de co-cultura, células proliferativas (Ki-67 positivas) só foram detectadas na camada basal, enquanto na camada mais superior foi detectada a expressão de involucrina, precursor do envelope de cornificação que forma a barreira de proteção contra infecção, desidratação e agentes químicos (Carroll *et al.*, 1993; Powell, Supp e Boyce, 2008). Entretanto, a expressão de K14, um marcador de queratinócitos da camada basal, foi detectada nas células da camada superior. Possivelmente, maiores tempos de cultivo e exposição ao ar (interface líquido-ar) seriam necessários para se obter uma epiderme madura e 100% estratificada (Souto *et al.*, 2006).

Embora não se tenha atingido uma estrutura semelhante à epiderme completamente estratificada, a presença da involucrina, na camada superior, pode ser benéfico para a implantação *in vivo* por fornecer mais rapidamente uma barreira contra agentes externos.

### III.5 Conclusões

Matrizes bicamada de PHBV foram projetadas e desenvolvidas através da combinação das técnicas de evaporação do solvente e liofilização que permitiram o desenvolvimento de uma membrana e uma matriz tridimensional com características distintas. A combinação dessas características, tais como susceptibilidade à degradação enzimática, capacidade de retenção de água e diferentes propriedades mecânicas, permitiu atingir um sistema aperfeiçoado que pode contribuir para uma melhor regeneração da pele. As propriedades da matriz bicamada favoreceram o desenvolvimento de análogos de epiderme e derme que levaram para um particular rearranjo dos queratinócitos com organização semelhante à epiderme. Esses resultados demonstram que a matriz bicamada de PHBV tem potencial para ser aplicado como substituto de pele ou como um modelo de pele *in vitro*.

## **Capítulo IV**

**Avaliação do potencial de regeneração tecidual da pele utilizando a matriz bicamada de PHBV associada com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.**

## IV.1 Introdução

Lesões agudas e crônicas podem levar a perda excessiva da pele e comprometer a homeostase do organismo, representando um problema de saúde pública mundial. Para se atingir a completa regeneração da pele é necessário que ocorra uma sequência de mecanismos biológicos e moleculares incluindo migração e proliferação celular, deposição de matriz extracelular, angiogênese e remodelação (Martin, 1997). Embora pequenas lesões cutâneas possam ser regeneradas sem o uso de enxertos, em casos de extensas lesões de espessura total é necessária uma intervenção rápida e eficaz para proteger o organismo, promover a regeneração e evitar o excesso de cicatrização (Singer e Clark, 1999).

Substitutos de pele produzidos a partir dos princípios da engenharia de tecidos são uma alternativa promissora aos autoenxertos tradicionais, que são eficazes, mas limitados pela disponibilidade de áreas sadias do doador (Shevchenko, R. V., James, S. L. e James, S. E., 2010).

Diversas matrizes produzidas a partir de polímeros naturais tem sido desenvolvidas com o intuito de guiar o crescimento celular promovendo um ambiente adequado para a regeneração tecidual (Chlapanidas *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2013). Membranas de PHBV produzidas principalmente pela técnica de *electrospinning* têm sido exploradas para o uso em lesões cutâneas demonstrando elevadas taxas de regeneração tecidual (Han *et al.*, 2007; Kuppan, P. *et al.*, 2011; Veleirinho *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Keshel *et al.*, 2013). No entanto, o potencial de regeneração a partir de matrizes bicamada de PHBV ainda não foi investigado.

A utilização de matrizes bicamada composta por uma camada superior mais densa e uma matriz tridimensional porosa pode favorecer o processo de regeneração. A camada superior exerce a função de um curativo protegendo o local da lesão de agentes externos (infecção) e evitando a perda de fluidos e temperatura. Enquanto isso, a matriz tridimensional mantém a umidade da ferida e permite o influxo de células, proliferação celular e a vascularização (Wang *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2013).

Diversos estudos tem demonstrado que a utilização de células-tronco mesenquimais em lesões agudas e crônicas resulta em melhor regeneração

tecidual, com redução na formação de cicatriz, fechamento mais rápido da lesão e recuperação das propriedades elásticas da pele (Shokrgozar *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2013). Por serem isoladas a partir de um procedimento simples, com menor morbidade e de um tecido relativamente abundante, as células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC) representam uma atraente fonte celular (Zuk *et al.*, 2001b). Essas células são capazes de secretar fatores angiogênicos, favorecendo a neovascularização (Rehman *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2013). Além disso, secretam citocinas e quimiocinas que atraem células do hospedeiro e modulam a resposta inflamatória (Kim *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Maxson *et al.*, 2012).

No capítulo anterior, uma matriz bicamada de PHBV foi produzida, caracterizada e cultivada com queratinócitos e fibroblastos para ser utilizada como substituto de pele. Nesse capítulo, optou-se por explorar o potencial terapêutico já reconhecido das células-tronco mesenquimais. Dessa forma, ASC foram cultivadas na matriz bicamada de PHBV e a avaliação do potencial de regeneração da pele foi realizada em um modelo de excisão produzido no dorso de ratos. As ASC foram isoladas de ratos transgênicos para a proteína verde fluorescente (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) para dessa forma, poderem ser rastreadas após o implante.

## **IV.2 Materiais e métodos**

### **IV.2.1 Animais**

Todos os ensaios utilizando animais estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), protocolo 168/2013 (Anexo 5).

Foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Lewis (LEW-Tg (EGFP) F455.5/Rrrc) cujas matrizes foram adquiridas do *Rat Resource and Reserach Center*, Universidade de Missouri, Estados Unidos.



#### **IV.2.2 Meio de cultura basal**

Foi utilizado como meio basal o meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de estreptomicina/mL e 0.25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco).

O pH do meio foi ajustado para 7.2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0.22µm (Millipore).

#### **IV.2.3 Isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo**

Para o isolamento das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC) foram utilizados ratos (n=3), fêmeas, com massa corporal de aproximadamente 250g, da linhagem Lewis (LEW-Tg (EGFP) F455.5/Rrrc) com o fenótipo +/-, expressam a proteína verde fluorescente EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*).

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e banhados com álcool 70% para evitar contaminação. Na câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o peritônio dos animais foi exposto e a gordura inguinal retirada e colocada em tubo de 50mL contendo meio DMEM. Posteriormente, o tecido foi submetido à digestão enzimática em solução contendo PBS com 0.15% de colagenase tipo I (Gibco), por 1 hora em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. No decorrer deste período, a cada 15 minutos, os tubos contendo o tecido e a solução de colagenase foram vigorosamente agitados. Após esse tempo, a digestão foi interrompida pela adição de DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino em volume igual ao contido na preparação. A suspensão de células foi centrifugada a 1400 rpm, por 10 minutos, a 10°C. Ao final da centrifugação o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado, e o precipitado contendo a fração estromal vascular foi suspenso em meio de cultura basal.

A cada dois dias o meio de cultura foi trocado e as células foram lavadas com PBS, para a remoção das células não aderentes. Quando as células atingiram a confluência, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS

e tratadas com 1 mL de 0.05% tripsina-EDTA (Gibco) por 5 minutos. A ação da tripsina foi inativada com 3mL de meio basal e essa suspensão foi dividida em dois novos frascos de cultura. As células foram utilizadas para a realização dos experimentos na 4ª passagem.

#### **IV.2.4 Caracterização fenotípica por imunocitoquímica**

As ASC foram caracterizadas por imunocitoquímica através da análise da presença das moléculas de superfície celular CD54, CD73 e CD90, que são marcadores expressos em células-tronco mesenquimais. Para verificar a existência de contaminações da cultura com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45.

As células ASC foram cultivadas sobre lamínula em placa de 6 poços, na densidade de  $1 \times 10^5$  células/poço. Após 48 horas as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e foi feita a permeabilização da membrana plasmática utilizando-se PBS/Triton-100X 0.1%, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min) e foi feito o bloqueio da reação com PBS/BSA 1% e soro fetal de cabra 5%, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas, por 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1%, tabela IV.1. Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min), e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de camundongo, Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) diluído em PBS/BSA 1%, 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o anticorpo secundário.

Posteriormente, as células foram incubadas com a sonda Hoechst, 0.2 µg/mL, por 20 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS (3 vezes/10min) e a montagem das lâminas com *Hydromount* (National Diagnostics).

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss 510 Meta) utilizando-se o programa LSM Image Browser (Zeiss).

**Tabela IV. 1: Anticorpos primários utilizados para a caracterização fenotípica das ASC.**

<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Clone</b>	<b>Espécie</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>CD54</b>	monoclonal	1A29	camundongo	BD Pharmingen	1:50
<b>CD73</b>	monoclonal	5F/B9	camundongo	BD Pharmingen	1:50
<b>CD90</b>	monoclonal	HIS51	camundongo	BD Pharmingen	1:50
<b>CD34</b>	monoclonal	ICO115	camundongo	Santa Cruz	1:50
<b>CD45</b>	monoclonal	69/CD45	camundongo	BD Transduction	1:50

#### **IV.2.5 Caracterização fenotípica por citometria de fluxo**

As ASC na densidade de  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com anticorpos primários, Tabela IV.1 por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de camundongo, Alexa Fluor 555, 1:500 (Molecular Probes), por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas com PBS e depois fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada. A obtenção dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA) utilizando-se o programa CELLQuest. Foram adquiridos 15.000 eventos e os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

#### **IV.2.6 Diferenciação osteogênica**

Para verificar se as ASC são capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade

$1 \times 10^5$  células/poço. A indução da diferenciação ocorreu através do cultivo em meio de cultura específico: meio de cultura basal suplementado com 50µg/mL de ácido ascórbico (Ecibra), 10mM de β-glicerofosfato (Sigma) e  $10^{-8}$ M de dexametasona (Achè). Células cultivadas em meio basal foram mantidas como controle. Após 21 dias, as células foram fixadas em formaldeído 4% por 1 hora à temperatura ambiente e submetidas à coloração de Von Kossa. Após fixação, as células foram incubadas por 30 minutos no escuro com nitrato de prata a 5%. Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada e expostos à luz ultra-violeta por uma hora. A secreção de matriz extracelular calcificada foi confirmada pela presença de nódulos de mineralização com coloração marrom a preto, observado em microscópio óptico.

#### **IV.2.7 Diferenciação adipogênica**

Para verificar se as ASC são capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços na densidade  $1 \times 10^5$  células/poço. A indução da diferenciação ocorreu através do cultivo em meio de cultura específico: meio de cultura basal suplementado com 0.1µM de dexametasona (Achè), 50µM indometacina (Sigma), 100UI insulina (Lilly) e 0.5mM isobutilmetilxantina (Sigma). Células cultivadas em meio basal foram mantidas como controle. Após 21 dias, as células foram fixadas em formalina 10% por 1 hora à temperatura ambiente e submetidas à coloração de Oil Red-O. Após fixação as células foram incubadas com solução de Oil Red-O 0.5% em isopropanol e, em seguida, foram feitas lavagens com água destilada. Oil Red-O é um corante de lipídeos neutros e a diferenciação adipogênica foi confirmada pela coloração dos lipídeos estocados no interior das células e observado em microscópio óptico.

#### **IV.2.8 Colonização *in vitro* da matriz bicamada de PHBV por ASC**

A matriz bicamada de PHBV foi produzida conforme descrito no Capítulo III, item III.2.1. A matriz bicamada foi cortada em fragmentos de 12mm de diâmetro e 2mm de espessura que foram esterelizados por irradiação gama, a

15K Gy, por 30 minutos. A irradiação foi feita no CDTN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear- UFMG).

As matrizes bicamada de PHBV foram distribuídas em placas de 24 poços, com a porção da matriz tridimensional voltada para cima, sendo disposta uma matriz por poço. Em seguida,  $1 \times 10^6$  células foram semeadas sobre a matriz. A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para que ocorresse a adesão celular na matriz. Após a incubação, acrescentou-se a cada poço, 1 mL de meio de cultura basal. As matrizes foram cultivadas por 3 dias e em seguida foram utilizadas nos ensaios *in vivo*. Antes da implantação das matrizes, estas foram lavadas cuidadosamente com PBS estéril para prevenir a transferência de fatores de crescimento derivados do meio e imunógenos.

#### **IV.2.9 Análise da adesão e morfologia celular através de imunofluorescência**

Para verificar a adesão e morfologia das ASC à matriz de PHBV foi realizado o ensaio de imunofluorescência utilizando-se a sonda Faloidina alexa fluor 647 (Mollecular Probes) que se liga aos filamentos de actina e a sonda Hoechst (Mollecular Probes) que se liga ao núcleo.

Após a colonização da matriz pelas ASC, essas foram mantidas em cultivo com meio de cultura basal por 3 dias. As células sobre a matriz foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, foram realizadas três lavagens com PBS e foi feita a permeabilização da membrana celular, utilizando-se PBS/Triton-100X 0.1%, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS (3 vezes/5min). Em seguida, as células foram incubadas com a sonda Faloidina, 0.2 µg/mL por 1 hora e, logo após, com a sonda Hoechst, 0.2 µg/mL, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após as incubações foram feitas novas lavagens com PBS (3 vezes/10min).

As matrizes foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss 5 Live) utilizando-se o programa Zen (Zeiss).

#### IV.2.10 Procedimento cirúrgico

Para a avaliação do potencial de regeneração da pele utilizando matrizes bicamada de PHBV cultivadas com ASC foram realizadas excisões de 12mm de diâmetro na pele do dorso de ratos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Lewis (LEW-Tg (EGFP) F455.5/Rrrc) com o fenótipo -/-, não expressam a proteína verde fluorescente EGFP.

Foram utilizados 24 animais, machos, com idade variando entre 60 e 75 dias, pesando em média 250 gramas na data do experimento inicial.

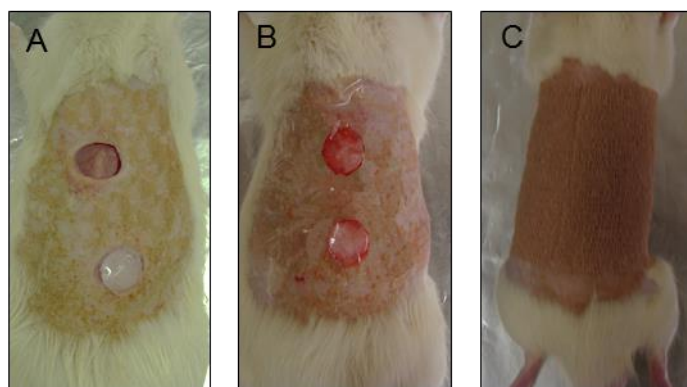
Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no biotério, dentro de gaiolas individuais de policarbonato autoclaváveis, de 30 a 50 cm de tamanho, com maravalha autoclavada (121°C/30min), recebendo alimentação sólida e água filtrada.

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com solução cetamina 10% (0.1mL/100g) e cloridrato de xylazina 2% (0.1mL/100g), via intraperitoneal. Foi realizada a tricotomia da região e assepsia com PVPI (solução de iodo a 10%). Posicionado em decúbito ventral e com o auxílio de um punch de 12mm, 2 feridas foram criadas no dorso do animal. Os implantes foram colocados nos devidos grupos (Tabela IV.2) e a ferida foi coberta com uma película protetora (Tegaderm, 3M). Além disso, uma atadura elástica (Nexcare, 3M coban) foi utilizada para prevenir que os animais retirassem as matrizes do local das feridas. O procedimento cirúrgico está ilustrado na figura IV.1. Após o procedimento, os animais foram mantidos sob o efeito de lâmpadas de aquecimento por um período de 6 horas antes de retornarem para as condições de temperatura, ventilação e iluminação controlados. Durante todo período do ensaio, os animais foram observados diariamente para garantir a recuperação pós-operatória.

Os animais foram avaliados após 7, 14, 21 e 28 dias da cirurgia. Para cada tempo foram criados 4 feridas para cada grupo totalizando 16 feridas por grupo: controle (o local da excisão foi deixado vazio), PHBV (no local da excisão colocou a matriz bicamada de PHBV) e PHBV+ASC (no local da excisão colocou a matriz bicamada de PHBV colonizada com ASC).

**Tabela IV. 2: Grupos Experimentais**

Número de animais	Defeito Superior	Defeito Inferior
8	Controle (vazio)	PHBV
8	Controle (vazio)	PHBV+ASC
8	PHBV	PHBV+ASC



**Figura IV. 1:** Representação do procedimento cirúrgico. (A) Duas excisões foram realizadas no dorso dos animais. Após os implantes, os defeitos foram cobertos com uma película protetora (B) e com atadura elástica (C).

#### **IV.2.11 Avaliação do tamanho da ferida**

Ao final de cada tempo, o tamanho das feridas foi mensurado com o auxílio de um paquímetro. Imagens digitais foram feitas e a área da ferida foi calculada utilizando a medição do paquímetro e o programa de análise de imagens, ImageJ.

#### **IV.2.12 Análise histológica**

Após os tempos determinados, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. O implante extraído foi dividido ao meio e metade do implante foi fixado em paraformaldeído 4% e incluído em paraplast (Sigma) para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Foram feitos cortes transversais de 5µm de espessura e corados por Hematoxilina e Eosina (H&E) e Tricrômico de Masson. Imagens de H&E (4 secções/animal, aumento de 2x) foram analisadas utilizando o programa

ImageJ para mensurar a espessura total da nova pele formada (Sun *et al.*, 2011). Para a quantificação dos vasos, 6 a 8 imagens de Tricômico de Masson foram capturadas no aumento de 40X representando toda a região do implante e analisadas no programa ImageJ. Os resultados apresentam a média do número de vasos/campo para cada grupo (Lee *et al.*, 2009)

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico e analisados estatisticamente por one-way ANOVA (dados não paramétricos) e pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Foi considerada diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

#### **IV.2.13 Avaliação da presença de células EGFP por imunofluorescência**

A fim de se determinar a presença das células implantadas no local da ferida, alguns implantes, após a fixação em paraformaldeído 4%, foram lavados com PBS e incubados em soluções de sacarose 20% e 40% por duas horas cada. Em seguida, os implantes foram embebidos em solução de inclusão para criostato (*OCT compound, Tissue-Tek*) e imediatamente congelados à  $-70^{\circ}\text{C}$ . Utilizando um criostato (Leica), cortes histológicos de  $5\mu\text{m}$  de espessura foram realizados e utilizados para análises por imunofluorescência. A emissão da fluorescência verde natural das células foi confirmada com a utilização de um anticorpo específico para a proteína EGFP. Primeiramente os cortes foram lavados em PBS (3 vezes/5min) para remoção da solução de inclusão (OCT). Em seguida, foi realizado o bloqueio da reação com PBS/BSA 1%, soro fetal de cabra 5% e triton-100X 0.2%, por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados, por 1 hora à temperatura ambiente, com anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1% (policlonal de coelho anti-GFP, 1:1000, Abcam). Após incubação com anticorpo primário, os cortes foram novamente lavados com PBS (3 vezes/5min), e, em seguida, foram incubados com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de coelho, Alexa Fluor 555 (Molecular Probes) diluído em PBS/BSA 1%, 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o anticorpo secundário.

Posteriormente, os cortes foram incubados com a sonda Hoechst,  $0.2\mu\text{g/mL}$ , por 20 minutos para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas



novas lavagens com PBS (3 vezes/10min) e a montagem das lâminas com *Hydromount* (National Diagnostics).

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas no Microscópio Confocal (Zeiss 5 Live) utilizando-se o programa Zen (Zeiss).

#### **IV.2.14 Quantificação relativa de transcritos gênicos**

Após os tempos determinados, a metade dos implantes que não foram utilizadas para análises histológicas foram imediatamente congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da expressão de transcritos gênicos relacionados a regeneração da pele pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

##### **IV.2.14.1 Extração de RNA**

A extração do RNA total foi feita utilizando 1mL do reagente Trizol (Gibco) para cada 50-100mg de tecido previamente congelado. Em seguida o tecido foi macerado e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram então adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio (Merck) e a solução foi vigorosamente agitada por cerca de 20 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 12.000 rpm e  $4^{\circ}\text{C}$ . A fase aquosa e incolor, situada na parte superior do tubo, foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico (Merck). Os tubos foram então incubados à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  por aproximadamente 1 hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 12.000 rpm e  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol (Merck) 75% gelado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 7.500 rpm e  $4^{\circ}\text{C}$ . Então, descartou-se novamente o sobrenadante e, após seco à temperatura ambiente, o precipitado formado foi suspenso em 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , ultra pura e esterilizada. Por fim, a suspensão foi homogeneizada a  $58^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos.

A concentração do RNA total obtido foi então determinada pela leitura da absorbância a 260/280nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). A relação

entre as leituras realizadas a 260 e a 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de pureza do referido RNA. Foi considerada pura, as amostras em que estavam com a relação entre 1.8 e 2.0.

#### **IV.2.14.2 Síntese do DNA complementar**

Para certificar que as amostras de RNA isolado não estavam contaminadas com DNA, foi feito um tratamento com DNase anterior a síntese do DNA complementar (cDNA). O tratamento com DNase foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, Promega.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o *Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas). O RNA total (1.3µg) foi incubado com 0.5µg de oligo(dT)<sub>18</sub>, a 65°C por 5 minutos e, em seguida, as amostras foram colocadas no gelo. Logo após, foi adicionado às amostras, 5X Reaction buffer, 20 unidades Ribolock™ Ribonuclease inhibitor, 10mM dNTP mix, e foram incubadas a 37°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 unidades da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV RT e as amostras foram incubadas por 60 minutos a 42°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C por 5 minutos.

#### **IV.2.14.3 Elaboração de oligonucleotídeos (primers)**

Para as reações de PCR em Tempo Real, foram elaborados, com o auxílio do programa *PrimerExpress* versão 3.0 (Applied Biosystems), um par de oligonucleotídeos específicos para cada gene de interesse. Os parâmetros utilizados pelo programa *PrimerExpress* para a elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular variasse entre 50 e 200 pares de base (pb), apresentasse teor de GC entre 30 e 60%, não apresentasse complementaridade entre si ou mesmo estruturas secundárias estáveis e apresentasse temperatura de anelamento de 60°C.

**Tabela IV. 3: Sequências dos oligonucleotídeos (primers) utilizados nas reações de PCR em Tempo Real**

<b>Gene e número de acesso (NCBI)</b>	<b>Sequência (5'- 3')</b>	<b>Tamanho do fragmento (pb)</b>
Colágeno I NM_053304.1	TGCCGATGTCGCTATCCA	80
	TCTTGCAGTGATAGGTGATGTTCTG	
Colágeno III NM_032085.1	CCAGAACATTACATACCACTGCAA	77
	TCAGAGACTTCTTTACATTGCCATTG	
bFGF NM_019305.2	GCGACCCACACGTCAAATA	107
	CAGCCGTCCATCTTCCTTCA	
VEGF NM_031836.2	AAATCCTGGAGCGTTCCTGTG	106
	AACGCGAGTCTGTGTTTTTGC	
TGF- $\beta$ 1 NM_021578.2	GACCGCAACAACGCAATCTA	90
	CACTGCTTCCCGAATGTCTGA	
TGF- $\beta$ 3 NM_013174.2	TACTGCTTCCGCAACTTGG	93
	AGGTTTCGTGGACCCATTTCC	
$\alpha$ -SMA NM_031004.2	AAGGCCAACCGGGAGAAAA	127
	CAGAGTCCAGCACAATACCAGTTGT	
EGFP EU056364.1	ACGACGGCAACTACAAGACC	95
	GTCCTCCTTGAAGTCGATGC	
GAPDH NM_017008.4	TGCACCACCAACTGCTTA	177
	GGATGCAGGGATGATGTTC	

#### **IV.2.14.4 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real**

O cDNA produzido foi utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real. Esta técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou de um corante fluorescente, na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em triplicata, foram realizadas utilizando-se os cDNA produzidos, primers específicos para cada gene analisado e o reagente *SyberGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, tampão, Taq Ampli-Gold), continha o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição a amostra. Todo procedimento para a PCR em tempo real foi feito na plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando-se 45 ciclos de 15 seg a 95°C para desnaturação, 1 min a 60°C para anelamento e 1 min a 75°C para extensão, seguido de mais 10 min a 75°C para o término da reação. Os resultados foram apresentados pelo programa SDS 2.4 (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado Ct (*cycle threshold*). Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e conseqüentemente, menor é o Ct.

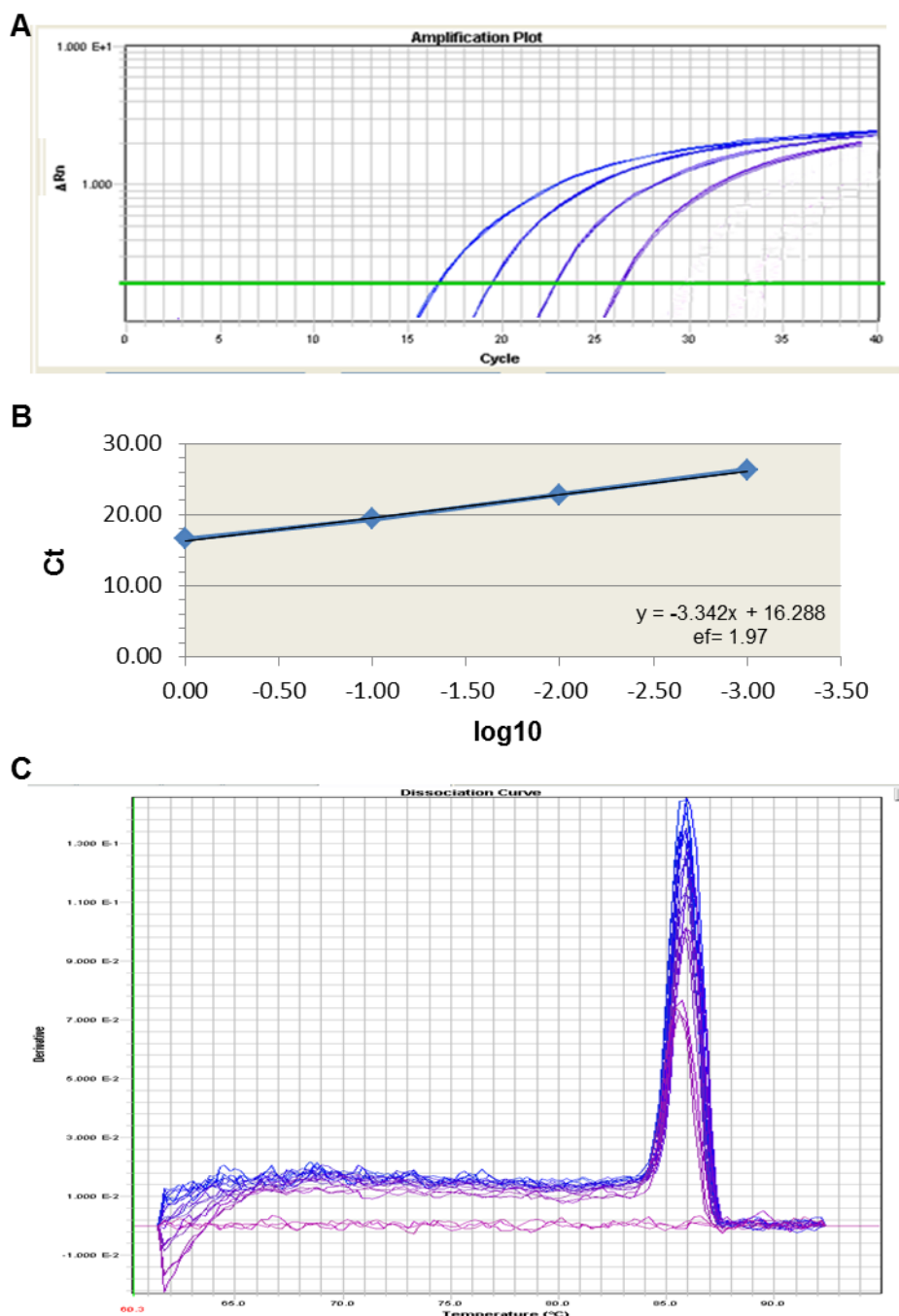
#### **IV.2.14.5 Determinação da eficiência de amplificação dos primers**

A eficiência de amplificação para os primers utilizados (tabela IV.1) foi estimada por meio de reações de Real Time, contendo cDNA submetido a diluições seriadas de 4 vezes (1, 1:10, 1:100 e 1:1000) (Figura IV.2A). Para cada par de primers, foi utilizada uma amostra de cDNA controle (pele normal de rato). As reações foram realizadas em triplicatas para cada uma das quatro diluições das amostras de cDNA. A partir dos Ct obtidos, foi possível determinar os valores de eficiência de amplificação para cada par de primers utilizados.

Com os valores dos Ct foi construída uma curva-padrão, onde a média dos Ct obtidos, em cada concentração, variava em função do logaritmo da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta obtida (a, em  $y=ax+b$ ) foi utilizado para cálculo da eficiência da amplificação dos primers, obtida através da seguinte fórmula:  $ef = 10^{-1/a}$  (sendo ef = eficiência, a = coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1.80 e 2.10 (Figura IV.2B).

#### **IV.2.14.6 Especificidade da amplificação**

A especificidade da amplificação pôde ser verificada pela temperatura de desnaturação do produto amplificado, que depende de seu tamanho e constituição de nucleotídeos. A temperatura teórica foi predita pelo programa *Primer Express* (Applied Biosciences), e experimentalmente, foi determinada ao final do programa de amplificação, em protocolo de dissociação, que constituiu em aumento gradativo de temperatura de 60°C a 95°C. A temperatura de desnaturação é aquela em que se observou queda brusca de fluorescência, ocasionada pela separação das duas fitas e liberação do intercalante. Assim, a especificidade da amplificação foi verificada a partir de uma única temperatura de dissociação para cada segmento gênico amplificado em todas as amostras testadas. Em todos os resultados obtidos foi observado somente um pico na curva de dissociação, sugerindo a presença de somente um fragmento de DNA amplificado (Figura IV.2C).



**Figura IV. 2:** Exemplo da padronização das reações de PCR em tempo real. (A) Resultado das amplificações com emprego dos primers para o gene codificador do GAPDH. É possível observar as curvas de amplificação referentes a cada diluição de cDNA testada. É notável a relação inversa existente entre a quantidade de cDNA empregada na reação e o valor alcançado de Ct. (B) Regressão linear baseada nas médias dos Cts para amplificações relativas ao gene GAPDH. No gráfico, as unidades do eixo x representam o logaritmo de diluições seriadas de 4 vezes. (C) Curvas de dissociação contínua obtidas para os transcritos relativos ao gene GAPDH. É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico, cuja média da temperatura de dissociação está entre 85 e 87°C.

#### **IV.2.14.7 Reações**

Após todas as padronizações, as reações realizadas continham 10µL do reagente SyberGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1.25ng de amostra de cDNA e 1µL de cada primer (100pmoles/µL), perfazendo um volume final de 20µL.

#### **IV.2.14.8 Análise dos dados**

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a genes chamados calibradores. Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Os níveis relativos do mRNA alvo foram normalizados de acordo com o controle endógeno GAPDH. A expressão foi avaliada com base no constitutivo (GAPDH) e no calibrador (pele normal), a partir do Ct destes grupos para cada gene testado.

A análise foi feita a partir da média aritmética do Ct de cada triplicata, utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{gene}) - Ct(\text{GAPDH})] - [Ct(\text{calibrador}) - Ct(\text{GAPDH})]$ .

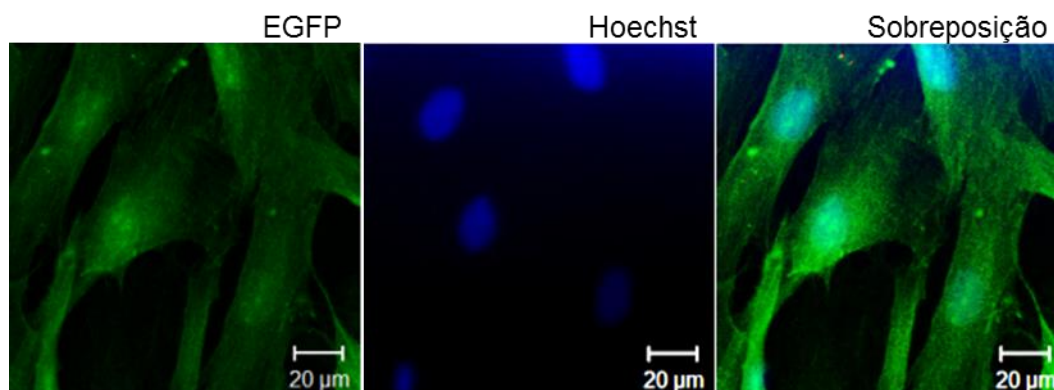
Os resultados foram plotados na forma de gráfico e analisados estatisticamente por *two-way* ANOVA (dados não paramétricos) e pós-teste de Bonferroni, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Foi considerada diferença significativa quando  $p < 0.05$ .

### **IV.3 Resultados**

#### **IV.3.1 Isolamento e caracterização das ASC**

As ASC foram extraídas de ratos transgênicos isogênicos da linhagem Lewis que expressam EGFP em todos os seus tecidos. Esses ratos possuem alterações genéticas caracterizadas pela presença do vetor lentivírus, contendo o gene EGFP sob controle do promotor da ubiquitina C. Essa proteína é facilmente detectada em células ou tecidos vivos, congelados ou fixados com alta sensibilidade e especificidade. Através de microscopia de fluorescência

confocal foi possível detectar a fluorescência verde emitida pelas células. Além disso, as ASC isoladas eram aderentes ao plástico e apresentaram morfologia característica, fusiforme com núcleo central e alguns prolongamentos (Figura IV.3).

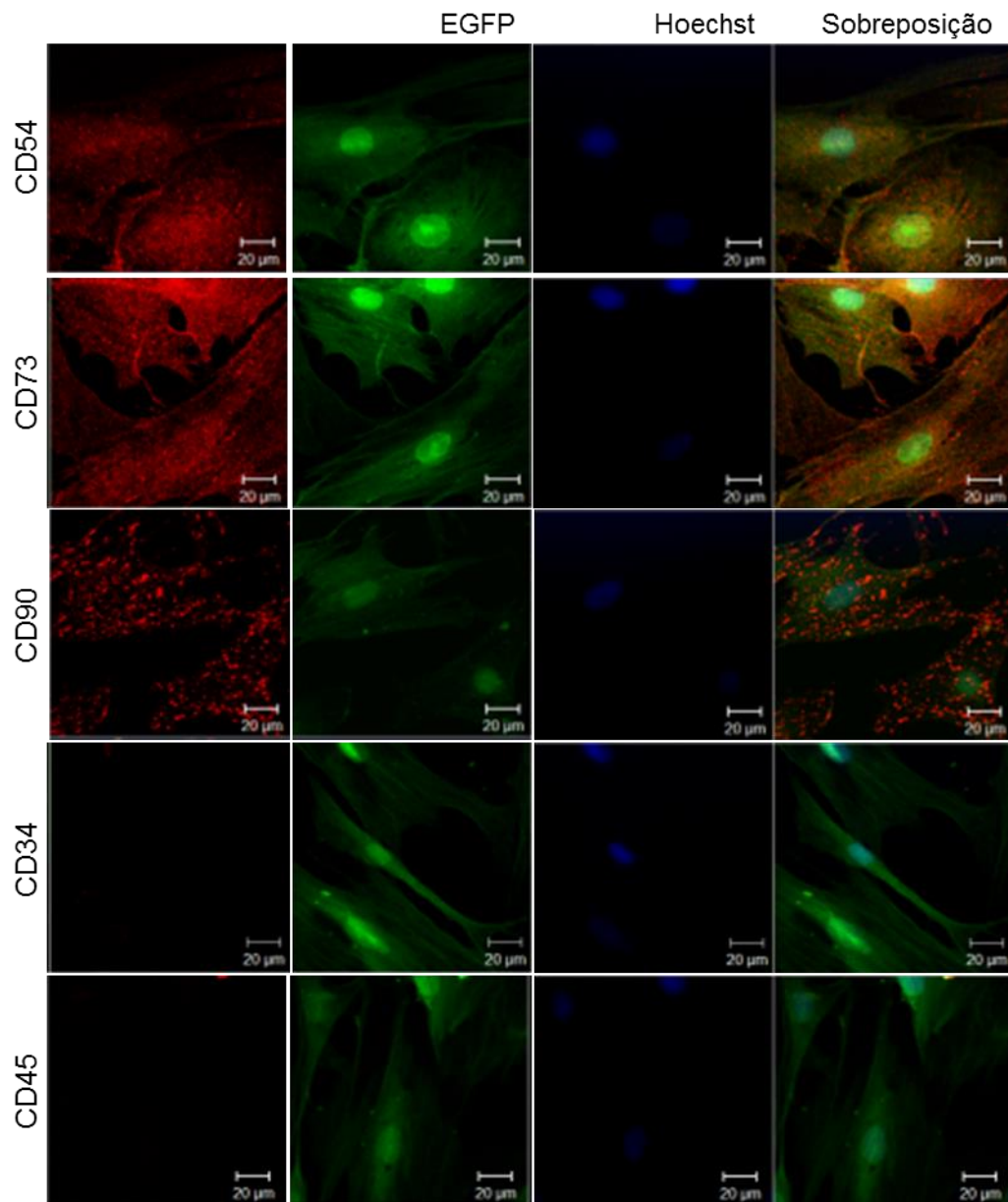


**Figura IV. 3:** Aspecto morfológico das ASC. Imagem de microscopia confocal mostrando a detecção da fluorescência verde emitida pela proteína EGFP. Os núcleos foram marcados com a sonda Hoechst (azul).

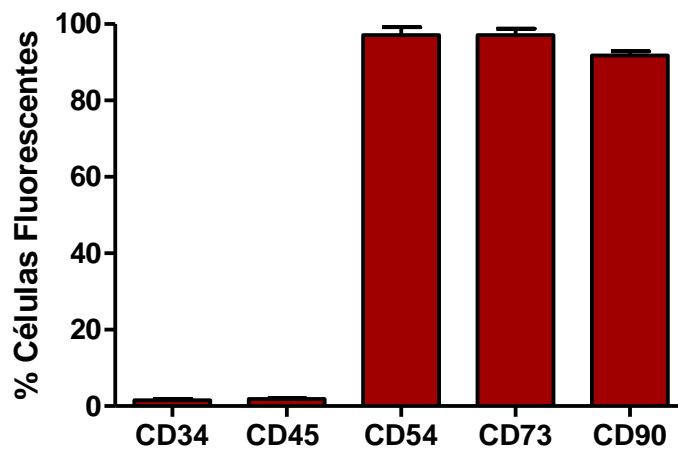
Para serem consideradas como sendo células-tronco mesenquimais, a população celular deve apresentar a expressão de antígenos de superfície específicos bem como serem capazes de se diferenciar em pelo menos duas linhagens específicas (Dominici *et al.*, 2006; Camassola *et al.*, 2012).

A confirmação do fenótipo das ASC foi feita pela técnica de imunocitoquímica e citometria de fluxo nas células na 4ª passagem. As imagens de microscopia de fluorescência confocal demonstram que as células em cultura expressam os marcadores de células-tronco mesenquimais CD54, CD73 e CD90 e não expressam os marcadores de células-tronco hematopoiéticas CD34 e CD45. Análises por citometria de fluxo confirmaram que acima de 90% das células expressam CD54 ( $97.13 \pm 2.05$ ), CD73 ( $97.10 \pm 1.65$ ) e CD90 ( $91.80 \pm 1.08$ ) enquanto que menos de 2% expressam CD34 ( $1.53 \pm 0.36$ ) e CD45 ( $1.87 \pm 0.14$ ) (Figura IV.5).



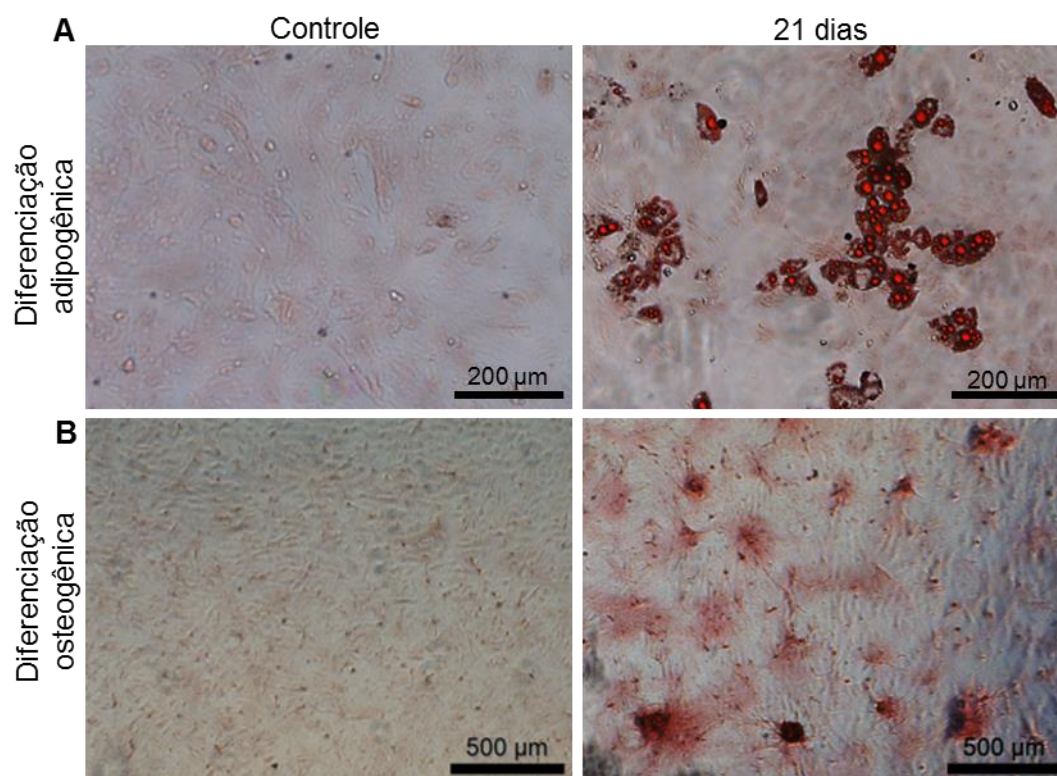


**Figura IV. 4:** Análise fenotípica das ASC por imunocitoquímica. As ASC expressam os marcadores CD54, CD73 e CD90 (vermelho) e não expressam os marcadores CD34 e CD45. Em verde é possível observar a fluorescência emitida pela proteína EGFP. Os núcleos foram marcados com a sonda Hoechst (azul).



**Figura IV. 5:** Análise fenotípica das ASC por citometria de fluxo. Representação gráfica do percentual de células fluorescentes para cada marcador de superfície.

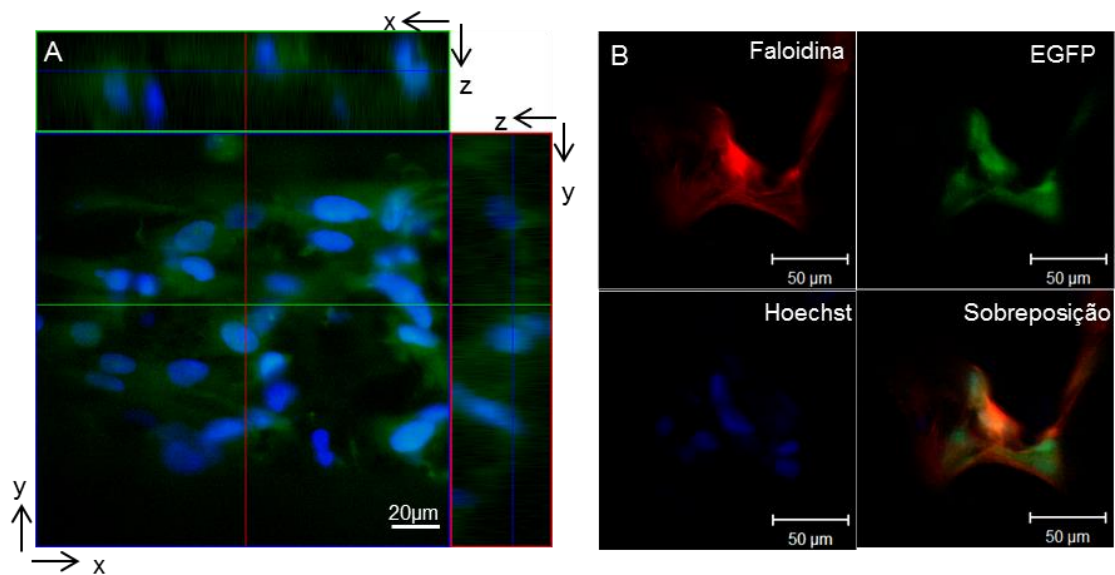
O potencial de diferenciação das ASC nas linhagens adipogênica e osteogênica foi confirmado pela coloração de Oil Red-O e Von Kossa, respectivamente. As imagens de Oil Red-O demonstram que após 21 dias de cultivo em meio específico, as células foram capazes de produzir e estocar lipídeos no citoplasma (Figura IV.6A). A formação de nódulos de mineralização, visualizados pela coloração de Von Kossa, comprovam que as ASC foram capazes de se diferenciarem na linhagem osteogênica quando devidamente estimuladas por 21 dias (Figura IV.6B).



**Figura IV. 6:** Avaliação do potencial de diferenciação das ASC. (A) Imagens da coloração Oil Red-O. (B) Imagens da coloração Von Kossa.

### IV.3.2 Avaliação da adesão das ASC à matriz bicamada de PHBV

No intuito de determinar se as ASC estariam aderidas à matriz PHBV após 3 dias de cultura e anterior a implantação nos animais, realizou-se ensaios de imunofluorescência. Através de microscopia confocal, foi possível observar as células aderidas à matriz pela fluorescência verde emitida pela proteína EGFP (Figura IV.7A). Devido a irregularidade da superfície da matriz, células foram observadas em diferentes profundidades. Após a adesão, as células mantiveram a morfologia típica fibroblastóide, conforme observado pela marcação dos filamentos de actina pela sonda faloidina (Figura IV.7B).



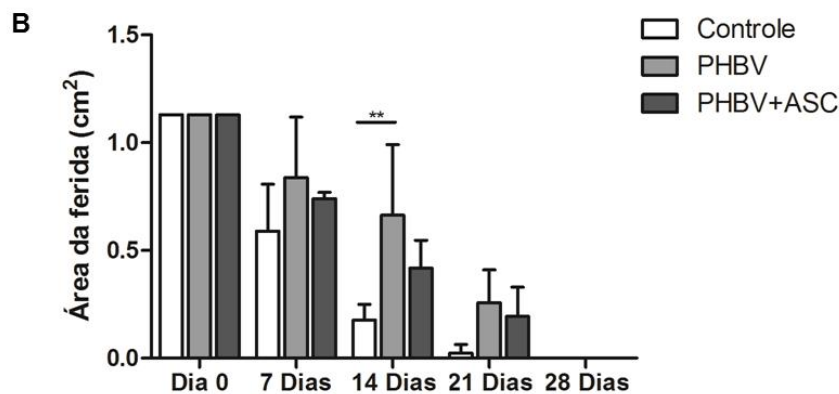
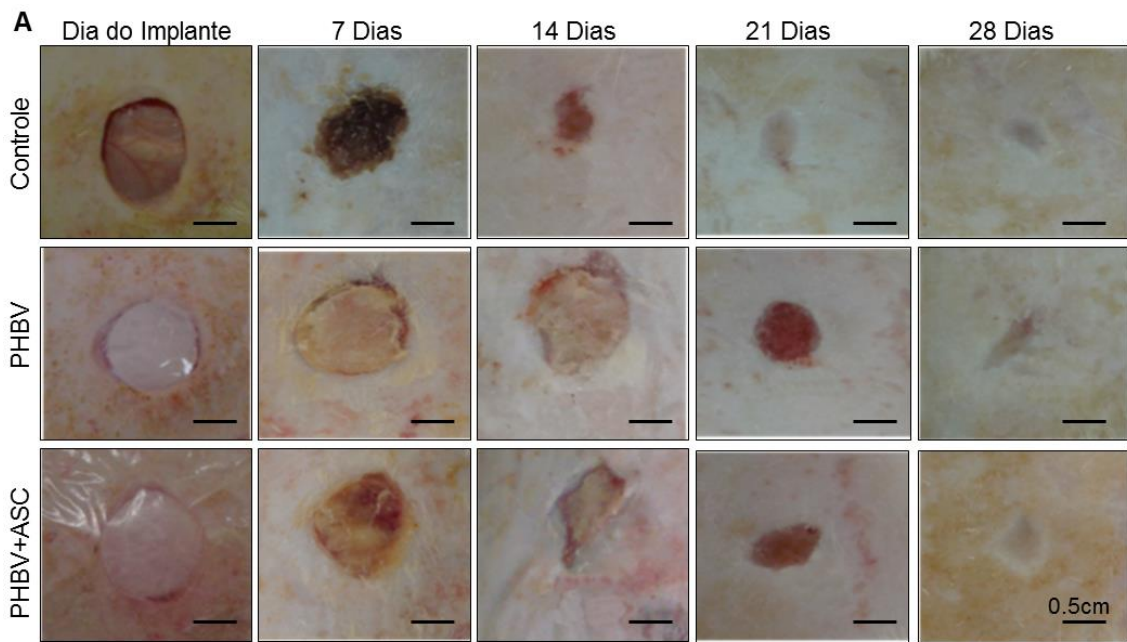
**Figura IV. 7:** Microscopia Confocal das ASC aderidas na matriz bicamada de PHBV. (A) Secção XY demonstrando a presença de células em diferentes camadas. (B) Marcação com Faloidina confirmou a morfologia fibroblastóide das células.

### IV.3.3 Avaliação *in vivo*

#### IV.3.3.1 Análise macroscópica

Para verificar o potencial da matriz PHBV colonizada ou não com células ASC de promover a regeneração da pele, foram realizadas excisões de 12mm de diâmetro no dorso de ratos que não expressam a proteína EGFP.

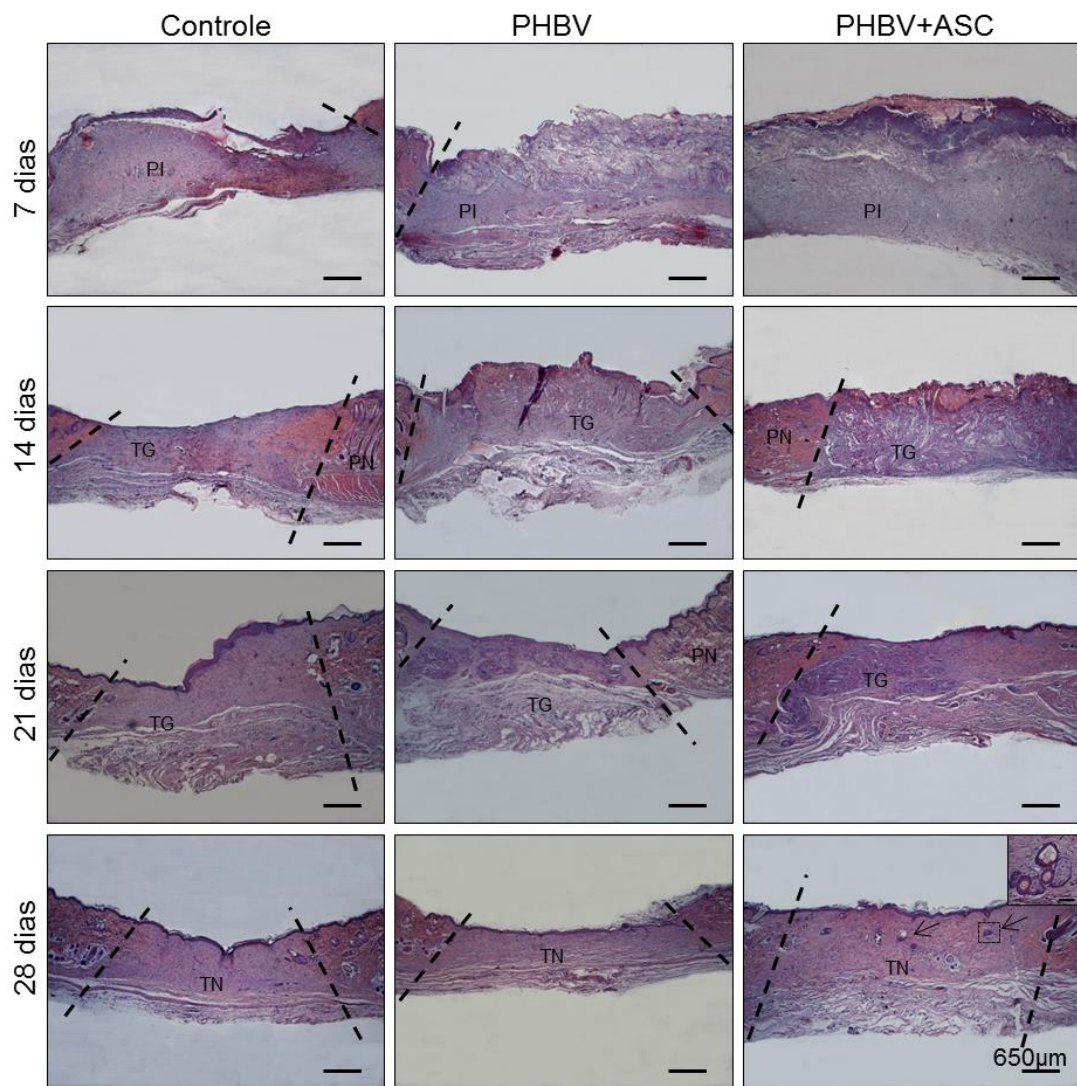
Durante todo o período do ensaio, os animais apresentaram-se saudáveis. Os animais foram observados diariamente e imagens digitais macroscópicas foram feitas ao final de 7, 14, 21 e 28 dias (Figura IV.8A). As dimensões da ferida foram mensuradas com o auxílio de um paquímetro e a média das áreas de todos os animais está apresentada no gráfico da figura IV.8B. No geral, a presença da matriz de PHBV com ou sem células não afetou significativamente no fechamento da ferida apesar do grupo controle apresentar uma tendência de fechamento mais rápido. Apenas após 14 dias houve diferença significativa entre o grupo PHBV e o grupo controle.



**Figura IV. 8:** Efeito da matriz PHBV na regeneração da ferida. (A) Imagens macroscópicas representativas dos diferentes grupos experimentais no dia da cirurgia e após 7, 14, 21 e 28 dias. (B) Representação gráfica da área da ferida nos diferentes grupos ao longo do tempo. \*\*  $p < 0.001$ .

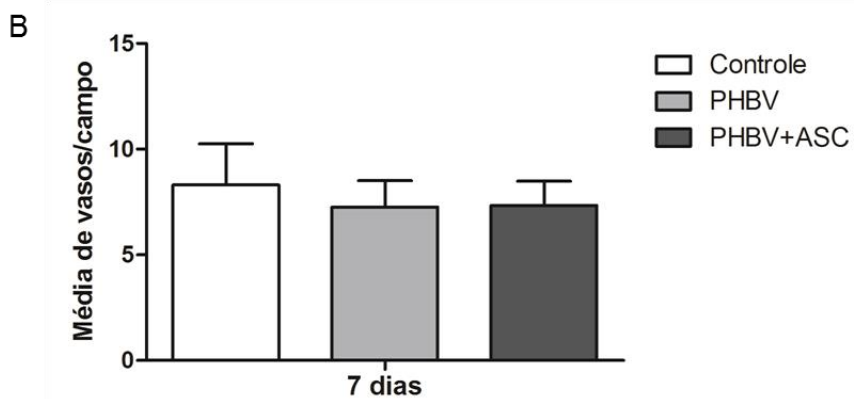
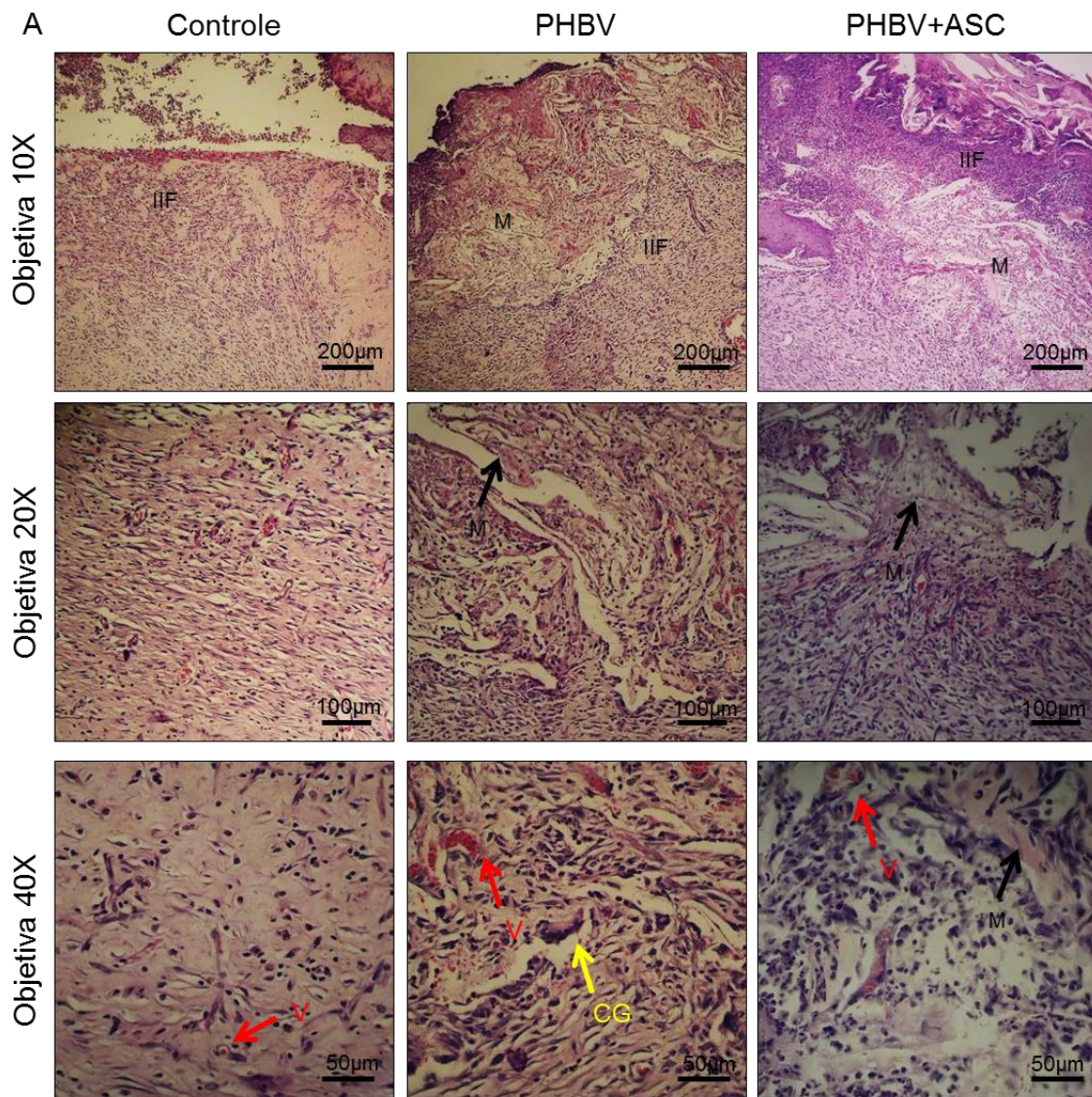
### IV.3.3.2 Análise histológica

A partir das análises histológicas feitas pela coloração H&E pode-se observar a integração do material aos tecidos adjacentes e sua completa absorção ao fim de 28 dias. Tanto na região do implante quanto nos tecidos adjacentes não foram observados focos necróticos. A pele adjacente ao local da ferida permaneceu íntegra durante todo o período de análise. Ao final de 28 dias, os animais de todos os grupo apresentaram epiderme íntegra, entretanto, apenas os animais do grupo PHBV ASC apresentaram formação de apêndices glandulares e folículos pilosos no tecido neoformado (Figura IV.9).



**Figura IV. 9:** Imagens histológicas coradas com H&E com visão panorâmica do local da excisão demonstrando a progressão da regeneração tecidual ao longo do tempo. Linhas tracejadas delimitam o local da excisão. PI- processo inflamatório, TG- tecido de granulação, PN- pele normal, TN- tecido neoformado. As setas apontam para apêndices glandulares. Imagem no canto superior direito representa uma área ampliada demonstrando os apêndices glandulares, barra de escala: 50µm.

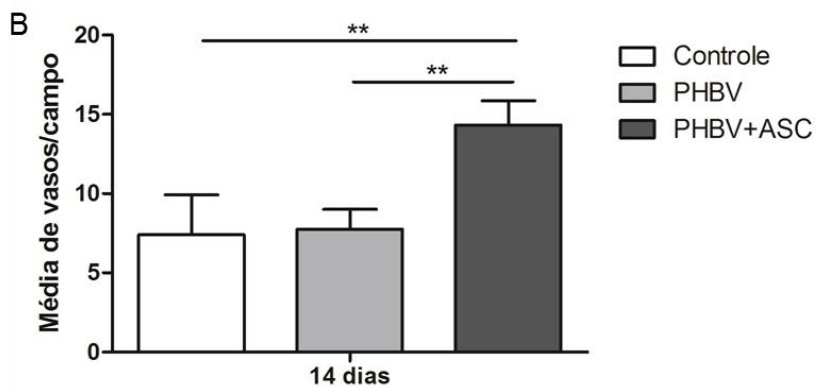
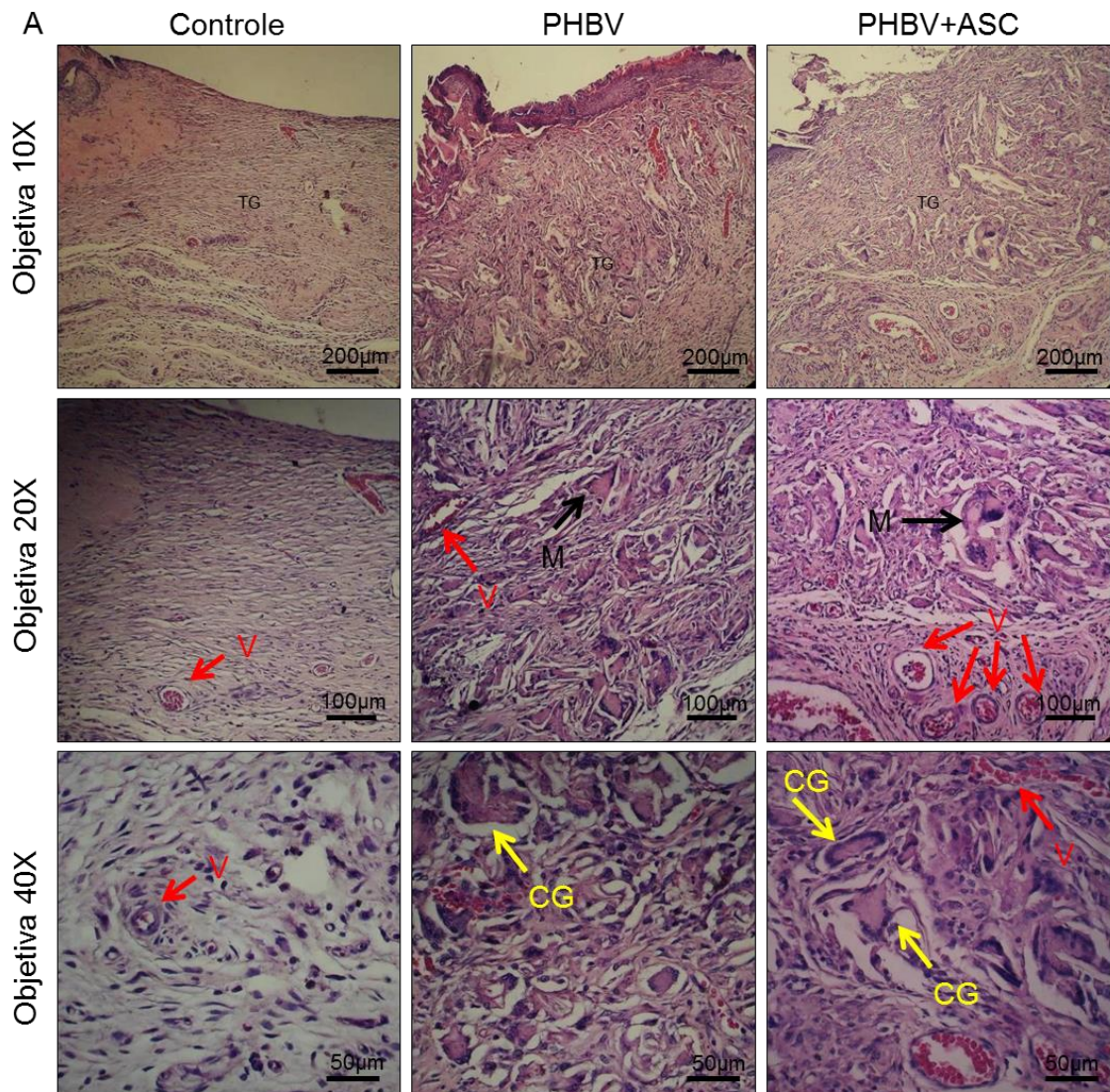
Após 7 dias do implante, pode-se observar em todos os grupos a presença de um processo inflamatório linfocitário e neutrofílico multifocal moderado. Nos grupos PHBV e PHBV+ASC esse processo inflamatório está associado a presença multifocal discreta de células gigantes (tipo corpo estranho e tipo Langhans) e material amorfo eosinofílico e acelular (matriz PHBV). Em todos os grupos a epiderme apresentou ulceração focal extensa associada a restos celulares (Figura IV.10A). Não houve diferença significativa na neovascularização entre os grupos (Figura IV.10B).



**Figura IV. 10:** Análise da região da lesão após 7 dias. (A) Análise histológica por coloração H&E. IIF- infiltrado inflamatório. M- Matriz de PHBV. V-vaso sanguíneo. CG- célula gigante. (B) Representação gráfica da quantificação do número de vasos no local do implante.

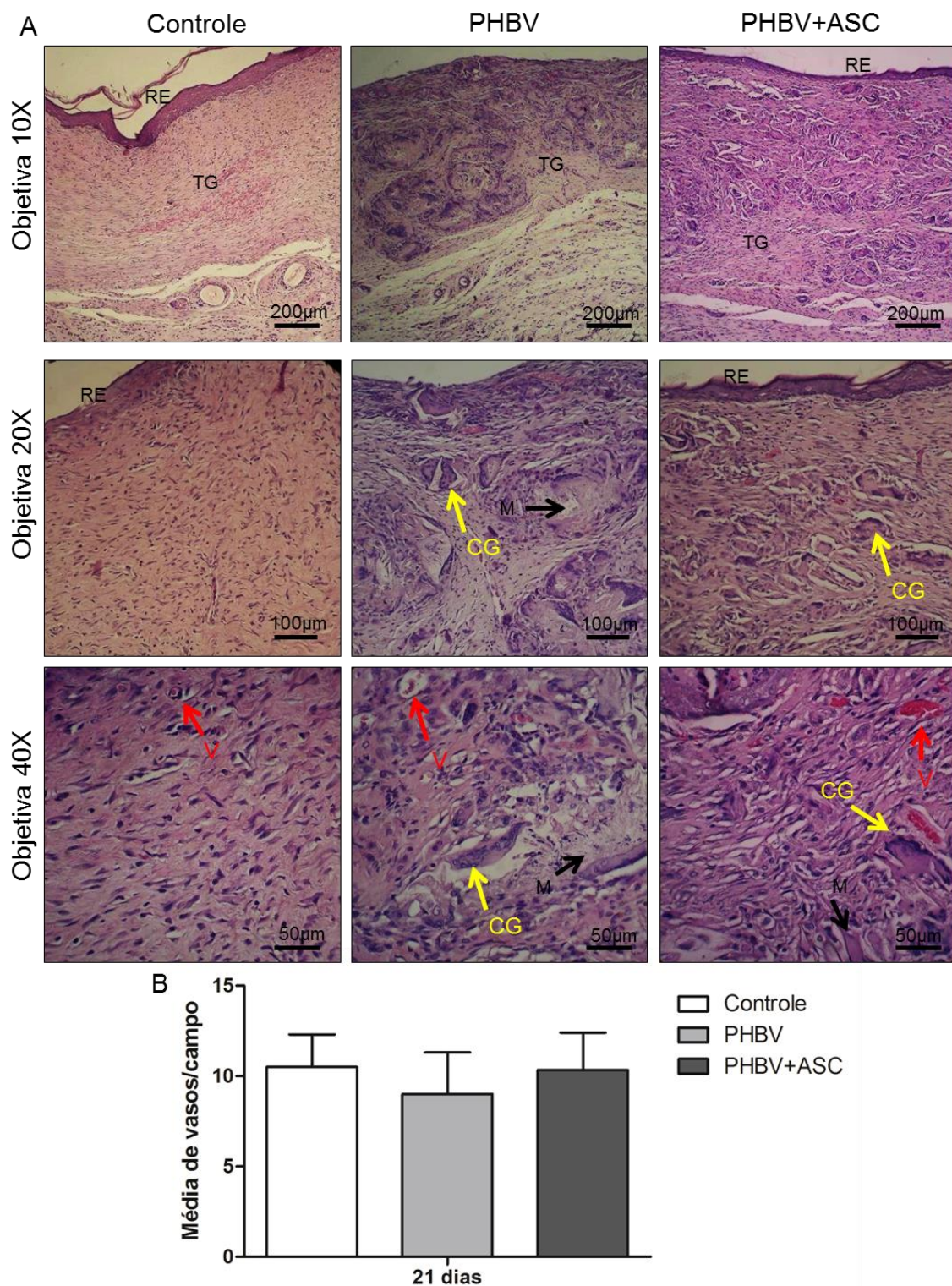


Após 14 dias, a epiderme continuou apresentando ulceração focal extensa em todo os grupos e infiltrado inflamatório linfocitário multifocal discreto a moderado. Presença intensa de células gigantes (tipo corpo estranho e tipo Langhans) foi observada nos grupos PHBV e PHBV+ASC. Também foi observado, nesses grupos, a presença de material amorfo eosinofílico e acelular (matriz PHBV). Formação de tecido de granulação com fibroplasia multifocal intensa em todos os grupos (Figura IV.11A). Nos grupos controle e PHBV observou-se neovascularização multifocal moderada estatisticamente inferior ao grupo PHBV+ASC que apresentou neovascularização multifocal intensa (Figura IV.11B).



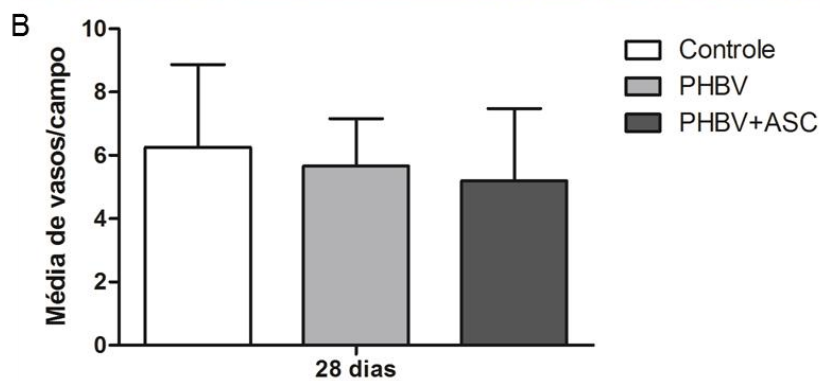
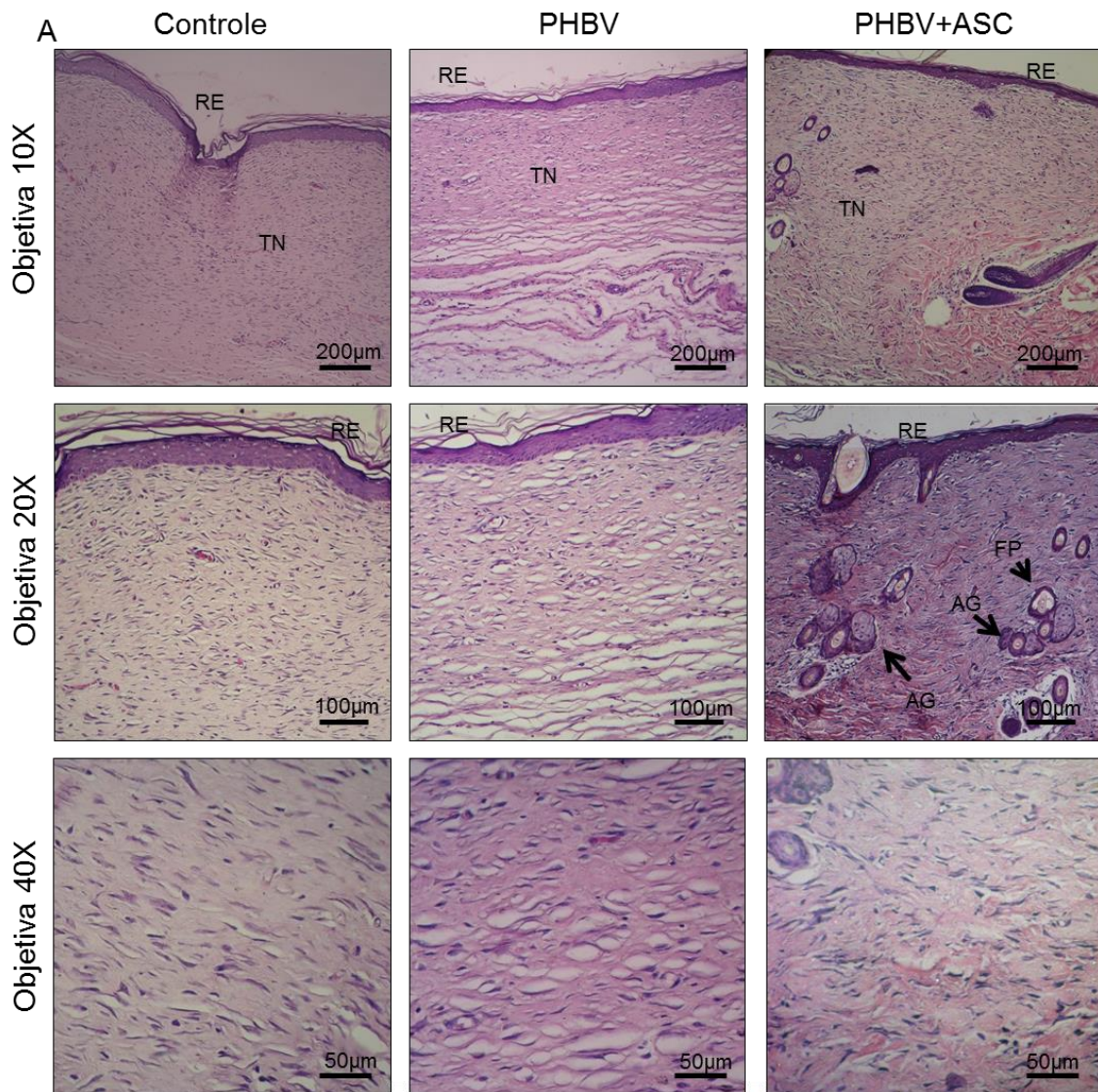
**Figura IV. 11:** Análise da região da lesão após 14 dias. (A) Análise histológica por coloração H&E. TG- tecido de granulação. M- Matriz de PHBV. V-vaso sanguíneo. CG- célula gigante. (B) Representação gráfica da quantificação do número de vasos no local do implante. \*\*  $p < 0.01$ .

Após 21 dias, os grupos controle e PHBV+ASC apresentaram epiderme íntegra, entretanto o grupo PHBV ainda apresentou ulceração focal discreta. Derme com infiltrado inflamatório linfocitário discreto e presença intensa de células gigantes (tipo corpo estranho e tipo Langhans) nos grupos PHBV e PHBV+ASC. Também se observou nesses grupos a presença de material amorfo eosinofílico e acelular (matriz PHBV). Formação de tecido de granulação com fibroplasia multifocal intensa em todos os grupos (Figura IV.12A). Houve um aumento na neovascularização nos grupos controle e PHBV em relação ao tempo de 14 dias e, não houve diferença significativa em relação ao grupo PHBV+ASC (Figura IV.12B).



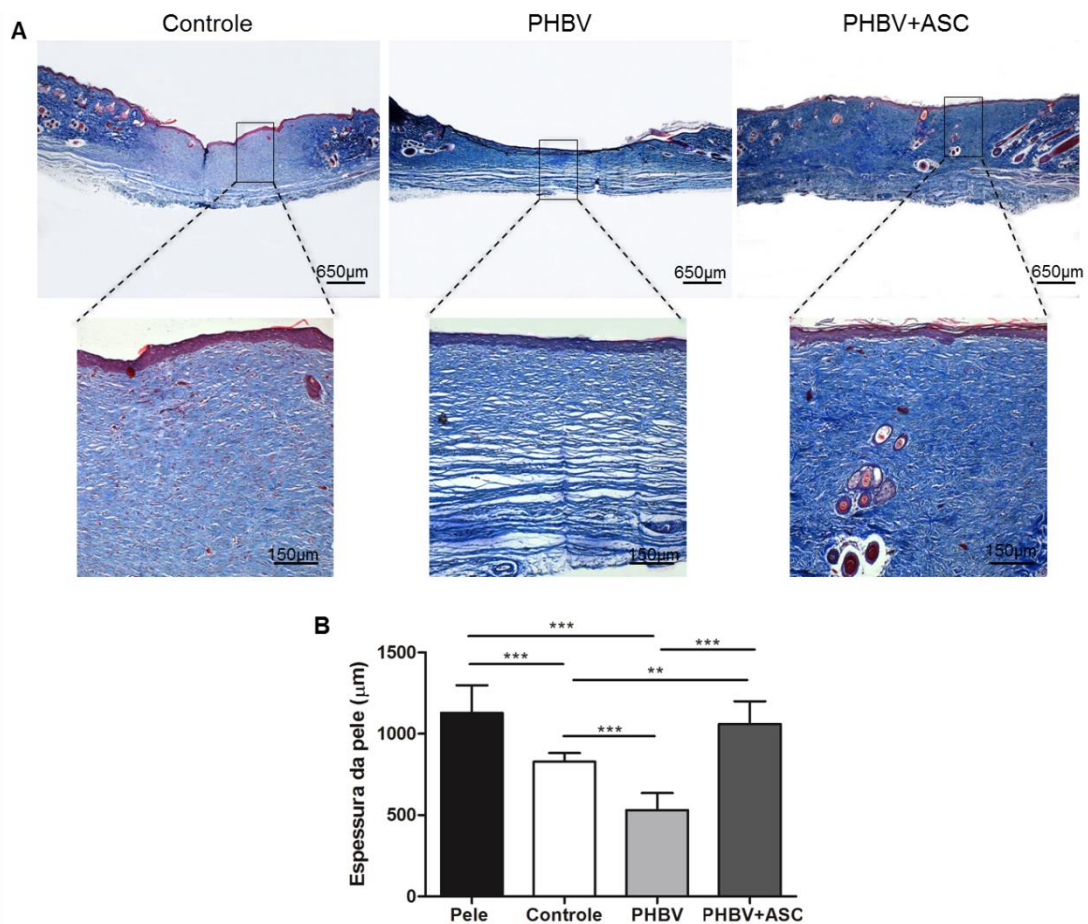
**Figura IV. 12:** Análise da região da lesão após 21 dias. (A) Análise histológica por coloração H&E. TG- tecido de granulação. RE- reepitelização. M- Matriz de PHBV. V- vaso sanguíneo. CG- célula gigante. (B) Representação gráfica da quantificação do número de vasos no local do implante.

Ao final de 28 dias, em todos os grupos um tecido neoformado com epiderme íntegra foi observado (Figura IV.13A). A neovascularização permaneceu constante em todos os grupos (Figura IV.13B). Entretanto, apenas o grupo PHBV+ASC apresentou a formação de apêndices glandulares e folículos pilosos.



**Figura IV. 13:** Análise da região da lesão após 28 dias. (A) Análise histológica por coloração H&E após 28 dias da cirurgia. TN- tecido neoformado. RE- reepitelização. AG- apêndices glandulares FP-folículo piloso. (B) Representação gráfica da quantificação do número de vasos no local do implante.

Análises histológicas pela coloração de Tricrômico de Masson ao final dos 28 dias revela a formação de uma estrutura dérmica mais madura no grupo PHBV+ASC com feixes de colágeno mais espessos e distribuídos em múltiplos planos formando uma arquitetura mais complexa (Figura IV.14A). A avaliação da espessura da pele neoformada revelou que o grupo PHBV+ASC formou uma pele com espessura semelhante à pele normal enquanto que os grupos PHBV e controle formaram peles significativamente mais finas (Figura IV.14B).

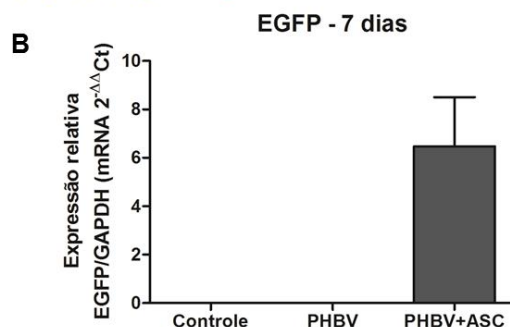
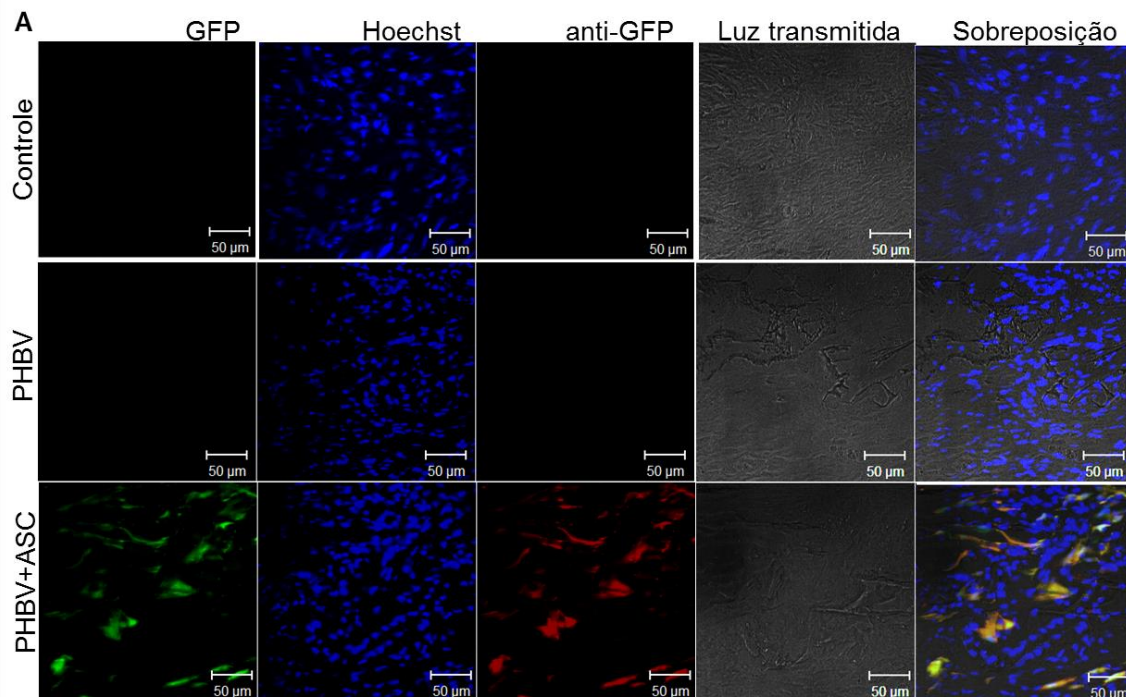


**Figura IV. 14:** Avaliação da pele neoformada. (A) Análise histológica por coloração de Tricrômico de Masson, áreas ampliadas evidenciam a organização da matriz dérmica nos grupos. (B) Representação gráfica da espessura da pele neoformada. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , *one-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

### **IV.3.3.3 Avaliação de células EGFP in vivo**

No intuito de rastrear as células EGFP no local do implante, foram realizados ensaios de imunofluorescência e avaliação dos transcritos gênicos por PCR em tempo real. Foi possível detectar a fluorescência verde da proteína EGFP em cortes histológicos após 7 dias da cirurgia. A confirmação de que a fluorescência visualizada não era auto fluorescência do tecido se fez através da marcação com anticorpo anti-GFP. A sobreposição da fluorescência verde com a vermelha confirma a presença de células EGFP. As células foram detectadas apenas na região do implante junto a matriz PHBV (Figura IV.15A). Através de análises da expressão de transcritos gênicos para EGFP, confirmou-se a detecção desses transcritos após 7 dias no grupo PHBV+ASC. A expressão do transcrito gênico para EGFP não foi detectada após 14, 21 e 28 dias corroborando os resultados de imunofluorescência (Figura IV.15B).





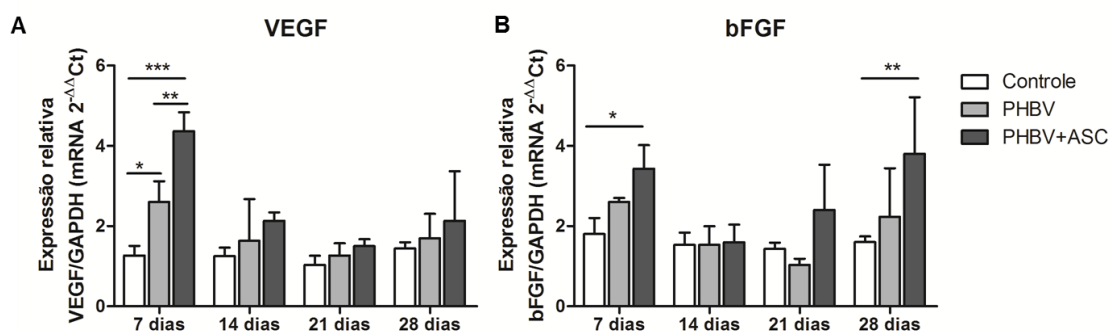
**Figura IV. 15:** Avaliação da presença de células EGFP *in vivo*. (A) Análise por microscopia confocal. (B) Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para EGFP.

### IV.3. Quantificação relativa dos transcritos gênicos

Para avaliar a evolução do processo regenerativo nos diferentes grupos foram feitas análises da expressão relativa de transcritos gênicos importantes na formação tecidual da pele.

Realizou-se a análise da expressão de fatores angiogênicos, VEGF e b-FGF, nos diferentes grupos. Houve um aumento significativo na expressão do transcrito gênico para VEGF nos grupos PHBV e PHBV+ASC apenas após 7 dias (Figura IV.16A). Em relação a expressão de transcritos gênicos para bFGF

houve um aumento significativo no grupo PHBV+ASC após 7 e 28 dias (Figura IV.16B).



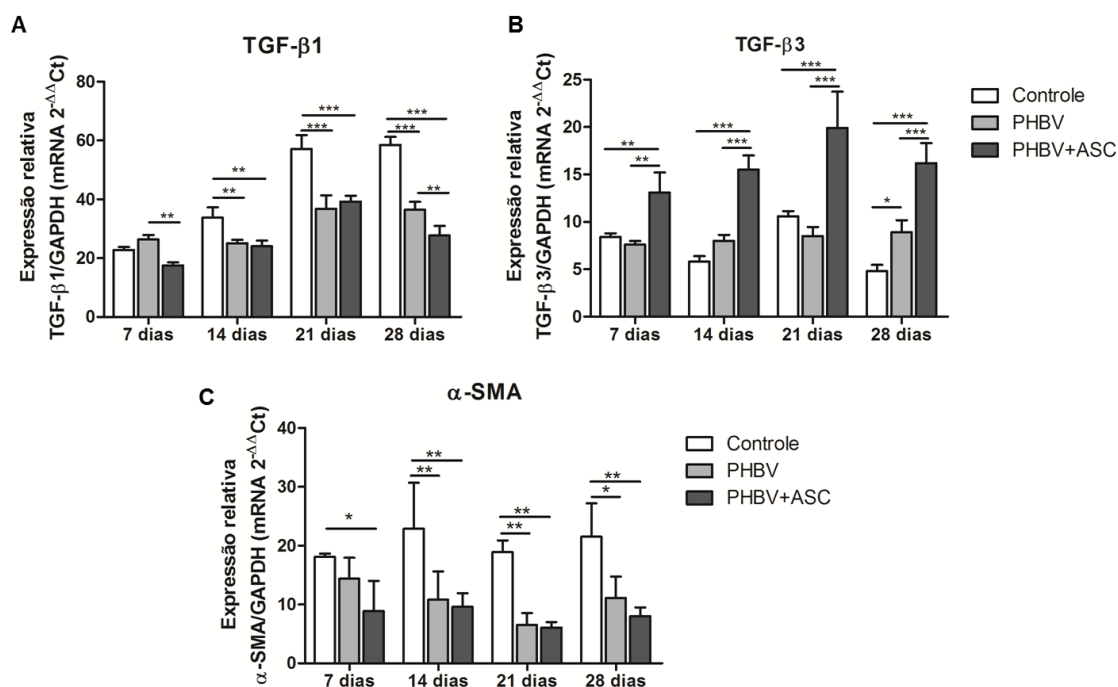
**Figura IV. 16:** Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para VEGF (A) e bFGF (B), normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

A expressão de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 está relacionada com a indução da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e conseqüentemente no processo de cicatrização. Os miofibroblastos expressam a proteína  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Dessa forma, analisou-se a expressão relativa de transcritos para TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 e  $\alpha$ -SMA.

Os resultados obtidos demonstram uma redução significativa na quantidade de transcritos gênicos para TGF- $\beta$ 1 nos grupos PHBV e PHBV+ASC a partir de 14 dias em relação ao grupo controle. Houve uma menor expressão no grupo PHBV+ASC em relação ao grupo PHBV nos dias 7 e 28 (Figura IV.17A).

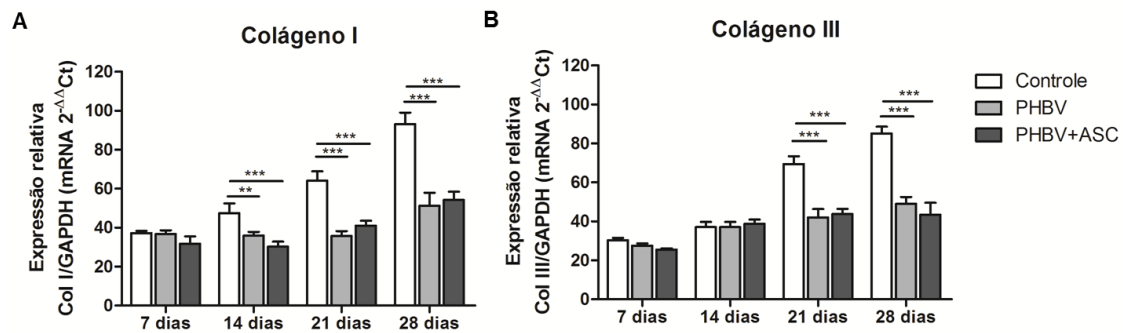
A expressão de transcritos gênicos para TGF- $\beta$ 3 foi significativamente maior no grupo PHBV+ASC para todos os tempos comparado com os grupos controle e PHBV. Diferença entre os grupos controle e PHBV só foi demonstrada após 28 dias com redução da expressão no grupo controle (Figura IV.17B).

Em relação a expressão de transcritos gênicos para  $\alpha$ -SMA, houve uma menor expressão no grupo PHBV+ASC em relação ao grupo controle em todos os tempos analisados. No grupo PHBV também houve redução na expressão a partir de 14 dias (Figura IV.17C).



**Figura IV. 17:** Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para TGF-β1 (A), TGF-β3 (B) e α-SMA(C), normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

A derme é constituída predominantemente de colágeno tipo I e III. A produção excessiva de colágeno resulta em fibrose. Dessa forma, analisou-se a expressão dos transcritos gênicos para colágeno tipo I e III em todos os grupos ao longo do tempo. Análises da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, demonstrou uma redução na expressão desse transcrito a partir de 14 dias para os grupos PHBV e PHBV+ASC comparados com o grupo controle (Figura IV.18A). Houve também uma redução na expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo III a partir de 21 dias nos grupos PHBV e PHBV+ASC comparados com o grupo controle (Figura IV.18B).



**Figura IV. 18:** Representação gráfica da quantificação relativa da expressão dos transcritos para Colágeno I (A) e Colágeno III (B), normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

#### IV.4 Discussão

O desenvolvimento de substitutos de pele baseados nos princípios da engenharia de tecidos representa uma alternativa promissora quando o processo de regeneração natural está comprometido, principalmente quando há perda de grandes áreas de tecido como no caso de extensas queimaduras. Nesses casos, a utilização de enxerto autólogo se torna inviável bem como a biópsia de pele para obtenção de grandes quantidades de queratinócitos e fibroblastos. Além disso, por serem terminalmente diferenciadas, a taxa de proliferação dessas células é limitada e influenciada pela idade do doador (Barrandon e Green, 1987; Shokrgozar *et al.*, 2012). Dessa forma, é necessária a utilização de outras fontes celulares.

Nesse trabalho, optou-se pela utilização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ASC). As células-tronco mesenquimais são uma atraente fonte celular devido a sua capacidade de auto-renovação, diferenciação em diversos tipos celulares e propriedades imunorregulatórias (Dorronsoro *et al.*, 2013).

As ASC extraídas de ratos transgênicos para EGFP apresentaram as características básicas para células-tronco mesenquimais estabelecidas pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e comprovada em diversos trabalhos (Dominici *et al.*, 2006; Carvalho L R P, 2012; Miranda *et al.*, 2012; Melo *et al.*, 2013). Essas células demonstraram aderência à superfície plástica, assim como morfologia típica fibroblastóide. A análise do perfil fenotípico por

citometria de fluxo e imunocitoquímica comprovou se tratar de uma população homogênea de células que expressam os marcadores de superfície mesenquimais CD54, CD73 e CD90 e não expressam os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. Além disso, as ASC quando devidamente estimuladas foram capazes de se diferenciarem nas linhagens adipogênica e osteogênica, confirmando o seu potencial de diferenciação (Pittenger *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2004). A partir desses resultados podemos confirmar que a população isolada do tecido adiposo é referente a uma população de células-tronco mesenquimais.

Células-tronco mesenquimais tem demonstrado capacidade de melhorar o processo de regeneração da pele através de efeitos parácrinos que influenciam na migração celular, proliferação, diferenciação e na promoção da vascularização (Cerqueira *et al.*, 2013). Dessa forma, são um tipo de células bastante atraentes para a utilização em substitutos de pele.

A biocompatibilidade de ASC de origem humana com matrizes produzidas a partir de PHBV foi demonstrado no capítulo 2 dessa tese. No presente capítulo foram utilizadas células provenientes de ratos e a adesão à matriz bicamada de PHBV foi comprovada por ensaios de imunofluorescência.

Em seguida, o potencial de regeneração da pele utilizando a matriz bicamada de PHBV cultivada ou não com ASC foi avaliado e comparado a um grupo controle onde o local da lesão permaneceu vazio. O modelo utilizado foi excisão da pele do dorso de rato. Esse modelo apresenta algumas limitações, uma vez que o processo de cicatrização nos roedores difere dos humanos. Em roedores, o principal mecanismo de fechamento da ferida é a contração enquanto que em humanos, a formação de tecido de granulação e reepitelização são os principais mecanismos envolvidos nesse processo (Davidson, 1998). Entretanto, a facilidade na realização de estudos com roedores devido à sua disponibilidade, baixo custo e facilidade de manuseio faz com que vários trabalhos sejam realizados nesse modelo e aceitos pela comunidade científica (Galiano *et al.*, 2004; Veleirinho *et al.*, 2012). Vale ressaltar que as conclusões extraídas dos estudos com estes animais não podem ser totalmente redirecionadas aos seres humanos, mas sim, utilizadas como guia para novos estudos.

A matriz de PHBV implantada demonstrou possuir propriedades mecânicas suficientes para suportar as tensões provocadas pelo mecanismo de contração sem danificar sua estrutura. De modo geral, o fechamento da ferida foi mais acelerado no grupo controle comparado com os grupos que receberam a matriz. A inibição da contração pode favorecer a formação de tecido de granulação e reepitelização tornando o processo de regeneração mais semelhante ao que ocorre nos humanos. Recentemente, tem-se utilizado anéis de silicone suturados nas bordas da ferida para minimizar os efeitos da contração (Wang *et al.*, 2013).

Análises histológicas demonstraram uma boa integração da matriz de PHBV com os tecidos adjacentes e ao final de 28 dias a matriz nos dois grupos estava completamente degradada e um novo tecido foi formado. Tanto no grupo PHBV e PHBV+ASC pode-se observar a presença de células gigantes a partir de 7 dias que se tornaram mais intensas com 14 e 21 dias. As células gigantes são provenientes da fusão de macrófagos e são responsáveis pela fagocitose e reabsorção do biomaterial resultante da resposta do organismo ao corpo estranho (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008; Van Putten *et al.*, 2013). As análises *in vitro* da degradação da matriz de PHBV foi demonstrado no Capítulo III. Conforme esperado, o processo inflamatório gerado *in vivo* levou a um aumento na taxa de degradação do biomaterial favorecendo a formação do novo tecido. Enquanto que após 4 semanas em torno de 50% do material havia sido degradado *in vitro* no mesmo período a matriz encontrava-se 100% degradada *in vivo*.

Além disso, ao final de 28 dias o grupo PHBV+ASC apresentou um tecido neoformado mais semelhante à pele normal com melhor organização das fibras de colágeno e formação de apêndices glandulares e folículos pilosos. Esse resultado demonstra que a presença de ASC favoreceu o processo de regeneração. Entretanto, análises por imunohistoquímica e PCR em tempo real só detectou a presença dessas células após 7 dias na região em torno da matriz. Vários trabalhos descritos na literatura utilizando células marcadas com GFP ou outros marcadores relatam a dificuldade em se rastrear essas células por tempos superiores a uma semana, ou, a diminuição significativa no número de células marcadas ao longo do tempo (Sasaki *et al.*, 2008; Leonardi *et al.*, 2012; Wu, Y. *et al.*, 2013).

Apesar disso, alguns estudos foram capazes de demonstrar a permanência das ASC e o potencial de transdiferenciação de ASC em linhagens epidérmicas e endoteliais durante o processo de regeneração da pele (Altman *et al.*, 2008; Altman *et al.*, 2009; Nie *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012). O potencial de diferenciação *in vitro* das ASC em células endoteliais foi demonstrado no Capítulo II, mas a diferenciação *in vivo* não foi detectada. Apesar disso, a contribuição das ASC em promover a neovascularização foi evidente.

Nossos resultados sugerem que as ASC implantadas junto com a matriz de PHBV influenciam na regeneração do tecido através dos seus efeitos parácrinos nas células residentes, principalmente na fase inicial inflamatória. A liberação de fatores de crescimento e citocinas pelas ASC implantadas leva a geração de um nicho que atrai células-tronco mesenquimais e progenitoras para o local da lesão, estimula a proliferação, controla a formação da matriz extracelular, a formação de novos vasos e, conseqüentemente, acelera o processo de regeneração (Rehman *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007; Maxson *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2013).

Por exemplo, já foi demonstrado que ASC podem secretar fatores angiogênicos como VEGF, HGF e bFGF *in vitro* e *in vivo* (Nie *et al.*, 2011). Análises por PCR em tempo real revelaram um aumento significativo na expressão de transcritos gênicos para VEGF e bFGF após 7 dias no grupo PHBV+ASC sugerindo a expressão desses fatores pelas ASC transplantadas e presentes no local. O aumento da expressão desses fatores influenciou na formação de novos vasos, acelerando a angiogênese. Após 14 dias o grupo PHBV+ASC apresentou maior neovascularização comparado ao grupo controle e PHBV. A expressão de VEGF tem grande influência não só na angiogênese mas também na deposição de colágeno e na indução da reepitelização (Bao *et al.*, 2009).

Além disso, foi demonstrado que nos grupos PHBV e principalmente PHBV+ASC houve uma modulação na expressão dos transcritos gênicos para TGF- $\beta$ . TGF- $\beta$  pode ser secretado por vários tipos celulares incluindo macrófagos e fibroblastos e é uma das moléculas de sinalização mais importantes durante o processo de cicatrização da ferida (Chalmers, 2011; Liu *et al.*, 2013). Tem atuação no recrutamento de fibroblastos e na diferenciação

em miofibroblastos, além de regular a deposição de colágeno e modular a organização estrutural da matriz extracelular. O excesso de TGF- $\beta$ 1 leva a maior diferenciação de miofibroblastos e produção excessiva de matriz extracelular levando a formação de tecido cicatricial. Por outro lado, TGF- $\beta$ 3 apresenta um efeito oposto suprimindo a diferenciação de miofibroblastos e síntese de colágeno formando um tecido com maior qualidade funcional semelhante à pele normal (Serini e Gabbiana, 1996).

A formação de cicatriz hipertrófica e quelóide está relacionada ao excesso de TGF- $\beta$ 1 (Lee *et al.*, 1999). Diante disso, diversas terapias vem sendo desenvolvidas no intuito de inibir a expressão de TGF- $\beta$ 1 utilizando métodos como neutralização com anticorpo, inativação por proteoglicanos, bloqueio do receptor endógeno e RNA de interferência (Shah, Foreman e Ferguson, 1994; Zhang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

De forma interessante, a presença da matriz de PHBV levou a redução da expressão de transcritos gênicos para TGF- $\beta$ 1 e a combinação com ASC resultou no aumento da expressão de transcritos gênicos para TGF- $\beta$ 3. O aumento de TGF- $\beta$ 3 induzido por células-tronco mesenquimais foi demonstrado em trabalhos recentes (Qi *et al.*, 2013; Zografou *et al.*, 2013).

A menor expressão de TGF- $\beta$ 1 levou a uma redução na diferenciação de fibroblastos para miofibroblastos indicado pela menor expressão de transcritos gênicos para  $\alpha$ -SMA nos grupos PHBV e PHBV+ASC. Os miofibroblastos são células contráteis e o excesso e a persistência dessas células durante o processo de regeneração contribui para a contração da ferida e acúmulo de matriz extracelular levando a formação de cicatriz (Hinz *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 2005). A maior expressão de  $\alpha$ -SMA pelo grupo controle pode justificar o fechamento mais rápido das feridas desse grupo.

Esses resultados sugerem que a matriz PHBV pode modular a formação de cicatriz e associada com ASC esse efeito é intensificado.

Colágeno tipo I e III são os principais componentes da matriz extracelular da derme, e a expressão dos transcritos gênicos para essas proteínas foi suprimida em relação ao grupo controle nos grupos PHBV e PHBV+ASC favorecendo um melhor balanço entre os tipos de colágeno e a formação de uma derme sem excesso de matriz extracelular (Liu *et al.*, 2013; Revi *et al.*, 2013).



A modulação da expressão desses fatores pode ser explicada pelo caráter piezoelétrico da matriz PHBV. A própria movimentação do animal e a deformação mecânica da matriz podem levar a geração de estímulos elétricos que influenciam no comportamento celular. Já foi demonstrado *in vitro* que fibroblastos e células-tronco epidérmicas respondem a estímulos elétricos influenciando na proliferação, migração e expressão gênica (Berta *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Entretanto, a utilização de materiais piezoelétricos *in vivo* em modelo de lesão de pele ainda não foi investigado, e, o mecanismo pelo qual essa característica pode beneficiar o processo de regeneração, deve ser melhor avaliado.

Apesar de possuírem padrões de expressão de colágeno semelhantes, as análises por histologia revelaram que a derme formada no grupo PHBV assim como no grupo controle, possui feixes de colágeno mais finos e organizados paralelamente à membrana basal enquanto que no grupo PHBV+ASC a organização da derme é mais semelhante à pele normal. Esses resultados indicam que apesar da matriz de PHBV ter tido um efeito positivo na regeneração da pele, as ASC tiveram um papel crucial na modulação do nicho, conseqüentemente levando a formação de apêndices glandulares e folículos pilosos.

#### **IV.5 Conclusões**

O presente trabalho demonstrou que a utilização da matriz bicamada de PHBV em lesões de espessura total da pele auxilia no processo de regeneração. A modulação da expressão de transcritos gênicos para TGF- $\beta$ 1,  $\alpha$ -SMA e Colágeno tipo I e III sugere que a matriz de PHBV pode promover a regeneração da pele com menor tendência a formação de tecido cicatricial e melhoramento do aspecto estético. Além disso, a associação com ASC proporcionou um ambiente ainda mais favorável levando a formação de um novo tecido semelhante à pele normal. Dessa forma, podemos concluir que a matriz bicamada de PHBV possui grande potencial para ser utilizada como substituto de pele.

### 3- Considerações finais

O trabalho desenvolvido para essa tese permitiu a obtenção de resultados que acrescentam conhecimento na área da engenharia de tecidos, principalmente na utilização do polímero natural PHBV. O PHBV demonstrou ser um polímero versátil que possibilita o desenvolvimento de diferentes matrizes a partir da utilização de uma ou mais técnicas de processamento.

Como descrito ao longo dos diferentes capítulos desta tese, os resultados obtidos suportam várias conclusões que estão resumidas nos parágrafos seguintes.

A partir da técnica de *electrospinning* foi possível obter uma membrana de microfibras que se assemelha à disposição das fibras de colágeno da matriz extracelular. Essa organização e morfologia acrescentaram estímulos físicos que modularam as interações celulares e favoreceram a proliferação e, principalmente, a diferenciação de ASC na linhagem endotelial. As células semeadas na membrana de PHB/PHBV e induzidas à diferenciação endotelial foram capazes de não só expressar marcadores específicos de células endoteliais mas de formar estruturas circulares semelhantes a estrutura tubular dos capilares, confirmando assim o potencial angiogênico das ASC a partir da diferenciação celular.

Em uma segunda abordagem, utilizando as técnicas de evaporação do solvente e liofilização, foi possível obter uma estrutura em bicamada formada por uma fina membrana com nanoporos e uma matriz tridimensional altamente porosa que representam, respectivamente, a estrutura da pele dividida em epiderme e derme. A combinação das duas estruturas possibilitou a formação de uma matriz bicamada com propriedades mecânicas adequadas que pode ser completamente degradada em um ambiente inflamatório provocado por uma lesão e que corresponde à fase inicial do processo regenerativo. A diferença na morfologia da matriz permite cultivar queratinócitos e fibroblastos nas suas respectivas camadas sem haver migração das células de uma camada para outra. Entretanto, a nanoporosidade da membrana garante a comunicação por fatores bioquímicos entre as células das duas camadas. O co-cultivo de queratinócitos e fibroblastos sob condições definidas permitiu a

reorganização dos queratinócitos em múltiplas camadas com diferença morfológica e fenotípica semelhante à estrutura estratificada da epiderme. Dessa forma, pode-se observar que a matriz bicamada de PHBV permite a formação de análogos da epiderme e derme e pode ser explorada para utilização como modelo de pele *in vitro* ou como substituto biológico da pele lesada.

A composição da matriz bicamada de PHBV pode favorecer a utilização *in vivo*. A camada superior formada pela membrana exerce a função de proteger o local da lesão de agentes externos e evitar a perda de fluidos e temperatura. Enquanto isso, a matriz tridimensional mantém a umidade da ferida e permite o influxo de células, proliferação celular e a vascularização. Na última parte dessa tese, optou-se por associar o potencial angiogênico das ASC à matriz bicamada de PHBV e avaliar o potencial regenerativo em um modelo de excisão de pele no dorso de ratos. A matriz bicamada foi degradada completamente após 28 dias e não demonstrou efeito citotóxico permitindo a formação do novo tecido. Além disso, a partir de análises da quantificação de transcritos gênicos, foi possível demonstrar que a matriz bicamada de PHBV possui propriedades adequadas para a promoção da regeneração da pele com menor tendência à formação de tecido cicatricial. Além disso, a associação com ASC levou à liberação de fatores de crescimento que proporcionou a formação de um nicho ainda mais favorável à regeneração tecidual com maior neovascularização e formação de um novo tecido semelhante à pele normal.

Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho de tese demonstram o potencial da utilização do polímero PHBV para o desenvolvimento de matrizes de suporte a partir de diferentes técnicas de processamento que podem favorecer tanto a formação de novos vasos quanto a regeneração tecidual da pele.

## 4. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, podem-se traçar algumas perspectivas:

1- Utilizar a membrana de *electrospinning* associada com células diferenciadas na linhagem endotelial para promover a vascularização de implantes com matrizes tridimensionais em diferentes abordagens.

2- Avaliar a co-cultura de queratinócitos e fibroblastos em diferentes condições para se atingir uma epiderme completamente estratificada e viabilizar a utilização como modelo *in vitro* de pele.

3- Avaliar a piezoelectricidade da matriz bicamada de PHBV e sua influência no comportamento celular *in vitro* e *in vivo*.

4- Incorporar sinais bioquímicos a matriz bicamada de PHBV de modo a permitir a permanência e a migração de células-tronco mesenquimais para o local da lesão, como o fator 1 derivado de células estromais (SDF-1, *stromal-derived factor 1*) e promover a vascularização como o VEGF.

5- Avaliar o potencial da membrana bicamada de PHBV em diferentes modelos animais que se assemelham mais ao processo de regeneração da pele humana.

## 5. Referências Bibliográficas

AGUIRRE, A.; PLANELL, J. A.; ENGEL, E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 400, n. 2, p. 284-91, Sep 17 2010. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732306> >.

ALTMAN, A. M. et al. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 29, n. 10, p. 1431-42, Apr 2008. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18191190> >.

ALTMAN, A. M. et al. IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. **Stem Cells**, v. 27, n. 1, p. 250-8, Jan 2009. ISSN 1549-4918 (Electronic) 1066-5099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818439> >.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol**, v. 20, n. 2, p. 86-100, Apr 2008. ISSN 1044-5323 (Print) 1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162407> >.

APPELGREN, P. et al. A prospective study of infections in burn patients. **Burns**, v. 28, n. 1, p. 39-46, Feb 2002. ISSN 0305-4179 (Print) 0305-4179 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834328> >.

AROSARENA, O. Tissue engineering. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 13, n. 4, p. 233-41, Aug 2005. ISSN 1068-9508 (Print) 1068-9508 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16012248> >.

ASAKAWA, N. et al. Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 3903-9, May 2010. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170957> >.

AURICH, H. et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570-581, Apr 2009. ISSN 0017-5749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000264307200019 >.

BALAJI, S. et al. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 4, p. 975-982, 2012. ISSN 0928-4931. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493112000756> >.

BAO, P. et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. **J Surg Res**, v. 153, n. 2, p. 347-58, May 15 2009. ISSN 1095-8673 (Electronic) 0022-4804 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027922> >.

BARRANDON, Y.; GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 8, p. 2302-6, Apr 1987. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2436229> >.

BERTA, L. et al. Extracorporeal shock waves enhance normal fibroblast proliferation in vitro and activate mRNA expression for TGF-beta1 and for collagen types I and III. **Acta Orthop**, v. 80, n. 5, p. 612-7, Oct 2009. ISSN 1745-3682 (Electronic) 1745-3674 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19916698> >.

BOEHNKE, K. et al. Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. **Eur J Cell Biol**, v. 86, n. 11-12, p. 731-46, Dec 2007. ISSN 0171-9335 (Print) 0171-9335 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17292509> >.

BRAGULLA, H. H.; HOMBERGER, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **J Anat**, v. 214, n. 4, p. 516-59, Apr 2009. ISSN 1469-7580 (Electronic) 0021-8782 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422428> >.

BREYNER, N. M. et al. Effect of a three-dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. **Cells Tissues Organs**, v. 191, n. 2, p. 119-28, 2010. ISSN 1422-6421 (Electronic) 1422-6405 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641289> >.

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S336-S344, Feb 2010. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000280170600031 >.

BRUSSELAERS, N. et al. Skin replacement in burn wounds. **J Trauma**, v. 68, n. 2, p. 490-501, Feb 2010. ISSN 1529-8809 (Electronic)

0022-5282 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154563> >.

BURKE, J. F. et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Ann Surg**, v. 194, n. 4, p. 413-28, Oct 1981. ISSN 0003-4932 (Print)

0003-4932 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6792993> >.

CAMASSOLA, M. et al. Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. **Methods Mol Biol**, v. 879, p. 491-504, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic)

1064-3745 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22610579> >.

CAO, Y. et al. The influence of architecture on degradation and tissue ingrowth into three-dimensional poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2854-2864, May 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000236168500008 >.

CAO, Y. et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 332, n. 2, p. 370-9, Jul 1 2005. ISSN 0006-291X (Print)

0006-291X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896706> >.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 6, p. 259-264, Jun 2001. ISSN 1471-4914. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000169975900007 >.

CARROLL, J. M. et al. Tissue- and stratum-specific expression of the human involucrin promoter in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 21, p. 10270-4, Nov 1 1993. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234288> >.

CARVALHO L R P, B. N. M., HELL R C R, VALÉRIO P, NOVIKOFF S AND GOES A M Healing Pattern in Calvarial Bone Defects Following Bone Regeneration in Rats Guided by Chitosan Scaffold and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal**, v. 5, p. 25-34, 2012.

CARVALHO, P. P. et al. The effect of storage time on adipose-derived stem cell recovery from human lipoaspirates. **Cells Tissues Organs**, v. 194, n. 6, p. 494-500, 2011. ISSN 1422-6421 (Electronic)

1422-6405 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494019> >.

CERQUEIRA, M. T.; MARQUES, A. P.; REIS, R. L. Using stem cells in skin regeneration: possibilities and reality. **Stem Cells Dev**, v. 21, n. 8, p. 1201-14, May 20 2012. ISSN 1557-8534 (Electronic)  
1547-3287 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22188597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22188597) >.

CERQUEIRA, M. T. et al. Human Adipose Stem Cells Cell Sheet Constructs impact epidermal morphogenesis in full-thickness excisional wounds. **Biomacromolecules**, Oct 4 2013. ISSN 1526-4602 (Electronic)  
1525-7797 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093541> >.

CHALMERS, R. L. The evidence for the role of transforming growth factor-beta in the formation of abnormal scarring. **Int Wound J**, v. 8, n. 3, p. 218-23, Jun 2011. ISSN 1742-481X (Electronic)  
1742-4801 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21449929> >.

CHALUPOWICZ, D. G. et al. Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. **J Cell Biol**, v. 130, n. 1, p. 207-15, Jul 1995. ISSN 0021-9525 (Print)  
0021-9525 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540617> >.

CHARERNSRIWILAIWAT, N. et al. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. **Int J Pharm**, v. 427, n. 2, p. 379-84, May 10 2012. ISSN 1873-3476 (Electronic)  
0378-5173 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22353400> >.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, n. 33, p. 6565-78, Nov 2005. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15946738> >.

CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18382669> >.

CHEN, M.; PRZYBOROWSKI, M.; BERTHIAUME, F. Stem cells for skin tissue engineering and wound healing. **Crit Rev Biomed Eng**, v. 37, n. 4-5, p. 399-421, 2009. ISSN 0278-940X (Print)  
0278-940X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20528733> >.

CHEN, R. R. et al. Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation. **Pharmaceutical Research**, v. 24, n. 2, p.



258-264, Feb 2007. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243398900005 >.

CHEN, W.; TONG, Y. W. PHBV microspheres as neural tissue engineering scaffold support neuronal cell growth and axon-dendrite polarization. **Acta Biomater**, v. 8, n. 2, p. 540-8, Feb 2012. ISSN 1878-7568 (Electronic) 1742-7061 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005329> >.

CHENG, S. et al. The effect of D,L-beta-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3758-3765, 2006a. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000237346000008 >.

\_\_\_\_\_. The effect of D,L-beta-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3758-65, Jul 2006b. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549197> >.

CHLAPANIDAS, T. et al. Formulation and characterization of silk fibroin films as a scaffold for adipose-derived stem cells in skin tissue engineering. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 26, n. 1 Suppl, p. 43-9, Jan-Mar 2013. ISSN 0394-6320 (Print) 0394-6320 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24046948> >.

CHOI, G. G. et al. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp MT-16. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 6, p. 540-545, 2005. ISSN 1226-8372. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234360500011 >.

CHOI, J. et al. Wnt5a-mediated neurogenesis of human adipose tissue-derived stem cells in a 3D microfluidic cell culture system. **Biomaterials**, v. 32, n. 29, p. 7013-7022, Oct 2011. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294512800015 >.

CHURCH, D. et al. Burn wound infections. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 2, p. 403-34, Apr 2006. ISSN 0893-8512 (Print) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16614255> >.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, Jun 1 2006. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684817> >.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair. **Arch Dermatol Res**, v. 290 Suppl, p. S1-11, Jul 1998. ISSN 0340-3696 (Print)

0340-3696 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9710378> >.

DAVIES, N. H. et al. Sustaining neovascularization of a scaffold through staged release of vascular endothelial growth factor-A and platelet-derived growth factor-BB. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 1-2, p. 26-34, Jan 2012. ISSN 1937-335X (Electronic)

1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21895488> >.

DE COPPI, P. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 100-106, Jan 2007. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000243491000035 >.

DE PAULA, A. C. et al. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 1-2, p. 277-89, Jan 2013. ISSN 1937-335X (Electronic)

1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920790> >.

DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 7, p. 1141-6, Jul 2004. ISSN 1357-2725 (Print)

1357-2725 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15109560> >.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. **Shock**, v. 4, n. 4, p. 233-40, Oct 1995. ISSN 1073-2322 (Print)

1073-2322 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564549> >.

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. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249 (Print)

1465-3249 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DONG, W. et al. Skin hyperproliferation and susceptibility to chemical carcinogenesis in transgenic mice expressing E6 and E7 of human papillomavirus type 38. **J Virol**, v. 79, n. 23, p. 14899-908, Dec 2005. ISSN 0022-538X (Print)

0022-538X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282489> >.

DORRONSORO, A. et al. Human Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Immunoregulation: Mechanisms of Action and Clinical Applications. **Bone Marrow Res**, v. 2013, p. 203643, 2013. ISSN 2090-2999 (Print)

2090-3006 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24187625> >.

DRUECKE, D. et al. Neovascularization of poly(ether ester) block-copolymer scaffolds in vivo: Long-term investigations using intravital fluorescent microscopy. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 68A, n. 1, p. 10-18, Jan 1 2004. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187666400002 >.

ECKERT, R. L.; RORKE, E. A. Molecular biology of keratinocyte differentiation. **Environ Health Perspect**, v. 80, p. 109-16, Mar 1989. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466639> >.

EL GHALBZOURI, A. et al. Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 1, p. 79-86, Jan 2005. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15654956> >.

EL GHALBZOURI, A.; PONEC, M. Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 3, p. 359-67, May-Jun 2004. ISSN 1067-1927 (Print) 1067-1927 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225215> >.

ELLIOTT, M.; VANDERVORD, J. Initial experience with cultured epithelial autografts in massively burnt patients. **ANZ J Surg**, v. 72, n. 12, p. 893-5, Dec 2002. ISSN 1445-1433 (Print) 1445-1433 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485229> >.

ENGELBERG, I.; KOHN, J. PHYSICOMECHANICAL PROPERTIES OF DEGRADABLE POLYMERS USED IN MEDICAL APPLICATIONS - A COMPARATIVE-STUDY. **Biomaterials**, v. 12, n. 3, p. 292-304, 1991. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991FH06800005 >.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877-891, Dec 2004. ISSN 1521-6934. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000226044600005 >.

FENG, J.; YUAN, H.; ZHANG, X. Promotion of osteogenesis by a piezoelectric biological ceramic. **Biomaterials**, v. 18, n. 23, p. 1531-4, Dec 1997. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430335> >.

FISCHER, L. J. et al. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. **J Surg Res**, v. 152, n. 1, p. 157-66, Mar 2009. ISSN 1095-8673 (Electronic)

0022-4804 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883577> >.

FRANCO, R. A. et al. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. **J Biomater Appl**, Nov 9 2011. ISSN 1530-8022 (Electronic)

0885-3282 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22071350](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22071350) >.

\_\_\_\_\_. Fabrication and biocompatibility of novel bilayer scaffold for skin tissue engineering applications. **J Biomater Appl**, v. 27, n. 5, p. 605-15, Jan 2013. ISSN 1530-8022 (Electronic)

0885-3282 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071350> >.

FRANCO, R. A.; NGUYEN, T. H.; LEE, B. T. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 10, p. 2207-18, Oct 2011. ISSN 1573-4838 (Electronic)

0957-4530 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805330> >.

FU, L. et al. Evaluation of bacterial nanocellulose-based uniform wound dressing for large area skin transplantation. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 5, p. 2995-3000, Jul 1 2013. ISSN 1873-0191 (Electronic)

0928-4931 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623124> >.

FUKADA, E.; ANDO, Y. Piezoelectric properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and copolymers of  $\beta$ -hydroxybutyrate and  $\beta$ -hydroxyvalerate. **Int J Biol Macromol**, v. 8, n. 6, p. 361-366, 1986. ISSN 0141-8130. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141813086900565> >.

GALIANO, R. D. et al. Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 12, n. 4, p. 485-92, Jul-Aug 2004. ISSN 1067-1927 (Print)

1067-1927 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260814> >.

GALLICO, G. G., 3RD et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. **N Engl J Med**, v. 311, n. 7, p. 448-51, Aug 16 1984. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6379456> >.

GENCHI, G. G. et al. PC12 neuron-like cell response to electrospun poly(3-hydroxybutyrate) substrates. **J Tissue Eng Regen Med**, Oct 22 2012. ISSN 1932-7005 (Electronic)

1932-6254 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23086861> >.

GLORIA, A.; DE SANTIS, R.; AMBROSIO, L. Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. **J Appl Biomater Biomech**, v. 8, n. 2, p. 57-67, May-Aug 2010. ISSN 1722-6899 (Print)  
1722-6899 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20740467> >.

GOGOTOV, I. N. et al. Composite Biodegradable Materials Based on Polyhydroxyalkanoate. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 607-613, Nov 2010. ISSN 0003-6838. Disponível em: < <Go to ISI>://000284165500008 >.

GORY-FAURE, S. et al. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. **Development**, v. 126, n. 10, p. 2093-102, May 1999. ISSN 0950-1991 (Print)  
0950-1991 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10207135> >.

GUO, A. et al. Effects of physiological electric fields on migration of human dermal fibroblasts. **J Invest Dermatol**, v. 130, n. 9, p. 2320-7, Sep 2010. ISSN 1523-1747 (Electronic)  
0022-202X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410911> >.

GUO, H. F. et al. Piezoelectric PU/PVDF electrospun scaffolds for wound healing applications. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 96, p. 29-36, Aug 1 2012. ISSN 1873-4367 (Electronic)  
0927-7765 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22503631> >.

GUO, Y. et al. Effects of mechanical stimulus on mesenchymal stem cells differentiation toward cardiomyocytes. **Asian Biomedicine**, v. 5, n. 5, p. 655-661, Oct 2011. ISSN 1905-7415. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000297960600012 >.

GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314-321, May 2008. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000255868400038 >.

HAIMI, S. et al. Growth and osteogenic differentiation of adipose stem cells on PLA/bioactive glass and PLA/beta-TCP scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 7, p. 1473-80, Jul 2009. ISSN 1937-335X (Electronic)  
1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19072198> >.

HAJIABBAS, M. et al. Chitosan-gelatin sheets as scaffolds for muscle tissue engineering. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, Nov 6 2013. ISSN 2169-141X (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195583> >.

HAN, I. et al. Effect of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanofiber matrices cocultured with hair follicular epithelial and dermal cells for biological wound dressing. **Artif Organs**, v. 31, n. 11, p. 801-8, Nov 2007. ISSN 1525-1594 (Electronic)

0160-564X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18001389> >.

HANKIEWICZ, J.; SWIERCZEK, E. Lysozyme in human body fluids. **Clin Chim Acta**, v. 57, n. 3, p. 205-9, Dec 17 1974. ISSN 0009-8981 (Print)

0009-8981 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4434640> >.

HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. Science, medicine, and the future - Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7330, p. 160-163, Jan 2002. ISSN 0959-535X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173470600023 >.

HEMLINGER, G. et al. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. **Nat Med**, v. 3, n. 2, p. 177-82, Feb 1997. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018236> >.

HERNDON, D. N. et al. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. **Ann Surg**, v. 209, n. 5, p. 547-52; discussion 552-3, May 1989. ISSN 0003-4932 (Print)

0003-4932 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2650643> >.

HINZ, B. et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Mol Biol Cell**, v. 12, n. 9, p. 2730-41, Sep 2001. ISSN 1059-1524 (Print)

1059-1524 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553712> >.

HIPP, J.; ATALA, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2008 2008. ISSN 1550-8943. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257615600002 >.

HUANG, S. P. et al. Adipose-derived stem cells seeded on acellular dermal matrix grafts enhance wound healing in a murine model of a full-thickness defect. **Ann Plast Surg**, v. 69, n. 6, p. 656-62, Dec 2012. ISSN 1536-3708 (Electronic)

0148-7043 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23154338> >.

HUANG, S. P. et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. **J Biomed Sci**, v. 20, n. 1, p. 51, Jul 22 2013. ISSN 1423-0127 (Electronic)

1021-7770 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876213>>.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529-2543, Dec 2000. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000089861700006 >.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 3, n. 10, p. 589-601, Oct 2006. ISSN 1742-5689. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000242227800001 >.

JAIN, R. K. et al. Engineering vascularized tissue. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 7, p. 821-3, Jul 2005a. ISSN 1087-0156 (Print)  
1087-0156 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16003365>>.

\_\_\_\_\_. Engineering vascularized tissue. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 821-823, 2005b. ISSN 1087-0156. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230427700025 >.

JANSSEN, F. W. et al. A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: In vivo bone formation showing proof of concept. **Biomaterials**, v. 27, n. 3, p. 315-323, Jan 2006. ISSN 0142-9612. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233187300004 >.

JI, Y.; LI, X. T.; CHEN, G. Q. Interactions between a poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) terpolyester and human keratinocytes. **Biomaterials**, v. 29, n. 28, p. 3807-14, Oct 2008. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18597841>>.

JIMENEZ-ACOSTA, F.; PLANAS, L.; PENNEYS, N. S. Lipase expression in human skin. **J Dermatol Sci**, v. 1, n. 3, p. 195-200, May 1990. ISSN 0923-1811 (Print)  
0923-1811 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2085506>>.

JIN, G.; PRABHAKARAN, M. P.; RAMAKRISHNA, S. Stem cell differentiation to epidermal lineages on electrospun nanofibrous substrates for skin tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 7, n. 8, p. 3113-22, Aug 2011. ISSN 1878-7568 (Electronic)  
1742-7061 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550425>>.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v. 12, n. 4, p. 390-9; quiz 400-1, Jul-Aug 2002. ISSN 1167-1122 (Print)  
1167-1122 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095893>>.

KANNAN, R. Y. et al. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1857-75, May 2005. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15576160> >.

KE, S. et al. Nearly constant dielectric loss behavior in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biodegradable polyester. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 9, p. 096103, 2009. Disponível em: <  
<http://link.aip.org/link/?JAP/105/096103/1>  
<http://dx.doi.org/10.1063/1.3125271> >.

KE, Y. et al. Bioactive surface modification on amide-photografted poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **Biomed Mater**, v. 6, n. 2, p. 025007, Apr 2011. ISSN 1748-605X (Electronic)  
1748-6041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358029> >.

KEARNEY, J. N. Clinical evaluation of skin substitutes. **Burns**, v. 27, n. 5, p. 545-551, Aug 2001. ISSN 0305-4179. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170094700024 >.

KEMPF, M. et al. A denatured collagen microfiber scaffold seeded with human fibroblasts and keratinocytes for skin grafting. **Biomaterials**, v. 32, n. 21, p. 4782-92, Jul 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477857> >.

KESHEL, S. H. et al. The healing effect of unrestricted somatic stem cells loaded in collagen-modified nanofibrous PHBV scaffold on full-thickness skin defects. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, Aug 2 2013. ISSN 2169-141X (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23909504> >.

KHUBUTIYA, M. S. et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. **Cytotherapy**, Oct 8 2013. ISSN 1477-2566 (Electronic)  
1465-3249 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113425> >.

KIM, B.-S.; BAEZ, C. E.; ATALA, A. Biomaterials for tissue engineering. **World Journal of Urology**, v. 18, n. 1, p. 2-9, 2000. ISSN 0724-4983. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s003450050002> >.

KIM, B. S.; BAEZ, C. E.; ATALA, A. Biomaterials for tissue engineering. **World J Urol**, v. 18, n. 1, p. 2-9, Feb 2000. ISSN 0724-4983 (Print)  
0724-4983 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766037> >.



KIM, W. S. et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. **J Dermatol Sci**, v. 48, n. 1, p. 15-24, Oct 2007. ISSN 0923-1811 (Print)  
0923-1811 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17643966> >.

KOC, O. N. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone Marrow Transplantation**, v. 30, n. 4, p. 215-222, Aug 2002. ISSN 0268-3369.  
Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177963200003 >.

KODE, J. A. et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. **Cytotherapy**, v. 11, n. 4, p. 377-91, 2009. ISSN 1477-2566 (Electronic)  
1465-3249 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568970> >.

KOSE, G. T. et al. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. **Biomaterials**, v. 26, n. 25, p. 5187-97, Sep 2005. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15792546> >.

KOTWAL, A.; SCHMIDT, C. E. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. **Biomaterials**, v. 22, n. 10, p. 1055-64, May 2001. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352099> >.

KRAMPERA, M. et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 382-390, Feb 2007. ISSN 8756-3282. Disponível em: <  
<Go to ISI>://WOS:000243767700014 >.

KU, S. H.; PARK, C. B. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 31, n. 36, p. 9431-7, Dec 2010. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880578> >.

KUBOTA, Y. et al. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. **J Cell Biol**, v. 107, n. 4, p. 1589-98, Oct 1988. ISSN 0021-9525 (Print)  
0021-9525 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049626> >.

KUPPAN, P. et al. Development of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fibers for skin tissue engineering: effects of topography,

mechanical, and chemical stimuli. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3156-65, Sep 12 2011. ISSN 1526-4602 (Electronic) 1525-7797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21800891> >.

KUPPAN, P. et al. Development of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Fibers for Skin Tissue Engineering: Effects of Topography, Mechanical, and Chemical Stimuli. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3156-3165, Sep 2011. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000294699000007 >.

KUSUMA, S.; ZHAO, S.; GERECHT, S. The extracellular matrix is a novel attribute of endothelial progenitors and of hypoxic mature endothelial cells. **FASEB J**, v. 26, n. 12, p. 4925-36, Dec 2012. ISSN 1530-6860 (Electronic) 0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919069> >.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, May 14 1993. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8493529> >.

LASCHKE, M. W. et al. Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. **Tissue Eng**, v. 12, n. 8, p. 2093-104, Aug 2006. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968151> >.

LASCHKE, M. W. et al. Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. **Ann Surg**, v. 248, n. 6, p. 939-48, Dec 2008. ISSN 1528-1140 (Electronic) 0003-4932 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19092338> >.

LEE, B. J. et al. Effect of botulinum toxin type a on a rat surgical wound model. **Clin Exp Otorhinolaryngol**, v. 2, n. 1, p. 20-7, Mar 2009. ISSN 1976-8710 (Print) 1976-8710 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434287> >.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol Bioeng**, v. 49, n. 1, p. 1-14, Jan 5 1996a. ISSN 0006-3592 (Print) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623547> >.

\_\_\_\_\_. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 1, p. 1-14, 1996b. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996TK64000001 >.

LEE, T. Y. et al. Expression of transforming growth factor beta 1, 2, and 3 proteins in keloids. **Ann Plast Surg**, v. 43, n. 2, p. 179-84, Aug 1999. ISSN 0148-7043 (Print)  
0148-7043 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10454326> >.

LEONARDI, D. et al. Mesenchymal stem cells combined with an artificial dermal substitute improve repair in full-thickness skin wounds. **Burns**, v. 38, n. 8, p. 1143-50, Dec 2012. ISSN 1879-1409 (Electronic)  
0305-4179 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22998897> >.

LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2363-2378, Jun 2003. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182280400027 >.

LEVENBERG, S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. **Curr Opin Biotechnol**, v. 16, n. 5, p. 516-23, Oct 2005. ISSN 0958-1669 (Print)  
0958-1669 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16144762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16144762) >.

LI, L. et al. Electric fields guide migration of epidermal stem cells and promote skin wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 20, n. 6, p. 840-51, Nov-Dec 2012. ISSN 1524-475X (Electronic)  
1067-1927 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082865> >.

LIN, S. D. et al. Engineering adipose tissue from uncultured human adipose stromal vascular fraction on collagen matrix and gelatin sponge scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 17, n. 11-12, p. 1489-98, Jun 2011. ISSN 1937-335X (Electronic)  
1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21247363> >.

LIU, H. et al. Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 32, n. 15, p. 3784-93, May 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376391> >.

LIU, J. et al. PHBV and predifferentiated human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, n. 2, p. 603-10, Aug 2010. ISSN 1552-4965 (Electronic)  
1549-3296 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20198693> >.

LIU, X. et al. RNAi functionalized collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal equivalent for full-thickness skin regeneration with inhibited scarring. **Biomaterials**, v. 34, n. 8, p. 2038-48, Mar 2013. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261213> >.

LU, L. X. et al. Effects of hydroxyapatite-containing composite nanofibers on osteogenesis of mesenchymal stem cells in vitro and bone regeneration in vivo. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 5, n. 2, p. 319-30, Jan 23 2013. ISSN 1944-8252 (Electronic) 1944-8244 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267692> >.

LU, T. Y. et al. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. **Nat Commun**, v. 4, p. 2307, 2013. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942048> >.

MA, G. et al. Organic-soluble chitosan/polyhydroxybutyrate ultrafine fibers as skin regeneration prepared by electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, n. 6, p. 3619-3624, 2010. ISSN 1097-4628. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/app.32671> >.

MA, J. et al. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, v. 22, n. 4, p. 331-6, Feb 2001. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11205436](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11205436) >.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874-80, Feb 22 2007. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17314974> >.

MANN, R.; HEIMBACH, D. Prognosis and treatment of burns. **Western Journal of Medicine**, v. 165, n. 4, p. 215-220, Oct 1996. ISSN 0093-0415. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VU11100005 >.

MAO, J. S. et al. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1067-74, Mar 2003. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504529> >.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, Apr 4 1997. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989> >.

MARTINS, A. et al. Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. **Nanomedicine (Lond)**, v. 2, n. 6, p. 929-42, Dec 2007. ISSN 1748-6963 (Electronic)

1743-5889 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18095855> >.

MARTINS, A. et al. Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. **Biomaterials**, v. 31, n. 22, p. 5875-85, Aug 2010. ISSN 1878-5905 (Electronic)

0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452016> >.

MAXSON, S. et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem Cells Transl Med**, v. 1, n. 2, p. 142-9, Feb 2012. ISSN 2157-6564 (Print)

2157-6564 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23197761> >.

MAZLYZAM, A. L. et al. Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. **Burns**, v. 33, n. 3, p. 355-363, May 2007. ISSN 0305-4179. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000245972800013 >.

MCCULLEN, S. D. et al. Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. **Int J Nanomedicine**, v. 2, n. 2, p. 253-63, 2007. ISSN 1176-9114 (Print)

1176-9114 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17722553> >.

MEIRELLES, L. D. 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, Jun 1 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <Go to ISI>://000238413300004 >.

MELO, C. S. et al. Cytoplasmic-targeted parvalbumin blocks the proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells in prophase. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 4, p. 92, Aug 8 2013. ISSN 1757-6512 (Electronic)

1757-6512 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23928293> >.

METALLO, C. M. et al. Human embryonic stem cell-derived keratinocytes exhibit an epidermal transcription program and undergo epithelial morphogenesis in engineered tissue constructs. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 1, p. 213-23, Jan 2010. ISSN 1937-335X (Electronic)

1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19686061> >.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n.

14, p. 413-437, Jun 22 2007. ISSN 1742-5689. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000247311700001 >.

METTOUCHI, A. The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. **Cell Adh Migr**, v. 6, n. 6, p. 528-34, Nov-Dec 2012. ISSN 1933-6926 (Electronic)  
1933-6918 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23257831> >.

MIRANDA, S. C. et al. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: a potential strategy for alveolar bone regeneration. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 10, p. 2775-86, Oct 2012. ISSN 1552-4965 (Electronic)  
1549-3296 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623117> >.

MISRA, S. K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 8, p. 2249-58, Aug 2006. ISSN 1525-7797 (Print)  
1525-7797 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903667> >.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **J Nippon Med Sch**, v. 76, n. 2, p. 56-66, Apr 2009. ISSN 1345-4676 (Print)  
1345-4676 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19443990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19443990) >.

MO, X. M. et al. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1883-90, May 2004. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738852> >.

MORIMOTO, N. et al. In vivo cultured skin composed of two-layer collagen sponges with preconfluent cells. **Ann Plast Surg**, v. 47, n. 1, p. 74-81; discussion 81-2, Jul 2001. ISSN 0148-7043 (Print)  
0148-7043 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756808> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print)  
0022-1759 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOUNTFORD, J. C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. **Transfus Med**, v. 18, n. 1, p. 1-12, Feb 2008. ISSN 1365-3148 (Electronic)

0958-7578 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18279188>>.

MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J.; NAKAMOTO, C. Practical Modeling Concepts for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. **J Biomed Biotechnol**, v. 2003, n. 3, p. 170-193, 2003. ISSN 1110-7251 (Electronic)

1110-7243 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12975533>>.

NAIR, L.; LAURENCIN, C. Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. In: LEE, K. e KAPLAN, D. (Ed.). **Tissue Engineering I**: Springer Berlin Heidelberg, v.102, 2006. cap. 137240, p.47-90. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). ISBN 978-3-540-31944-3.

NG, W.; IKEDA, S. Standardized, defined serum-free culture of a human skin equivalent on fibroblast-populated collagen scaffold. **Acta Derm Venereol**, v. 91, n. 4, p. 387-91, Jun 2011. ISSN 1651-2057 (Electronic)

0001-5555 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461550>>.

NICHOLS, J. E. et al. Production and assessment of decellularized pig and human lung scaffolds. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 17-18, p. 2045-62, Sep 2013. ISSN 1937-335X (Electronic)

1937-3341 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638920>>.

NIE, C. et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. **Cell Transplant**, v. 20, n. 2, p. 205-16, 2011. ISSN 1555-3892 (Electronic)

0963-6897 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20719083>>.

NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **J Dermatol Sci**, v. 40, n. 3, p. 157-68, Dec 2005. ISSN 0923-1811 (Print)

0923-1811 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16150577>>.

NOMI, M. et al. Principals of neovascularization for tissue engineering. **Mol Aspects Med**, v. 23, n. 6, p. 463-83, Dec 2002. ISSN 0098-2997 (Print)

0098-2997 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385748>>.

NOVOSEL, E. C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P. J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4-5, p. 300-311, Apr 30 2011. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000292433000010 >.

OGAWA, R. et al. Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 313, n. 4, p. 871-7, Jan 23 2004. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14706623>>.

OSWALD, J. et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, v. 22, n. 3, p. 377-84, 2004. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153614>>.

OTT, H. C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nat Med**, v. 14, n. 2, p. 213-21, Feb 2008. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193059>>.

PAPINI, M. et al. Lysozyme distribution in healthy human skin. **Arch Dermatol Res**, v. 272, n. 1-2, p. 167-70, 1982. ISSN 0340-3696 (Print) 0340-3696 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6762151>>.

PATENAUDE, J. et al. Burn injury induces a change in T cell homeostasis affecting preferentially CD4+ T cells. **J Leukoc Biol**, v. 77, n. 2, p. 141-50, Feb 2005. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542542>>.

PETERS, T. et al. Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation. **EMBO J**, v. 24, n. 19, p. 3400-10, Oct 5 2005. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16148944>>.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 2 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10102814>>.

PLANAT-BENARD, V. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, n. 5, p. 656-63, Feb 10 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic) 0009-7322 (Linking). Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14734516](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14734516)>.



PORTNER, R. et al. Bioreactor design for tissue engineering. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 235-245, Sep 2005. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000233309700002 > .

POST, M. J.; RAHIMI, N.; CAOLO, V. Update on vascularization in tissue engineering. **Regen Med**, v. 8, n. 6, p. 759-70, Nov 2013. ISSN 1746-076X (Electronic)  
1746-0751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24147531> > .

POWELL, H. M.; BOYCE, S. T. Engineered human skin fabricated using electrospun collagen-PCL blends: morphogenesis and mechanical properties. **Tissue Eng Part A**, v. 15, n. 8, p. 2177-87, Aug 2009. ISSN 1937-335X (Electronic)  
1937-3341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19231973> > .

POWELL, H. M.; SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Influence of electrospun collagen on wound contraction of engineered skin substitutes. **Biomaterials**, v. 29, n. 7, p. 834-43, Mar 2008. ISSN 0142-9612 (Print)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054074> > .

QI, Y. et al. TSG-6 Released from Intradermally Injected Mesenchymal Stem Cells Accelerates Wound Healing and Reduces Tissue Fibrosis in Murine Full-Thickness Skin Wounds. **J Invest Dermatol**, Aug 6 2013. ISSN 1523-1747 (Electronic)  
0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921952> > .

RATHBONE, S. et al. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. **J Biomed Mater Res A**, v. 93, n. 4, p. 1391-403, Jun 15 2010. ISSN 1552-4965 (Electronic)  
1549-3296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911384> > .

RAVINDRAN, S.; SONG, Y.; GEORGE, A. Development of three-dimensional biomimetic scaffold to study epithelial-mesenchymal interactions. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 1, p. 327-42, Jan 2010. ISSN 1937-335X (Electronic)  
1937-3341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712044> > .

REHMAN, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-8, Mar 16 2004. ISSN 1524-4539 (Electronic)  
0009-7322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993122> > .

REVI, D. et al. Chitosan Scaffold Co cultured with Keratinocyte and Fibroblast Heals Full Thickness Skin Wounds in Rabbit. **J Biomed Mater Res A**, Oct 16 2013. ISSN 1552-4965 (Electronic) 1549-3296 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133040>>.

RIBEIRO-SAMY, S. et al. Development and Characterization of a PHB-HV-based 3D Scaffold for a Tissue Engineering and Cell-therapy Combinatorial Approach for Spinal Cord Injury Regeneration. **Macromol Biosci**, Aug 22 2013. ISSN 1616-5195 (Electronic) 1616-5187 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24038969>>.

RIBEIRO, C. et al. Fibronectin adsorption and cell response on electroactive poly(vinylidene fluoride) films. **Biomed Mater**, v. 7, n. 3, p. 035004, Jun 2012. ISSN 1748-605X (Electronic) 1748-6041 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22356773>>.

RIEKSTINA, U. et al. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 378-386, Dec 2009. ISSN 1550-8943. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000273470400009 >.

RINGE, J. et al. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 8, p. 338-351, Aug 2002. ISSN 0028-1042. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000177897500002 >.

RIVA, F. et al. Generation of human epidermal constructs on a collagen layer alone. **Tissue Eng**, v. 13, n. 11, p. 2769-79, Nov 2007. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931165>>.

ROBBINS, S. L. A. C., R. S. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROMANOV, Y. A. et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization, and differentiation potentialities. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 140, n. 1, p. 138-143, Jul 2005. ISSN 0007-4888. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000233296300035 >.

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Vascularization in tissue engineering. **Trends Biotechnol**, v. 26, n. 8, p. 434-41, Aug 2008. ISSN 0167-7799 (Print) 0167-7799 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18585808>>.

SABATINI, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, v. 85, n. 8, p. 962-971, Aug 2005. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230645800004 >.

SADLER, J. E. von Willebrand factor assembly and secretion. **J Thromb Haemost**, v. 7 Suppl 1, p. 24-7, Jul 2009. ISSN 1538-7836 (Electronic) 1538-7836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630761> >.

SALERNO, S. et al. Human hepatocytes and endothelial cells in organotypic membrane systems. **Biomaterials**, v. 32, n. 34, p. 8848-59, Dec 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871658> >.

SANTOS, M. I.; REIS, R. L. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. **Macromolecular Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 12-27, 2010. ISSN 1616-5187. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000274394700001 >.

SANTOS, T. C. et al. Vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 incorporation in starch-based bone tissue-engineered constructs promote the in vivo expression of neovascularization mediators. **Tissue Eng Part A**, v. 19, n. 7-8, p. 834-48, Apr 2013. ISSN 1937-335X (Electronic) 1937-3341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173745> >.

SASAKI, M. et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2581-7, Feb 15 2008. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250469> >.

SAÚDE, P. Número de transplantes no país cresce 118% na última década. Portal Saúde, 2013. Disponível em: < [www.portalsaude.saude.gov.br](http://www.portalsaude.saude.gov.br) >. Acesso em: 05 november.

SAWICKI, G. et al. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors. **Mol Cell Biochem**, v. 269, n. 1-2, p. 209-16, Jan 2005. ISSN 0300-8177 (Print) 0300-8177 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15786734> >.

SEAL, B. L.; OTERO, T. C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science & Engineering R-Reports**, v. 34, n. 4-5, p. 147-230, 2001. ISSN 0927-796X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000171717000001 >.

SERINI, G.; GABBIANA, G. Modulation of alpha-smooth muscle actin expression in fibroblasts by transforming growth factor-beta isoforms: an in vivo and in vitro study. **Wound Repair Regen**, v. 4, n. 2, p. 278-87, Apr-Jun 1996. ISSN 1067-1927 (Print)

1067-1927 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17177825> >.

SHAFIEE, A. et al. Electrospun nanofiber-based regeneration of cartilage enhanced by mesenchymal stem cells. **J Biomed Mater Res A**, v. 99, n. 3, p. 467-78, Dec 1 2011. ISSN 1552-4965 (Electronic)

1549-3296 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887742> >.

SHAH, M.; FOREMAN, D. M.; FERGUSON, M. W. Neutralising antibody to TGF-beta 1,2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. **J Cell Sci**, v. 107 (Pt 5), p. 1137-57, May 1994. ISSN 0021-9533 (Print)

0021-9533 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7929624> >.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-258, Feb 6 2010. ISSN 1742-5689. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000272995800002 >.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **J R Soc Interface**, v. 7, n. 43, p. 229-58, Feb 6 2010. ISSN 1742-5662 (Electronic)

1742-5662 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864266> >.

SHOKRGOZAR, M. A. et al. Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. **Iran Biomed J**, v. 16, n. 2, p. 68-76, 2012. ISSN 2008-823X (Electronic)

1028-852X (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22801279> >.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v. 341, n. 10, p. 738-46, Sep 2 1999. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471461> >.

SOMBATMANKHONG, K. et al. Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 44, n. 19, p. 2923-2933, 2006. ISSN 1099-0488. Disponível em: <

<http://dx.doi.org/10.1002/polb.20915> >.

SOMBATMANKHONG, K. et al. Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. **Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics**, v. 44, n. 19, p.

2923-2933, 2006. ISSN 0887-6266. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000240753700016 >.

SOUTO, L. R. et al. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Med J**, v. 124, n. 2, p. 71-6, Mar 2006. ISSN 1516-3180 (Print) 1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16878189> >.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. D. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-Hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615-622, 2004. ISSN 0100-4042. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000400016&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400016&nrm=iso) >.

STANTON, R. A.; BILLMIRE, D. A. Skin resurfacing for the burned patient. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 29, n. 1, p. 29-+, Jan 2002. ISSN 0094-1298. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000173459100004 >.

STREM, B. M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio J Med**, v. 54, n. 3, p. 132-41, Sep 2005. ISSN 0022-9717 (Print) 0022-9717 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16237275](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16237275) >.

SUN, G. et al. Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 52, p. 20976-81, Dec 27 2011. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22171002> >.

SUN, J. et al. In vitro effect of oligo-hydroxyalkanoates on the growth of mouse fibroblast cell line L929. **Biomaterials**, v. 28, n. 27, p. 3896-903, Sep 2007. ISSN 0142-9612 (Print) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17574664> >.

SUWANTONG, O. et al. In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. **Int J Biol Macromol**, v. 40, n. 3, p. 217-23, Feb 20 2007. ISSN 0141-8130 (Print) 0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949148> >.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. S311-S324, Jun 6 2009. ISSN 1742-5689. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000265529100005 >.

TIETZ, N. W.; SHUEY, D. F. Lipase in serum--the elusive enzyme: an overview. **Clin Chem**, v. 39, n. 5, p. 746-56, May 1993. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8485865> >.

TILKORN, D. J. et al. Implanted myoblast survival is dependent on the degree of vascularization in a novel delayed implantation/prevascularization tissue engineering model. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 1, p. 165-78, Jan 2010. ISSN 1937-335X (Electronic) 1937-3341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650726> >.

TIMPER, K. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 341, n. 4, p. 1135-40, Mar 24 2006. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16460677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16460677) >.

TOMA, J. G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 778-784, Sep 2001. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000170979600010 >.

TOYOKAWA, N. et al. Electrospun synthetic polymer scaffold for cartilage repair without cultured cells in an animal model. **Arthroscopy**, v. 26, n. 3, p. 375-83, Mar 2010. ISSN 1526-3231 (Electronic) 0749-8063 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206048> >.

TREMBLAY, P. L. et al. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice. **American Journal of Transplantation**, v. 5, n. 5, p. 1002-1010, May 2005. ISSN 1600-6135. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228134800007 >.

TU, C. L.; BIKLE, D. D. Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 27, n. 3, p. 415-27, Jun 2013. ISSN 1878-1594 (Electronic) 1521-690X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23856269> >.

UNGER, R. E. et al. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. **Biomaterials**, v. 31, n. 27, p. 6959-67, Sep 2010. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20619788> >.

VAILHE, B. et al. In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to alpha(v)beta3 integrin localization. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 33, n. 10, p. 763-73, Nov-Dec 1997. ISSN 1071-2690 (Print)

1071-2690 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9466681> >.

VAJANTO, I. et al. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ. **J Gene Med**, v. 4, n. 4, p. 371-80, Jul-Aug 2002. ISSN 1099-498X (Print)

1099-498X (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12124979](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12124979) >.

VAN PUTTEN, S. M. et al. Macrophage phenotypes in the collagen-induced foreign body reaction in rats. **Acta Biomater**, v. 9, n. 5, p. 6502-10, May 2013. ISSN 1878-7568 (Electronic)

1742-7061 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376130> >.

VELEIRINHO, B. et al. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. **Int J Biol Macromol**, v. 51, n. 4, p. 343-50, Nov 2012. ISSN 1879-0003 (Electronic)

0141-8130 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652216> >.

VELEIRINHO, B.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; LOPES-DA-SILVA, J. A. Processing conditions and characterization of novel electrospun poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)/chitosan blend fibers. **Materials Letters**, v. 65, n. 14, p. 2216-2219, 2011. ISSN 0167-577X. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X11004356> >.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; FREED, L. E. Culture of organized cell communities. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 33, n. 1-2, p. 15-30, Aug 3 1998. ISSN 1872-8294 (Electronic)

1872-8294 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10837650](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10837650) >.

WANG, B. Y. et al. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, Nov 21 2011. ISSN 1552-4965 (Electronic)

1549-3296 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105865> >.

WANG, T. W. et al. Evaluation and biological characterization of bilayer gelatin/chondroitin-6-sulphate/hyaluronic acid membrane. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 82, n. 2, p. 390-9, Aug 2007. ISSN 1552-4973 (Print)

1552-4973 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245743> >.

WANG, X. et al. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nat Protoc**, v. 8, n. 2, p. 302-9, Feb 2013. ISSN 1750-2799 (Electronic)  
1750-2799 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329003> >.

WANG, Y. Y. et al. Cellular compatibility of RGD-modified chitosan nanofibers with aligned or random orientation. **Biomed Mater**, v. 5, n. 5, p. 054112, Oct 2010. ISSN 1748-605X (Electronic)  
1748-6041 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20876956> >.

WEBER, N. et al. Characterization and in vitro cytocompatibility of piezoelectric electrospun scaffolds. **Acta Biomater**, v. 6, n. 9, p. 3550-6, Sep 2010. ISSN 1878-7568 (Electronic)  
1742-7061 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371302> >.

WIDGEROW, A. D. Bioengineered matrices--part 1: attaining structural success in biologic skin substitutes. **Ann Plast Surg**, v. 68, n. 6, p. 568-73, Jun 2012. ISSN 1536-3708 (Electronic)  
0148-7043 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22643101> >.

WILLIAMS, D. F. **The Williams Dictionary of Biomaterials** Liverpool: Liverpool University Press, 1999.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **Int J Biomater**, v. 2012, p. 926059, 2012. ISSN 1687-8795 (Electronic)  
1687-8787 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701121> >.

WU, H. et al. Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, n. 12, p. 3207-15, Dec 2010. ISSN 1573-4838 (Electronic)  
0957-4530 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20890639> >.

WU, J. et al. Improvement of PHBV scaffolds with bioglass for cartilage tissue engineering. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71563, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)  
1932-6203 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23951190> >.

WU, Q.; WANG, Y.; CHEN, G. Q. Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. **Artificial Cells Blood Substitutes and**



**Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2009. ISSN 1073-1199. Disponível em: < <Go to ISI>://000263569000001 >.

WU, Y. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. **Int Wound J**, Feb 15 2013. ISSN 1742-481X (Electronic)  
1742-4801 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23409729> >.

XIANG, P. et al. Cytocompatibility of electrospun nano fiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels. **Int J Biol Macromol**, v. 49, n. 3, p. 281-8, Oct 1 2011. ISSN 1879-0003 (Electronic)  
0141-8130 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600916> >.

XIE, J. et al. Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. **Nanoscale**, v. 2, n. 1, p. 35-44, Jan 2010. ISSN 2040-3372 (Electronic)  
2040-3364 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20648362> >.

YANG, S. et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Eng**, v. 7, n. 6, p. 679-89, Dec 2001. ISSN 1076-3279 (Print)  
1076-3279 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11749726](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11749726) >.

YE, C. et al. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, n. 26, p. 4401-6, Sep 2009. ISSN 1878-5905 (Electronic)  
0142-9612 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19481254> >.

YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 2, p. 213-221, Feb 2012. ISSN 0253-6269. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000300760900004 >.

YUAN, J. et al. Novel wound dressing based on nanofibrous PHBV-keratin mats. **J Tissue Eng Regen Med**, Dec 4 2012. ISSN 1932-7005 (Electronic)  
1932-6254 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23208930> >.

YUN, E. J. et al. Cell therapy for skin wound using fibroblast encapsulated poly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) thermogel. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 4, p. 1106-11, Apr 9 2012. ISSN 1526-4602 (Electronic)  
1525-7797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22394182> >.

ZHANG, J. et al. RanBPM competitively interacts with TRAF6 or TGF-beta type I receptor and inhibits TGF-beta induced nuclear accumulation of TGF-beta type I receptor. **Cell Signal**, Oct 6 2013. ISSN 1873-3913 (Electronic) 0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103590> >.

ZHANG, Z. et al. Recombinant human decorin inhibits TGF-beta1-induced contraction of collagen lattice by hypertrophic scar fibroblasts. **Burns**, v. 35, n. 4, p. 527-37, Jun 2009. ISSN 1879-1409 (Electronic) 0305-4179 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167828> >.

ZHAO, K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, n. 6, p. 1041-1045, Mar 2003. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180454000018 >.

ZHU, X. H.; WANG, C. H.; TONG, Y. W. In vitro characterization of hepatocyte growth factor release from PHBV/PLGA microsphere scaffold. **J Biomed Mater Res A**, v. 89, n. 2, p. 411-23, May 2009. ISSN 1552-4965 (Electronic) 1549-3296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431776> >.

ZHU, Y. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 6, p. 664-75, Aug 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636461> >.

ZISCH, A. H.; LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. **Cardiovasc Pathol**, v. 12, n. 6, p. 295-310, Nov-Dec 2003. ISSN 1054-8807 (Print) 1054-8807 (Linking). Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14630296](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14630296) >.

ZOGRAFOU, A. et al. Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats. **Ann Plast Surg**, v. 71, n. 2, p. 225-32, Aug 2013. ISSN 1536-3708 (Electronic) 0148-7043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23636118> >.

ZONARI, A. et al. Endothelial differentiation of human stem cells seeded onto electrospun polyhydroxybutyrate/polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate fiber mesh. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35422, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22523594> >.

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, 2001a. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000168274200010 >.

\_\_\_\_\_. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-28, Apr 2001b. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11304456](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11304456) >.

## **Anexos**

# 1. Publicações

## 1.1 Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese

1. **Zonari, Alessandra**; Novikoff, Silviene; Electo, Naira R.P.; Breyner, Natália M.; Gomes, Dawidson A.; Martins, Albino; Neves, Nuno M.; Reis, Rui L ; Goes, Alfredo M. . Endothelial Differentiation of Human Stem Cells Seeded onto Electrospun Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate Fiber Mesh. Plos One, v. 7, p. e35422, 2012.
2. **Zonari, Alessandra**; Cerqueira, Mariana T; Novikoff, Silviene; Goes, Alfredo M; Marques, Alexandra P; Correló, Vitor M; Reis, Rui L. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate bilayer skin substitute with improved epidermal rearrangement. 2013 (submetido, em revisão).

## 1.2 Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese

1. Carvalho, Juliana L; **Zonari, Alessandra**; Paula, Ana C.C.; Martins, Thaís M.M.; Gomes, Dawidson A; Goes, Alfredo, M. Production of human endothelial cells free from soluble xenogeneic antigens for small diameter vascular graft. 2013. Submetido.
2. Silva, Alexandra R.P.; Paula, Ana C.C.; **Zonari, Alessandra**; Martins, Thaís M.M.; Goes, A.M.; Pereira, M.M. Development of a Protocol for Human Adipose Stem Cell Culture in CO<sub>2</sub> Independent Medium and Perfusion Bioreactor. Journal of Tissue Science & Engineering, v. S11, p. 1-9, 2013.
3. Brito, Renata C.H; Carvalho, J.L.; **Zonari, Alessandra**; Breyner, N.M.; Gomes, D.A.; Goes, A.M. Genotype and expression of the enhanced green fluorescent protein in LEW-Tg (EGFP) F455.5/Rrrc rats. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science (Impresso), v. 50, p. 87-97, 2013
4. Shainberg, Ana Paula M.; Ozyegin, Lutfiye S.; **Zonari, Alessandra**; Oktar, Faik N.; Leite, Maria F.; Valério, Patrícia; Goes, Alfredo M.; Graça, Manuel Pedro F. Attachment and Proliferation of Osteoblasts on Lithium-Hydroxyapatite Composites. Advances in Materials Science and Engineering (Online), v. 2012, p. 1-10, 2012.
5. Paula, Ana C.C.; **Zonari, Alessandra**; Martins, Thaís M.M.; Novikoff, Silviene; Silva, Alexandra R.P.; Correló, Vitor M; Reis, Rui L; Gomes, Dawidson A; Goes, Alfredo M. Human Serum is a Suitable Supplement for the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Seeded on Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate Scaffolds. Tissue Engineering. Part A, 2012.
6. Gomide, Viviane S; **Zonari, Alessandra**; Ocarino, Natalia M; Goes, Alfredo M; Serakides, Rogéria ; Pereira, Marivalda M ; In vitro and in vivo osteogenic

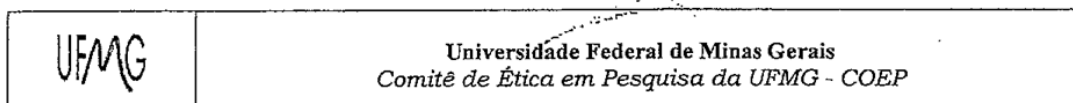
potential of bioactive glass PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials (Bristol. Print)*, v. 7, p. 015004, 2012.

7. Gomide, Viviane; **Zonari, Alessandra**; Breyner, Natália M; Goes, Alfredo M; Pereira, Marivalda M. Attachment and Proliferation of Human-Adipose-Tissue-Derived Stem Cells on Bioactive Glass/PVA Hybrid Scaffolds. *ISRN Materials Science* v.2011, 2011.
8. Breyner, Natália M; **Zonari, Alessandra**; Carvalho, Juliano L; Gomide, Viviane; Gomes, Dawidson; Goes, Alfredo M. Cartilage Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells and 3D Chitosan Scaffolds – In vitro and in vivo Assays. *Biomaterials Science and Engineering*. p. 211-226, 2011.

## 2. Apresentações em Congressos

1. Apresentação de poster no II Simpósio de Integração dos Programas de Pós-graduação em Biologia Celular e VI Simpósio de Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais - Prof<sup>o</sup> Hugo Pereira Godinho. Belo Horizonte- UFMG. 02/09/13-06/09/13.  
**Zonari, A.**; Cerqueira, MT; Novikoff, S; Goes, AM; Marques, AP; Correlo, VM; Reis, RL. Development of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate bilayer construct for skin tissue regeneration. 2013
2. Apresentação de poster no European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU), Istambul – Turquia, 17/06/13 – 20/06/13  
**Zonari, A.**; Cerqueira, MT; Novikoff, S; Goes, AM; Marques, AP; Correlo, VM; Reis, RL. Piezoelectric PHBV Bilayer Construct as an Innovative Skin Substitute. 2013.
3. Apresentação de poster no *3rd TERMIS World Congress “Tissue Engineering and Regenerative Medicine”*, Vienna – Austria, 05/09/12 – 08/09/12.  
**Zonari, A.**; Cerqueira, MT; Novikoff, S; Goes, AM; Marques, AP; Correlo, VM; Reis, RL. Evaluation of the potential of Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate bi-layered scaffolds for skin tissue engineering. 2012
4. Apresentação Oral no 6<sup>o</sup> Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 17/08/2010 – 20/10/2010.  
**Zonari, A.**; Novikoff, S.; Paiva, N. R. E.; Goes, A.M. Polyhydroxybutyrate (PHB) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB-HV) nanofiber meshes: a potential scaffold for improve the vascularization in bone tissue engineering. 2010.
5. Apresentação de poster no V Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular. 28/09/2010 -02/10/2010.  
**Zonari, A.**; Novikoff, S.; Paiva, N. R. E.; Goes, A.M. Associação de células-tronco humanas e microfibras de polihidroxibutirato: nova abordagem para auxiliar a vascularização na engenharia de tecido ósseo. 2010.

### 3. Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG




Parecer nº. ETIC 344/07

**Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Góes.**  
**Departamento de Bioquímica e Imunologia**  
**Instituto de Ciências Biológicas-UFMG**

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de setembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Células-tronco do tecido adiposo : estabelecimento, caracterização fenotípica e diferenciação**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Recomendamos encaminhar o projeto ao CETEA – Comitê de Experimentação Animal – para julgamento, tendo em vista a inoculação em camundongos.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

## 4. Acordo de Cooperação entre o Hospital da Prelada e Grupo de Investigação 3B's

**ACORDO DE COOPERAÇÃO:** Santa Casa da Misericórdia do Porto/Hospital da Prelada –Grupo de investigação 3B's-Universidade do Minho

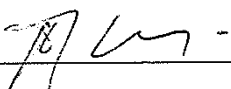
**DATA:** 12 de Fevereiro de 2007

**TÍTULO:** “Biocompatibilidade de Estruturas 3D de Materiais Poliméricos em Engenharia de Tecidos de Osso, Cartilagem ou Pele com Células Estaminais ou Células Primárias obtidas a partir de Tecido Adiposo, Pele, Osso ou Cartilagem”.

**INVESTIGADORES PRINCIPAIS:** Prof. Doutor Rui Reis, Dep. Eng. Polímeros, 3B's-UM, Prof. Doutor Nuno Neves – 3B's-UM


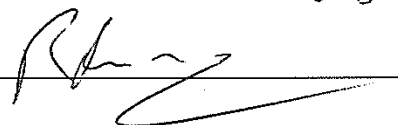
**LOCAL DO ESTUDO:** Centro de Investigação 3B's  
Universidade do Minho  
Campus de Gualtar  
4710-057 Braga

**RESPONSABILIDADE MÉDICA:**

 \_\_\_\_\_, Dr Artur Osório (Director Clínico do Hosp. da Prelada)


**O PRESENTE ACORDO DE COOPERAÇÃO FOI ANALIZADO E APROVADO PELA COMISSÃO DE ÉTICA DO HOSPITAL DA PRELADA, PORTO EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.**

Braga, 12 de Fevereiro de 2007

 \_\_\_\_\_ Exmo Sr. Cónego Dr. Ferreira dos Santos  
 \_\_\_\_\_ Prof. Doutor. Rui L. Reis



## 5. Certificado da Comissão de ética no uso de animais

 <p><b>UFMG</b></p>	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p><b>CEUA</b> COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p>
<p><b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 168 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do potencial de regeneração de pele utilizando um biomaterial de PHBV e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo", que tem como responsável Alfredo Miranda Góes, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/09/2013. Este certificado espira-se em 20/09/2018.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 168 / 2013, related to the Project entitled "The potential of PHBV bilayer scaffold colonized with adipose-derived stem cells in the skin regeneration", under the supervision of Alfredo Miranda Góes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/09/2013. This certificates expires in 20/09/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 20/09/2013.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	

## 6. Artigo publicado

OPEN ACCESS Freely available online



# Endothelial Differentiation of Human Stem Cells Seeded onto Electrospun Polyhydroxybutyrate/ Polyhydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate Fiber Mesh

Alessandra Zonari<sup>1</sup>, Silviene Novikoff<sup>1</sup>, Naira R. P. Electo<sup>1</sup>, Natália M. Breyner<sup>1</sup>, Dawidson A. Gomes<sup>1</sup>, Albino Martins<sup>2,3</sup>, Nuno M. Neves<sup>2,3</sup>, Rui L. Reis<sup>2,3</sup>, Alfredo M. Goes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, <sup>2</sup>3B's Research Group - Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Guimarães, Portugal, <sup>3</sup>ICV5/3B's - PT Government Associate Laboratory, University of Minho, Braga/Guimarães, Portugal

### Abstract

Tissue engineering is based on the association of cultured cells with structural matrices and the incorporation of signaling molecules for inducing tissue regeneration. Despite its enormous potential, tissue engineering faces a major challenge concerning the maintenance of cell viability after the implantation of the constructs. The lack of a functional vasculature within the implant compromises the delivery of nutrients to and removal of metabolites from the cells, which can lead to implant failure. In this sense, our investigation aims to develop a new strategy for enhancing vascularization in tissue engineering constructs. This study's aim was to establish a culture of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) to evaluate the biocompatibility of electrospun fiber mesh made of polyhydroxybutyrate (PHB) and its copolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-HV) and to promote the differentiation of hASCs into the endothelial lineage. Fiber mesh was produced by blending 30% PHB with 70% PHB-HV and its physical characterization was conducted using scanning electron microscopy analysis (SEM). Using electrospinning, fiber mesh was obtained with diameters ranging from 300 nm to 1.3 μm. To assess the biological performance, hASCs were extracted, cultured, characterized by flow cytometry, expanded and seeded onto electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh. Various aspects of the cells were analyzed *in vitro* using SEM, MTT assay and Calcein-AM staining. The *in vitro* evaluation demonstrated good adhesion and a normal morphology of the hASCs. After 7, 14 and 21 days of seeding hASCs onto electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, the cells remained viable and proliferative. Moreover, when cultured with endothelial differentiation medium (i.e., medium containing VEGF and bFGF), the hASCs expressed endothelial markers such as VE-Cadherin and the vWF factor. Therefore, the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh appears to be a suitable material that can be used in combination with endothelial-differentiated cells to improve vascularization in engineered bone tissues.

**Citation:** Zonari A, Novikoff S, Electo NRP, Breyner NM, Gomes DA, et al. (2012) Endothelial Differentiation of Human Stem Cells Seeded onto Electrospun Polyhydroxybutyrate/Polyhydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate Fiber Mesh. PLoS ONE 7(4): e35422. doi:10.1371/journal.pone.0035422

**Editor:** Christophe Egles, Université de Technologie de Compiègne, France

**Received:** September 21, 2011; **Accepted:** March 15, 2012; **Published:** April 16, 2012

**Copyright:** © 2012 Zonari et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), the Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: alessandrazonari@gmail.com

### Introduction

Tissue engineering is 'an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function or a whole organ' [1]. One approach utilized in this area is based on the fabrication of scaffolds that can be employed as cell support devices upon which cells are seeded *in vitro* and able to lay down a matrix to produce the foundations of a tissue for transplantation. Growth factors can be introduced to stimulate cell proliferation and differentiation [2,3].

The need for bone repair in many patients suffering from large bone resections or significant trauma has led to the development of bone grafts using tissue-engineering approaches. To become widely used in clinical practice, bone tissue-engineering products must overcome a series of challenges, the completely supply of nutrients and metabolites diffusion being one of the most

important. [4–6]. Indeed, the vascularization of cell-seeded implants plays an important role in cell survival, as these cells require access to substrate molecules (oxygen, glucose and amino acids) and clearance of products of metabolism (CO<sub>2</sub>, lactate and urea) [7,8]. Additionally, due to the limitations of oxygen diffusion, most cells cannot survive at distances greater than or equal to 150 μm from a capillary [4] and blood vessels also have important metabolic and rheological functions that are organ-specific and important for the regeneration of tissue [9].

Therefore, as in the development of native bone, vascularization following implantation is of critical importance for the survival, integration and functionality of engineered bone tissue [10]. Many approaches have been proposed to increase vascularization in bone tissue engineering, including modulation of scaffold architecture, inclusion of angiogenic growth factors, co-culture systems and pre-vascularization *in vitro* [11–17].

In blood vessels, endothelial cells are attached as a monolayer to a basement membrane composed of protein fibers at the nanoscale, such as type IV collagen and laminin fibers. This natural extracellular matrix (ECM) is critical for the support of the vascular endothelium by maintaining the organization of vascular endothelial cells into blood vessels. Furthermore, the endothelial cells proliferation, migration, morphogenesis, survival and blood vessel stabilization are dependent on their adhesion to the ECM [18].

In the biomaterials field, the electrospinning processing technique allows to produce polymer fibers with diameters in the range of nanometers to micrometers that are physically comparable to the collagen fibers found in the natural ECM and [19,20] has been extensively employed in tissue engineering strategies [21–26].

Polymeric biomaterials have widely been utilized in biomaterials research for tissue engineering applications, mainly because of the great variety of natural and synthetic biodegradable polymers. [27].

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are naturally polyesters of hydroxyalkanoic acids that are synthesized by a wide range of bacteria, generally under unbalanced growth conditions, to act as carbon and energy reserve materials [28]. PHAs are promising materials for various applications, including tissue engineering, because they have useful mechanical properties and are biodegradable and biocompatible [29]. In fact, polyhydroxybutyrate (PHB) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB-HV), which are members of PHAs family, degrade *in vivo* into D-3-hydroxybutyrate, a normal constituent of human blood [30–32].

Although PHB is inherently biocompatible and biodegradable, the use of PHB is significantly limited in biomedical applications by several of its characteristics, including rigidity, brittleness and low mechanical properties [33,34]. PHB-HV is less crystalline and more flexible than PHB [35,36]. The combination of these two polymers could provide a suitable candidate material blend for bioactive and biodegradable composite implants that would guide tissue growth and be replaced by newly formed tissue [37].

The aim of the current study was to create an endothelial network that could improve the vascularization of engineered bone tissue. To this end, we established a culture of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) to evaluate the biocompatibility of electrospun fiber mesh made of PHB and PHB-HV and to promote the differentiation of hASCs into endothelial cells.

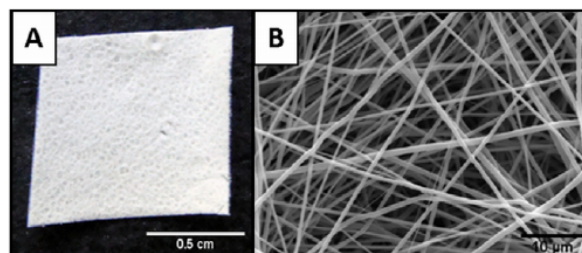
## Results

### Morphology of electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh

The PHB/PHB-HV fiber mesh was produced by electrospinning from a blend of 30% PHB and 70% PHB-HV. Figure 1A depicts the top surface of the electrospun fiber mesh. The SEM image confirmed the possibility of obtaining a mesh-like structure with 100  $\mu\text{m}$  thickness and composed of randomly distributed fibers with diameters ranging from 300 nm to 1.3  $\mu\text{m}$  with mean of  $770 \text{ nm} \pm 0,25$  (Figure 1B). This structure is similar to that of a natural ECM.

### Isolation and characterization of human adipose tissue-derived stem cells

Stem cells from the stromal fractions of adipose tissue were isolated by enzymatic dissociation following centrifugation. The isolated cells displayed a fibroblastic morphology and were adherent to plastic. Also, the cells were able to self-renew and form colonies (data not shown). Isolated stem cells from human



**Figure 1. Structure of the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh.** (A) Digital photograph of the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh surface; (B) SEM micrograph illustrating the disposition of the fibers. doi:10.1371/journal.pone.0035422.g001

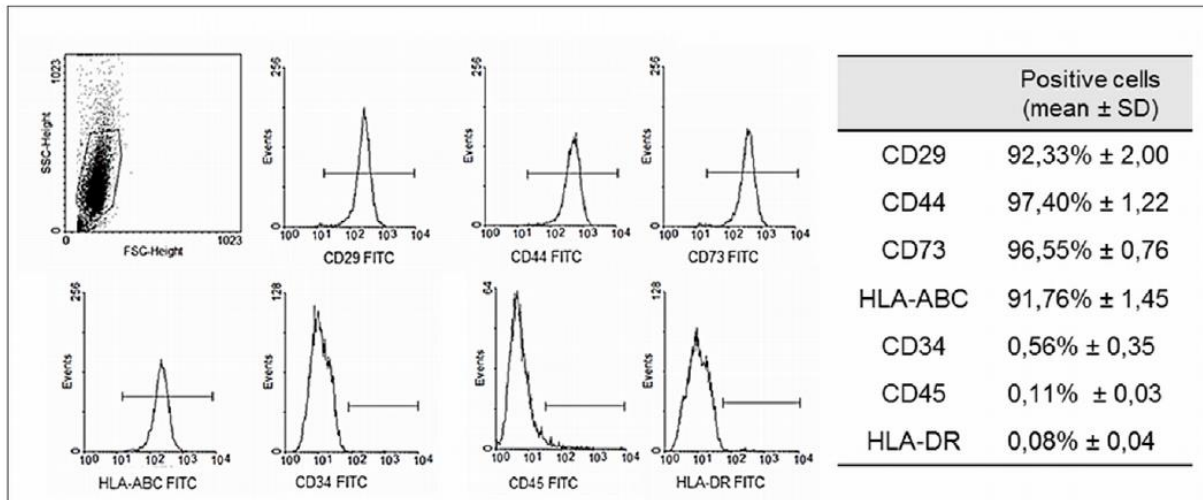
adipose tissue were expanded and their specific surface antigens were characterized by flow cytometry, which was essential for ensuring the purity of the cell population. Flow cytometry analysis indicated that the isolated cell population expressed CD29 ( $92,33\% \pm 2,00$ ), CD44 ( $97,40\% \pm 1,22$ ), CD73 ( $96,55\% \pm 0,76$ ) and HLA-ABC ( $91,76\% \pm 1,45$ ) and was completely isolated from lymphocytes and hematopoietic stem cells, as the cells did not express CD34 ( $0,56\% \pm 0,35$ ), CD45 ( $0,11\% \pm 0,03$ ) and HLA-DR ( $0,08\% \pm 0,04$ ) (Figure 2). This isolated cell population was designed human adipose tissue-derived stem cells (hASCs).

### Cell adhesion and morphology by SEM

Human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) were seeded onto the electrospun fiber mesh and cultured for seven days. The morphology of the cells was examined by SEM, which indicated that the cells adhered to and interacted with the fibrous structure and spread over the surface. The cells exhibited the typical spindle-shape morphology and cell-to-cell interactions were also observed (Figure 3).

### Cell proliferation and viability

A metabolic activity-based assay (MTT) was performed at various time points to determine the cells viability and proliferation when cultured in two types of culture medium: a basal medium and an endothelial differentiation medium. MTT results are directly proportional to the number of living cells. The results indicated that hASCs proliferated in both types of medium since the absorbance value enhanced from 7 to 21 days (Figure 4A). When cultured in basal medium, hASC exhibit enhanced proliferation when seeded on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh comparing to culture plates. During the endothelial differentiation, hASCs cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh proliferate less comparing to hASCs cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh with basal medium and hASCs cultured without fiber mesh with endothelial differentiation medium. When the endothelial differentiation was performed in cells cultured without the fiber mesh, no difference on the proliferation comparing with the basal medium was detected (Figure 4A) Moreover, cell viability assay employing Calcein-AM staining was performed to ensure the viability and assess the morphology and distribution of hASCs after 21 days (Figure 4B and C). These results showed that the cells cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh with basal medium are well distributed and the cells cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh with endothelial differentiation medium rearrange themselves forming circle-like structures that are characteristic of endothelial cells organization, mimicking the tubular organization of blood vessels.

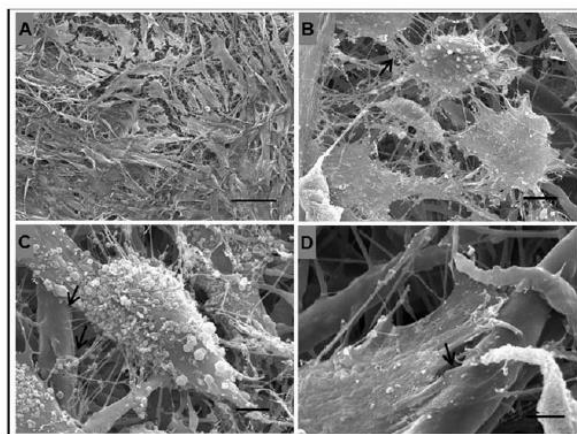


**Figure 2. Flow cytometry analysis of hASCs.** The expression pattern of specific antigens on the surface of the hASCs is depicted with representative histograms and the expression of each marker. The cell population expressed CD29, CD44, CD73 and HLA-ABC, and did not express CD34, CD45 and HLA-DR.  
doi:10.1371/journal.pone.0035422.g002

**Endothelial differentiation**

To analyze the cells differentiation towards the endothelial phenotype, an immunofluorescence assay was performed to examine the expression of endothelial markers. The hASCs cultured with basal medium indicated no specific staining for VE-Cadherin and vWF when cultured on TCPS coverslips (Figure 5A) and electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh (Figure 5D). After 21 days of culture in endothelial differentiation medium, hASCs expressed VE-Cadherin and vWF when cultured on TCPS coverslips (Figure 5B and C) and electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh (Figure 5E and F). When the endothelial induction was performed on hASCs cultivated on electrospun PHB/PHB-HV

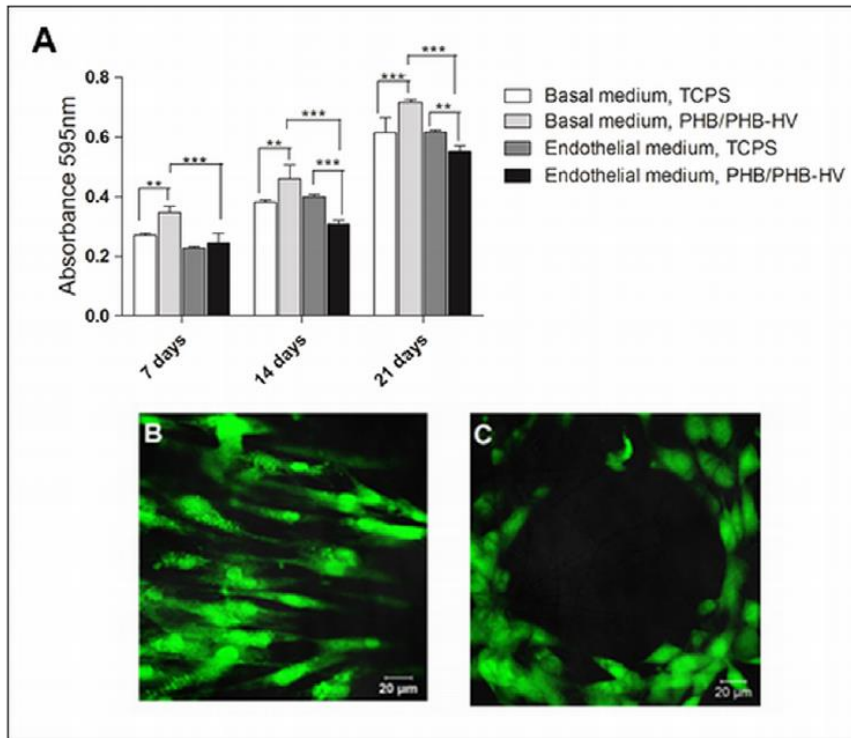
fiber mesh, the cells exhibited tube-like structures that were not present in hASCs differentiated in TCPS coverslips (Figure 5E and F). Additionally, the cells that were differentiated on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh presented enhanced fluorescence intensity for both markers comparing to cells differentiated on TCPS coverslip (Figure 5H). For more evidence of endothelial differentiation, the mRNA expression over time of selected endothelial marker on hASCs cultured on TCPS and on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh was analyzed by RT-PCR. The results indicated that the mRNA expression of VEGFR2 was detected in the cells cultured for 21 days in basal medium, but was upregulated after 21 days in endothelial differentiation medium, more evidenced in the cells cultured on electrospun PHB-HV fiber mesh than in TCPS (Figure 6). These results indicate that the cells, cultured on electrospun PHB-HV fiber mesh successfully differentiated into the endothelial phenotype.



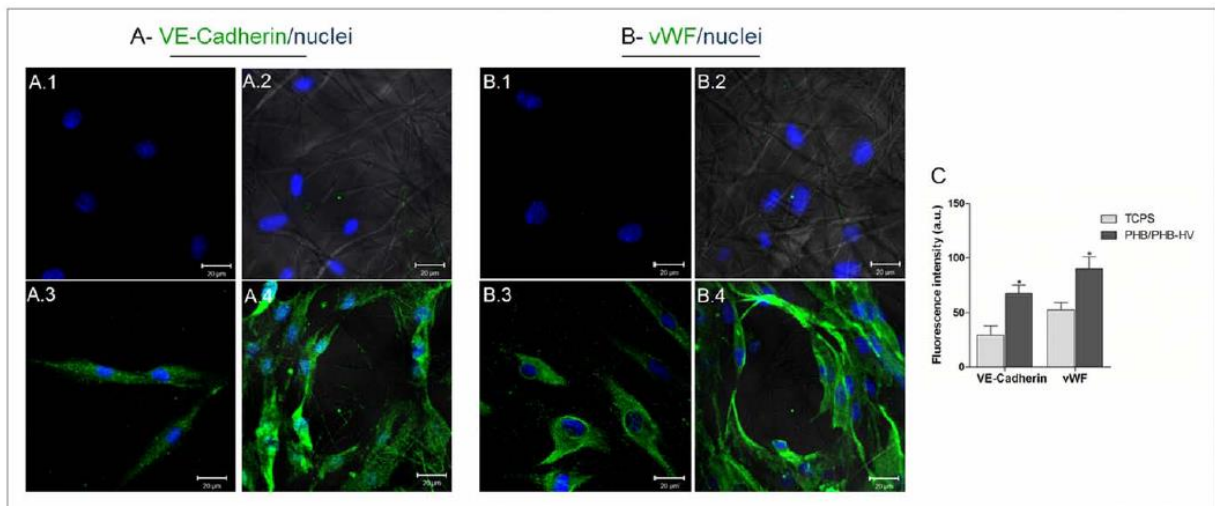
**Figure 3. SEM micrographs of the morphology of hASCs cultured for 7 days on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh.** (A) Panoramic view depicting high cell density and spindle-shape morphology, scale bar: 100 µm; (B) arrow indicate the interaction between two and more cells, scale bar: 10 µm; (C–D) arrows indicate the interaction of hASCs with the fibers, scale bar: 5 µm.  
doi:10.1371/journal.pone.0035422.g003

**Discussion**

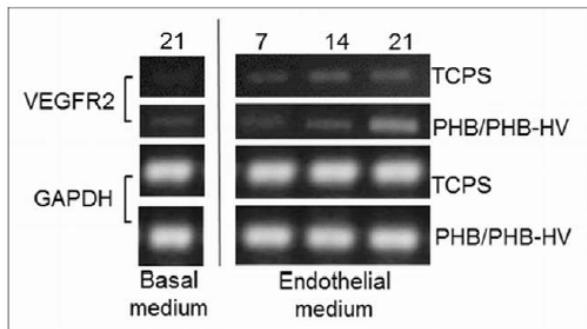
Regenerative medicine is based on the possibility of repairing tissues damaged by disease, trauma or senescence. In tissue engineering approaches, these repairs may be achieved by combining the materials field with the life science to create a construct that can temporarily replace mechanical function, guide tissue growth and degrade at rates appropriate to tissue regeneration [1]. Furthermore, for metabolically active tissues, such as the bone tissue, the vascularization of the construct to be implanted is crucial for cell survival and the formation of new tissue [6,38]. Bone growth greatly depends on the vascular network to supply nutrients, remove metabolites and allow osseous formation and repair. In large bone grafts, without the proper blood supply, seeded osteoblasts in the middle of porous scaffolds are subject to necrosis due to ineffective transportation of oxygen, nutrients and metabolites and only a shell of bone may be formed at the surface of the scaffold. In this way, the rate and range of vascular growth seem to determine the efficiency of new bone formation. Numerous strategies for vascularization of engineered bone tissue have been reported, but most involve sophisticated scaffolds, co-cultures systems and local delivery of angiogenic



**Figure 4. Proliferation and viability of hASCs cultured on TCPS and electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh.** (A) MTT proliferation assays performed 7, 14 and 21 days after the cell seeding and cultured in two specific medium: the basal medium and the endothelial differentiation medium. The results are expressed as the means  $\pm$  SD, (\*) indicating a significant difference with  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$ , (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; (B) cell viability after 21 days of cell culture with the basal medium and (C) the endothelial differentiation medium on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, as analyzed by Calcein-AM staining. doi:10.1371/journal.pone.0035422.g004



**Figure 5. Protein expression of hASCs during endothelial differentiation.** Confocal images of the expression of the VE-Cadherin (A) and the vWF factor (B) after 21 days. A.1 and B.1 - hASCs cultured with the basal medium on the TCPS coverslips, A.2 and B.2 - hASCs cultured with the endothelial differentiation medium on the TCPS coverslips, A.3 and B.3 - hASCs cultured with the basal medium on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, A.4 and B.4 - hASCs cultured with the endothelial differentiation medium on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh. Scale bar 20  $\mu$ m. The images, A.2, A.4, B.2 and B.4 represent the overlay of bright-field and confocal images for visualization of the fiber mesh. (C) Fluorescence intensity of the expression of VE-Cadherin and the vWF factor in cells differentiated on TCPS coverslip and electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh. The results are expressed as the means  $\pm$  SD, (\*) significant difference for  $p < 0.05$ . (a.u): arbitrary units. doi:10.1371/journal.pone.0035422.g005



**Figure 6. RT-PCR analysis of VEGFR2 mRNA expression during endothelial differentiation on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh and TCPS.** Total RNA was extracted from cells cultured on basal medium and endothelial differentiation medium for analysis of VEGFR2 mRNA expression. The cells were cultivated up to 21 days. doi:10.1371/journal.pone.0035422.g006

factors [11–17]. Thus, the ability to enhance the vascularization of bone grafts in a clinically relevant manner could vastly expand the utility of engineered bone tissue grafts.

In this study, we developed a fiber mesh made by blending PHB and PHB-HV using the electrospinning technique. These polymers are members of the PHA family and are useful for tissue engineering, due to their biocompatibility and biodegradability. Various scaffolds made by PHB or PHB-HV have demonstrated high levels of biocompatibility and cell attachment with various cell types [39–42]. Electrospinning has been proposed as a promising technique to produce fiber mesh with fiber diameters ranging from a few micrometers to the nanometer range [22]. Sombatmankhong and colleagues [37] successfully fabricated and characterized PHB/PHB-HV fibers in various compositions. In contrast to our fiber mesh, that exhibits fibers with diameters ranging from 300 nm to 1.3  $\mu\text{m}$ , the structures obtained by Sombatmankhong and colleagues [37] exhibited fibers with diameters ranging from 1.1  $\mu\text{m}$  to 4.0  $\mu\text{m}$ . The natural extracellular matrix is composed of randomly oriented collagens of nanometer-scale diameters similar to our structure, which favors cell adhesion, proliferation and differentiation. It was also reported the production of electrospun fiber meshes by blending PHB with other biomaterials, such as chitosan [43] and polyvinyl alcohol (PVA) [44]. Both fibers showed to be nontoxic and enable for cell attachment, growth and proliferation.

To assess the biocompatibility of electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, isolated human adipose tissue cells were expanded and characterized by flow cytometry. The isolated cell population exhibited a specific surface antigen expression pattern characteristic of mesenchymal stem cells, which indicated that these cells are human adipose-derived stem cells (hASCs) [45–47]. The SEM images indicated that the hASCs attached to the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh and spread extensively. The hASCs were able to interact with the PHB/PHB-HV fibers and with neighboring cells. The hASCs attached at multiple focal points at the surface of the fibers, demonstrating that the cells adapted to this new environment.

The MTT assay is employed to evaluate the cytotoxicity of various tissue engineering materials, and the absorbance value can provide an indication of the cells growth and proliferation. When cultured in basal medium, the hASCs proliferated more on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh over an increased culture time comparing to hASCs cultured on culture plates. This

confirmed that the fiber mesh promotes cell proliferation without a cytotoxic effect and is a better environment for the cells. The viability of the cells was confirmed by the Calcein-AM assay. After 21 days, the cells seeded onto the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh were live cells exhibiting intact membranes. Our results were in line with those of another study that seeded hASCs onto electrospun PLA nanofiber [48]. Furthermore, prior studies have demonstrated that hASCs can grow and proliferate with various types of biomaterials [49–52]. Thus, hASCs can be considered a good cell type for a tissue engineering approach, as they are derived from an abundant and available source and can be harvested with minimal morbidity. Also, these cells possess the ability to differentiate into various lineages under specific culture conditions [46]. Stem cells are a great source of cells for tissue engineering, due to their capability for self-renewal and potential for multilineage differentiation. These features are important because most differentiated progenitor cells are difficult to obtain and possess limited capacities for proliferation [53].

In this study, hASCs seeded on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh were induced to differentiate into the endothelial lineage with the purpose of obtaining endothelial cells for enhancing the vascularization of bone grafts. The ability of hASCs to differentiate into endothelial cells was previously reported [54,55]. We employed a specific medium to induce the differentiation and the MTT assay was performed to determine if the cells were viable and proliferative in the presence of the endothelial differentiation medium. MTT tests indicated that the cells cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh proliferated in the presence of the endothelial medium, but the basal medium was significantly more effective in stimulating cell proliferation. Research has demonstrated that the capacity to self-renew is unique to stem cells, and, as the differentiation stages increase, the proliferative potential diminishes [56]. Mature cells are unable to proliferate; however, the majority of lineages have a precursor or committed-progenitor stage in which proliferation and differentiation are balanced [57,58]. The results indicated that the cells proliferate less in endothelial differential medium, and the proliferation was even less when the cells were cultured on the fiber mesh comparing to TCPS, suggesting that the electrospun PHB/PHB-HV was helping the compromise of the cells to the endothelial lineage. Although the cells in the differentiation medium proliferated less than those in the basal medium, the cells that were on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh surface after 21 days were still viable, as demonstrated by the Calcein-AM assay.

In our differentiation system, the hASCs expressed endothelial markers, such as the vWF factor and VE-Cadherin. These markers are generally expressed when mesenchymal stem cells are induced to endothelial differentiation with medium containing VEGF and bFGF [54,59]. Additionally, the expressions of those markers were enhanced on the cells cultured on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh. These expression are important for maintain the endothelial cells functions. VWF factor mediate the adhesion of blood platelets at sites of vascular injury and stabilizes clotting factor VIII. Also, vWF may help to anchor endothelial cells to ECM [60]. VE-Cadherin is a strictly endothelial specific adhesion molecule located at junctions between endothelial cells and plays an important role in the maintenance and control of endothelial cells contacts permitting the formation of a mature and stable vascular network [61].

Furthermore, the cells that were seeded onto the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, when induced to endothelial differentiation, spread randomly and formed interconnected clusters with delineated of circular spaces among them. This capillary-like

structure is similar to the structure formed when endothelial cells are cultivated in specialized conditions that mimics ECM structure, i.e collagen I gel supplemented with laminin [62], fibrin gel [63,64], self-assembling peptide scaffold [65] and organotypic membrane systems [66]. These studies demonstrate that the capillary development depends on the interactions between endothelial cells and matrix proteins or biomaterials. In this sense, the structure of electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh, that mimics the nanofiber structure of ECM can be favoring the endothelial differentiation.

Additionally, the differentiation of hASCs with VEGF also upregulates the expression of the VEGF receptor 2 (KDR), which plays a major role in the *in vivo* angiogenesis and contributes, also, with matrix-metalloproteinase to the formation of capillary-like structures *in vitro* [59]. In resume, the differentiation results indicates that the structure of electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh associated with specific growth factor, VEGF and bFGF, can improve the endothelial differentiation of hASCs. It has been reported the use of electrospinning technique as a good choice for developing structures for vascular tissue engineering. Many types of biomaterials, such as poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), polycaprolactone and silk, have been processed and have good properties that supports the attachment and proliferation of differently sources of endothelial cells [67–71]. However, these works use only endothelial cells and we demonstrated the possibility of stimulating the endothelial differentiation from hASCs. This enables the use of an autologous and proliferative source of cells.

In conclusion, this study demonstrated that the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh is a suitable and biocompatible material that can be employed in combination with endothelial differentiated cells. This new construct can be used for enhancing vascularization in engineered bone tissue. The differentiation of cells on the fiber mesh surface is interesting because the process can be conducted separately from other types of differentiation, which could prevent nonspecific differentiation. Furthermore, studies *in vivo* need to be performed to verify the efficiency of this new approach.

## Materials and Methods

### Preparation of polymers scaffolds

The PHB and PHB-HV polymers were obtained through the fermentation of sugar cane syrup from *Ralstonia eutropha* bacteria. The polymers were produced by PHB Industrial S.A. (PHBISA), Usina da Pedra, Serrana-SP, Brazil. The PHB/PHB-HV fiber mesh was produced in the 3B's Research Group - Portugal by the polymer processing technique named electrospinning. PHB and PHB-HV were dissolved in chloroform/dimethylformamide (30:70) at a concentration of 5% (w/v). The resulting polymer solution was placed into a 5 ml syringe, which was fitted with a metallic needle having an internal diameter of 0.8 mm. The syringe was connected to a syringe pump (KDS100, KD Scientific) to control the flow rate. A positive electrode was connected to the needle. A flat aluminum sheet covering the ground plate was employed as the collector. A high voltage power supply was employed to generate the electrostatic field (0–25 kV). The capillary tip-to-collector distance and the flow rate were 15 cm and 1 ml/h, respectively. The applied voltage was 9 kV. The conditions for the electrospinning were optimized to obtain a continuous process and reproducible mesh morphology. The scaffolds were sterilized with  $\gamma$  irradiation from a  $\text{Co}^{60}$  source at 15 kGy, and the surface morphology was examined by scanning electron microscopy (Leica Cambridge S360 micro-

scope). The SEM images of three different samples were analyzed using ImageJ software to determine the thickness and fiber diameter.

### Isolation of ASC from human adipose tissue

Human adipose tissue was obtained with written informed consent from healthy patients who had undergone liposuction surgery for an esthetic reasons in the “Plastic Surgery Center – Dr. Luiz Alberto Lamana” in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. The liposuction tissue was collected after obtaining informed consent from the patients according to procedures approved by Ethics Committee of Federal University of Minas Gerais. No diabetes, hepatitis, metabolic diseases, or other systemic complications were reported for these donors. The isolation and culture of human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) was performed as described by Zuk [45]. Briefly, adipose tissues were washed with phosphate-buffered saline (PBS), and the extracellular matrix was digested with 0.15% type I collagenase for two hours and centrifuged at 1400 rpm for 10 min to obtain a pellet, which was incubated for two days at 37°C/5%  $\text{CO}_2$  atmosphere in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 U/mL streptomycin (Basal medium). Following incubation, the tissue culture plates were washed to remove residual non-adherent cells and were maintained at 37°C/5%  $\text{CO}_2$  in the control medium and were cultured for 7 to 10 days until they reached confluence. The medium was changed every two days. The cells were then harvested by digestion with 0.05% trypsin-EDTA, centrifuged at 1400 rpm for 5 minutes, suspended in culture medium, and plated at a density of approximately  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Cells were utilized at passage 4.

### Flow cytometry analysis

The cell surface antigens specific to hASCs were characterized by flow cytometry. Cells were harvested and washed with PBS. Approximately  $5 \times 10^5$  cells were incubated for 30 min at 4°C with the following primary antibodies: mouse anti-human CD29 (Santa Cruz Biotechnology), CD34 (Abcam), CD44 (Santa Cruz Biotechnology), CD45 (BD Bioscience), CD73 (PE-conjugated, BD Bioscience), HLA-ABC (FITC-conjugated, Abcam) and HLA-DR (FITC-conjugated, Abcam). After washing, the cells were incubated with a secondary antibody, the FITC-labeled anti-mouse IgG (Calbiochen), for 30 min at 4°C, washed again and suspended in PBS. As a control, cells were incubated with only the secondary antibody to exclude nonspecific binding. Quantitative analysis was performed using a FACScan argon laser cytometer (Becton Dickson, San Jose, CA). For each sample, 15,000 events were acquired and analyzed with the CELL QUEST software. Cell surface marker expression was determined by comparison with the isotype control on a histogram plot and data analysis was performed using WinMid 2.8 analysis software.

### Cell seeding

The hASCs at the passage 4 were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells onto the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh with 1 cm<sup>2</sup> and onto TCPS coverslip that had previously been placed in 24 well culture plates. The cells were allowed to attach to the substrates for 1 h, then 1 ml of fresh culture medium was added to each well. After, the cells were incubated in a humidified atmosphere at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ .

### Morphological analysis using scanning electron microscopy (SEM)

In order to examine the morphology of hASCs, the cells were cultured for 7 days on the electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh and the constructs prepared for SEM analysis. Basically, the samples were washed twice with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h, dehydrated in increasing concentrations of ethanol (from 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, and 95% to 100%) and were critical point-dried. Next, the samples were mounted on aluminum stumps, coated with gold and examined with a scanning electron microscope at 15 KV (JEOL/JSM-6360LV from the Department of Metallurgy – UFMG).

### Cellular viability and proliferation

The viability and proliferation of the hASCs on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh was determined by the tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay, which is based on the reduction of tetrazolium salt to formazan crystals by the dehydrogenase present in living cells mitochondria [39]. At various culture times 7, 14 and 21 days after cell seeding, the medium was removed and 210  $\mu$ l of fresh culture media and 170  $\mu$ l of MTT solution (5 mg/mL in PBS) were added to each well, followed by incubation for 2 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The resulting formazan salts were solubilized with 210  $\mu$ L of SDS-10% HCl (sodium dodecyl sulfate – hydrochloric acid) for 18 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and the optical density of the solution was evaluated with a microplate spectrophotometer at 595 nm. Cells cultured without the scaffold were employed as the control for the proliferation experiment, which evaluated the proliferation of the hASCs cultured with the basal medium and the endothelial differentiation medium.

### Morphology and distribution

For the assessment of the cell morphology and distribution and viability, hASCs were seeded onto electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh at various time point over 7, 14 and 21 days and were incubated for 20 min in Tyrode's HEPES buffer (140 mmol/l NaCl, 0.34 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.9 mmol/l KCl, 10 mmol/l HEPES, 12 mmol/l NaHCO<sub>3</sub>, 5 mmol/l glucose, pH 7.4) containing 0.1 mM Calcein Acetoxymethylester (Calcein-AM). Calcein-AM is a non-fluorescent, cell-permeant compound that is hydrolyzed by intracellular esterases into the fluorescent anion calcein. The Calcein-AM stained scaffold was placed on a microscope slide and visualized through confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta). The cellular viability was evaluated for cells cultured with the basal medium and the endothelial differentiation medium.

### Endothelial cell differentiation

The hASCs growing on electrospun PHB/PHB-HV fiber mesh scaffolds and on tissue culture polystyrene (TCPS) coverslips were induced to differentiate into the endothelial lineage by culturing with DMEM medium containing 2% FBS, 50 ng/mL VEGF and 10 ng/mL bFGF. The cells were cultivated for 7, 14 and 21 days in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every two days.

### Immunofluorescence

After 21 days of endothelial differentiation, the cells were analyzed by immunofluorescence for the presence of endothelial

cell markers. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT). Samples were then rinsed with 0.1% Triton for 10 min at RT. After washing with PBS, the samples were incubated overnight at 4°C with 1:100 dilution of mouse anti-human vWF (VW92-3, Abcam) and 1:20 dilution of FITC-labeled rabbit polyclonal anti-human VE-Cadherin (Abcam) primary antibodies. Following PBS washing, the samples that were incubated with the vWF antibody were next incubated with the anti-mouse Alexa Fluor 488 (Molecular Probes) secondary antibody for 1 h at RT. The nuclei were counterstained with 0.2  $\mu$ g/mL Hoechst in PBS for 20 min. Next, the cells were washed with PBS, mounted and visualized through confocal microscopy (Zeiss LSM 510 Meta). The fluorescence intensity was calculated by measuring the intensity of the pixels using ImageJ software. The images were analyzed only in the green channel. Using ROI manager, a region was drawn around each cell to be measured, and other region with no fluorescence was drawn to be used for background subtraction. The mean of the intensity of the pixels of each cell was subtracted from the mean of the background and plotted on a graph, using GraphPad Prism 5.0. Each bar represents an average of 15 cells in three different regions.

### Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RT-PCR was performed to evaluate the relative mRNA levels expressed by the receptor of VEGF type 2 (VEGFR2) gene. Total cellular RNA was extracted from hASCs cultured on TCPS and PHB/PHB-HV fiber mesh up to 21 days (basal medium and differentiation medium) with Trizol (Invitrogen), as described by the manufacturer. Total RNA was treated with the RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV RT (Fermentas) to generate cDNA using an oligo(dT) adapter primer. Next, PCR amplification was performed for VEGFR2 and GAPDH cDNA. The primers used were VEGFR2 forward: 5'GGAATACCCCTTGAGTCC3', VEGFR2 reverse: 5'CCTCCAACCTGCCAATACC3', GAPDH forward: 5'GGTATCGTGGAAGGACTCATGAC3' and GAPDH reverse: 5'ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC3'. The PCR cycles were as follows: 94°C for 2 min, 94°C for 30 s, 56°C for 45 s and 72°C for 45 s (30 cycles), 72°C for 10 min. The RT-PCR products were analyzed through 1% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide.

### Statistical analysis

All experiments were repeated 3 times in triplicate, and the data were presented as the mean  $\pm$  SD. Statistical comparisons were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post-hoc test. P-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

### Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Hélio Chiarini Garcia Ph.D and CEMEL (Centro de Microscopia Eletrônica/Brazil) for assisting with the SEM studies.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AZ SN AMG. Performed the experiments: AZ NRPE NMB AM DAG. Analyzed the data: AZ SN AM AMG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AMG NMN RLR. Wrote the paper: AZ.



## References

- Langer R, Vacanti JP (1993) TISSUE ENGINEERING. *Science* 260: 920–926.
- Ravindran S, Song YQ, George A (2010) Development of Three-Dimensional Biomimetic Scaffold to Study Epithelial-Mesenchymal Interactions. *Tissue Engineering Part A* 16: 327–342.
- Gloria A, De Santis R, Ambrosio L (2010) Polymer-based composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics* 8: 57–67.
- Yu HY, VandeVord PJ, Mao L, Matthew HW, Wooley PH, et al. (2009) Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials* 30: 508–517.
- Zhang ZY, Teoh SH, Chong MSK, Lee ESM, Tan LG, et al. (2010) Neovascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials* 31: 608–620.
- Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA (2008) Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology* 26: 434–441.
- Cassell OCS, Hofer SOP, Morrison WA, Knight KR (2002) Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *British Journal of Plastic Surgery* 55: 603–610.
- Jain RK, Au P, Tam J, Duda DG, Fukumura D (2005) Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology* 23: 821–823.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, et al. (2008) Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther* 3: 254–264.
- Santos MI, Reis RL (2010) Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. *Macromolecular Bioscience* 10: 12–27.
- Nomi M, Atala A, De Coppi P, Soker S (2002) Principals of neovascularization for tissue engineering. *Molecular Aspects of Medicine* 23: 463–483.
- Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, et al. (2010) Engineered vascularized bone grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 3311–3316.
- Aguirre A, Planell JA, Engel E (2010) Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400: 284–291.
- Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, et al. (2010) The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 31: 6959–6967.
- Klenke FM, Liu YL, Yuan HP, Hunziker EB, Siebenrock KA, et al. (2008) Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 85A: 777–786.
- Wernike E, Montjovent MO, Liu Y, Wismeijer D, Hunziker EB, et al. (2010) VEGF INCORPORATED INTO CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS PROMOTES VASCULARISATION AND BONE FORMATION IN VIVO. *European Cells & Materials* 19: 30–40.
- Davis GE, Senger DR (2005) Endothelial extracellular matrix - Biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation Research* 97: 1093–1107.
- Araujo JV, Martins A, Leonor IB, Pinho ED, Reis RL, et al. (2008) Surface controlled biomimetic coating of polycaprolactone nanofiber meshes to be used as bone extracellular matrix analogues. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 19: 1261–1278.
- Sill TJ, von Recum HA (2008) Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29: 1989–2006.
- Wang YY, Lu LX, Feng ZQ, Xiao ZD, Huang NP (2010) Cellular compatibility of RGD-modified chitosan nanofibers with aligned or random orientation. *Biomedical Materials* 5.
- Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX (2009) Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology* 1: 226–236.
- Martins A, Araujo JV, Reis RL, Neves NM (2007) Electrospun nanostructured scaffolds for tissue engineering applications. *Nanomedicine* 2: 929–942.
- Toyokawa N, Fujioka H, Kokubu T, Nagura I, Inui A, et al. (2010) Electrospun Synthetic Polymer Scaffold for Cartilage Repair Without Cultured Cells in an Animal Model. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 26: 375–383.
- Xie JW, MacEwan MR, Schwartz AG, Xia YN (2010) Electrospun nanofibers for neural tissue engineering. *Nanoscale* 2: 35–44.
- Martins A, Duarte ARC, Faria S, Marques AP, Reis RL, et al. (2010) Osteogenic induction of hBMSCs by electrospun scaffolds with dexamethasone release functionality. *Biomaterials* 31: 5875–5885.
- da Silva MLA, Martins A, Costa-Pinto AR, Costa P, Faria S, et al. (2010) Cartilage Tissue Engineering Using Electrospun PCL Nanofiber Meshes and MSCs. *Biomacromolecules* 11: 3228–3236.
- Seal BL, Otero TC, Panitch A (2001) Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science & Engineering R-Reports* 34: 147–230.
- Lee SY (1996) Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* 49: 1–14.
- Wu Q, Wang Y, Chen GQ (2009) Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* 37: 1–12.
- Tokiwa Y, Calabia BP (2004) Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters* 26: 1181–1189.
- Choi GG, Kim HW, Kim YB, Rhee YH (2005) Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes sp* MT-16. *Biotechnology and Bioengineering* 10: 540–545.
- Cheng S, Chen GQ, Leski M, Zou B, Wang Y, et al. (2006) The effect of D,L-beta-hydroxybutyric acid on cell death and proliferation in L929 cells. *Biomaterials* 27: 3758–3765.
- Engelberg I, Kohn J (1991) PHYSICOMECHANICAL PROPERTIES OF DEGRADABLE POLYMERS USED IN MEDICAL APPLICATIONS - A COMPARATIVE-STUDY. *Biomaterials* 12: 292–304.
- Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR (2006) Polyhydroxyalkanoate (PHA)/inorganic phase composites for tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 7: 2249–2258.
- Chen GQ, Wu Q (2005) The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials* 26: 6565–6578.
- Gogotov IN, Gerasin VA, Knyazev YV, Antipov EM, Barazov SK (2010) Composite Biodegradable Materials Based on Polyhydroxyalkanoate. *Applied Biochemistry and Microbiology* 46: 607–613.
- Sombatmankhong K, Suwantong O, Waleetorncheepsawat S, Supaphol P (2006) Electrospun fiber mats of poly(3-hydroxybutyrate), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics* 44: 2923–2933.
- Wan C, Gilbert SR, Wang Y, Cao X, Shen X, et al. (2008) Activation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha pathway accelerates bone regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 686–691.
- Kose GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysal Y, Ozdemir T, et al. (2005) Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials* 26: 5187–5197.
- Suwantong O, Waleetorncheepsawat S, Sanchavanakit N, Pavasant P, Chemsunthorn P, et al. (2007) In vitro biocompatibility of electrospun poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fiber mats. *International Journal of Biological Macromolecules* 40: 217–223.
- Rathbone S, Furrer P, Lubben J, Zinn M, Cartmell S (2010) Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93A: 1391–1403.
- Ma GP, Yang DZ, Wang KM, Han J, Ding SM, et al. (2010) Organic-Soluble Chitosan/Polyhydroxybutyrate Ultrafine Fibers as Skin Regeneration Prepared by Electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* 118: 3619–3624.
- Ma G, Yang D, Wang K, Han J, Ding S, et al. (2010) Organic-Soluble Chitosan/Polyhydroxybutyrate Ultrafine Fibers as Skin Regeneration Prepared by Electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* 118: 3619–3624.
- Asran AS, Razghandi K, Aggarwal N, Michler GH, Groth T (2010) Nanofibers from Blends of Polyvinyl Alcohol and Polyhydroxy Butyrate As Potential Scaffold Material for Tissue Engineering of Skin. *Biomacromolecules* 11: 3413–3421.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, et al. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* 7: 211–228.
- Zhu YX, Liu TQ, Song KD, Fan XB, Ma XH, et al. (2008) Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochemistry and Function* 26: 664–675.
- Carvalho PP, Wu X, Yu G, Dias IR, Gomes ME, et al. (2011) The effect of storage time on adipose-derived stem cell recovery from human lipospirates. *Cells Tissues Organs* 194: 494–500.
- McCullen SD, Stevens DR, Roberts WA, Clarke LI, Bernacki SH, et al. (2007) Characterization of electrospun nanocomposite scaffolds and biocompatibility with adipose-derived human mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine* 2: 253–263.
- Haimi S, Suuriniemi N, Haaparanta A-M, Ella V, Lindroos B, et al. (2009) Growth and Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells on PLA/Bioactive Glass and PLA/beta-TCP Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* 15: 1473–1480.
- Ye C, Hu P, Ma MX, Xiang Y, Liu RG, et al. (2009) PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30: 4401–4406.
- Rada T, Reis RL, Gomes ME (2009) Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Their Application in Bone and Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B-Reviews* 15: 113–125.
- Lin SD, Huang SH, Lin YN, Wu SH, Chang HW, et al. (2011) Engineering Adipose Tissue from Uncultured Human Adipose Stromal Vascular Fraction on Collagen Matrix and Gelatin Sponge Scaffolds. *Tissue Engineering Part A* 17: 1489–1498.
- Arosarena O (2005) Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 13: 233–241.
- Cao Y, Sun Z, Liao LM, Meng Y, Han Q, et al. (2005) Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve

- postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332: 370–379.
55. Fischer IJ, McIlhenny S, Tulenko T, Golesorkhi N, Zhang P, et al. (2009) Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells: Effects of Endothelial Cell Growth Supplement and Shear Force. *Journal of Surgical Research* 152: 157–166.
  56. Breyner NM, Hell RCR, Carvalho LRP, Machado CB, Peixoto Filho IN, et al. (2010) Effect of a Three-Dimensional Chitosan Porous Scaffold on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes. *Cells Tissues Organs* 191: 119–128.
  57. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C (2003) Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. pp 170–193.
  58. Mountford JC (2008) Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine* 18: 1–12.
  59. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, et al. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22: 377–384.
  60. Sadler JE (2009) von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1: 24–27.
  61. Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roulot V, Pignot-Paintrand I, et al. (1999) Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 126: 2093–2102.
  62. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ (1988) Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589–1598.
  63. Vaillhé B, Ronot X, Tracqui P, Usson Y, Tranqui L (1997) In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to alpha(v)beta3 integrin localization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33: 763–773.
  64. Chalupowicz DG, Chowdhury ZA, Bach TL, Barsigian C, Martinez J (1995) Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J Cell Biol* 130: 207–215.
  65. Narmoneva DA, Oni O, Sieminski AL, Zhang S, Gertler JP, et al. (2005) Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials* 26: 4837–4846.
  66. Salerno S, Campana C, Morelli S, Drioli E, De Bartolo L (2011) Human hepatocytes and endothelial cells in organotypic membrane systems. *Biomaterials* 32: 8848–8859.
  67. Mo XM, Xu CY, Kotaki M, Ramakrishna S (2004) Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 25: 1883–1890.
  68. Wu H, Fan J, Chu C-C, Wu J (2010) Electrospinning of small diameter 3-D nanofibrous tubular scaffolds with controllable nanofiber orientations for vascular grafts. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 21: 3207–3215.
  69. Ku SH, Park CB (2010) Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 31: 9431–9437.
  70. Liu H, Li X, Zhou G, Fan H, Fan Y (2011) Electrospun sulfated silk fibroin nanofibrous scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials* 32: 3784–3793.
  71. Xiang P, Li M, Zhang C-y, Chen D-l, Zhou Z-h (2011) Cytocompatibility of electrospun nanofiber tubular scaffolds for small diameter tissue engineering blood vessels. *International Journal of Biological Macromolecules* 49: 281–288.