

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

**NATHÁLIA ALVES RODRIGUES LIMA**

**CULTIVO DE CÉULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM MATRIZES DE  
SUPORTE À BASE DE QUITOSANA**

Belo Horizonte  
2016

NATHÁLIA ALVES RODRIGUES LIMA

**CULTIVO DE CÉULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS EM MATRIZES DE  
SUPORTE À BASE DE QUITOSANA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular.

**Orientador:** Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes

Belo Horizonte  
2016

## **DEDICATÓRIA**

**Aos meus amados pais,  
que sempre estiveram ao meu lado!  
Aos meus irmãos,  
exemplos de luta e perseverança!**

## AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação marca o fim de mais uma importante etapa da minha vida. Para chegar até aqui foi preciso construir uma grande caminhada, de muito aprendizado, amadurecimento, choros, momentos em que pensei em desistir, outros em que a única coisa que me importava era seguir em frente e aproveitar ao máximo do que a pós graduação poderia me proporcionar. Hoje olho para trás e vejo que dias intermináveis na verdade se passaram rápido e que as noites em claro de estudos valeram a pena. Chegar até aqui só foi possível por que muitas pessoas estiveram ao meu lado e eu não posso deixar de agradecer a todos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes, pela orientação e introdução ao mundo das células-tronco e engenharia tecidual, pelo exemplo de humildade e profissionalismo.

A todos os amigos do LICM1 e LICM2 por me mostrarem que o espírito de cooperação e união fazem a força. Obrigada por toda ajuda, pelos conselhos, pelos desabafos, por tornarem o ambiente de trabalho um local de alegria e realizações de sonhos. Um agradecimento especial a Thaís, que me acudiu em muitos dos meus apertos, e por todo conhecimento transmitido, a Pricila, pela amizade e carinho, e Joyce, que esteve ao meu lado em todos os momentos, e contribuiu imensamente para a realização desse trabalho, a sua ajuda e amizade foi essencial em cada momento. Seu conhecimento e apoio enriqueceram este trabalho. Obrigada por ter sido meu braço direito, um anjo que apareceu nessa etapa da minha vida!! Essa vitória é nossa!! Huhul!!

Agradeço a todos os membros da banca, Dra. Vanessa Pinho da Silva, Dra. Érika Cristina Jorge e Dra. Carolina Reis de Oliveira por terem aceitado gentilmente avaliar este trabalho.

Agradeço a Betinha, por todo carinho com que cuida das meninas do LICM, do laboratório e do biotério.

Ao Professor Rodrigo Lambert Oréfice e Anderson M. Peres, do laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos por todo suporte metodológico para caracterização mecânica das membranas. Obrigada pela paciência e aprendizado.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) pela irradiação das placas e ao Marcelo Cipreste do serviço de nanotecnologia do CDTN pela paciência, boa vontade e grande ajuda nas análises de FTIR.

Ao Marcos Augusto Sá, pela imensa paciência, e aprendizado na cirurgia com os ratos, foi essencial!!!

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às agências financiadoras CNPQ, FAPEMIR e Colgate-Palmolive.

Agradeço todos os dias pela oportunidade de crescer no seio de uma família tão maravilhosa, sendo fontes constantes de amor, carinho, apoio, amizade. Obrigada Pai, obrigada Mãe, por me permitirem voar em busca dos meus sonhos, e principalmente por não me deixarem desistir, por toda força, por não me abandonarem, por estarem presentes em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Sem vocês eu não chegaria aonde cheguei. Amo Vocês. Obrigada Bruno e Marcelo, por serem mais do que irmãos, serem amigos, companheiros, por todo apoio e toda palavra amiga que me deram forças para seguir em frente.

Em fim, Agradeço a Deus, que sempre me protegeu, atendendo minhas orações, me dando as mãos nos momentos difíceis, e não me deixando sentir sozinha, e a Virgem Maria, por sempre interceder por mim.

## RESUMO

A Engenharia tecidual é um campo interdisciplinar com objetivo de desenvolver substitutos biológicos capazes de interagir com tecidos lesados auxiliando no seu reparo e regeneração, restaurando sua função. A quitosana, polímero natural, tem sido proposta como biomaterial devido suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, possuindo grupos funcionais importantes que permitem a sua reticulação, bem como sua associação com outros polímeros. Uma das mais promissoras áreas de pesquisa utilizando matrizes de quitosana envolve o uso de células-tronco, que são capazes de se diferenciar em células especializadas. O objetivo do nosso trabalho foi desenvolver membranas a partir da associação de quitosana e gelatina, reticuladas ou não com glutaraldeído ou tripolifosfato de sódio (TPP) para auxiliar na regeneração de tecidos lesados, empregando princípios da engenharia de tecidos. Membranas de quitosana-gelatina foram produzidas pelo método de evaporação de solvente e posteriormente reticuladas com glutaraldeído ou TPP. As membranas foram caracterizadas (microscopia eletrônica de varredura, capacidade de absorção de água, degradação enzimática, Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e propriedades mecânicas). Células tronco derivadas de tecido adiposo hASC foram cultivadas nas membranas, sua viabilidade, morfologia, adesão e capacidade de diferenciação foram analisadas; foi realizada a avaliação da biocompatibilidade *in vivo* dessas membranas utilizando ratos Lewis. Membranas reticuladas ou não com glutaraldeído ou TPP, apresentaram-se finas, transparentes e densas, com superfície uniforme, lisa e plana, sendo que membranas reticuladas com glutaraldeído absorveram menor quantidade de água e demoram mais para se degradar; espectros com picos característicos da quitosana e da gelatina foram observados em todas as membranas; a reticulação altera as propriedades mecânicas das membranas. Em todas as membranas houve adesão de hASC, que permaneceram com sua morfologia preservada, e tiveram viabilidade aumentada nos tempos avaliados; apresentando capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos, além disso, após o implante foi observado, em todas as membranas, uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho. Nossos resultados demonstram o potencial da utilização dos polímeros quitosana e gelatina para o desenvolvimento de matrizes de suporte para uso na engenharia tecidual.

**Palavras-chaves:** Engenharia de tecidos, quitosana, gelatina, células-tronco.

## ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field in order to development of biological substitutes with interact with damage tissue support in their repair and regeneration, restoring their function. Chitosan (Ch), a naturally derived polymer, is a suitable functional biomaterial because it is biocompatible, biodegradable, immunogenic, nontoxic, furthermore it has important functional groups which enable their cross-linking, as well as its association with other polymers. One of the most promising areas of research utilizing chitosan and gelatin membranes involves the use of stem cells, cells which are capable of self-regeneration and differentiation into one or more types of specialized cells. Our aim was to develop membranes from chitosan and gelatin association, crosslinked or non-crosslinked with glutaraldehyde or sodium tripolyphosphate to assist in regeneration with damaged tissue, using tissue engineering principles. Chitosan-gelatin membranes were produced by solvent evaporation technique and crosslinking by glutaraldehyde and TPP. Membranes were characterized (scanning electron microscopy, water absorption capacity, enzymatic degradation, Fourier transform infrared spectroscopy and mechanical properties). Human adipose-derived stem cells (hASC) were cultured on the membranes, were analyzed its viability, morphology, adhesion and differentiation capacity this cells; *in vivo* biocompatibility were evaluation using Lewis rats model. Crosslinked or non-crosslinked with glutaraldehyde or TPP membranes, we present thin, transparent and dense, with uniform, smooth and plane surface, the glutaraldehyde crosslinked membranes showed lower water uptake and slower degradation, comparing with others membranes; were observed spectra with characteristic peaks of chitosan and gelatin in all membranes; the crosslinking changes the mechanical properties of the membranes. The membranes of chitosan-gelatin produced were effective in promoting of hASC adhesion, with maintaining its preserved morphology, and had an increased viability in the evaluated times, with present differentiation potential into adipocytes and osteocyte, additionally, after implantation was observed for all membranes, an foreign body response. Our results demonstrate that chitosan and gelatin are a potential polymers in the development of new scaffolds for use in tissue engineering.

**Key-words:** Tissue engineering, chitosan, gelatin, stem cells.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismos de reparo tecidual .....  | 15 |
| Figura 2. Princípios básicos da engenharia tecidual .....  | 17 |
| Figura 3. Reação de desacetilação e estrutura química da quitina e da quitosana...24   |    |
| Figura 4. Procedimento cirúrgico para avaliação da biocompatibilidade in vivo das membranas quitosana-gelatina (3:1).....                                  | 49 |
| Figura 5. Células tronco do tecido adiposo isoladas e cultivadas .....   | 50 |
| Figura 6. Perfil imunofenotípico das hASC realizado por citometria de fluxo. ....  | 51 |
| Figura 7. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC cultivadas em placas de 24 poços sem membranas .....  | 52 |
| Figura 8. Membranas de quitosana (1%) produzidas pelo método de evaporação de solvente.....  | 53 |
| Figura 9. Avaliação da adesão das hASC em membranas de quitosana (1%) .....  | 54 |
| Figura 10. Ensaio de viabilidade celular das hASC cultivadas nas membranas de quitosana (1%) .....   | 55 |
| Figura 11. Membranas de quitosana-gelatina (3:1) produzidas pelo método de evaporação de solvente .....  | 56 |
| Figura 12. Análise morfológica por microscopia óptica das hASC aderidas à membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não.....                    | 57 |
| Figura 13. Avaliação da adesão das hASC, por MEV, em membranas de quitosana-gelatina (2:1) retiucladas ou não .....  | 58 |
| Figura 14. Avaliação da viabilidade das células cultivadas em membrana de quitosana-gelatina (3:1) sem reticular .....                                     | 59 |
| Figura 15. Avaliação da Proliferação e viabilidade das células cultivadas em membrana de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com glutaraldeído 0,02%..... | 59 |
| Figura 16. Avaliação da viabilidade das células cultivadas em membrana de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com TPP 0,1%.....                           | 60 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 17. Avaliação da Proliferação e viabilidade das células cultivadas em membrana de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com TPP 1%.....                    | 60 |
| Figura 18. Ensaio de MTT das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não .....   | 61 |
| Figura 19. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC, cultivadas nos diferentes tipos de membranas, em linhagem adipogênica .....                         | 62 |
| Figura 20. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC, cultivadas em membranas, em linhagem osteogênica.....   | 63 |
| Figura 21. Caracterização morfológica das membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não .....   | 64 |
| Figura 22. Ensaio de absorção de água das membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....  | 65 |
| Figura 23. Ensaio de degradação enzimática <i>in vitro</i> das membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....   | 66 |
| Figura 24. Gráficos relativos às curvas de tensão-deformação no ensaio de tração para as membranas de quitosana-gelatina .....                                   | 68 |
| Figura 25. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier nas membranas .....   | 70 |
| Figura 26. Análises histológicas de H&E após 2 dias do implante de membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não com glutaraldeído ou TPP ,1% e 1%... | 71 |
| Figura 27. Análises histológicas de H&E dos implantes subcutâneos de membranas de Quitosana:Gelatina (3:1) reticuladas ou não. ....                              | 72 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Tipos de membranas de quitosana (1%) .....                                     | 39 |
| <b>Tabela 2.</b> Grupos de membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....                          | 41 |
| <b>Tabela 3.</b> Grupos experimentais para avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> ..... | 48 |
| <b>Tabela 4.</b> Propriedades mecânicas das membranas de quitosana-gelatina (3:1).....          | 68 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C** - Grau Celsius

**CDTN/CNEN** - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia nuclear

**cm** – centímetros

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**DMEM** – Meio Eagles Modificado por Dulbecco

**EDTA** – Ácido Tetracético Etilenodiamidina

**ESC** – Células-tronco Embrionárias

**FTIR** – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

**g** – grama

**GAG** – Glicosaminoglicanos

**h** – hora

**hASC** – Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano

**HLA** – Antígeno Leucocitário Humano

**HSC** - Células-tronco hematopoiéticas

**IL** – Interleucina

**kDa** – quilodalton

**kGy** – kilogray

**kV** – quilovolt

**L** – litro

**M** – molaridade

**MEC** – Matriz Extracelular

**m/m** – massa por massa

**m/v** – massa por volume

**mg** – miligrama

**mL** – mililitro

**mm** – milímetro

**MSC** – Células-tronco mesenquimais

**MTT** – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

**NaOH** - Hidróxido de sódio

**Nm** – nanômetros

**PBS** – Tampão fosfato-salino

**pH** – potencial hidrogenômico

**PSA** – penicilina, estreptomicina e anfotericina

**Q** – Membrana de Quitosa (1%)

**QI** – Membrana de Quitosana com insulina

**QT** – Membrana de Quitosana com TPP

**QIT** – Membrana de Quitosana com insulina e TPP

**QGG** – Membrana de Quitosana reticulada com Glutaraldeído 0,02%

**QGS** – Membrana de Quitosana sem reitular

**QGT01** – Membrana de Quitosana reticulada com TPP 0,1%

**QGT1** – Membrana de Quitosana reticulada com TPP 1%

**RGD** – Arginina-Glicina-Ácido Aspártico

**rpm** – rotações por minuto

**SDS** – Dodecil Sulfato de Sódio

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**TPP** – Tripolifosfato de Sódio

**UFMG** - Universidade Federal de Minas Gerais

**v/v** – volume por volume

**µg** – micrograma

**µL** – microlitro

**µm** - micrômetro

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 15 |
| 1.1. Engenharia de Tecidos .....  | 15 |
| 1.2. Biomateriais .....   | 18 |
| 1.3. Quitosana e Gelatina.....  | 22 |
| 1.4. Células-tronco .....   | 29 |
| 2. JUSTIFICATIVA.....   | 33 |
| 3. OBJETIVO GERAL .....   | 34 |
| 3.1. Objetivos Específicos .....  | 34 |
| 4. METODOLOGIA .....  | 35 |
| 4.1. Meios de cultura celular .....   | 35 |
| 4.1.1. Meio de cultura basal.....   | 35 |
| 4.1.2. Meios de diferenciação .....   | 35 |
| 4.2. Isolamento e cultivo das hASC .....  | 35 |
| 4.3. Caracterização fenotípica das hASC por citometria de fluxo .....   | 36 |
| 4.4. Potencial de Diferenciação <i>in vitro</i> .....   | 37 |
| 4.4.1. Diferenciação Adipogênica .....  | 37 |
| 4.4.1 Diferenciação osteogênica .....   | 38 |
| 4.5. Preparo das membranas de quitosana (1%).....   | 38 |
| 4.6. Preparo das membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....  | 40 |
| 4.7. Colonização <i>in vitro</i> das membranas de quitosana (1%) e quitosana-gelatina (3:1) 42  |    |
| 4.8. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia óptica das membranas de quitosana-gelatina (3:1) ..... | 42 |
| 4.9. Avaliação da viabilidade celular .....   | 43 |
| 4.10. Potencial de diferenciação das hASC em membranas de quitosana-gelatina (3:1) 44   |    |
| 4.11. Caracterização das membranas quitosana-gelatina (3:1) .....   | 45 |
| 4.11.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....  | 45 |
| 4.11.2. Ensaio de Absorção de Água das membranas.....   | 45 |
| 4.11.3. Ensaio de degradação <i>in vitro</i> das membranas.....   | 46 |
| 4.11.4. Propriedades Mecânicas .....  | 46 |
| 4.11.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) 47   |    |
| 4.12. Análises Estatísticas .....   | 47 |

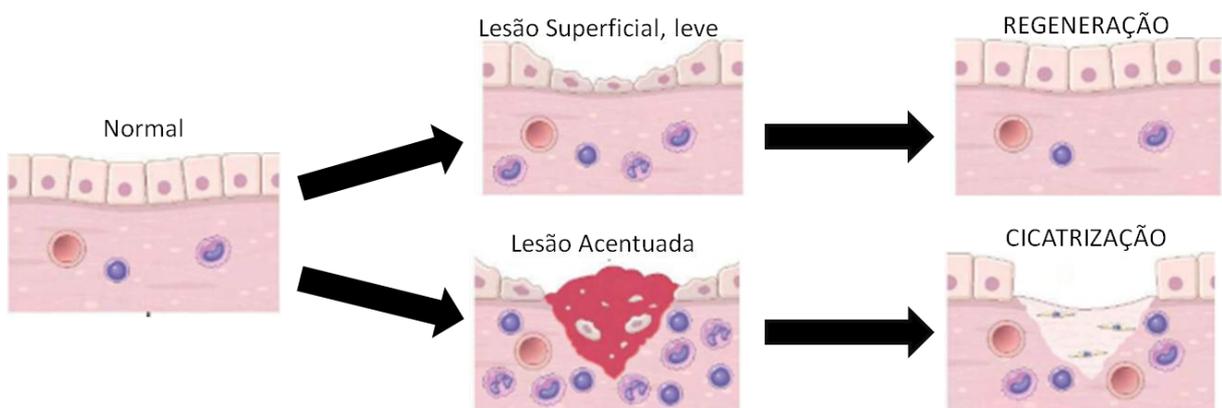
|  |    |
|--|----|
| 4.13. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> das membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....   | 47 |
| 4.10.1 Procedimento cirúrgico da avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> das membranas de Quitosana-Gelatina (3:1) .....                                | 48 |
| 4.10.2 Avaliação dos implantes subcutâneos – análise histológica .....   | 49 |
| 5. RESULTADOS .....  | 50 |
| 5.1. Isolamento e Caracterização das hASC .....  | 50 |
| 5.2. Desenvolvimento da membrana de suporte de quitosana (1%) e avaliação da adesão e viabilidade celular .....  | 52 |
| 5.3. Desenvolvimento da membrana de suporte quitosana-gelatina (3:1) .....   | 55 |
| 5.4. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia óptica das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1) ..... | 56 |
| 5.5. Avaliação da viabilidade celular .....  | 58 |
| 5.6. Capacidade de diferenciação <i>in vitro</i> das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....  | 62 |
| 5.7. Caracterização das membranas de quitosana-gelatina (3:1) .....  | 63 |
| 5.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....   | 63 |
| 5.7.2. Ensaio de absorção de água .....  | 64 |
| 5.7.3. Ensaio de degradação das membranas .....  | 65 |
| 5.7.4. Propriedades mecânicas .....  | 67 |
| 5.7.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....  | 68 |
| 5.8. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> das membranas de Quitosana-Gelatina (3:1) reticuladas ou não .....   | 70 |
| 6. DISCUSSÃO .....   | 73 |
| 7. CONCLUSÕES .....  | 86 |
| 8. PERSPECTIVAS .....  | 87 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 88 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Engenharia de Tecidos

Quando algum tecido é lesado, o corpo humano faz uso de algumas propriedades intrínsecas de regeneração. Porém, esse potencial de regeneração pode variar entre os diferentes tipos de tecidos, sendo comprometido pelo grau e severidade da lesão (Kumar, 2013; Zonari, 2013).

Alguns tecidos são capazes de substituir células lesadas e retornar ao estado normal, em um processo chamado regeneração, porém, se o tecido lesado é incapaz de se regenerar ou, se as estruturas de suporte do tecido são gravemente lesadas, o reparo ocorre a partir da deposição de tecido conjuntivo, resultando na formação de cicatriz, a qual fornece estabilidade estrutural para o tecido, porém não recuperando a função das células perdidas do parênquima (Figura 1) (Kumar, 2013).



**Figura 1. Mecanismos de reparo tecidual:** Regeneração e formação de cicatriz. A recuperação da função do tecido é feita pelo processo de regeneração após lesão leve. Após lesão mais severa, com dano do tecido conjuntivo, ocorre a formação da cicatriz, sem recuperação das funções das células lesadas. Adaptado de (Kumar, 2013)

Com o avanço na expectativa de vida da população, o número de pacientes com doenças crônicas e degenerativas tem aumentado, e em muitos dos casos, o transplante de órgão continua a ser a primeira alternativa, porém ele enfrenta problemas como a escassez de órgão doados e a rejeição imunológica (Ikada, 2006; Zonari, 2013). Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), em dezembro do ano de 2015, um total de 31.915 pacientes ativos estava na lista de espera para recebimento de órgãos doados (Pacheco, 2015). Diante desse cenário, novas terapias na área de medicina regenerativa estão sendo investigadas para

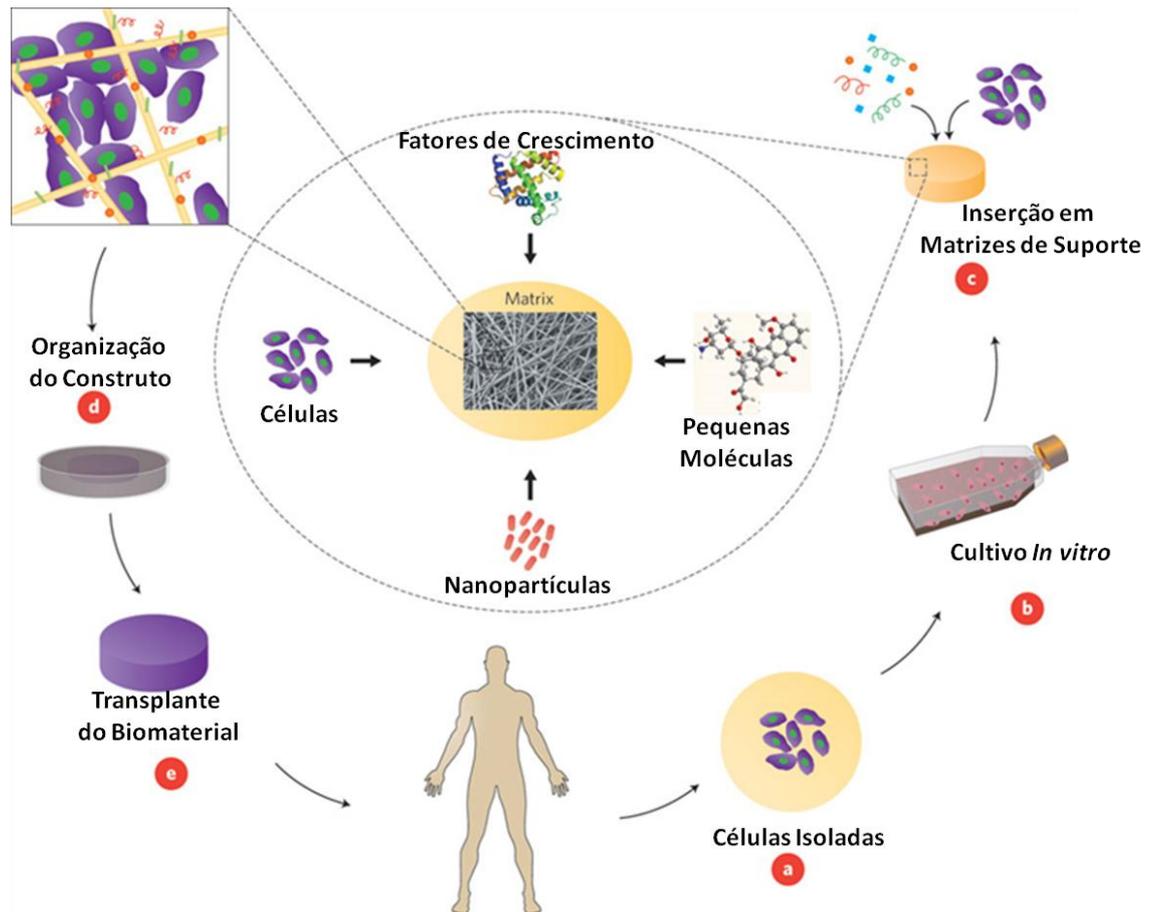
auxiliar a regeneração de tecidos e órgãos lesados por traumas, doenças ou senescência (Arosarena, 2005).

A engenharia tecidual tem sido definida como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e da biologia no desenvolvimento de substitutos biológicos para o reparo e regeneração de tecidos e recuperação da função de órgãos (Langer & Vacanti 1993). Baseando-se, dessa maneira, na compreensão da formação e regeneração tecidual, objetivando induzir novos tecidos funcionais através da combinação integrada com diversas áreas do conhecimento (Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

Esse promissor campo de pesquisa tem o objetivo de desenvolver matrizes capazes de interagir com o tecido lesado fornecendo elementos necessários para o reparo *in vivo*, estimulando a capacidade intrínseca de regeneração do tecido danificado e restaurando sua função (Greenwood *et al.* 2006; Marklein & Burdick, 2010).

Sabe-se que a matriz extracelular (MEC) não só oferece suporte físico para as células, mas também um substrato com ligantes específicos para a adesão e migração celular, regulando a proliferação e função das células por proporcionar vários fatores de crescimento, tendo isso em vista, um suporte de engenharia de tecidos que imita uma MEC irá desempenhar papel semelhante na promoção da regeneração de tecidos *in vitro*, como a MEC faz *in vivo* (Kode *et al.*, 2009).

Esse importante campo de pesquisa tem como ênfase a substituição transitória do órgão ou tecido lesado por um biomaterial que mimetize MEC, criando um ambiente para microinterações e assim, focando a reposição tecidual a partir da proliferação celular (Arosarena, 2005). Dessa maneira, a combinação de células com componentes da MEC, fatores de crescimento e matrizes de suporte busca alcançar o desenvolvimento do tecido (Figura 2) (Breyner *et al.*, 2010; Boos *et al.*, 2016). Nesse contexto, a seleção de células, materiais e moléculas biológicas apropriados determina o sucesso ou a falha do biomaterial (Marklein & Burdick, 2010).



**Figura 2. Princípios básicos da engenharia tecidual.** A engenharia de tecidos baseia-se no isolamento de células de um paciente (a), que são em seguida cultivadas *in vitro* para sua expansão (b), posteriormente essas células são cultivadas em biomateriais que servem como matrizes de suporte para crescimento, migração e diferenciação, essas matrizes podem então ser associadas a fatores de crescimento, ou pequenas moléculas com capacidade de estimular o processo de regeneração (c), uma vez construído e organizado (d) esse conjunto de biomaterial, células e moléculas pode então ser transplantado para promover o remodelamento e regeneração do tecido (e). Adaptado de (Dvir *et al.*, 2011)

Pesquisas relacionadas à área de engenharia de tecidos tem se expandido significativamente nos últimos anos, com programas de pesquisa ativos em todo o país e em todo mundo, com intuito de desenvolver tratamentos que afetam de maneira positiva a função do tecido (Smith *et al.*, 2009; Birla, 2014; Boos *et al.*, 2016). Atualmente, pesquisas sobre a produção e implantação da bioengenharia no reparo de vasos, bexigas, vias aéreas, uretra e válvulas cardíacas, bem como em órgãos sólidos como coração, fígado, pulmão, rim e pâncreas mostram as maneiras pelas quais metodologias de engenharia tecidual podem aumentar o conjunto de ferramentas para reconstrução tecidual (Katari, Peloso e Orlando, 2014).

No campo da engenharia de tecidos cardiovascular, muitas pesquisas têm sido dedicadas à fabricação de músculos cardíacos artificiais, vasos sanguíneos, válvulas, bombas cardíacas, ventrículos e de corações totalmente bioartificiais. Já na

área de pesquisa do sistema músculo-esquelético, tem dado ênfase a produção de ossos, cartilagem, músculos esqueléticos e tendões, muitas pesquisas tem sido investidas na engenharia de tecido do sistema urinário e das vias respiratórias, com fabricação de tecido pulmonar artificial. Outra área muito ativa envolve o sistema digestivo, com desenvolvimento de tecido artificial de fígado e pâncreas por exemplo. Além disso, há um interesse significativo no desenvolvimento de estratégias para produção de pele artificial

O sistema digestivo tem sido uma área de investigação muito activa de engenharia de tecidos focada no desenvolvimento de tecido artificial fígado, pâncreas, tecido intestinal, e tecido esofágico. Além disso, há um interesse significativo no desenvolvimento de peles artificiais e da aplicação de estratégias da engenharia tecidual no sistema nervoso central (Birla, 2014).

Diversas companhias no mundo inteiro têm criado programas de engenharia tecidual, alguns já atingiram o mercado, oferecendo tratamentos para queimaduras e úlceras, válvulas cardíacas para cirurgia de substituição, construção de tecidos para testes toxicológicos além das várias pesquisas *in vitro* para regeneração e substituição de tecidos ósseos (Tissue engineering, 2000).

A engenharia de tecidos aumenta as possibilidades terapêuticas permitindo a criação de novas estratégias para pacientes que não responderam aos tratamentos convencionais, porém, a aplicação clínica e a produção de biomateriais ainda é um desafio, visto que é necessário entender os efeitos do cultivo de células *in vitro* além das vias de sinalização envolvidas na formação e integração do novo tecido formado, sendo importante a padronização da construção dos biomateriais com capacidade de reproduzir um ambiente *in vivo* gerando um tecido viável para implantação (Griffith e Naughton, 2002; Tabata, 2009).

## **1.2. Biomateriais**

Biomateriais, utilizados como matrizes de suporte para neoformação de tecidos são componentes importantes na engenharia tecidual (Marklein & Burdick, 2010). O termo Biomaterial foi primeiramente definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde, em 1982, e compreende qualquer substância ou combinação destas, que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, destinada a interagir com sistemas biológicos, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter sua função, podendo servir como

veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de novo tecido, com a finalidade de manter e ou melhorar a qualidade de vida do paciente (Willians, 1999; Helmus, 2008).

Os biomateriais empregados na engenharia tecidual podem ser classificados em orgânicos, inorgânicos e compósitos (associação de dois ou mais biomateriais) (Lichte *et al.*, 2011). Dentre os biomateriais orgânicos, temos os metais e as cerâmicas (incluindo carbonos, vitocerâmicas e vidros); os metais são biocompatíveis, moldáveis ao local de interesse e apresentam alta resistência, porém, não são biodegradáveis; as cerâmicas são biocompatíveis, quebradiças, osteoindutoras e osteocondutoras, apresentam baixa estabilidade mecânica, e tem biodegradabilidade difícil de ser prevista, o que compromete a estabilidade da matriz (Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Lichte *et al.*, 2011).

Os biomateriais orgânicos compreende os polímeros, que são biocompatíveis, biodegradáveis e com grande potencial para utilização na engenharia tecidual (Lichte *et al.*, 2011). Os polímeros são classificados em naturais e sintéticos com base em sua origem. Os polímeros naturais podem ser tanto de origem animal, quanto de origem vegetal, compostos por polipeptídios, polissacarídeos, ácidos nucleicos, poliésteres, hidroxiapatita, sendo que os mais comumente usados na engenharia tecidual são colágeno, gelatina, fibrinogênio, seda, elastina, quitina, quitosana, amido e ácido hialurônico; os polímeros sintéticos, devido sua flexibilidade, podem ter um amplo espectro de propriedades com uma reprodutibilidade excelente, os mais comumente utilizados são poli( $\alpha$ -hidroxiácidos), poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(propileno fumaratos), poli(carbonatos) e poli(anidridos) (Suh & Matthew, 2000; Kim, Baez e Atala, 2000; Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Ikada, 2006; Whu *et al.*, 2013).

As baixas propriedades mecânicas dos polímeros naturais são uma desvantagem, no entanto, muitos polímeros sintéticos suportam o crescimento de células em estado diferenciado, porém, conduzindo uma menor deposição de tecido, enquanto os polímeros naturais além de suportarem o crescimento celular, também levam a uma melhor regeneração de tecidos danificados (Whu *et al.*, 2013).

Na medicina regenerativa a utilização de membranas poliméricas tem se desenvolvido a partir da necessidade de obtenção de materiais biocompatíveis que possuam propriedades mecânicas e características de permeação ideais para originar membranas seletivas que possam ser utilizadas na obtenção de

regeneração tecidual (Khor et al. 2003; Okamoto & Watanabe 2003). Para desempenhar essas funções, polímeros naturais são preferenciais, dado que, sendo componentes naturais dos seres vivos, tem propriedades mecânicas únicas, são biodegradáveis por mecanismos enzimáticos ou hidrolíticos e apresentam semelhanças química e biológica aos tecidos naturais, apresentando um menor índice de rejeição e assim maior biocompatibilidade quando comparados aos polímeros sintéticos (Kim, Baez e Atala, 2000; Pillai & Panchagnula 2001; Trindade et al., 2004; Nair e Laurencin, 2006). Sendo que, a biocompatibilidade, capacidade do biomaterial realizar uma resposta no hospedeiro que seja apropriada para sua aplicação específica, é um pré-requisito essencial para um biomaterial (Nair e Laurencin, 2006).

Inicialmente, os biomateriais eram desenvolvidos para desempenhar funções mecânicas de forma a prevenir a rejeição biológica, e por isso era interessante que eles fossem inertes e não interagissem com os sistemas biológicos (Huebsch e Mooney, 2009). No final do século XX, houve uma mudança no pensamento, para aplicações biomédicas, de um modelo de biomaterial estável para materiais biodegradáveis, capazes de se degradar *in vitro* e *in vivo* em metabólitos normais do corpo, ou que possam ser completamente eliminados do corpo, com capacidade de ajudar o organismo a regenerar e reparar tecidos (Nair & Laurencin, 2006). Dessa forma, os biomateriais devem possuir a característica de serem gradualmente degradados, enquanto são ocupados por um novo tecido formado pela interação entre o biomaterial, as células e os fatores de crescimento, essa taxa de degradação deve corresponder a aplicação pretendida, além disso, os produtos de degradação devem ser atóxicos (Nair & Laurencin, 2006; Breyner et al., 2010).

Nos últimos anos, biomateriais com aplicações na engenharia tecidual e medicina regenerativa têm sido desenvolvidos com intuito de alcançar modelos de matrizes de suporte que sejam capazes de recriar o microambiente *in vivo*, que é fornecido principalmente pela MEC, sendo capazes de proporcionar a proliferação, diferenciação de células em sua estrutura e se adaptarem ao microambiente, proporcionando condições ideais para a regeneração de tecidos (Castells-Sala et al., 2013; Aibibu et al., 2016). Assim, a engenharia tecidual depende do uso de um biomaterial que suporte a regeneração do tecido e interaja com moléculas de adesão específicas bem como com receptores de fatores de crescimento nas células alvo, com isso, matrizes de suporte ideais guiam a migração das células

progenitoras e estimulam a sua expansão e diferenciação (Arosarena, 2005; Breyner *et al.*, 2010).

As características estruturais dos biomateriais na engenharia tecidual, como morfologia, hidrofiliçidade e energia de superfície, contribuem para a modulação da forma celular e da expressão gênica, bem como o recrutamento de células na interface tecido-matriz *in vivo*, como também afetam a resposta celular, sendo dessa maneira manipuladas para sustentar a adesão, proliferação, migração e diferenciação celular, atuando assim, como uma MEC provisória que interage com as células, proporcionando suporte para a formação de um novo tecido (Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Smith *et al.*, 2009; Breyner *et al.*, 2010; Muzzarelli, 2011).

As matrizes de suporte devem ser produzidas de acordo com o tecido de interesse e, possuir a característica de servir como reservatórios para fatores de crescimento, água, nutrientes e citocinas, funcionando como uma matriz temporária que fornece apoio estrutural e mecânico para proliferação celular e deposição de MEC, podendo também ser utilizados como indutores, participando ativamente no processo regenerativo do tecido (Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Marklein & Burdick, 2010).

Dessa forma, para gerar matrizes de suporte com propriedades úteis para a aplicação na regeneração tecidual, vários métodos de fabricação de biomateriais têm sido desenvolvidos como, por exemplo, técnicas de evaporação de solvente, utilizado para produzir membranas densas, que podem ser utilizadas na regeneração da pele, processo de liofilização, empregada no processamento principalmente de matrizes estruturais para a regeneração óssea, pois formam estruturas porosas, técnica de eletrofiliação, que permite a obtenção de nanofibras comparáveis às fibras de colágeno encontradas na MEC, sendo utilizada, por exemplo, como suporte para diferenciação de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano em células endoteliais, dentre outras (Mao *et al.*, 2003; Salgado, Coutinho e Reis, 2004; Sombatmankhong *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2010; Puppi *et al.*, 2010; Kuppan *et al.*, 2011; Zonari, 2013; Aibibu *et al.*, 2016). O tipo de técnica e biomateriais utilizados dependem da complexidade, estrutura e função do tecido a ser regenerado, dessa forma, a técnica de processamento escolhida deve ser consistente com as propriedades desejadas (Yang *et al.*, 2001; Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

Uma primeira avaliação de biomateriais ideais é se eles servem como matrizes de suporte temporárias e, recentemente a quitosana e seus derivados têm sido reportados como candidatos atrativos para uso como matrizes de suporte, pois possuem a capacidade de degradar enquanto o novo tecido é formado, sem causar reações inflamatórias ou degradação tóxica (Alves & Mano, 2008).

A disponibilidade de polímeros para produção de biomateriais tem influenciado significativamente o crescimento da engenharia tecidual, levando dessa maneira, a uma busca contínua por materiais não apenas com propriedades físicas e químicas adequadas como também com propriedades químicas ideais para a interação do biomaterial com o meio biológico.

### **1.3. Quitosana e Gelatina**

Os polissacarídeos, como a quitina e a quitosana, têm sido propostos como biomateriais devido suas propriedades de boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (Pillai, Willi e Sharma, 2009; Jayakumar *et al.*, 2010).

A quitina e a quitosana são aminopolissacarídeos, formadas por unidades monossacarídicas, unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$ , elas possuem uma estrutura única, com muitas propriedades e funções importantes, além de altas taxas de aplicações na área biomédica e em outras áreas da indústria, possuindo papel crucial em esquemas de sinalização celular, na atividade antimicrobiana e também na imunidade (Suh & Matthew, 2000; Pillai, Willi e Sharma, 2009).

A quitina é um polímero que exerce função estrutural, possuindo dessa forma um papel análogo ao do colágeno nos animais e ao da celulose nas plantas, sendo encontrada no exoesqueleto de artrópodes e crustáceos ou nas paredes celulares de fungos e leveduras, sendo o segundo mais abundante polímero natural, perdendo apenas para a celulose (Cheng *et al.*, 2003; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005; Pillai, Willi e Sharma, 2009). No mundo, milhões de toneladas de quitina são colhidas anualmente e, portanto, este biopolímero representa uma fonte barata e prontamente disponível (Dash *et al.*, 2011).

A quitosana consiste em um polímero natural biodegradável, polieletrólito, catiônico derivado a partir da *N*-desacetilação alcalina da quitina, ela possui dois tipos de grupos funcionais reativos, o grupamento amino ( $-NH_2$ ) no carbono 2 e grupamentos hidroxilas ( $-OH$ ) primária e secundária nos carbonos 3 e 6,

respectivamente, capazes de formar vários tipos de ligações (Cheng *et al.*, 2003; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005; Beppu *et al.*, 2007; Breyner, 2010; Dash *et al.*, 2011). Esses grupos funcionais são importantes, pois permitem a formação de interações eletrostáticas com glicosaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos e com outras moléculas negativas presentes na MEC, além disso são essenciais para a formação de interações iônicas e ligações covalentes que alteram as propriedades mecânicas e biológicas da quitosana (Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005; Kim *et al.*, 2008; Alves & Mano, 2008). A interação da quitosana com GAGs é importante para a bioatividade do material, já que eles se ligam a fatores de crescimento e citocinas secretados por células (Mao *et al.*, 2003; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005).

As unidades monoméricas da quitina e da quitosana são 2-amino-2-desoxi-*D*-glicopirranose (glicosamina) e 2-acetamido-2-desoxi-*D*-glicopirranose (*N*-acetil glicosamina), e o grau de *N*-desacetilação, ou seja, a proporção de glicosamina e *N*-acetil glicosamina tem um efeito notável na solubilidade da quitina, além de determinar se o composto é quitina ou quitosana, dessa maneira, quando a quitina é desacetilada em pelo menos 50%, torna-se solúvel em ácidos diluídos e é referida como quitosana (Figura 3) (Cheng *et al.*, 2003; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005; Pillai, Willi e Sharma, 2009).



Uma característica importante da quitosana é sua possibilidade de ser processada para formar diferentes tipos de biomateriais como: soluções, pós, películas, esferas, fibras, esponjas, filmes, membranas, géis, dentre outros, além da possibilidade de ser modificada em policamadas (Kumar, 2000; Gao, Lai e Leung, 2012). Estas características tornam a quitosana um biomaterial quase ideal para aplicações na engenharia tecidual associada ao cultivo de células (Gao, Lai e Leung, 2012).

Devido à existência de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares nos resíduos D-glucosamina na Quitosana, esta possui excelentes propriedades de formação de filmes e fibras, transformando a Quitosana em um dos promissores polímeros utilizados no preparo de membranas (Chao *et al.*, 2004).

As membranas de quitosana foram descritas e caracterizadas pela primeira vez por Muzzarelli (Muzzarelli, Barontini e Rocchetti, 1978). Uma das técnicas para a preparação das membranas de quitosana é a evaporação do solvente de uma solução de quitosana sobre uma placa de vidro que, geralmente, produz membranas resistentes e transparentes, com elevada absorvidade à água e lenta degradação enzimática pela lisozima, presente em tecidos e fluidos corporais de mamíferos (Beppu, Baba e Kamizawa, 1993).

Membranas de quitosana têm sido estudadas para aplicações biomédicas como, por exemplo, atuando como agente quelante, agente indutor de cicatrização de feridas, como revestimento biodegradável, pervaporação, na ultrafiltração (hemodiálise) e como padrões de referência em sistemas de liberação de fármacos (Moreira, Dodane e Reese, 1998; Dureja, Tiwary e Gupta, 2001; Cheng *et al.*, 2003; Gao, Lai e Leung, 2012). Porém ainda são escassos os estudos envolvendo membranas densas de quitosana para o uso na regeneração tecidual.

A quitosana possui grande potencial para aplicações na engenharia tecidual, devido a sua biocompatibilidade, alta densidade de carga, baixa toxicidade, e mucoadesão, além de importantes atividades biológicas como a baixa imunogenicidade (Cheng *et al.*, 2003; Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005). Além disso, a quitosana é metabolizada por algumas enzimas humanas, principalmente a lisozima, sendo, portanto, considerada biodegradável, sendo que, a biodegradação desempenha um papel importante na transformação metabólica da quitosana (Berger *et al.*, 2004; Dash *et al.*, 2011). Dessa forma, é importante entender o controle da taxa de degradação da quitina e de biomateriais a base de quitosana,

uma vez que a degradação é essencial em muitas aplicações de biomateriais, como, por exemplo, na liberação de fármacos e na regeneração de tecidos funcionais (Dash *et al.*, 2011).

A taxa de degradação da quitosana pode ser controlada pela mudança no seu grau de *N*-desacetilação, de sua massa molecular e pela distribuição de grupos acetil, é importante ressaltar que seus produtos de degradação são não tóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos (Cheng *et al.*, 2003). Como a taxa de degradação *in vivo* é inversamente proporcional ao grau de *N*-desacetilação, a quitosana pode permanecer inalterada por muitos meses depois de implantada (Di Martino, Sittinger e Risbud, 2005).

Matrizes de suporte para regeneração de tecidos devem fornecer condições para a viabilidade celular, induzindo dessa forma o reparo tecidual, além de serem não imunogênicas (Marklein e Burdick, 2010; Muzzarelli, 2011). Estudos prévios demonstraram que membranas de quitosana suprimem o crescimento de células fibrosas e a formação de cápsula, facilitam o crescimento de células endoteliais, células de vasos capilares, músculo cardíaco e crescimento de células nervosas promovendo o reparo de injúrias nervosas (Cheng *et al.*, 2003).

Com o objetivo de obter biomateriais adequados para a utilização na regeneração tecidual, a combinação de dois ou mais materiais é comumente empregada (Whu *et al.*, 2013). O uso da quitosana no desenvolvimento de materiais compostos, através da mistura com outros polímeros é muito vantajoso devido aos seus vários grupos funcionais, que permitem modificações químicas apropriadas capazes de aumentar a sua solubilidade, tornando-a mais bacteriostática e melhora sua resistência química e mecânica (Cheng *et al.*, 2003; Beppu *et al.*, 2007; Pillai, Willi e Sharma, 2009; Dash *et al.*, 2011). Devido à presença desses grupamentos funcionais, a quitina e a quitosana podem realizar vários tipos de ligações químicas, como eterificação, esterificação, reticulação e copolimerização (Pillai, Willi e Sharma, 2009).

A combinação de quitosana com gelatina pode formar complexos polieletrólíticos devido à formação de interação iônica entre as duas moléculas, uma vez que a gelatina tipo B é carregada negativamente, melhorando dessa maneira as propriedades mecânicas do biomaterial (Whu *et al.*, 2013).

A gelatina é um importante biopolímero biorreabsorvível obtida a partir de hidrólise de colágeno, principal proteína presente na MEC da pele, ossos, cartilagem

e tecido conjuntivo e considerado um ótimo modelo para a regeneração tecidual (Zhang *et al.*, 2006; Whu *et al.*, 2013).

A gelatina tem sido alvo de estudos na área da engenharia tecidual devido algumas de suas características, como, sua solubilidade em água e a capacidade de formação de gel termo-reversível e filmes flexíveis (Bigi *et al.*, 2000). A gelatina é não imunogênica quando comparada ao seu precursor, tem excelente biocompatibilidade e pode promover adesão, proliferação e migração celular (Zhang *et al.*, 2006; Whu *et al.*, 2013). A gelatina, como todos os tipos de colágeno, apresenta motivos RGD (Arg-Gly-Asp) que promovem a adesão, migração e diferenciação das células, a manutenção do fenótipo celular e a formação de complexos polieletrólíticos (Thein-Han *et al.*, 2009).

Muitos métodos disponíveis na literatura para obtenção de derivados estruturais da quitosana promovem a reticulação das cadeias poliméricas desse polímero, um processo também denominado reação de enterocruzamento, que visa unir suas cadeias poliméricas, conferindo-lhe propriedades atraentes como, maior resistência à dissolução em meio ácido, menor hidrofília, geração de estruturas poliméricas densas ou porosas e redução da reatividade química do material ( De Assis Gonsalves *et al.*, 2011).

A reticulação é feita para fornecer uma arquitetura mais estável e também para aumentar o tempo de degradação *in vivo*. O controle da degradação é importante para garantir a formação de um novo tecido por células indiferenciadas, desta forma o biomaterial é capaz de fornecer uma matriz de suporte temporária para as células em desenvolvimento, como também suporte para a fixação dessas células e do novo tecido formado (Breyner *et al.*, 2010).

Estudos têm relatado que a reticulação com glutaraldeído, etileno glicol dentre outros, e sua modificação química com hexametileno e aldeídos, modifica a carga iônica das membranas de quitosana, influenciando na sua permeabilidade (Chen *et al.*, 2002). Devido sua alta solubilidade em água, a gelatina é frequentemente reticulada, a reticulação pode conferir resistência à água e melhorar a estabilidade térmica e mecânica destes polímeros, alguns reticulantes comuns utilizados na reticulação da gelatina são glutaraldeído, bis-epoxy e carbodiimida solúveis em água, que por vezes podem causar citotoxicidade (Whu *et al.*, 2013).

A modificação de grupos funcionais, principalmente os grupamentos amino, usando-se o glutaraldeído é extremamente interessante, uma vez que o uso de

agentes bifuncionais pode bloquear os grupos amino e tornar a quitosana uma estrutura mais inerte e resistente ao meio ácido (Beppu *et al.*, 2007).

Glutaraldeído ou 1,5-pentanodial ( $\text{OHC}-(\text{CH}_2)_3\text{-COH}$ ) é um dialdeído alifático muito usado como imobilizador de proteínas e como agente reticulante (Beppu *et al.*, 2007). Ele é um dos reticulantes mais usados na indústria química devido seu grande efeito estabilizador e, ultimamente, tem sido amplamente aplicado como agente reticulante em materiais a base de quitosana e de colágeno (Qian *et al.*, 2011). O glutaraldeído promove reticulação covalente do material, devido à adição nucleofílica da amina da quitosana à carbonila do glutaraldeído (De Assis Gonsalves *et al.*, 2011).

Beppu e colaboradores estudaram a síntese e caracterização de membranas densas e porosas de quitosana reticuladas com Glutaraldeído observando membranas mais resistentes do ponto de vista físico, químico e microbiológico, como também mais hidrofóbicas (Beppu, Baba e Kamizawa, 1993).

O tripolifosfato de sódio (TPP) é um ânion multivalente e atóxico que vem sendo estudado como agente reticulante alternativo ao glutaraldeído (considerado tóxico) (Sharma, Mondal e Gupta, 2002). O TPP pode reticular a quitosana, formando um gel, uma vez que seus íons fosfóricos e hidroxil interagem com grupamento amino da quitosana (Calvo *et al.*, 1997; Bhumkar e Pokharkar, 2006; Giri *et al.*, 2012). A reticulação da quitosana com TPP leva a uma diminuição da degradação da quitosana pela quitinase, além de alterar o comportamento da solubilidade do polímero, podendo, dessa maneira, ser utilizada como ferramenta para mudanças desejáveis nas propriedades da quitosana em aplicações na engenharia tecidual (Sharma, Mondal e Gupta, 2002).

Estudos sugerem que nanopartículas de quitosana/TPP são menos tóxicos do que outros polímeros catiônicos como a poli-L-lisina e polietilenoimina *in vivo* e *in vitro* (Richardson, Kolbe e Duncan, 1999). Vimal e colaboradores demonstraram que nanopartículas de quitosana/TPP foram pouco tóxicas, causando menos de 10% de morte de células da linhagem catla do coração (Vimal *et al.*, 2013).

A utilização da quitosana na criação de biomateriais similares a tecidos como pele, cartilagem, osso e nervos, tem se desenvolvido muito, devido ao seu grande potencial de utilização na engenharia tecidual (Kim *et al.*, 2008).

#### 1.4. Células-tronco

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 (Zonari, 2013). Para que uma célula seja ideal, ela deve estar disponível em quantidades suficientes, ser capaz de exercer a função a ela destinada, ser isolada com o mínimo de morbidade da área doadora e ser compatível com o sistema imunológico do receptor (Jain *et al.*, 2005). Dessa forma, a fonte de células tem grande influência sobre o sucesso da engenharia de tecidos (Ikada, 2006).

As células com aplicações na engenharia tecidual podem ser classificadas como autólogas, quando o doador é o próprio paciente, alogênicas, quando o doador é da mesma espécie, porém não é o paciente, e como xenogênicas, doadas a partir de animais (Ikada, 2006). A utilização de células autólogas na engenharia tecidual é preferencial devido sua maior biocompatibilidade com menor risco de rejeição e um potencial crescimento do tecido guiado por biomaterial, porém na utilização de células autólogas encontra-se a dificuldade de se conseguir coletar quantidades suficientes de células, principalmente em pacientes idosos ou severamente doentes (Handel, Hammer e Hofer, 2012; Ikada, 2006).

As células também podem ser classificadas com base no seu grau de diferenciação, aquelas diferenciadas possuem baixa taxa de proliferação, não sendo facilmente expandidas *in vitro*. E as indiferenciadas são células capazes de se diferenciar em diferentes tipos celulares e com grande potencial de expansão (Brignier & Gewirtz, 2010; Ikada, 2006).

Hoje uma das mais promissoras áreas de pesquisa envolve o uso de células-tronco, fonte de células relevante como modelo de doenças *in vitro* e para aplicação em engenharia tecidual, área na qual as células-tronco tem se tornado uma abordagem importante, devido sua capacidade de proliferação e diferenciação, na rápida expansão do campo da engenharia tecidual (Gepstein 2002; Cosson *et al.*, 2015).

Células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto, elas têm a capacidade de se transformar e reabastecer diferentes tipos de tecidos que compõem o corpo (Gepstein 2002; Cosson *et al.*, 2015; Brignier & Gewirtz, 2010). Em geral, as células-tronco podem se

dividir em duas categorias, aquelas conhecidas como células-tronco adultas (somáticas) e as células-tronco embrionárias (hESC). Todas as categorias de células-tronco são definidas por terem duas propriedades básicas: capacidade de auto-renovação e potencial de se diferenciarem em um ou mais tipos de células especializadas durante o desenvolvimento e ao longo da vida de um organismo (Gepstein 2002; Cosson *et al.*, 2015).

As células-tronco embrionárias podem ser classificadas em totipotentes, as quais são capazes de se diferenciar em todos os tipos celulares bem como em células dos anexos embrionários, estando presentes no zigoto e no blastômero (Fischbach & Fischbach 2004); e em pluripotentes, células retiradas da massa interna do blastocisto, capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários (Thomson *et al.*, 1998). As células-tronco adultas são consideradas multipotentes devido sua capacidade de originar células de diversos tecidos durante o tempo de vida do organismo, mas não de todos os folhetos embrionários (Brignier & Gewirtz, 2010). Apesar das células-tronco adultas terem uma menor capacidade de diferenciação, elas são preferencialmente utilizadas na medicina regenerativa pelo fato de não estarem ligadas a questões éticas associadas a aplicação de células-tronco embrionárias (Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011).

Células-tronco adultas residem em diversos tecidos e órgãos, como na circulação sanguínea, medula óssea fetal e adulta, tecido adiposo, baço, líquido amniótico, cartilagem, tendões dos músculos, placenta, tecido fetal, periósteo, fluido sinovial, timo, osso trabecular, derme, polpa dental, pulmão, cérebro, fígado, pele e trato gastrointestinal, e mesmo na ausência de lesão, essas células estão sempre produzindo células novas para substituir células senescentes (Alhadlaq e Mao, 2004; Beyer Nardi e Da Silva Meirelles, 2006; Kode *et al.*, 2009; Brignier e Gewirtz, 2010).

As células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais são as células-tronco adultas mais bem caracterizadas (Hipp & Atala, 2008). Desde a identificação de células-tronco adultas no estroma da medula óssea há 40 anos, elas se tornaram um padrão no campo da biologia de células-tronco adultas e na medicina regenerativa, devido ao seu potencial de diferenciação e baixa morbidade na colheita (Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011).

Células-tronco mesenquimais foram inicialmente denominadas como uma população de células presentes na medula óssea, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Caplan e Bruder, 2001; Casteilla *et al.*, 2011). Atualmente, já foram isoladas células com características semelhantes às células-tronco mesenquimais em quase todos os tecidos de um indivíduo adulto, incluindo o tecido adiposo, pele, pulmões e líquido amniótico (Toma *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 2005; Da Silva Meirelles, Chagastelles e Nardi, 2006; De Coppi *et al.*, 2007).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu, em 2005, três critérios para a definição de células-tronco mesenquimais: (a) aderência ao plástico, quando sob cultivo *in vitro*; (b) presença de antígenos de superfície específicos (expressão de CD73, CD90, CD105, e ausência de CD45, CD34, CD14 ou CD11bb, CD79 OU CD19, HLA-DR); e (c) capacidade de diferenciação *in vitro* em adipócitos, osteoblastos e condrócito (Casteilla *et al.*, 2011; Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011).

As células-tronco mesenquimais tem demonstrado um potencial de diferenciação não somente em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, como também em outras linhagens de origem mesodérmica (miócitos, osteócitos, endotélio, adipócito, cardiomiócitos), ectodérmica (neurônios), e endodérmicas (hepáticas, pancreáticas, epitélio respiratório) (Alhadlaq e Mao, 2004; Beyer Nardi e Da Silva Meirelles, 2006; Kode *et al.*, 2009). Além do potencial de diferenciação, as células-tronco mesenquimais tem capacidade imunossupressiva e de modulação da resposta inflamatória (Casteilla *et al.*, 2011)

O interesse pelas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC) tem aumentado bastante quando comparado as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, devido a facilidade de obtenção das hASC pelo processo de lipoaspiração, enquanto a coleta na medula óssea é feita através de procedimento doloroso e a quantidade de células adquiridas normalmente é muito menor do que as encontradas no tecido adiposo (Casteilla *et al.*, 2011; Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011).

A medicina regenerativa é um campo multidisciplinar e envolve o uso de biomateriais, fatores de crescimento e células para o reparo de tecidos e órgãos lesados. As hASC são candidatas ideais para o uso em medicina regenerativa

devido a sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens de células, além de ser encontrada em grande número, quando colhidas através de métodos poucos invasivos, com mínima morbidade, além de serem eficazes no transplante alogênico ou autólogo a partir de qualquer hospedeiro (Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011)

Nos últimos anos, o desenvolvimento de biomateriais inovadores tem permitido um sistema de cultivo de células *in vitro*, permitindo que o uso e propriedades-chaves no ambiente celular possam ser modificados, no entanto, o uso de hASC em matrizes é limitado pela necessidade de um suporte ideal (Kode *et al.*, 2009; Cosson *et al.*, 2015). Porém, os avanços na ciência de desenvolvimento de biomateriais oferecem uma promessa positiva no campo da engenharia tecidual e, a crescente capacidade de projetar suportes possibilita a fabricação de microambientes artificiais com capacidade de controlar o destino das células-tronco (Cosson *et al.*, 2015).

Fatores essenciais para a realização bem sucedida de combinações de células com biomateriais em medicina regenerativa são: fonte ideal de células; grande quantidade de células *in vitro*; possibilidade de longos períodos de cultivo; adesão e viabilidade celular no suporte; rápida vascularização; e potencial de diferenciação (Handel, Hammer e Hofer, 2012).

Na medicina regenerativa, além da importância de diferenciação, isolamento e diversidade de linhagens de células-tronco, também é necessário, para o aumento da regeneração de tecidos e órgãos, mobilizar a circulação das células-tronco, providenciando um ambiente apropriado para o tecido e para recrutamento do órgão-específico, adquirindo uma completa integração funcional (Mironov, Visconti e Markwald, 2004). Levando em consideração as grandes vantagens das hASC, elas se tornaram uma atraente fonte de célula para aplicação na engenharia de tecidos.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento de matrizes de suporte é fundamental para o avanço da engenharia tecidual, principalmente na área de regeneração tecidual, uma vez que permitem a manutenção das células no local do implante, permitindo também a proliferação e diferenciação das células-tronco, favorecendo a regeneração do tecido lesado.

O desenvolvimento de membranas reticuladas de Quitosana associadas à gelatina cria a possibilidades de promover regeneração de tecidos que não mais respondem aos tratamentos convencionais, a partir de células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASC), abrindo perspectivas promissoras na área da engenharia tecidual. Nesse contexto, foi proposto neste trabalho, a modificações das membranas de Quitosana e gelatina através da reticulação com glutaraldeído ou tripolifosfato de sódio (TPP), visando ampliar a adesão, proliferação e diferenciação celular.

### 3. OBJETIVO GERAL

Desenvolver membranas a partir da associação de quitosana e gelatina reticuladas ou não para auxiliar na regeneração de tecidos lesados, empregando princípios da engenharia de tecidos.

#### 3.1. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (hASC).
- Desenvolver membranas a base de quitosana e a partir da combinação de quitosana e gelatina.
- Reticulação das membranas com tripolifosfato de sódio ou glutaraldeído.
- Avaliar a adesão e viabilidade das hASC cultivada em membranas de quitosana-gelatina reticuladas ou não com tripolifosfato de sódio ou glutaraldeído
- Promover a diferenciação de hASC em linhagens osteoblásticas e adipogênicas nas membranas de quitosana-gelatina, reticuladas ou não com tripolifosfato de sódio ou glutaraldeído.
- Caracterizar membranas de quitosana-gelatina reticuladas ou não com tripolifosfato de sódio e glutaraldeído.
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* em ratos, das membranas de quitosana-gelatina, reticuladas ou não com tripolifosfato de sódio ou glutaraldeído.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Meios de cultura celular**

#### **4.1.1. Meio de cultura basal**

O meio de cultura basal consistiu de DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio, 60 mg/mL de gentamicina (Schering-Plough), 100 U/mL de penicilina, 0,10ng/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B (PSA, Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco).

#### **4.1.2. Meios de diferenciação**

##### **4.1.2.1 Meio adipogênico**

Para produção do meio adipogênico foram adicionados ao meio de cultura basal suplementado com 10% SFB os seguintes fatores indutores: 0,1µM de dexametasona (Achè), 50µM de indometacina (Sigma-Aldrich), 100UI de insulina (Lilly) e 0,5mM de isobutilmetilxantina (Sigma-Aldrich).

##### **4.1.2.2 Meio osteogênico**

Para produção do meio osteogênico foram adicionados ao meio de cultura basal suplementado com 10% SFB os seguintes fatores indutores: 0,1µM de dexametasona (Achè), 10mM de β-glicerofosfato (Sigma) e 50µg/mL de ácido ascórbico.

### **4.2. Isolamento e cultivo das hASC**

As hASC foram isoladas e cultivadas baseando-se no descrito por Zuk e *colaboradores*. 2001. O estudo foi realizado de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE:21176413.9.0000.5149). Foi utilizado, para isolamento das hASC, produtos de lipoaspiração de diferentes partes do corpo (flancos esquerdo e direito, regiões supra e infra umbilical) de pacientes saudáveis, o tecido adiposo foi acondicionado em seringas estéril de 60mL e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Utilizando capela de fluxo laminar, o conteúdo de tecido adiposo contido em seringas estéreis foi transferido para tubos falcons de 50mL para lavagem com

tampão fosfato salina (PBS) 0,15M e pH 7.2, seguido de centrifugação por 6 minutos a 1400 rpm. Após a centrifugação do produto de lipoaspiração, formou-se uma solução bifásica, com a fase inferior contendo PBS e hemácias e a fase superior, o tecido adiposo.

A fase superior contendo tecido adiposo foi transferida para um novo tubo falcon de 50mL e tratadas por 1 hora, em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> com collagenase tipo I (Gibco) 0,075% em PBS 0,15M, pH 7,2, no decorrer deste período, a cada 15 minutos, os tubos foram vigorosamente agitados até sumirem os grumos que ficam em suspensão.

Após o término do período de incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1400rpm, então, o sobrenadante contendo fração adipocitária foi desprezado e o precipitado contendo fração estromal vascular foi suspenso em meio DMEM com 10% de SFB, transferidas em garrafas de cultura celular e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 horas, o conteúdo das garrafas de cultura celular foi transferido para tubos falcons de 50mL e centrifugados nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado formado foi suspenso em meio de cultura basal e acondicionado em garrafas de cultura celular.

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e, nos primeiros dias, a garrafa foi lavada com PBS antes da troca do meio para limpar a cultura e remover células sanguíneas residuais e não aderentes. Quando as células atingiram confluência de 70-80%, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS (0,15M, pH 7,2) e tratadas com 1mL de tripsina/EDTA (Gibco) por 5 minutos. A ação da tripsina foi inativada com meio de cultura basal com 10% de SFB, a suspensão formada foi dividida em duas novas garrafas de cultura celular e acrescentado mais meio de cultura basal. As células foram expandidas dessa maneira para serem utilizadas nos experimentos.

#### **4.3. Caracterização fenotípica das hASC por citometria de fluxo**

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

Aproximadamente  $5 \times 10^5$  células foram incubadas com anticorpos primários, durante 30 minutos a 4°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS para remover os anticorpos primários não conjugados e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 goat anti-camundongo IgG 2mg/mL (Invitrogen), por 30

minutos. Anticorpos já possuíam ligação com fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. As células foram, em seguida, lavadas com PBS e, então fixadas em formaldeído 2%. Para controle negativo de fluorescência, anticorpo secundário foi adicionado às células não marcadas com anticorpo primário. A obtenção dos dados foi realizada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte™ 6-2 L Flow Cytometer (Millipore), utilizando-se o programa Incyte acquisition (Millipore). Foram adquiridos 15.000 eventos e os dados foram analisados no programa FlowJo 7.5.6 software (Treestar, Inc.).

#### **4.4. Potencial de Diferenciação *in vitro***

##### **4.4.1. Diferenciação Adipogênica**

Com objetivo de verificar se as hASC eram capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica,  $2,5 \times 10^3$  células, na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 48 poços e cultivadas em meio de cultura adipogênico específico (descrito no item 4.3.2.1) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por um período de 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana.

Após o período de indução, foi realizada a coloração de Oil Red para detectar a presença de lipídeos no interior das células e conseqüentemente sua diferenciação em adipócitos. Para tanto, o meio de cultura foi totalmente removido dos poços, em seguida lavados cinco vezes com PBS, as células foram então fixadas com solução de formalina 10% por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a fixação, a formalina 10% foi retirada dos poços e estes lavados três vezes com água destilada. Solução de Isopropanol 60% foi adicionado em cada poço e as placas deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, o isopropanol foi removido dos poços e solução do corante Oil Red foi colocado em cada poço, e deixado por 5 minutos em temperatura ambiente, após retirar o corante, os poços foram lavados com água destilada e em seguida adicionado Hematoxilina por 40 segundos, após esse período a hematoxilina foi retirada dos poços, e estes, lavados com água destilada. Foi adicionado 1mL de água destilada e feita a observação em microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus.

#### 4.4.1 Diferenciação osteogênica

Para avaliar se as hASC isoladas eram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica  $2,5 \times 10^3$  células, na 4ª passagem, foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de cultura osteogênico específico (descrito no item 4.3.2.2) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por um período de 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana.

Foi realizada, após o período de indução da diferenciação, a coloração de Von Kossa para avaliar a mineralização da matriz extracelular, que indica se as hASC se diferenciaram em linhagem osteogênica. Para tanto, o meio de diferenciação foi totalmente retirado dos poços, e estes lavados com PBS 0,15M, pH 7,4 e fixadas com solução de paraformaldeído a 4%, por um período de 1 hora. Logo após, as células foram lavadas dez vezes com água destilada, e então foi adicionado solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), e as placas expostas a luz ultra violeta por 1 hora. A solução de AgNO<sub>3</sub> foi então removida dos poços e as células lavadas com água destilada para posterior adição da solução de tiosulfato de sódio 5%, por 5 minutos. As células foram novamente lavadas com água destilada e em seguida coradas por 40 segundos com eosina. Foi adicionado 1mL de água destilada e feita a observação em microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus.

#### 4.5. Preparo das membranas de quitosana (1%)

As membranas de quitosana (1%) foram preparadas pelo método de evaporação de solvente. quitosana (Sigma, 85% desacetilada, derivada de caranguejo) foi dissolvida em solução de ácido acético (1% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 1% (m/v), a solução foi mantida sob agitação por aproximadamente 24 horas. Após dissolução total da quitosana, a solução foi filtrada a vácuo para remoção de substâncias insolúveis, em seguida, mantida sob agitação magnética para neutralização da solução com Hidróxido de Sódio (NaOH) a 1M. O pH foi medido com fitas indicadoras de pH, devido a viscosidade da solução polimérica, sendo considerado pH ideal aproximadamente 6, uma vez que a viscosidade da solução aumenta proporcionalmente ao aumento do pH.

A solução de quitosana (1%) foi pipetada em placas de 6 poços (5mL/poço) e em placas de cultura de 48 poços (0,6mL/poço), deixadas destampadas em temperatura ambiente para evaporação completa do solvente. Após a evaporação

completa, quando as placas encontravam-se secas, com uma fina membrana ao fundo da placa, foram realizadas três lavagens com água deionizada, em seguida as membranas foram tratadas com álcool absoluto e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente overnight para completa secagem das membranas.

Para incorporação de insulina (Humulin®, Insulina Humana, NPH, derivada de ADN recombinante) foi utilizada a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção da membrana de quitosana (1%), porém, após neutralização, a solução de quitosana foi distribuída em placas de 48 poços e foram adicionados em cada poço 1mL (100U) de insulina sob agitação, em seguida foram deixadas destampadas em temperatura ambiente para evaporação completa do solvente. Após a evaporação completa, quando as placas encontravam-se secas, com uma fina membrana ao fundo da placa, foram realizadas três lavagens com água deionizada, em seguida as membranas foram tratadas com álcool absoluto e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente overnight para completa secagem das membranas.

Para incorporação de tripolifosfato de sódio (Sigma Aldrich) foi utilizada a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção da membrana de quitosana (1%), porém, após a evaporação completa, quando as placas encontravam-se secas, com uma fina membrana ao fundo da placa, foi adicionada solução de TPP 0,1% (0,3mL/poço), as placas foram colocadas em estufa a 37°C por 3 horas, após esse período as membranas foram lavadas três vezes com água destilada, em seguida tratadas com álcool absoluto e as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente overnight para completa secagem das membranas.

Os grupos experimentais das membranas foram denominados Q, QI, QIT (Tabela 1).

**Tabela 1.** Tipos de Membranas de Quitosana (1%)

| TIPO MEMBRANA | COMPOSIÇÃO                                |
|---------------|---|
| Q             | Quitosana 1%                              |
| QI            | Quitosana 1% e Insulina (100UI)           |
| QT            | Quitosana 1% e TPP 0,1%                   |
| QIT           | Quitosana 1%, Insulina (100UI) e TPP 0,1% |

As placas de 48 poços contendo membranas foram mantidas à temperatura ambiente e esterilizadas por irradiação gama a 15K Gy no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN).

As membranas pipetadas em placas de 6 poços foram retiradas do fundo da placa para análise macroscópica.

#### **4.6. Preparo das membranas de quitosana-gelatina (3:1)**

As membranas de quitosana e gelatina foram preparadas pelo método de evaporação completa do solvente. Quitosana (Sigma, 85% desacetilada, derivada de caranguejo) e gelatina (Sigma, Tipo B, da pele de bovino) foram dissolvidas separadamente em solução de ácido acético 1% v/v, para uma concentração final de cada uma das soluções poliméricas 0,7% (m/v), as soluções foram mantidas sob agitação por aproximadamente 24 horas. Em seguida, as soluções foram filtradas a vácuo, para remoção de substâncias insolúveis, e então misturadas em uma proporção de 3 volumes de quitosana para cada 1 volume de gelatina, com uma concentração final de quitosana-gelatina (3:1). A solução de quitosana-gelatina foi mantida sob agitação magnética para neutralização do ácido acético utilizando hidróxido de sódio (NaOH) 1M. O pH foi medido utilizando fitas indicadora de pH, devido à viscosidade da solução polimérica, o pH considerado ideal – uma vez que o aumento pH aumenta a viscosidade e precipita os polímeros – foi de aproximadamente 6.

A solução formada foi pipetada em placas de cultura de 48 poços (0,6mL/poço), e em placas de Petri (20mL/placa), as quais foram deixadas destampadas à temperatura ambiente para evaporação completa do solvente. Após a evaporação completa do solvente – quando as placas encontravam-se totalmente secas e com uma fina membrana formada ao fundo - as membranas foram lavadas três vezes com água deionizada e posteriormente tratadas duas vezes com álcool absoluto. Em seguida, as membranas foram cobertas com uma fina camada de álcool absoluto, e as placas foram deixadas abertas *overnight* para secagem.

Para incorporação de glutaraldeído 0,02%, foi utilizada a mesma técnica de evaporação do solvente descrita para obtenção da membrana de quitosana-gelatina (3:1), porém, após a evaporação completa, quando as placas encontravam-se

secas, com uma fina membrana formada ao fundo da placa, foi adicionada solução de glutaraldeído 0,02% (0,3mL/poço), as placas foram colocadas em estufa a 37°C por 3 horas, após este período as membranas foram lavadas três vezes com água destilada, em seguida tratadas com álcool absoluto, e, então, cobertas com uma fina camada de álcool absoluto, as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente overnight para completa secagem das membranas.

Para incorporação de TPP 0,1% e 1% foi utilizada a mesma técnica de evaporação do solvente em placas, descrita para obtenção da membrana de quitosana-gelatina (3:1), porém, após a evaporação completa, quando as placas encontravam-se secas, com uma fina membrana ao fundo da placa, foi adicionada solução de TPP 0,1% (0,3mL/poço) ou TPP 1% (0,3mL/poço), as placas foram colocadas em estufa a 37°C por 3 horas, após este período as membranas foram lavadas três vezes com água destilada, em seguida tratadas com álcool absoluto, e, então, cobertas com uma fina camada de álcool absoluto, as placas foram deixadas destampadas em temperatura ambiente overnight para completa secagem das membranas.

Os grupos experimentais das membranas foram denominados QGS, QGG, QGT01 e QGT1 (Tabela 2).

**Tabela 2.** Grupos de Membranas de Quitosana:Gelatina (3:1)

| <b>TIPO MEMBRANA</b> | <b>COMPOSIÇÃO</b>                        |
|----------------------|--|
| <b>QG</b>            | quitosana-gelatina (3:1)                 |
| <b>QGG</b>           | quitosana-gelatina (3:1) e glutaraldeído |
| <b>QGT01</b>         | quitosana-gelatina (3:1) e TPP 0,1%      |
| <b>QGT1</b>          | quitosana-gelatina (3:1) e TPP 1%        |

As placas foram mantidas à temperatura ambiente e esterilizadas por irradiação gama a 15 Kgy no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN/CNEN).

#### **4.7. Colonização *in vitro* das membranas de quitosana (1%) e quitosana-gelatina (3:1)**

Para a distribuição de células em placas de cultura contendo as membranas a base de quitosana, foi realizado o mesmo procedimento descrito para expansão das subculturas, porém, após ressuspender as hASC em meio DMEM, elas foram centrifugadas a 1400 rpm por 5 minutos, logo após, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* formado, contendo as células, foi homogeneizado e ressuspendido em 1mL de meio de cultura basal. As células foram contadas, e aproximadamente  $2,5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 48 *poços* esterilizadas por irradiação gama (15KGy) no CDTN/CNEN contendo os biomateriais à base de quitosana e 1mL de meio de cultura basal. As placas contendo hASC cultivadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.8. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por microscopia óptica das membranas de quitosana-gelatina (3:1)**

As membranas colonizadas pelas hASC, em placas de 48 *poços*, foram mantidas em cultivo com meio de cultura basal por 4 dias em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após o tempo de incubação, o meio de cultura basal foi totalmente retirado, as amostras foram lavadas três vezes com 1mL de PBS e em seguida fixadas com Glutaraldeído 0,025% por um período de 2 horas a temperatura ambiente, protegidas da luz, para fixação das amostras. Em seguida, os Wells foram lavados três vezes com 1mL de PBS. Após este período, as amostras foram imersas em diferentes concentrações de álcool etílico (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%) durante 15 minutos cada, e álcool absoluto por 1 hora para desidratação das amostras. Após a desidratação, as amostras permaneceram em álcool absoluto até a secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Balzers, CPD-020), processo pelo qual o álcool é substituído pelo CO<sub>2</sub>, evitando dano à célula causado pela tensão superficial durante o processo de evaporação natural. Em seguida, as amostras foram montadas em suporte de alumínio (Stubs) e submetidos ao processo de metalização em ouro. A metalização e obtenção das imagens foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura FEG – Quanta 200 FEI.

A morfologia das células aderidas à membrana também foi avaliada por microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus.

#### **4.9. Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade e proliferação das hASC cultivadas em membranas à base de quitosana foram mensuradas utilizando um método colorimétrico sensível denominado MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), no qual baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presente nas mitocôndrias de células viáveis e metabolicamente ativas, em converter o sal de MTT, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de cristais de formazan produzidos é, portanto, diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (Mosmann, 1983). Os cristais de formazan são solubilizados e a densidade ótica determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

As hASC foram semeadas em placas de 48 poços contendo os diferentes tipos de membranas a base de quitosana, além de serem semeadas em placas sem biomateriais (grupo controle) na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células/poço contendo 1 mL de meio de cultura basal. Após 24, 48 e 72 horas de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e substituído por uma solução contendo meio de cultura basal e MTT (5mg/mL Invitrogen), em seguida a placa foi incubada por um período de 2 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após este período de incubação, a formação dos cristais de formazan pelas hASC, foi observada em microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus. Os cristais foram então solubilizados por meio da adição SDS10%-HCl (sulfato de sódio dodecil), seguido de incubação em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por 18 horas, foram transferidos 100µL de cada poço para uma placa de 96 poços de fundo chato, em triplicata, e a densidade ótica foi mensurada em espectrofotômetro (Anthos 210) a 595nm, os dados foram obtidos a partir do programa ADAP Basic (Anthos Labtec) e os gráficos construídos utilizando o programa GraphPad Prism 5.

Para controlar a interferência da membrana e do próprio meio basal no ensaio de MTT, foi realizado o ensaio do MTT, nas mesmas condições experimentais já descritas, em membranas e placas que não continham células semeadas, e o valor

da leitura da absorbância do ensaio contendo células foi diminuído da média da absorbância obtidas desses controles.

#### **4.10. Potencial de diferenciação das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1)**

##### **4.10.1. Diferenciação adipogênica**

Com objetivo de verificar se as hASC eram capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica mesmo após serem semeadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1),  $2,5 \times 10^3$  células, na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 48 poços, contendo membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não com glutaraldeído ou TPP e cultivadas em meio de cultura adipogênico específico (descrito no item 4.3.2.1) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por um período de 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana e hASC cultivadas em meio basal foram mantidas como controle.

Após o período de indução, foi realizada a coloração de Oil Red para detectar a presença de lipídeos no interior das células e conseqüentemente sua diferenciação em adipócitos. Para tanto, o meio de cultura foi totalmente removido dos poços, em seguida lavados cinco vezes com PBS, as células foram então fixadas com solução de formalina 10% por 1 hora, à temperatura ambiente. Após a fixação, a formalina 10% foi retirada dos poços e estes lavados três vezes com água destilada. Solução de Isopropanol 60% foi adicionado em cada poço e as placas deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, o isopropanol foi removido dos poços e solução do corante Oil Red foi colocado em cada poço, e deixado por 5 minutos em temperatura ambiente, após retirar o corante, os poços foram lavados com água destilada e em seguida adicionado Hematoxilina por 40 segundos, após esse período a hematoxilina foi retirada dos poços, e estes, lavados com água destilada. Foi adicionado 1mL de água destilada e feita a observação em microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus.

##### **4.10.2. Diferenciação osteogênica**

Com objetivo de verificar se as hASC eram capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica mesmo após serem semeadas em membranas de quitosana-

gelatina (3:1),  $2,5 \times 10^3$  células, na 4ª passagem, foram cultivadas em placas de 24 poços, contendo membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não com glutaraldeído ou TPP e cultivadas em meio de cultura osteogênico específico (descrito no item 4.3.2.2) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, por um período de 21 dias. O meio foi trocado três vezes por semana e hASC cultivadas em meio basal foram mantidas como controle.

Foi realizada, após o período de indução da diferenciação, a coloração de Von Kossa para avaliar a mineralização da matriz extracelular, que indica se as hASC se diferenciaram em linhagem osteogênica. Para tanto, o meio de diferenciação foi totalmente retirado dos poços, e estes lavados com PBS 0,15M, pH 7,4 e fixadas com solução de paraformaldeído a 4%, por um período de 1 hora. Logo após, as células foram lavadas dez vezes com água destilada, e então foi adicionado solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), e as placas expostas a luz ultra violeta por 1 hora. A solução de AgNO<sub>3</sub> foi então removida dos poços e as células lavadas com água destilada para posterior adição da solução de tiosulfato de sódio 5%, por 5 minutos. As células foram novamente lavadas com água destilada e em seguida coradas por 40 segundos com eosina. Foi adicionado 1mL de água destilada e feita a observação em microscópio invertido Olympus IX70 e as imagens foram adquiridas utilizando câmera Qimaging e o software Image-Pro Plus.

#### **4.11. Caracterização das membranas quitosana-gelatina (3:1)**

##### **4.11.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A caracterização morfológica das membranas de quitosana-gelatina (3:1) foi realizada pela microscopia eletrônica de varredura, MEV. Após o preparo das membranas (QGS, QGG, QGT01, QGT1) como descrito no item 4.2, elas foram montadas em suportes de alumínio e submetidas ao processo de metalização em ouro. A metalização e obtenção das imagens foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG, utilizando o Microscópio Eletrônico de Varredura FEG – Quanta 200 FEI.

##### **4.11.2. Ensaio de Absorção de Água das membranas**

Para avaliar a capacidade de absorção de água das membranas, foi utilizado um método gravimétrico. Três amostras de cada tipo de membrana (QGS, QGG, QGT01, QGT1) foram inicialmente pesadas e em seguida imersas em PBS 0,01M,

pH 7,4, à 37°C sob agitação (60rpm), por 15min, 30min, 1, 2, 3, 6, 12 e 48 horas. Finalizando os períodos determinados, as membranas foram retiradas da solução de PBS, e utilizando papel de filtro, elas foram rapidamente secas para retirada da água superficial, e logo em seguida pesadas. A seguinte equação foi utilizada para determinar a quantidade de água absorvida pelas membranas:

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

Os dados foram plotados e analisados no programa OriginPro 8 (OriginLabCorporation).

#### **4.11.3. Ensaio de degradação *in vitro* das membranas**

Amostras das membranas (QGS, QGG, QGT01, QGT1), foram inicialmente pesadas, em seguida, três amostras de cada grupo foram incubadas em solução de PBS contendo Lisozima (Sigma) na concentração de 9,8mg/L, semelhante à encontrada no soro humano (Tietz, 1993). Membranas de cada um dos grupos (n=3) imersas apenas em PBS foram utilizadas como controle. As membranas foram colocadas sob agitação (60rpm) em temperatura de 37°C por 1, 2, 4 e 8 semanas, a cada 3 dias as soluções foram trocadas, e ao final de cada tempo determinado, as amostras foram lavadas com água destiladas, colocadas em temperatura ambiente por 72 horas em papel filtro para secarem e em seguida pesadas. A porcentagem de massa perdida foi determinada utilizando-se a seguinte equação:

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

Os dados foram plotados e analisados no programa OriginPro 8 (OriginLabCorporation).

#### **4.11.4. Propriedades Mecânicas**

Para determinar as propriedades mecânicas (tensão máxima de tração, deformação específica e módulo de elasticidade) das membranas (QGS, QGG, QGT01, QGT1), utilizou o equipamento universal EMIC DL3000, utilizando uma placa de carga de 50N, velocidade do ensaio 5mm/min, e corpos de prova com 5mm

de largura, 30mm de comprimento e aproximadamente 0,034mm de espessura. Cinco Corpos de prova de cada amostra foram testados à velocidade de 5mm/min, à temperatura ambiente. O ensaio foi realizado seguindo as normas da ASTM D683.

#### **4.11.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

As membranas (QGS, QGG, QGT01, QGT1) foram cortadas em formato circular, com dimensões aproximadas de 9,75mm e posteriormente colocadas em estufa a 37°C por uma semana. Em seguida, as amostras foram analisadas no CDTN/CNEN.

Para avaliar a composição química das amostras, espectros de FTIR foram obtidos com sistema de pastilhas de brometo de potássio (KBr) à temperatura ambiente com um espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) de alcance entre 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$  e resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  com 64 varreduras. As amostras foram preparadas com a proporção de 100:1 (KBr:amostra). Os dados foram plotados e analisados no programa OriginPro 8 (OriginLabCorporation).

#### **4.12. Análises Estatísticas**

Todos os dados representados apresentam a média  $\pm$  desvio padrão. As análises foram feitas no programa GraphPad PRISM 5 (GraphPad Software, Inc). Os grupos de dados foram comparados por Two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni, sendo considerada diferença significativa para todos quando  $p < 0,05$ .

#### **4.13. Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das membranas de quitosana-gelatina (3:1)**

Este procedimento envolvendo animais está de acordo com os Princípios éticos da Experimentação Animal, adotados e aprovados pela Comissão de Ética o Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (processo nº: 373/2012).

Para o ensaio de biocompatibilidade foram utilizados ratos, Lewis GFP (++) , adquiridos do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Foram feitos implantes subcutâneos utilizando 2 animais para cada período experimental (2 e 30 dias), fêmeas, com peso médio de 250 gramas na data do experimento inicial.

Antes e durante o experimento, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, dentro de gaiolas individuais, com maravalha, recebendo alimentação sólida balanceada e água filtrada *ad libitum*.

#### **4.10.1 Procedimento cirúrgico da avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das membranas de Quitosana-Gelatina (3:1)**

Os animais foram inicialmente pesados e anestesiados com Ketamina e Cloridrato de Xylazina, na proporção 1:1 com dose de 0,10 mL/100 gramas de massa corporal do animal, via intramuscular. Foi realizado a tricotomia da região e assepsia com PVPI (solução de iodo 10%).

Os quatro diferentes tipos de membranas foram implantados subcutaneamente no dorso de ratos Lewis GFP (++) , os animais foram então divididos em quatro grupos de estudo (Tabela 3).

**Tabela 3.** Grupos experimentais para avaliação da biocompatibilidade *in vivo*

| <b>GRUPO</b>   | <b>TIPO DE MEMBRANA IMPLANTADA</b> |
|----------------|------------------------------------|
| <b>Grupo 1</b> | quitosana-gelatina                 |
| <b>Grupo 2</b> | quitosana-gelatina e glutaraldeído |
| <b>Grupo 3</b> | quitosana-gelatina e TPP 0,1%      |
| <b>Grupo 4</b> | quitosana-gelatina, TPP 1%         |

Posicionado em decúbito ventral e com auxílio de bisturi, foi realizada uma incisão longitudinal mediana na pele que recobre o animal, em seguida, foi feito o implante subcutâneo dos diferentes tipos de membranas, previamente esterilizados (item 4.2). A pele foi repostada e suturada com fio de sutura de algodão 4.0. O procedimento cirúrgico está ilustrado na figura 1.



**Figura 4.** Procedimento cirúrgico para avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das membranas quitosana-gelatina (3:1)

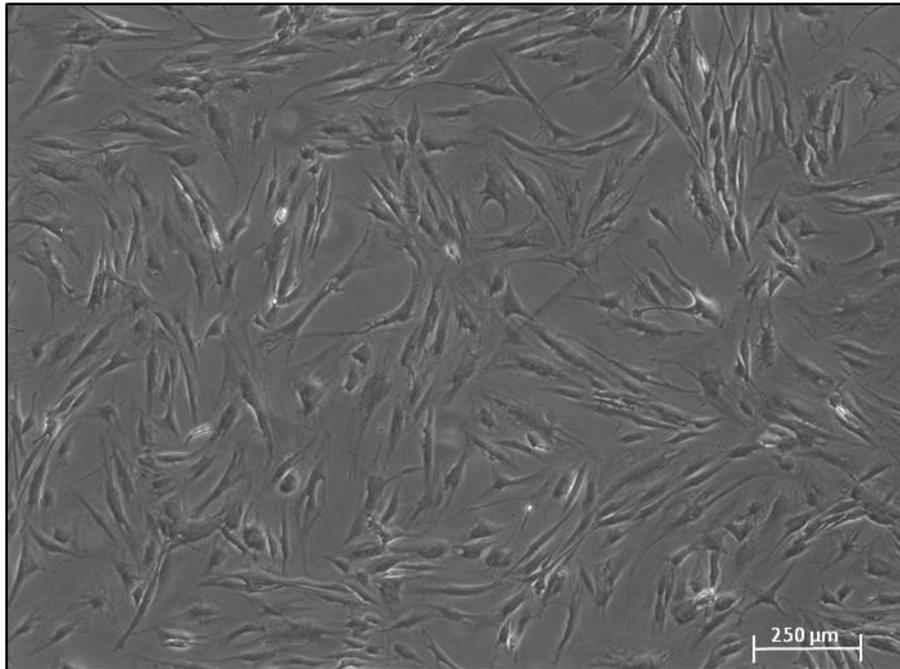
#### **4.10.2 Avaliação dos implantes subcutâneos – análise histológica**

Após 2 e 30 dias, os animais foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> e a região do implante foi removida, em seguida o implante foi fixado em paraformaldeído 4% e incluídos em parafina para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Cortes longitudinais de 5µm de espessura foram obtidos por microtomia, fixados em lâminas e corados por Hematoxilina e Eosina (HE). Os cortes foram avaliados com microscópio de luz Olympus BX53.

## 5. RESULTADOS

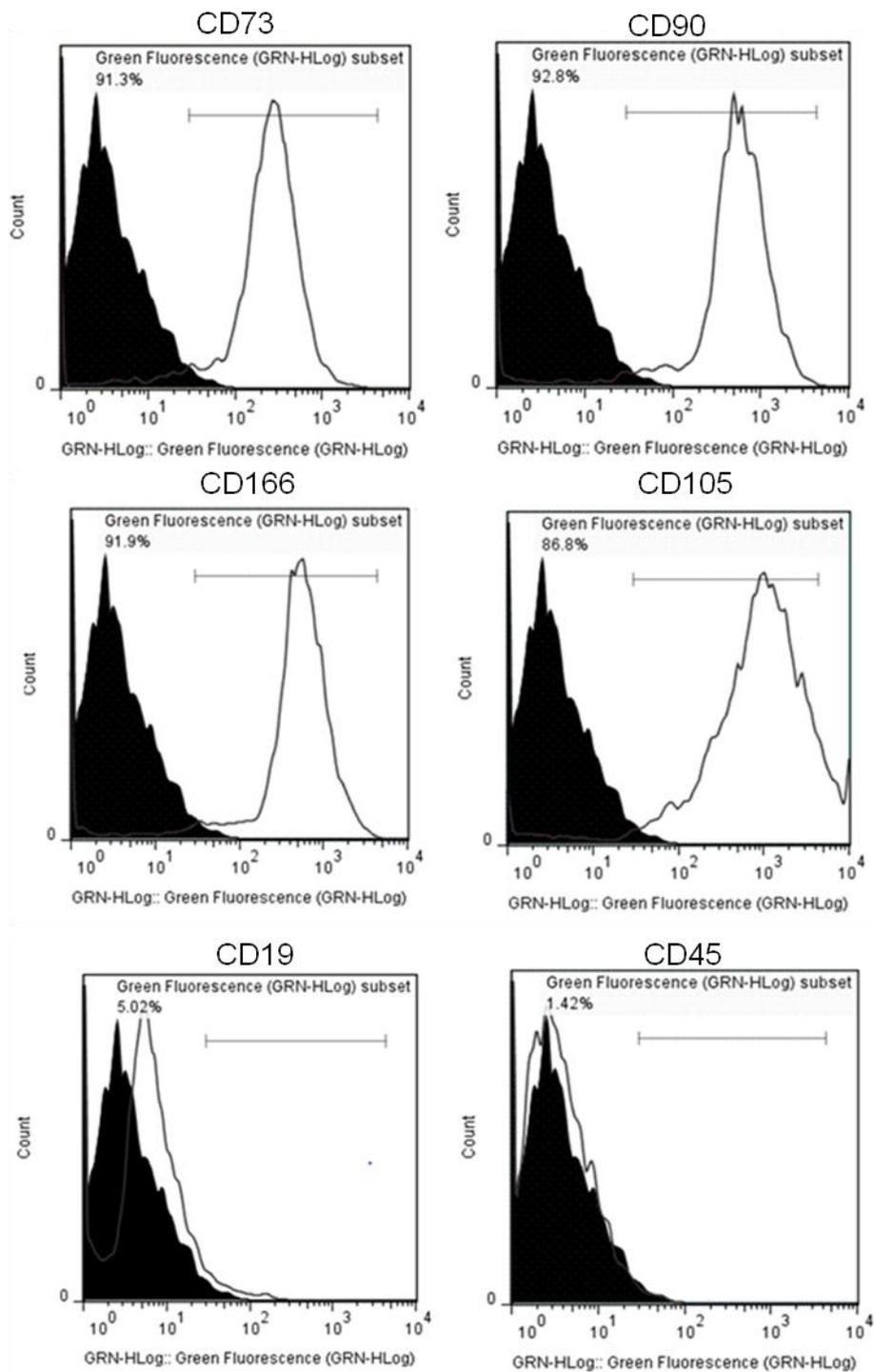
### 5.1. Isolamento e Caracterização das hASC

A partir do isolamento das hASC da fração estromal do tecido adiposo, realizada por digestão enzimática e centrifugação, foi possível observar que as células apresentavam aderência ao plástico e formato fusiforme (Figura 5).



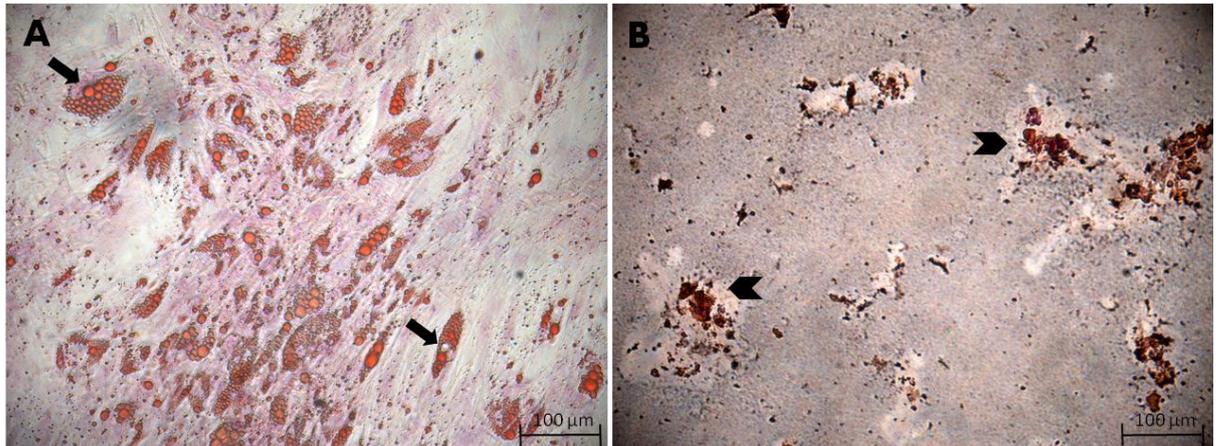
**Figura 5. Células tronco do tecido adiposo isoladas e cultivadas.** hASC na 4ª passagem, apresentam formato fibroblastóide e aderência ao plástico.

O perfil imunofenotípico, demonstrado na figura 6, demonstrou que a grande maioria das células expressava marcadores CD73, CD90, CD166 e CD105, específicos para MSCs, enquanto a expressão de CD19 e CD45, marcadores de células hematopoiéticas, estava presente em menos de 5% da população de células isoladas, indicando dessa forma que a população de células isoladas corresponde a células-tronco mesenquimais.



**Figura 6. Perfil imunofenotípico das hASC realizado por citometria de fluxo.** Histogramas representativos e cada marcador demonstra o padrão de expressão dos marcadores específicos para MSCs e HSCs. O pico em preto representa o controle negativo de fluorescência e o pico em branco está representando marcação positiva para o marcador analisado. Histograma demonstra que a maioria das células expressava marcadores CD73, CD90, CD166 e CD105, específico para MSCs, enquanto a expressão de CD19 e CD45, marcadores de células hematopoiéticas, estava presente em menos de 5% da população de células isoladas.

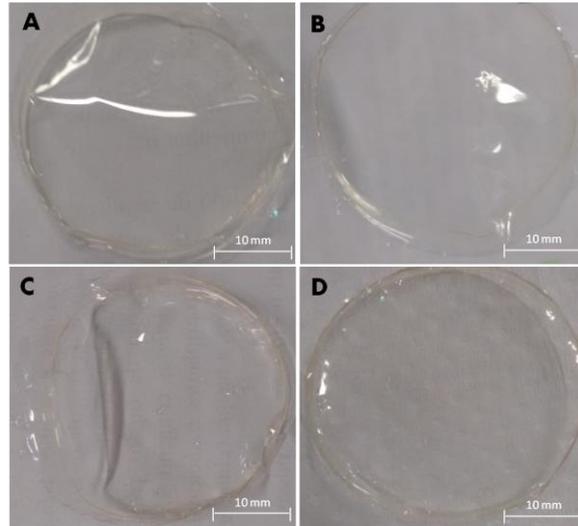
As colorações de Oil Red e Von Kossa confirmaram o potencial de diferenciação das hASC em linhagens adipogênicas e osteogênicas respectivamente (Figura 7).



**Figura 7. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC cultivadas em placas de 24 poços sem membranas.** (A) A coloração Oil Red confirma a diferenciação das hASC em linhagem adipogênica, devido a presença de gotículas de lipídeos no interior das células demonstrado pela coloração vermelha (seta); (B) coloração Von Kossa demonstra a capacidade das hASC se diferenciarem em células osteogênicas, demonstrada pela coloração castanha, que indica a mineralização da matriz extracelular (cabeça de seta). Escala 100µm.

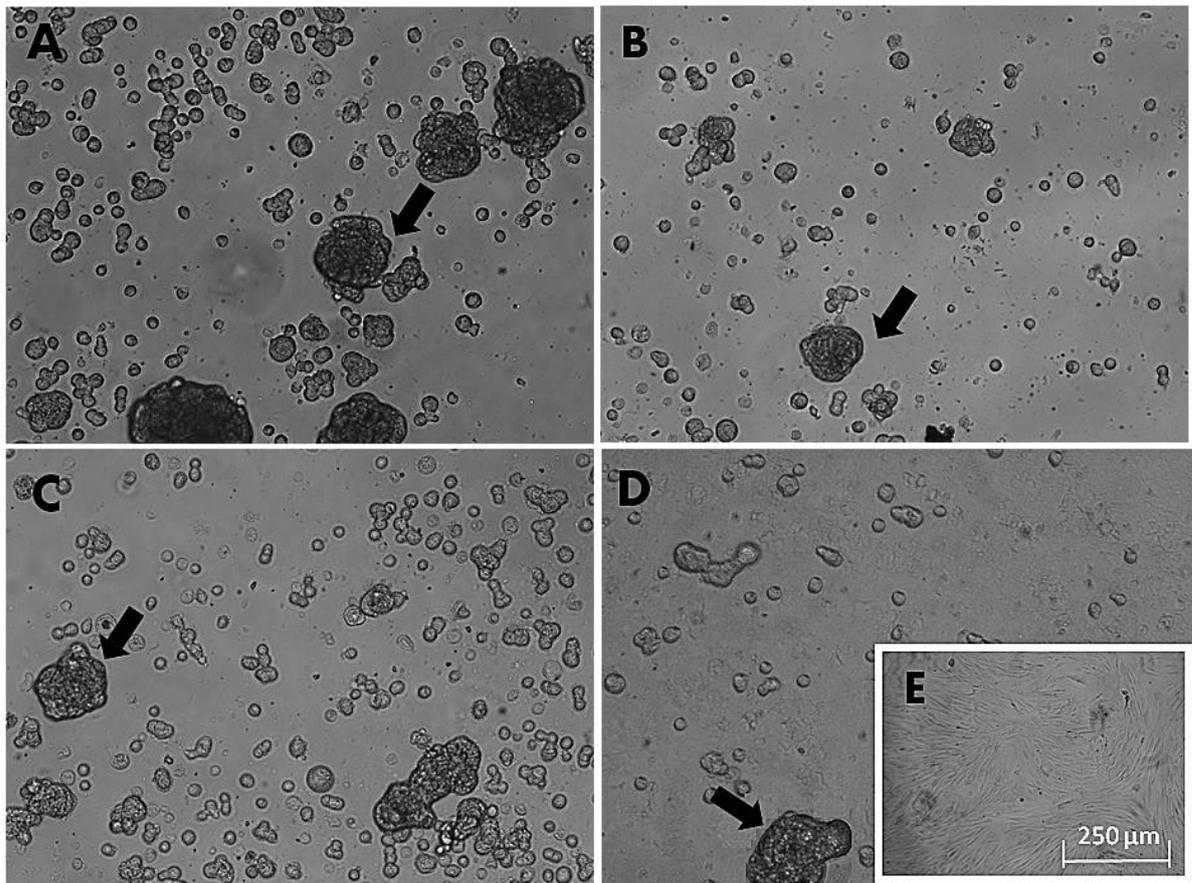
## **5.2. Desenvolvimento da membrana de suporte de quitosana (1%) e avaliação da adesão e viabilidade celular**

As membranas obtidas pelo método de evaporação de solvente descrito no item 5.1, denominadas Q, QI, QT e QIT, apresentam macroscopicamente estruturas finas, com aproximadamente 0,034mm de espessura, transparentes, com aspecto homogêneo e maleável, conforme observado na (Figura 8).



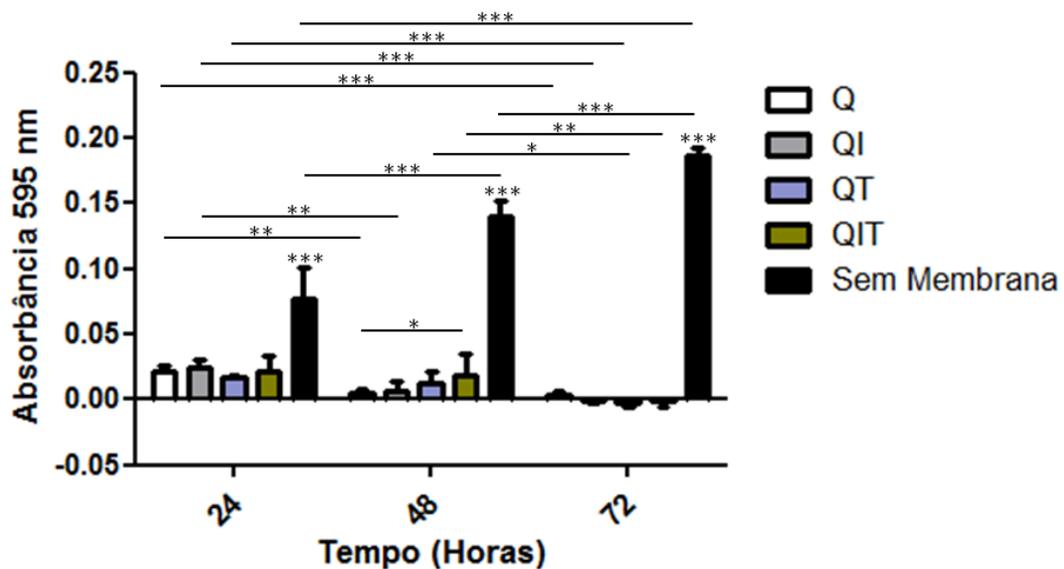
**Figura 8. Membranas de quitosana (1%) produzidas pelo método de evaporação de solvente.** As membranas apresentaram-se macroscopicamente estruturas finas, com aproximadamente 0,034mm de espessura, transparentes, com aspecto homogêneo e maleável (A) membrana de quitosana pura; (B) membrana de quitosana com insulina; (C) membrana de quitosana com TPP; (D) membrana de quitosana com insulina e TPP. Escala: 10mm.

O próximo passo foi avaliar a adesão das hASC cultivadas nos quatro diferentes tipos de membranas, sendo possível observar que as células não aderiram às membranas, apresentaram formato circular e formaram estruturas denominadas esferoides, enquanto que nas placas controles, sem membranas, as hASC aderiram às placas, e apresentaram formato fibroblástico (Figura 9).



**Figura 9. Avaliação da adesão das hASC em membranas de quitosana (1%).** Foram observadas a formação de esferóides, apontado pela seta e células hASC não aderidas com formato circular em todas as membranas. (A) membrana de quitosana pura; (B) membrana de quitosana e insulina; (C) membrana de quitosana e TPP 0,1%; (D) membrana de quitosana, insulina e TPP 0,1%; (E) controle sem membrana. Escala: 250 $\mu$ m.

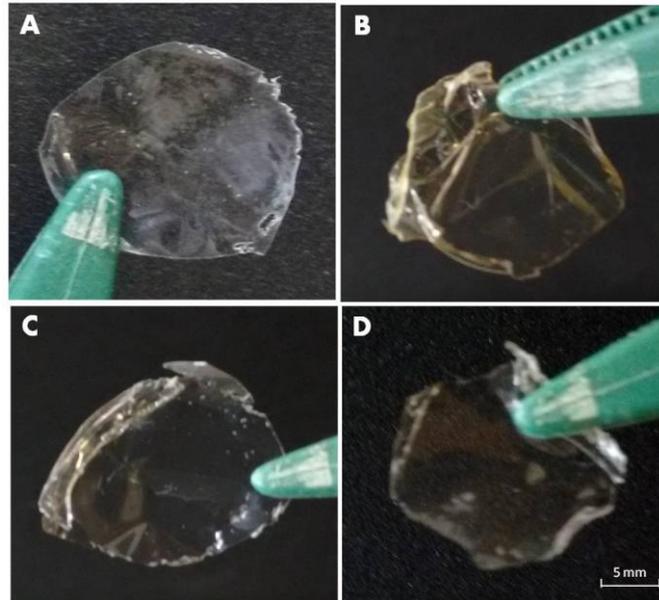
Foi observada, à partir do ensaio de MTT, uma viabilidade significativamente menor quando hASC foram cultivadas nos quatro diferentes tipos de membranas, em todos os tempos, quando comparada com o grupo controle, no qual as células foram cultivadas em placas que não continha nenhum dos tipos de membrana. Além disso, o valor da absorbância em todos os quatro tipos de membranas, diminuiu significativamente com o passar do tempo, enquanto que o valor da absorbância em placas sem membrana teve um aumento significativo, indicando nesse caso aumento da viabilidade celular (Figura 10).



**Figura 10. Ensaio de viabilidade celular das hASC cultivadas nas membranas de quitosana (1%).** Resultados das absorbâncias obtidas a partir da leitura de 595nm dos grupos (Q) quitosana (1%), (QI) quitosana (1%) e insulina, (QT) quitosana (1%) e TPP 0,15, (QIT) quitosana (1%), insulina e TPP 0,1% e controle sem membrana. Quando cultivadas nos diferentes tipos de membranas, o valor da absorbância foi significativamente menor em todos os tempos, quando comparadas ao controle; o valor da absorbância nos quatro tipos de membranas diminuiu com o passar do tempo, enquanto que no grupo controle esse valor aumentou significativamente nos tempos avaliados, indicando nesse caso uma aumento na viabilidade das hASC. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ . Two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

### 5.3. Desenvolvimento da membrana de suporte quitosana-gelatina (3:1)

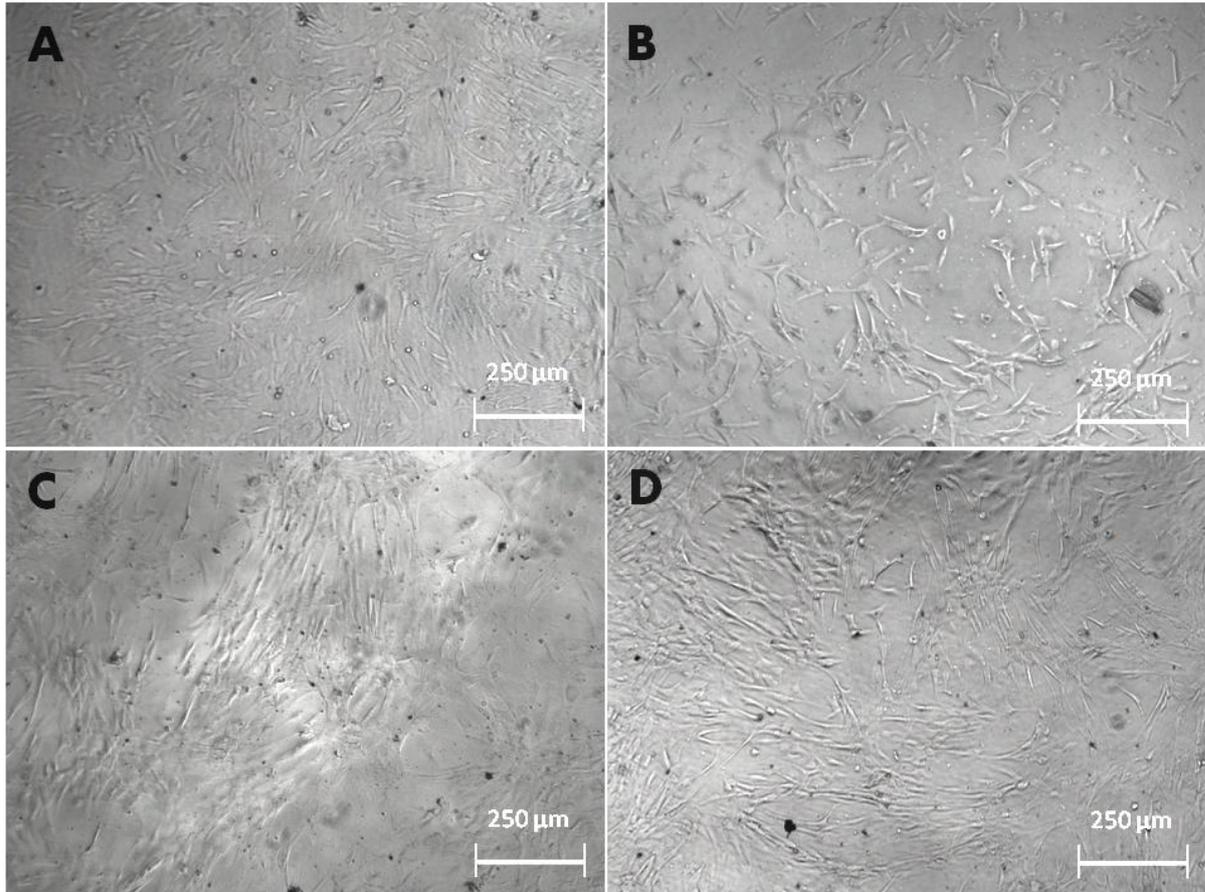
As membranas produzidas a partir de soluções de quitosana (0,7%) e gelatina (0,7%) em proporção de 3:1, obtidas pelo método de evaporação de solvente apresentaram-se macroscopicamente uma estrutura fina, com aproximadamente 0,034mm de espessura e transparentes, as membranas sem reticular, apresentaram estrutura homogênea, já as reticuladas com glutaraldeído, apesar de ter aspecto transparente, apresentava uma coloração alaranjada, elas se apresentaram com algumas rugas em algumas partes das membranas, já as reticulas com TPP, tanto com 0,1% ou 1%, diminuíam de tamanho após a reticulação, apresentando um aspecto como se elas tivessem sido amassadas (Figura 11).



**Figura 11. Membranas de Quitosana:Gelatina (3:1) produzidas pelo método de evaporação de solvente.** As imagens representam membranas produzidas em placas de petri e posteriormente cortadas com diâmetro aproximado de 9,75mm. Todas as membranas apresentaram macroscopicamente estruturas finas (0.034mm de espessura) e transparentes, as membranas de quitosana e gelatina sem reticular (A) apresentaram estrutura homogênea; as membranas de quitosana e gelatina reticulada com glutaraldeído (B) apresentaram-se com uma coloração alaranjada, com algumas rugas; as membranas de quitosana e gelatina reticulada com TPP 0,1% (C) e as membranas de quitosana e gelatina reticulada com TPP 1% (D) diminuíram de tamanho após a reticulação. Escala: 5mm.

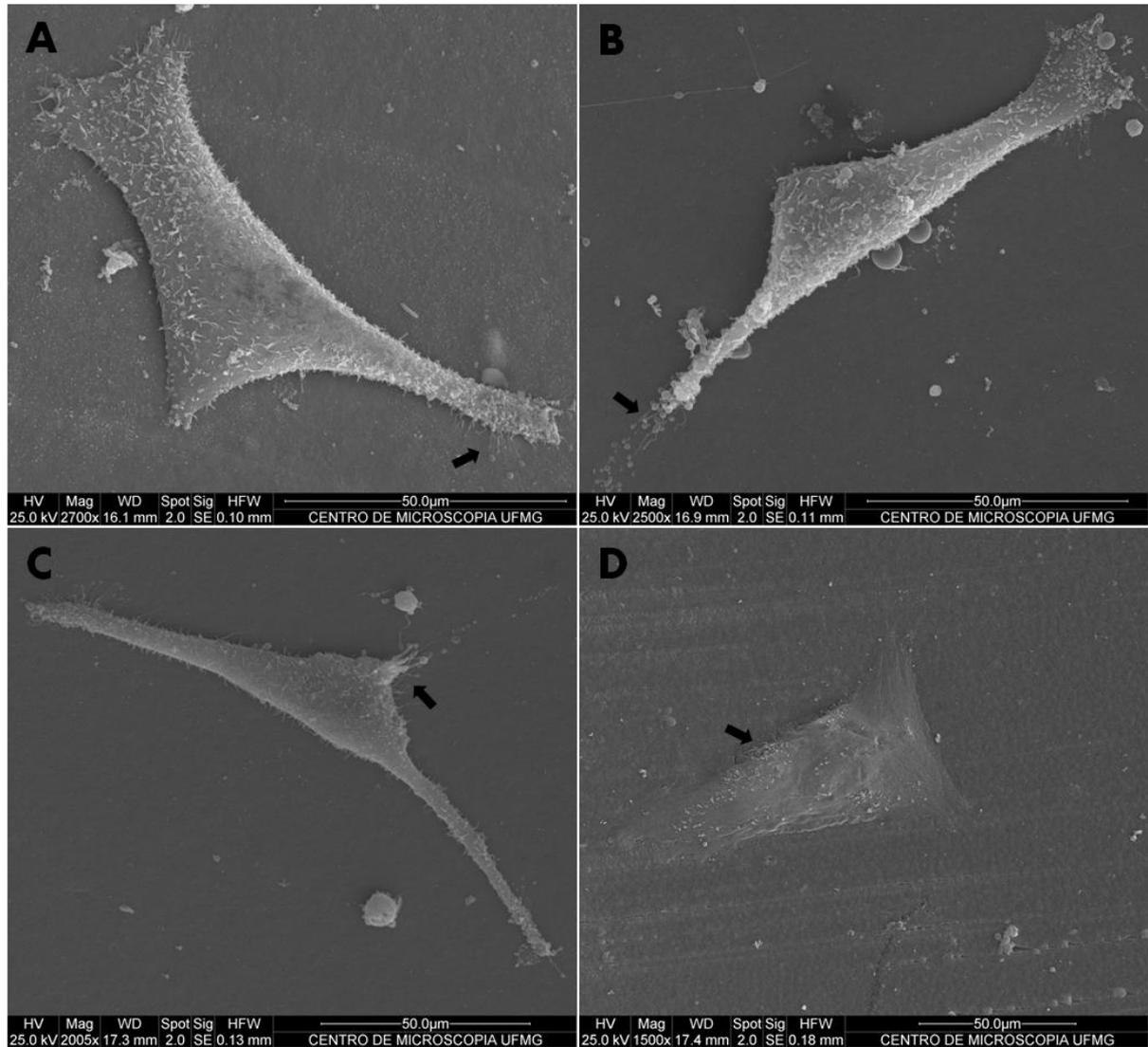
#### **5.4. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e microscopia óptica das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1)**

As hASC foram cultivadas nas diferentes membranas e após quatro dias de cultivo elas foram analisadas por microscopia óptica. As imagens obtidas revelaram que hASC cultivadas nos diferentes tipos de membranas apresentaram capacidade de aderência aos biomateriais e morfologia fibroblastóide. No entanto, as hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído apresentaram menor aderência e proliferação mais lenta quando comparadas com as membranas de quitosana-gelatina sem reticular e reticuladas com TPP 0,1 e 1%, que apresentaram densidade de aderência e proliferação semelhantes (Figura 12).



**Figura 12. Análise morfológica por microscopia óptica das hASC aderidas à membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não.** As imagens obtidas revelam que as hASC foram capazes de se aderir nos quatro diferentes tipos de membranas (A) membrana sem reticular; (B) membrana reticulada com glutaraldeído, apresentaram menor aderência e proliferação; (C) membrana reticulada com TPP 0,1%; (D) membrana reticulada com TPP 1%. Escala: 5μm

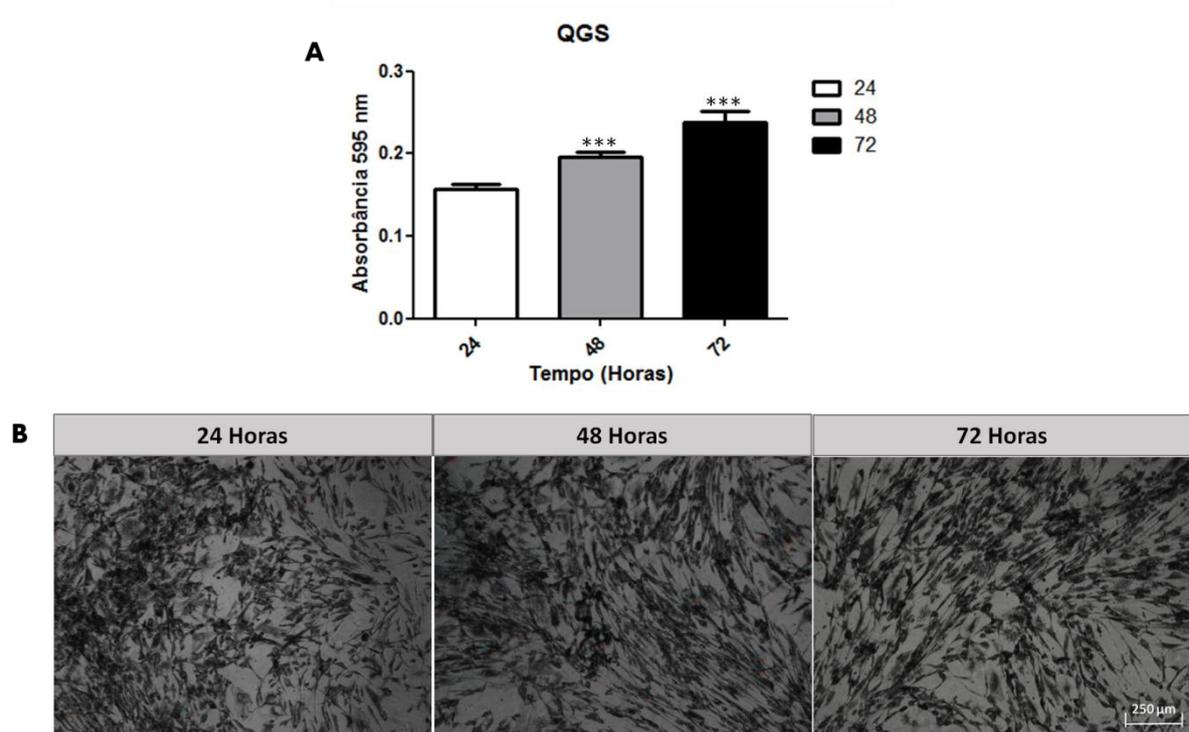
Com a análise das imagens do MEV, foi possível observar a presença de hASC com morfologia típica, e aderidas a superfície homogênea das membranas, emitindo prolongamentos citoplasmáticos que promovem a adesão celular (Figura 13)



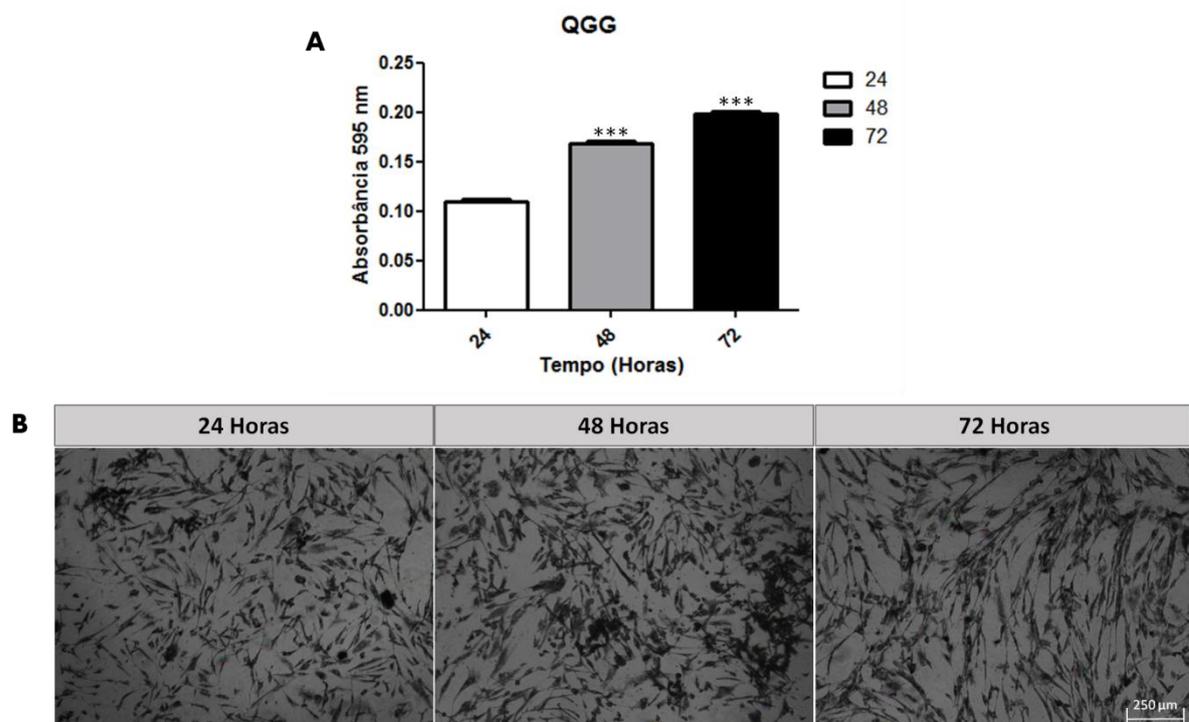
**Figura 13. Avaliação da adesão das hASC, por MEV, em membranas de Quitosana:Gelatina (2:1) reticuladas ou não.** Imagens mostrando células aderidas, com morfologia fibroblastóide e emitindo prolongamentos que promovem a adesão celular (setas). (A) membrana sem reticular; (B) membrana reticulada com glutaraldeído; (C) membrana reticulada com TPP 0,1%; (D) membrana reticulada com TPP 1%. Escala 50µm.

### 5.5. Avaliação da viabilidade celular

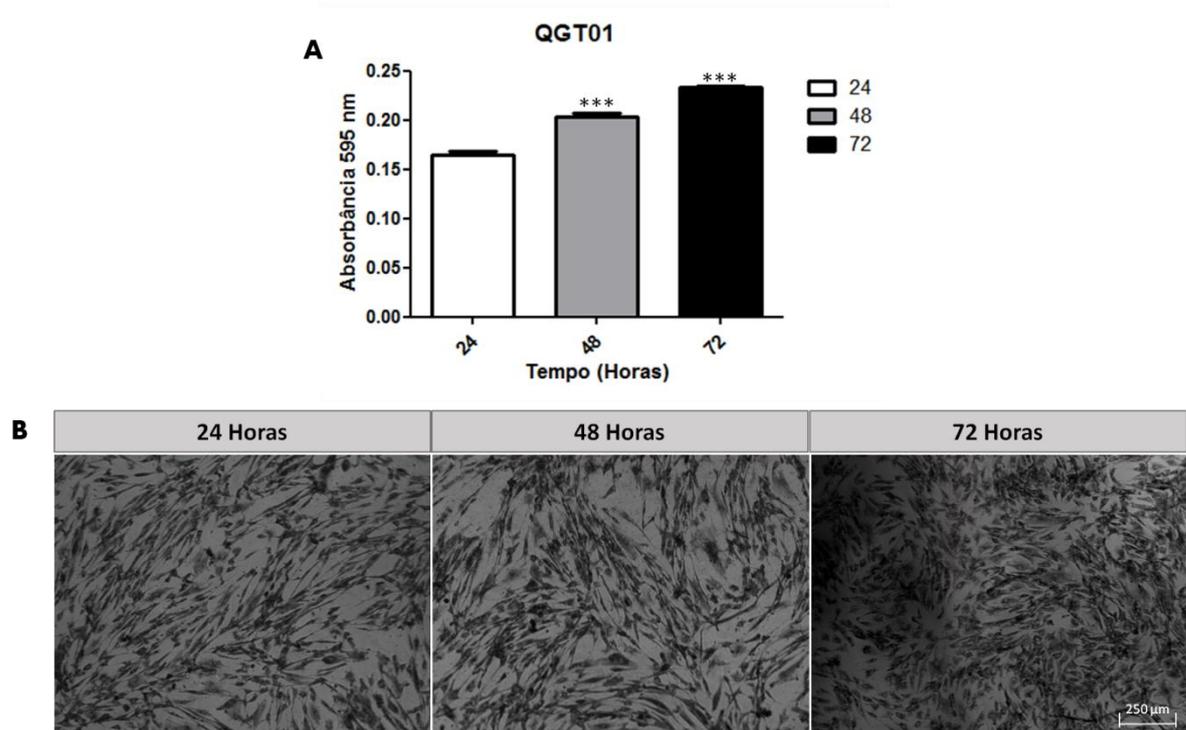
Os resultados da leitura de absorvância demonstraram que as hASC apresentaram-se viáveis quando cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1) sem reticular e reticuladas com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% ou TPP 0,01%, já que o valor da leitura aumentou entre 24h e 72h (Figuras 14 (A); 15 (A); 16 (A) e 17 (A)). As hASC cultivadas nos diferentes tipos de membranas foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan (Figuras 14 (B); 15 (B); 16 (B) e 17 (B)), demonstrando a viabilidade das mesmas.



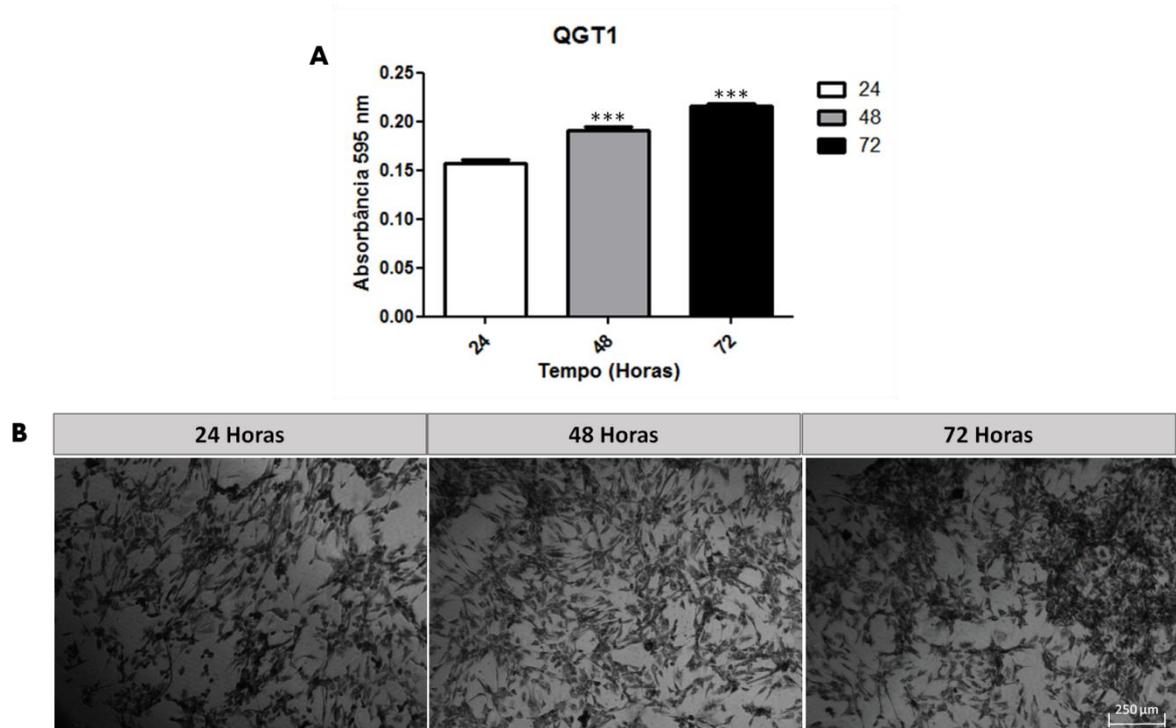
**Figura 14. Avaliação da viabilidade das células cultivadas em membrana de quitosana-gelatina (3:1) sem reticular.** (A) Leitura da absorbância do ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de cultivo em membrana QGS, demonstra aumento da viabilidade celular devido ao aumento da leitura de absorbância. \*\*\* indica diferença significativa entre os tempos com  $p < 0.001$ . (B) Imagens de microscopia óptica das hASC após adição de MTT, demonstrando a formação de cristais de formazan, indicando viabilidade celular. Escala 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 15. Avaliação da Proliferação e viabilidade das células cultivadas em membrana de Quitosana:Gelatina (3:1) reticuladas com Glutaraldeído 0,02%.** (A) Leitura da absorbância do ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de cultivo em membrana QGG demonstra aumento da viabilidade celular devido ao aumento da leitura de absorbância. \*\*\* indica diferença significativa entre os tempos com  $p < 0.001$ . (B) Imagens de microscopia óptica das hASC após adição de MTT, demonstrando a formação de cristais de formazan, indicando viabilidade celular. Escala 250  $\mu\text{m}$ .

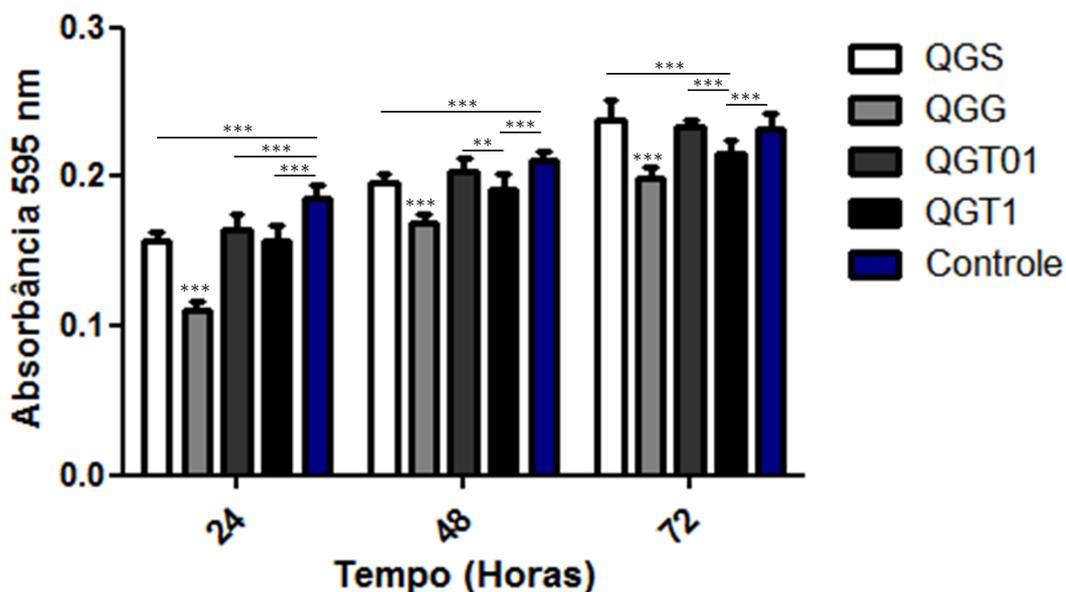


**Figura 16. Avaliação da Proliferação e viabilidade das células cultivadas em membrana de Quitosana:Gelatina (3:1) reticuladas com TPP 0,1%.** (A) Leitura da absorbância do ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de cultivo em membrana QGT01 demonstra aumento da viabilidade celular devido ao aumento da leitura de absorbância. \*\*\* indica diferença significativa entre os tempos com  $p < 0.001$ . (B) Imagens de microscopia óptica das hASC após adição de MTT, demonstrando a formação de cristais de formazan, indicando viabilidade celular. Escala 250  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17. Avaliação da Proliferação e viabilidade das células cultivadas em membrana de Quitosana:Gelatina (3:1) reticuladas com TPP 1%.** (A) Leitura da absorbância do ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de cultivo em membrana QGT1. \*\*\* indica diferença significativa entre os tempos com  $p < 0.001$ . (B) Imagens de microscopia óptica das hASC após adição de MTT, demonstrando a formação de cristais de formazan, indicando viabilidade celular. Escala 250  $\mu\text{m}$ .

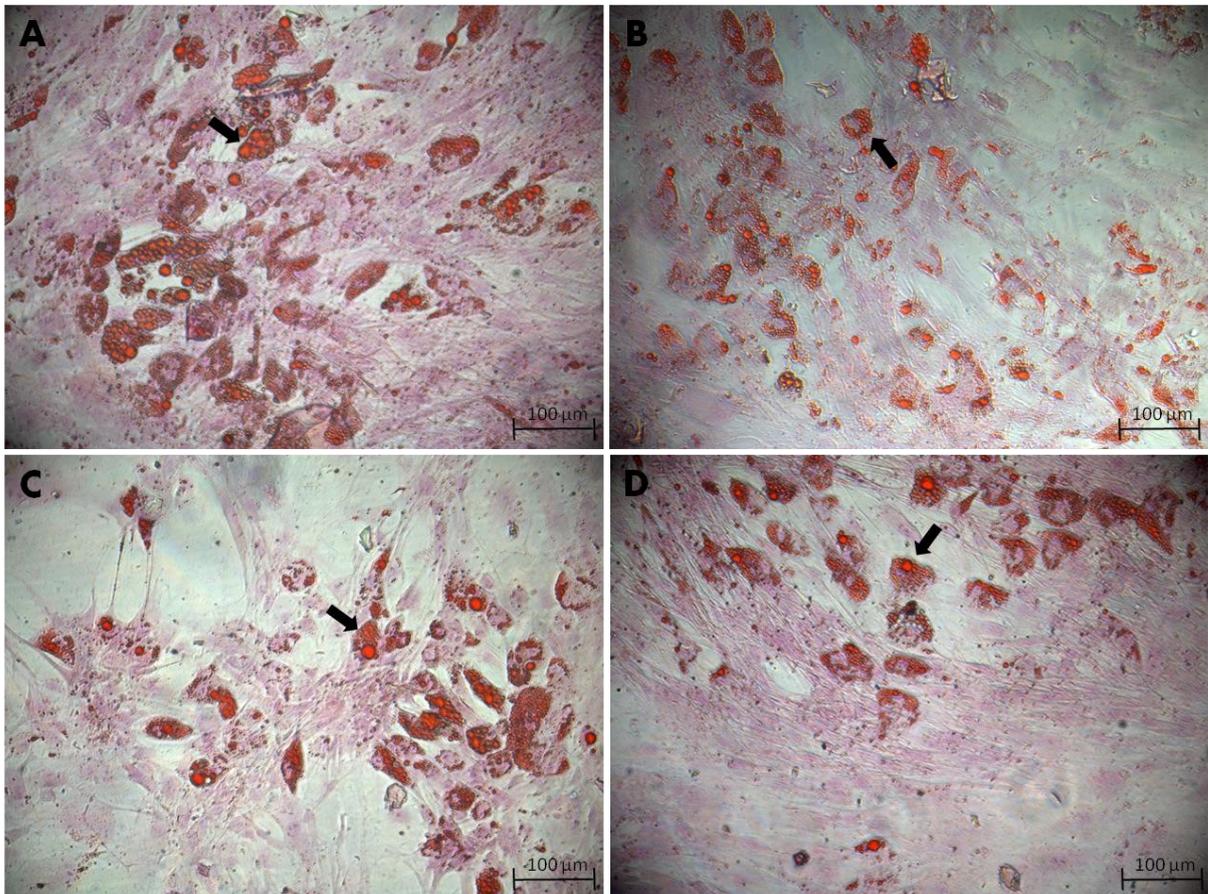
O valor da absorbância do grupo no qual as células não foram cultivadas em membranas (grupo controle) foi significativamente maior do que aquelas cultivadas em todos os tipos de membranas no tempo inicial de 24 horas, neste mesmo tempo, não houve diferença significativa entre o valor de absorbância dos grupos de hASC cultivadas em membranas quitosana-gelatina sem reticular (QGS), quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% (QGT01) e quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1% (QGT1). No tempo de 48 e 72 horas, não houve mais diferença significativa entre o grupo controle e a membrana QGT01, sendo que a partir de 48 horas, QGT01 torna-se significativamente maior do que QGT1, que continua sendo significativamente menor do que o grupo controle. As membranas QGS não possuem valor de absorbância significativamente diferente que o grupo controle no tempo de 72 horas, tornando-se significativamente maior do que QGT1. As membranas quitosana-gelatina reticulada com glutaraldeído (QGG), tiveram valores de absorbância menores quando comparada com todos os grupos, nos diferentes tempos (Figura 18).



**Figura 18. Ensaio de MTT das hASC cultivadas em membranas de Quitosana-Gelatina (3:1) reticuladas ou não.** Leitura da absorbância do ensaio de MTT após 24, 48 e 72 horas de cultivo em membrana (QGS) quitosana-gelatina sem reticular, (QGG) quitosana-gelatina reticulada com glutaraldeído 0,02%, (QGT01) quitosana-gelatina reticulada com TPP 0,1%, (QGT1) quitosana-gelatina reticulada com TPP 1%. O valor da absorbância do grupo controle foi significativamente maior do que o valor dos grupos de hASC cultivadas nas diferente membranas no tempo inicial de 24h, neste mesmo tempo, não houve diferença significativa entre a absorbância das hASC cultivadas em QGS, QGT01 e QGT1; Nos tempos de 48h e 72h, não houve mais diferença significativa entre QGT01 e controle; a partir de 48h, QGT01 é significativamente maior que QGT1; QGS não possui valor significativamente diferente de QGT1 em 72h; QGG teve valor de absorbância menor quando comparada com todos os grupos em todos os tempos. \* indica diferença significativa entre os tempos com  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 5.6. Capacidade de diferenciação *in vitro* das hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1)

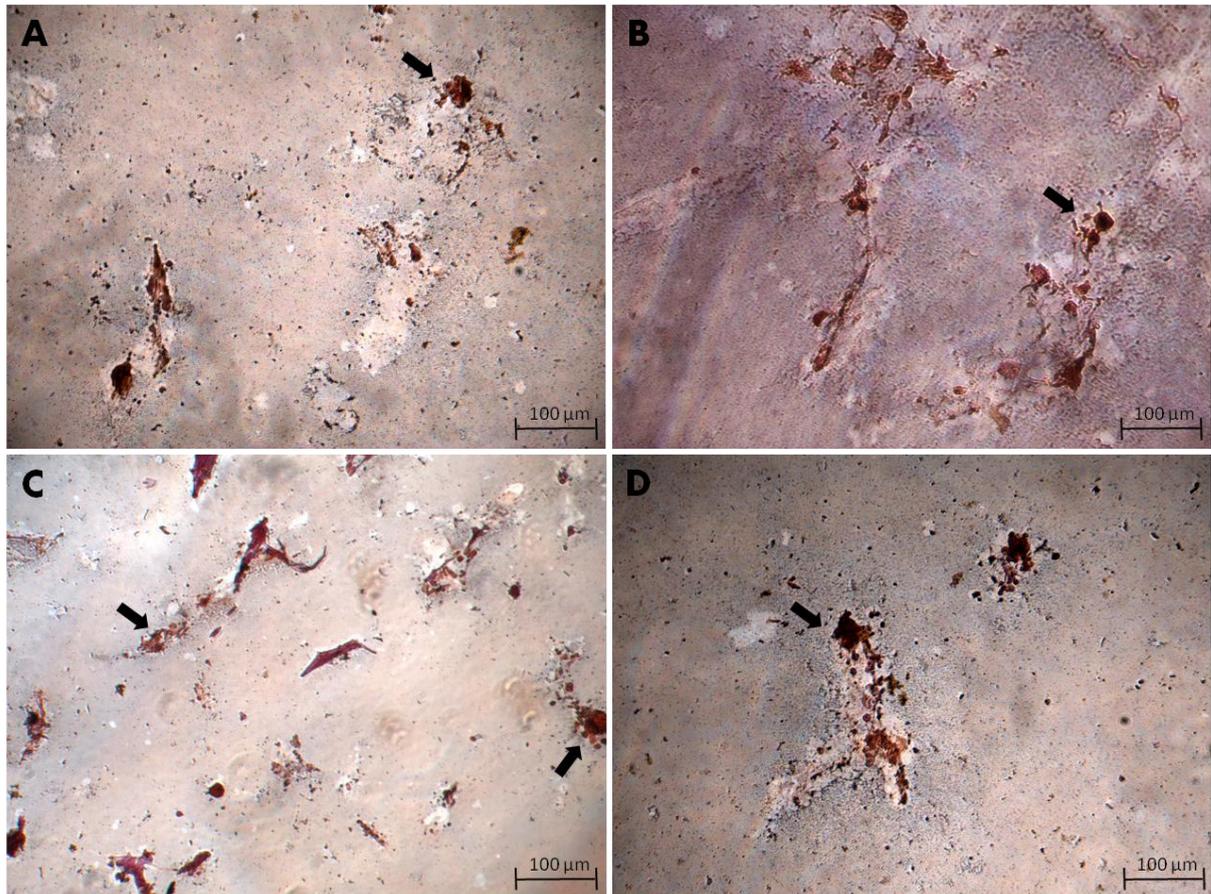
As imagens de Oil Red demonstram que após 21 dias de cultivo em membranas sem reticular (Figura 19 (A)), reticuladas com glutaraldeído (Figura 19 (B)), reticuladas com TPP 0,1% (Figura 19 (C)) ou reticuladas com TPP 1% (Figura 19 (D)) as células foram capazes de produzir e estocar lipídeos em vacúolos no citoplasma, confirmando a capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica.



**Figura 19. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC, cultivadas nos diferentes tipos de membranas, em linhagem adipogênica.** Coloração de Oil Red para confirmação da diferenciação, em adipócitos, de hASC cultivadas por 21 dias com meio de diferenciação específico, em membranas (A) sem reticular; (B) reticuladas com glutaraldeído; (C) reticuladas com TPP 0,1% e (D) reticuladas com TPP 1%. Em todas as membranas, as células cultivadas com meio indutor de diferenciação adipogênica foram capazes de produzir e estocar lipídios em vacúolos no citoplasma (setas), confirmando a capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica. Escala 100μm.

A formação de nódulos de mineralização após 21 dias de cultivo, foi demonstrada pela coloração de Von Kossa, demonstrando que hASC cultivadas em membranas sem reticular (Figura 20 (A)), reticuladas com glutaraldeído (Figura 20 (B)),

reticuladas com TPP 0,1% (Figura 20 (C)) ou reticuladas com TPP 1% (Figura 20 (D)) foram capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica.

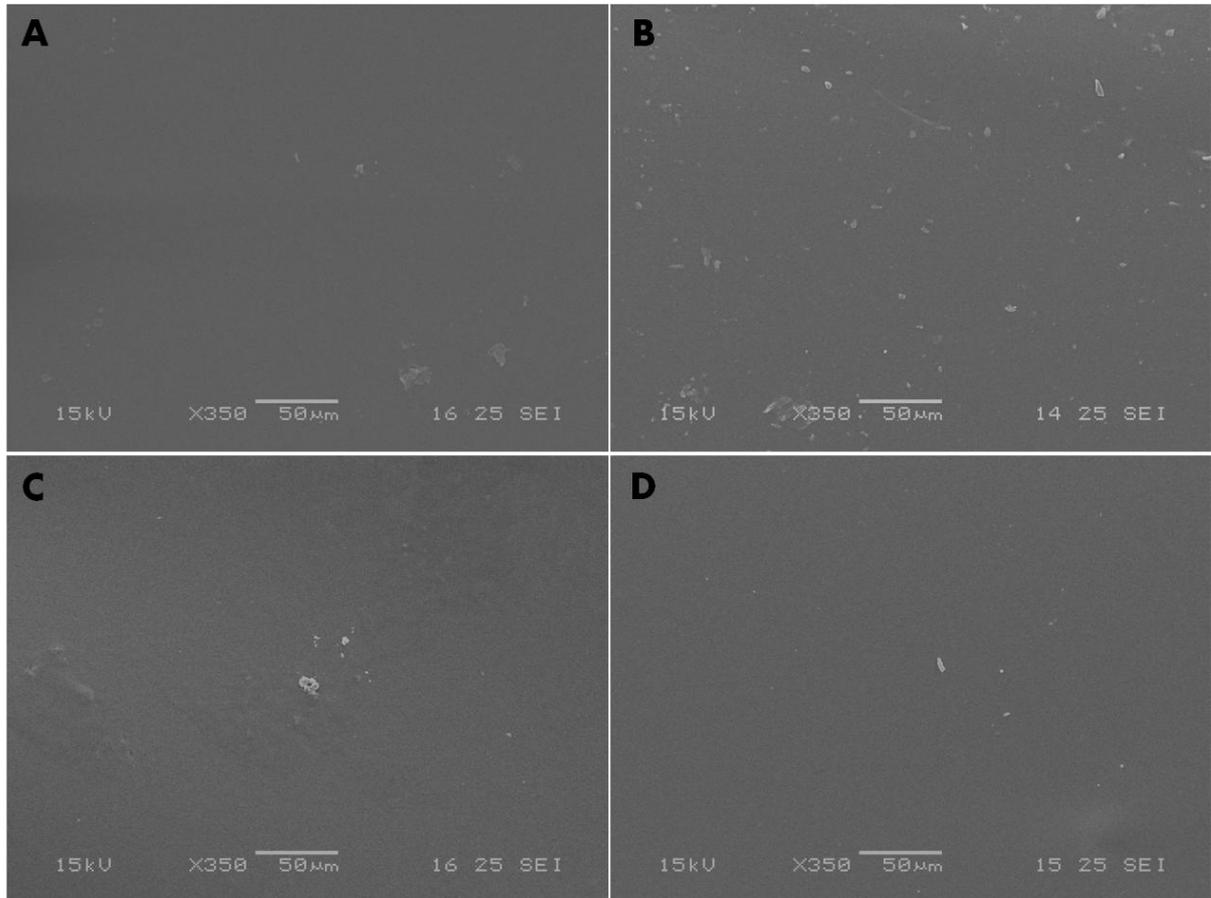


**Figura 20. Avaliação do potencial de diferenciação das hASC, cultivadas em membranas, em linhagem osteogênica.** Coloração de Von Kossa para confirmação da diferenciação, em osteócitos, de hASC cultivadas por 21 dias com meio de diferenciação específico, em membranas (A) sem reticular; (B) reticuladas com glutaraldeído; (C) reticuladas com TPP 0,1% e (D) reticuladas com TPP 1%. Coloração Von Kossa demonstra a capacidade das hASC se diferenciarem em células osteogênicas, demonstrada pela coloração castanha, que indica a mineralização da matriz extracelular (setas). Escala 100µm.

## 5.7. Caracterização das membranas de quitosana-gelatina (3:1)

### 5.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A partir da análise da morfologia da membrana de quitosana-gelatina (3:1) sem reticular, reticulada com glutaraldeído 0,02%, reticulada com TPP 0,1% ou reticulada com TPP 1%, observa-se uma superfície uniforme, lisa e plana, sem a presença de poros visíveis, caracterizando as membranas como densas (Figura 21).

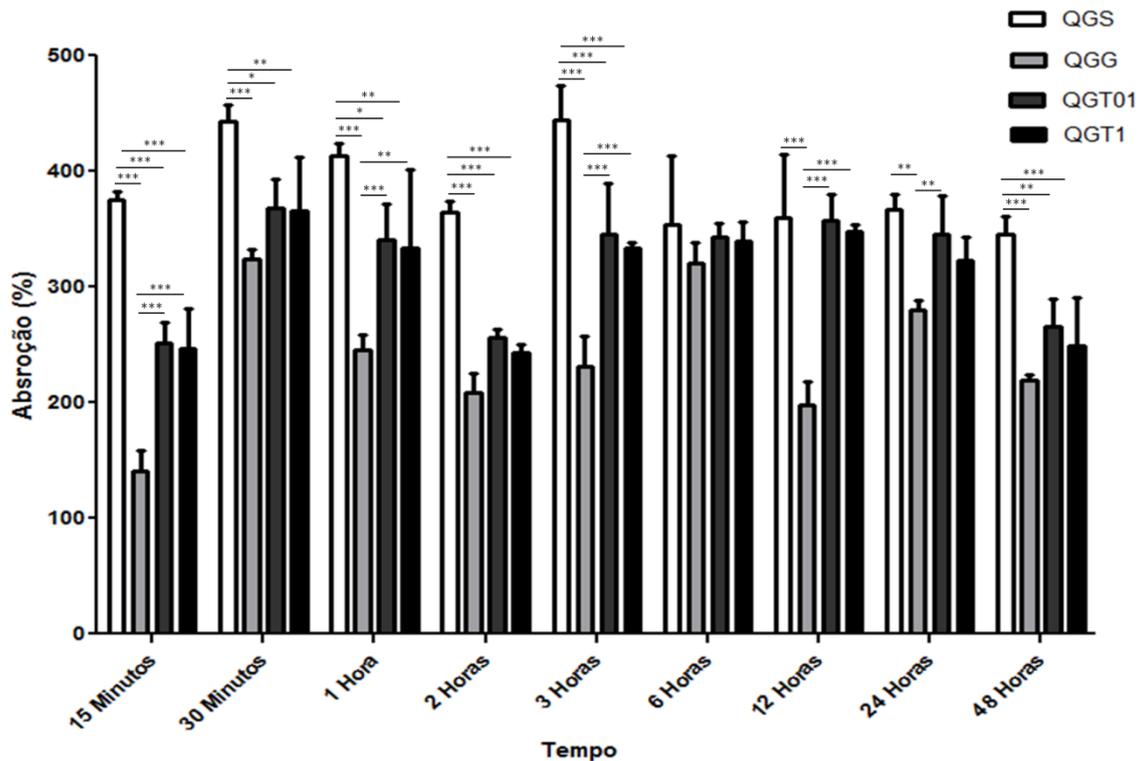


**Figura 21. Caracterização morfológica das membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não.** Análise das membranas através de microscopia eletrônica de varredura. Em todas as membranas, (A) QGS - quitosana-gelatina sem reticular; (B) QGG - quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído 0,02%; (C) QGT01 - quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (D) QGT1 – quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1%, foi possível observar uma superfície uniforme, lisa e plana. Escala: 350µm.

### 5.7.2. Ensaio de absorção de água

Utilizando o método gravimétrico, foi possível avaliar a capacidade de absorção das quatro membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não como demonstradas na figura 22. Analisando a capacidade de absorção de cada membrana, não foi possível comparar cada grupo individualmente nos diferentes tempos, devido a oscilação nas porcentagens de absorção de uma mesma membrana nos diferentes tempos. No entanto, foi possível observar que as membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com glutaraldeído (QGG), foram significativamente menores quando comparadas com os demais tipos de membranas, enquanto que as membranas sem reticular (QGS) se demonstraram com maior capacidade de absorção de água ao serem comparadas com as demais membranas, as membranas reticuladas com TPP nas concentrações de 0,1%

(QGT01) e 1% (QGT1) não apresentaram diferenças significativas na capacidade de absorção quando comparadas entre si, porém tiveram um valor intermediário de capacidade de absorção de água quando comparada as demais membranas.

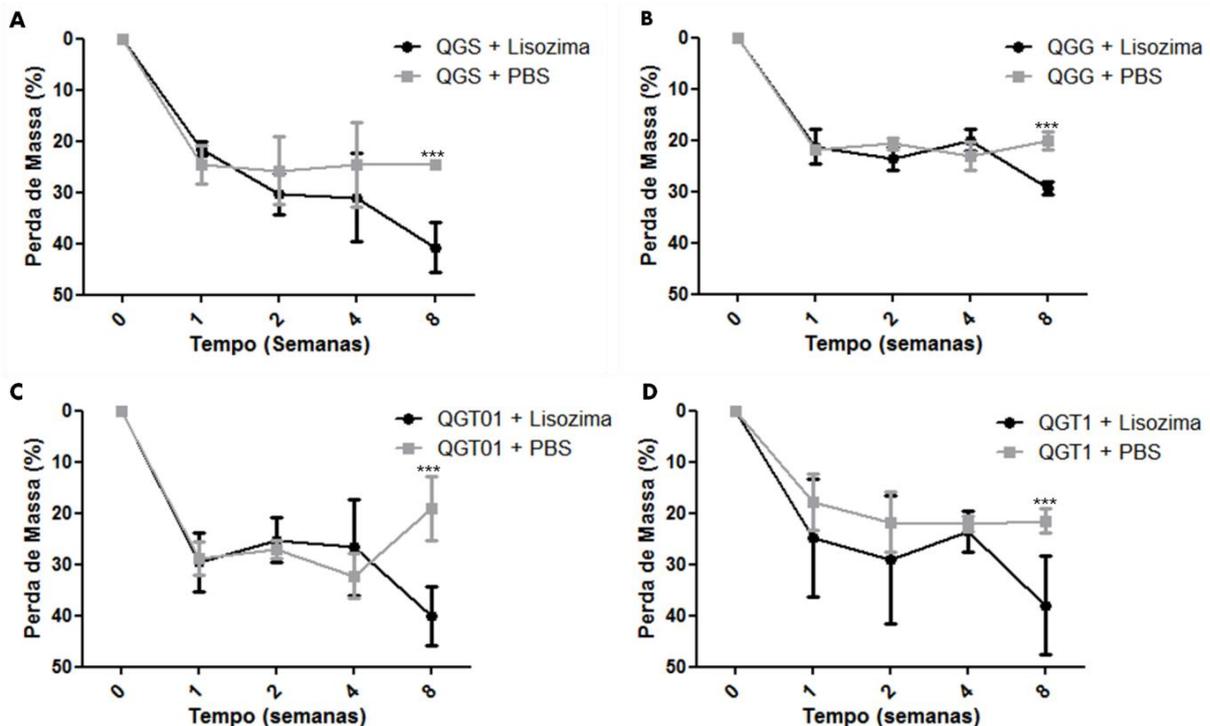


**Figura 22. Ensaio de absorção de água das membranas de quitosana-gelatina (3:1).** Representação gráfica da capacidade de absorção de água em relação ao tempo das membranas (QGS) quitosana-gelatina sem reticular; (QGG) quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído 0,02%; (QGT01) quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (QGT1) quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1%. À parti da análise do gráfico foi possível observar que membranas QGG tiveram capacidade de absorção de água significativamente menores quando comparadas com os demais tipos de membranas em todos os tempos; em geral, QGS se demonstraram com mais capacidade de absorção de água; QGT01 e QGT1 não apresentaram diferenças significativas na capacidade de absorção de água, obtendo um valor intermediário de capacidade de absorção. Diferenças significativas: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni.

### 5.7.3. Ensaio de degradação das membranas

Foi avaliada a capacidade de degradação *in vitro* das membranas de quitosana-gelatina (3:1) na presença de lisozima em concentrações fisiológicas, utilizando membranas imersas em PBS 0,01M como controle. A porcentagem de massa que cada membrana perdeu ao longo do tempo está demonstrada na figura 23. Foi possível observar que na primeira semana houve perda em torno de 23% de massa em todos os tipos de membranas, quitosana-gelatina sem reticular (QGS), quitosana-gelatina reticulada com glutaraldeído (QGG), quitosana-gelatina reticulada

com TPP 0,1% (QGT01) e quitosana-gelatina reticulada com TPP 1% (QGT1), tanto na presença de lisozima, quanto de PBS. Da segunda até a quarta semana não houve perda de massa significativa em nenhum dos tipos de membranas tanto naquelas que estavam na presença de lisozima quanto na presença de PBS 0,01M. A partir da oitava semana, houve uma perda significativa de massa das membranas tratadas com lisozima em todos os grupos quando comparadas com seu grupo controle, no qual as membranas foram imersas apenas em PBS 0,01M, sendo que, QGS, QGST01 e QGST1 tiveram uma redução em torno de 40% da massa inicial, enquanto que QGG tiveram uma redução em torno de 25%.



**Figura 23. Ensaio de degradação enzimática *in vitro* das membranas de quitosana-gelatina (3:1).** Avaliação da porcentagem de massa perdida ao longo de 8 semanas de incubação com lisozima ou PBS 0,01M, sob agitação a 37°C, das membranas (A) QGS - quitosana-gelatina sem reticular; (B) QGG - quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído 0,02%; (C) QGT01 - quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (D) QGT1 – quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1%. Em todos os grupos de membranas, na primeira semana houve perda em torno de 23% de massa em e entre a segunda e quarta semanas não houve perda de massa significativa, tanto na presença de lisozima, quanto de PBS; a partir da oitava semana, houve perda significativa de massa em todos os grupos de membranas quando comparadas ao seu controle, sendo que QGS, QGT01 e QGT1 tiveram uma redução em torno de 40% e QGG em torno de 23%. \*\*\* indica diferença significativa entre os grupos tratados com PBS 0,01M (controle) e tratados com lisozima com valor de  $p < 0.001$ , two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni ( $n=3$ ).

#### 5.7.4. Propriedades mecânicas

As membranas de quitosana-gelatina (3:1) foram preparadas em placas de Petri conforme descrito no item 4.2 e posteriormente cortadas, ficando com os seguintes diâmetros: 5mm de largura, 30mm de comprimento e aproximadamente 0,034mm de espessura para assegurar uma secção vertical de encaixe ao equipamento.

Calcula-se o módulo de elasticidade a partir da inclinação da parte linear do gráfico. A porcentagem de deformação corresponde à razão da variação do comprimento pelo comprimento inicial. A área sob a curva até o colapso do corpo de prova corresponde à tensão.

A partir da análise dos resultados, foi possível observar que membranas de quitosana-gelatina reticuladas tanto com glutaraldeído quanto com TPP a 0,1% e 1%, possuem uma tensão máxima maior do que aquelas membranas não reticuladas. Membranas reticuladas com glutaraldeído 0,02% possuem uma tensão máxima maior do que aquelas reticuladas com TPP 0,1% ou 1%, e a maior concentração de TPP leva a um resultado menor de tensão máxima.

Em relação à deformação das membranas, observou-se que membranas sem reticulante e reticuladas com TPP 0,1% têm maiores valores de deformação, indicando que são mais resistentes do que as membranas reticuladas com TPP 1% e com glutaraldeído 0,02%, estas últimas são a mais frágeis comparada às outras membranas.

Ao comparar o módulo de elasticidade das quatro membranas, foi observado que membranas reticuladas com TPP 1% e glutaraldeído 0,02% possuem maior módulo de elasticidade, e conseqüentemente são mais frágeis do que as membranas sem reticular e reticuladas com TPP 0,1%.

A tabela 4 apresentam os valores da deformação específica, módulo de elasticidade e tensão de tração. E a figura 24 apresenta os gráficos relativos às curvas de tensão-deformação no ensaio de tração para as membranas de quitosana-gelatina sem reticular, reticuladas com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% ou TPP 1%.

Tabela 4. Propriedades Mecânicas das Membranas de Quitosana:Gelatina (3:1)

| Amostras        | Deformação (%) | Módulo Elástico (MPa) | Tensão (F. Max.) (MPa) |
|-----------------|----------------|-----------------------|------------------------|
| Sem Reticulante | 5,0 ± 1,0      | 25,0 ± 5,0            | 45,0 ± 7,0             |
| TPP 0,1%        | 5,1 ± 0,5      | 26,0 ± 4,0            | 63,0 ± 7,0             |
| TPP 1%          | 3,3 ± 0,4      | 31,0 ± 3,0            | 57,0 ± 2,0             |
| Glutaraldeído   | 2,8 ± 0,1      | 33,0 ± 2,0            | 68,0 ± 4,0             |

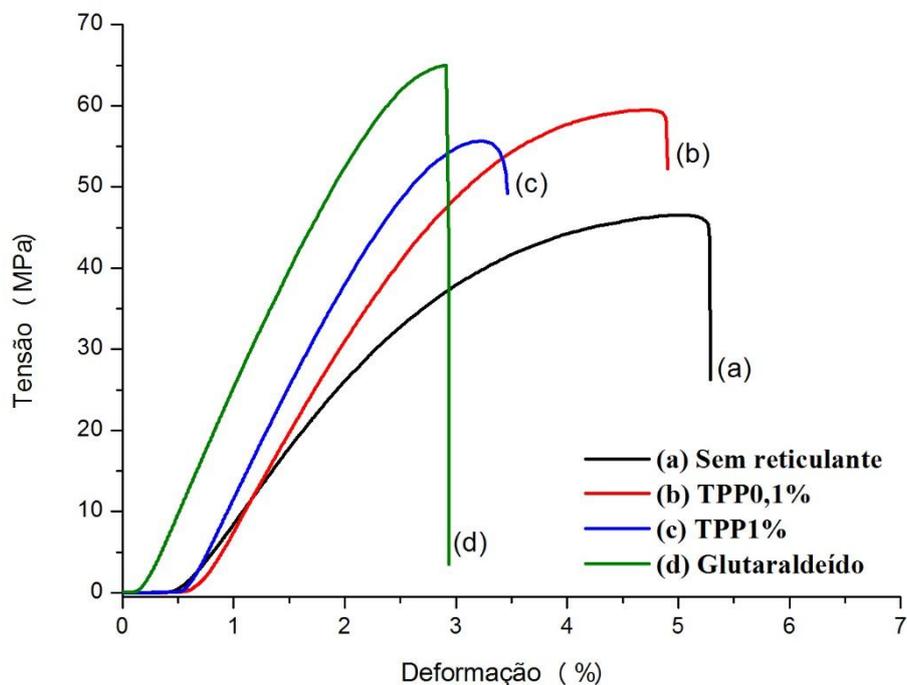


Figura 24. Gráficos relativos às curvas de tensão-deformação no ensaio de tração para as membranas de quitosana-gelatina. (a) Membrana sem reticulante; (b) Membrana reticulada com TPP 0,1%; (c) Membrana reticulada com TPP 1% e (d) Membrana reticulada com Glutaraldeído 0,02%.

#### 5.7.5. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A figura 25 representa os espectros das membranas de Quitosana sem reticular (QGS), reticulada com Glutaraldeído 0,02% (QGG), reticulada com TPP 0,1% (QGT01) e reticulada com TPP 1% (QGT1). Foi possível observar que os espectros de todas as membranas foram semelhantes, apresentando picos em

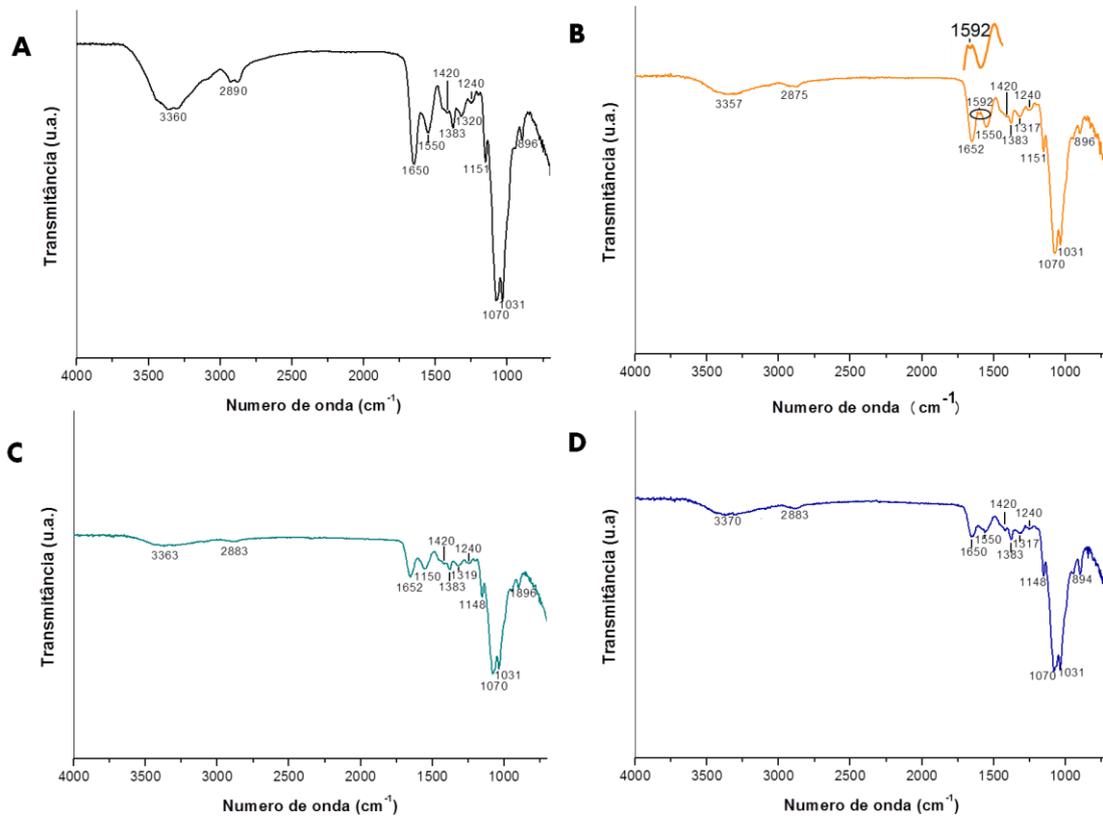
valores de comprimentos de ondas similares. Foi realizada apenas análise qualitativa, por isso, o tamanho do pico não foi considerado.

Bandas em torno de  $896\text{ cm}^{-1}$  e  $1322\text{ cm}^{-1}$  referem-se a ligações glicosídicas, e a amida terciária, presentes tanto na quitina, quanto na Quitosana. Picos de absorção em  $1550\text{ cm}^{-1}$  é representativo de alongamento de C–N, junto com flexão do grupo N–H, presentes na amida secundária tanto da Quitosana quanto da gelatina, o pico  $1650\text{ cm}^{-1}$  é referente a presença de estiramento da carbonila (C=O), da amida primária, presente na estrutura da Quitosana e da gelatina e o pico  $1240\text{ cm}^{-1}$  representa a presença de amida terciária, presente na estrutura química da gelatina.

A presença de uma larga banda em torno de  $3365\text{ cm}^{-1}$  é a indicação de resultado de sobreposição de vibrações de alongamento de O–H e N–H, grupos estes envolvidos em ligações de hidrogênio, enquanto a presença, também, de uma banda larga em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  representa sobreposição dos grupos alifáticos –CH<sub>2</sub> e –CH<sub>3</sub>.

Pico de absorção em torno de  $1150\text{ cm}^{-1}$  refere-se ao estiramento assimétrico da ponte C–O–C, enquanto que  $1070\text{ cm}^{-1}$  e  $1031\text{ cm}^{-1}$  envolve o estiramento do grupo C–O, característica da estrutura sacarídica da Quitosana, já os picos de  $1383\text{ cm}^{-1}$  e  $1420\text{ cm}^{-1}$  estão associados à deformação simétrica do grupo –CH<sub>3</sub>.

O pico de  $1590\text{ cm}^{-1}$  foi observado apenas no espectro da membrana de Quitosana:gelatina reticulada com glutaraldeído, e ele representa ligação C–N da imina, que ocorre entre a Quitosana e o glutaraldeído.



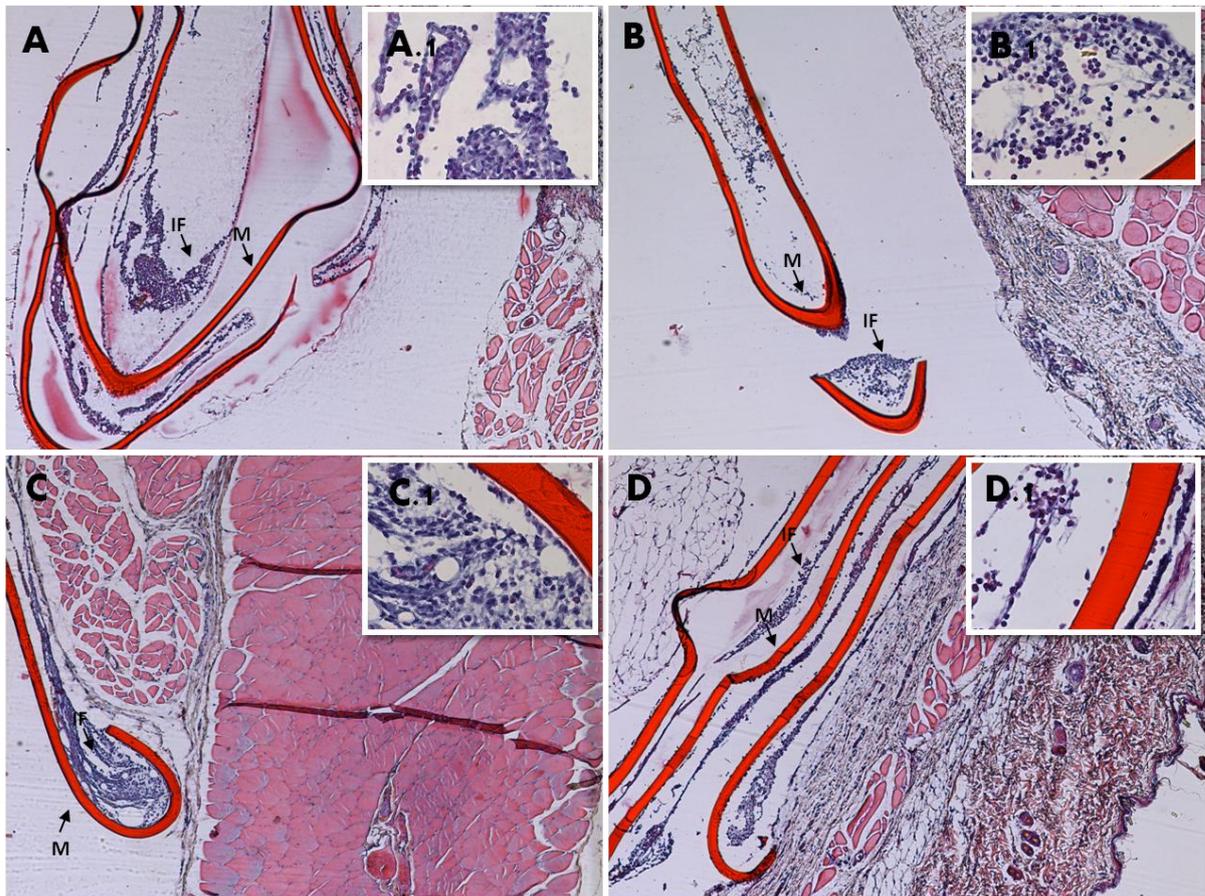
**Figura 25. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier nas membranas.** Os quatro tipos de membranas foram avaliadas pela técnica de FTIR com alcance entre 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>. Os gráficos estão no intervalo de 4000 – 700 cm<sup>-1</sup>. Foi realizada uma avaliação qualitativa, por isso os tamanhos dos picos não foram de importância e os valores de transmittâncias não estão representados nos gráficos (A) QGS - quitosana-gelatina sem reticular; (B) QGG - quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído 0,02%; (C) QGT01 - quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (D) QGT1 – quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1%

### 5.8. Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das membranas de Quitosana-Gelatina (3:1) reticuladas ou não

As membranas foram implantadas no animal horizontalmente e retas, porém ao remover a região do implante foi possível perceber que as membranas dobraram sobre si mesmas. Foi possível observar, a partir das análises histológicas, o encapsulamento do material e uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho.

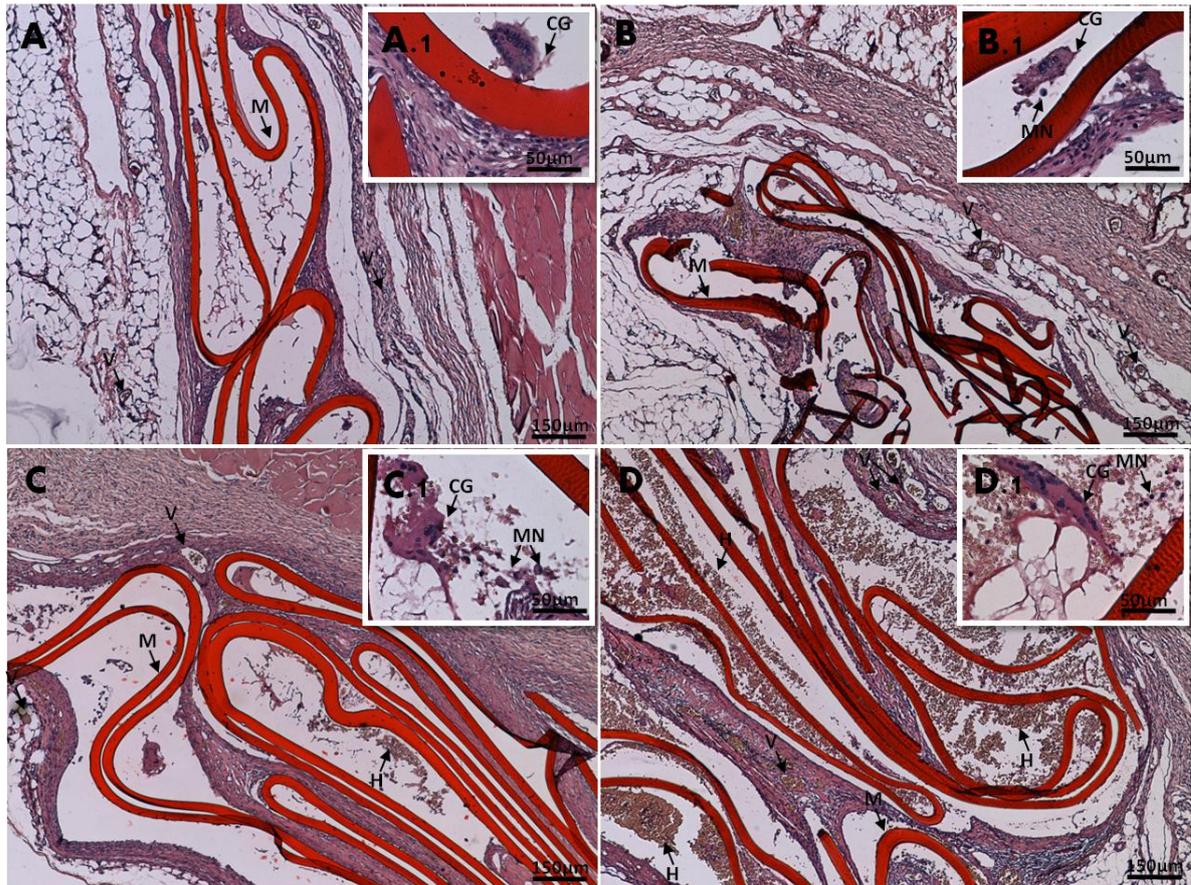
Após dois dias do implante, ao remover a região do implante, foi observado que as membranas não estavam totalmente aderidas ao tecido do animal, ficando um pouco solta na região subcutânea, mas mesmo assim, após a coloração, foi possível observar um material amorfo, extremamente eosinófilo e acelular que caracterizavam as membranas QGS, QGG, QGT01 e QGT1. Ao redor, nas marginações das membranas, foi observado infiltrado inflamatório

polimorfonuclear, com raras células mononucleares, vasos congestionados e com presença de marginação leucocitária, caracterizando uma inflamação aguda (Figura 26).



**Figura 26. Análises histológicas de H&E após 2 dias do implante de membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não com glutaraldeído ou TPP ,1% e 1%. A análise evidência uma reação inflamatória aguda nas membranas (A) QGS - quitosana-gelatina sem reticular; (B) QGG - quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído 0,02%; (C) QGT01 - quitosana-gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (D) QGT1 – quitosana-gelatina reticuladas com TPP 1%. M - membrana de quitosana-gelatina (3:1); IF - infiltrado inflamatório. Escalas: 50µm e 150µm.**

Após 30 dias do implante, foi possível observar que as membranas estavam totalmente encapsuladas e íntegras, com presença de células mononucleares, células gigantes e vasos distribuídos difusamente pela capsula que envolve o implante, caracterizando uma resposta inflamatória crônica do tipo corpo estranho nos implantes de membranas QGT01 foi observado alguns focos de hemorragia, enquanto que na QGT1 houve intensa hemorragia (Figura 27).



**Figura 27. Análises histológicas de H&E dos implantes subcutâneos de membranas de Quitosana:Gelatina (3:1) reticuladas ou não.** A análise evidencia uma reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho nas membranas (A) QGS - Quitosana-Gelatina sem reticular; (B) QGG - Quitosana-Gelatina reticuladas com Glutaraldeído 0,02%; (C) QGT01 - Quitosana-Gelatina reticuladas com TPP 0,1% e (D) QGT1 – Quitosana-Gelatina reticuladas com TPP 1%.. M- membrana de Quitosana:Gelatina (3:1); V- Vaso sanguíneo hiperemiado; H- Hemorragia; MN- monócitos; CG- células gigantes. Escalas: 50µm e 150µm.

## 6. DISCUSSÃO

Graves lesões em tecidos ou órgãos, devido aos variados fatores, como câncer, anomalia congênita, trauma, dentre outros, é um importante problema de saúde, e as opções de tratamento incluem o transplante (humano ou xenotransplante), a reparação cirúrgica, próteses artificiais, dispositivos mecânicos, e em alguns casos, o tratamento farmacológico, no entanto, grandes danos a um tecido ou órgão não podem ser reparados e nem recuperados em longo prazo de uma maneira satisfatória por estes métodos (Persidis, 1999; Ikada, 2006). Nesse contexto, o uso de biomateriais, baseados nos conceitos de engenharia tecidual, pode ser uma alternativa para regeneração tecidual, uma vez que não é necessária a existência de um doador bem como, atualmente, várias pesquisas estão sendo realizadas para minimizar ao máximo a resposta imunológica ao biomaterial transplantado.

A medicina regenerativa ou engenharia tecidual consiste em um campo multidisciplinar de pesquisa e, se baseia no uso de biomateriais, fatores de crescimento e células-tronco com o intuito de substituir temporariamente ou regenerar tecidos e órgãos danificados (Langer & Vacanti, 1993; Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011). O desenvolvimento de biomateriais com propriedades biofísicas e bioquímicas desejadas pode orientar a regeneração de tecidos complexos a partir do uso células-tronco associadas à matriz de suporte (Cosson *et al.*, 2015).

Biomateriais são projetados com objetivo de exibir propriedades físico-químicas que lembram o ambiente natural das células, além disso, eles devem ser de fabricação simples e reprodutível, de preferência transparentes para permitir a visualização de imagens através da microscopia de luz; apresentarem propriedades estruturais e mecânicas controladas; permitir a modulariedade e adaptação as propriedades do tecido; e serem biodegradáveis (Cosson *et al.*, 2015).

O preparo das membranas de quitosana 1% e de quitosana-gelatina (3:1) através do método de evaporação completa do solvente é um método reprodutível e relativamente rápido, visto que as membranas ficam prontas em aproximadamente sete dias. A partir desse método foi possível obter membranas finas e transparentes, facilitando dessa maneira, a visualização das células aderidas e do processo de diferenciação, além disso, as membranas são maleáveis, tornando-as mais fácil de se adaptarem à estrutura física do tecido ou órgão alvo. Entretanto, após a retirada

da região transplantada em ratos, para análise da biocompatibilidade do material, observou que as membranas, inseridas retas no tecido subcutâneo, apresentavam-se dobradas sobre elas mesmas, provavelmente devido ao movimento natural da região com a movimentação dos ratos, sendo necessário, portanto, desenvolver alguma técnica que possa impedir que a membrana se dobre, e que ela apenas se adapte ao formato do tecido.

A modificação da quitosana, a partir da substituição da superfície funcional devido sua reticulação, pode alterar as propriedades mecânicas e biológicas dos mesmos (Gao, Lai e Leung, 2012), a partir desse pensamento, as membranas desenvolvidas pelo método de evaporação de solvente foram posteriormente reticuladas, objetivando desenvolver membranas que se adequassem melhor aos requisitos exigidos pela medicina regenerativa.

Fonte confiável de células para o reparo tecidual tem sido um dos principais desafios encontrados pela medicina regenerativa (Gimble & Guilak, 2003). As hASCs são uma promessa significativa para aplicações futuras na medicina regenerativa e tem atendido muitos requisitos necessários para seu uso na engenharia tecidual. hASCs estão disponíveis em grandes quantidades nos indivíduos, podendo ser obtidas a partir de fragmentos de tecido adiposo isolado a partir de lipoaspiração, essas células possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, capacidade de serem transplantadas de forma autóloga, e podem ser isolada e expandidas de maneira controlada e em grande escala (Gimble & Guilak, 2003; Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011; Garcia-Olmo *et al.*, 2009).

Antes do uso clínico das hASCs, alguns estudos são necessários para que seja demonstrada a segurança e eficácia dessas células em modelos animais, quer isoladamente ou em combinação com biomateriais (Gimble & Guilak, 2003). As hASCs foram utilizadas neste estudo para avaliar a biocompatibilidade das membranas de quitosana (1%) e quitosa-gelatina (3:1).

Para que fossem realizados os testes utilizando as hASCs, foi necessário realizar a caracterização das mesmas. A caracterização das hASC é importante para sua utilização na terapia celular e engenharia tecidual de forma segura e reprodutível (Lindroos, Suuronen e Miettinen, 2011). A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) estabeleceu critérios mínimos para definir células-tronco mesenquimais: quando cultivadas em superfície plásticas elas possuem capacidade

de aderência; expressam antígenos de superfície específicos; e tem potencial de diferenciação *in vitro* na presença de fatores de indução específicos (Dominici *et al.*, 2006; Gimble, Guilak e Bunnell, 2010; Casteilla *et al.*, 2011).

As células-tronco utilizadas em nosso estudo foram isoladas da fração estromal de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração de interesse estético, o isolamento e expansão das hASC em garrafas de cultivo, demonstraram células fibroblastóides. Quando mantidas em cultura padrão, as células se apresentavam aderentes à superfície plástica com morfologia fibroblastóide. A caracterização das hASC foi realizada utilizando citômetro de fluxo, é importante a realização da análise fenotípica das células para comprovar a pureza da população celular a ser trabalhada. Nossos resultados demonstraram que as hASC isoladas e cultivadas apresentavam a expressão de marcadores de superfície celular específicos para MSC, CD73, CD90, CD166 e CD105 e ausência de expressão de CD19 e CD45 presentes na superfície de células hematopoiéticas.

Quando submetidas ao cultivo com meios de cultura indutores de diferenciação específicos, as hASC foram capazes de se diferenciarem em linhagens adipogênicas e osteogênicas. Todas essas características encontradas nas células utilizadas em nossos estudos apresentam os critérios mínimos definidos pela ISCT para definição de células-tronco mesenquimais, com isso podemos afirmar que as células isoladas são células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

A construção de um biomaterial de sucesso para utilização na engenharia de tecidos depende do objetivo que se deseja alcançar, com isso, a seleção de um biomaterial deve levar em consideração a adesividade celular ou a capacidade de conferir biofuncionalidade ao material, a fim de induzir uma resposta particular na regeneração tecidual (Marklein e Burdick, 2010). A adesão celular pode ser desejável ou não, dependendo de qual seja o objetivo a ser alcançado, atualmente existem várias técnicas que controlam a aderência celular em biomateriais e diversos estudos têm sido realizados para criar matrizes de suporte que promovam a adesão celular (Halberstadt *et al.*, 2002; Marklein e Burdick, 2010).

O objetivo do nosso trabalho, foi desenvolver membranas à base de quitosana que promovesse a adesão de hASC, no início dos estudos, com a produção de membranas apenas de quitosana com posterior adição de insulina e/ou TPP, nosso objetivo não foi alcançado, hASC foram cultivadas nas membranas e

apenas raras células se aderiram ao biomaterial, as células se atraíram e formaram agregados celulares denominados esferóides. Além disso, a avaliação da viabilidade celular nas membranas de quitosana pura, quitosana com insulina, quitosana com TPP e quitosana com TPP e insulina, demonstraram uma diminuição no valor da absorção, chegando a zero em 72 horas, porém, não pode-se afirmar que houve perda da viabilidade dessas células, pois como elas não estavam aderidas aos biomateriais, elas podem ter sido descartadas junto com o meio de cultivo, que é totalmente retirado dos poços para que seja adicionado o reagente MTT. Então, para comprovar a viabilidade dessas células, novos estudos deveriam ser realizados.

Hoje em dia, agregados celulares, incluindo os esferóides e camadas de células têm atraído cada vez mais a atenção de pesquisadores, pois eles são livres de biomateriais exógenos que podem de certa forma causar reação nociva sobre o transplante de células (Cheng, Wang e Young, 2012).

Chen *et al.* cultivaram hASC em finas membranas de quitosana e obtiveram resultados semelhantes ao encontrado nas membranas de quitosana (1%) produzidas inicialmente no presente trabalho, eles observaram a formação de esferóides com poucas células aderidas. Porém eles analisaram as características das células que formavam os esferóides, demonstrando que as hASCs presentes nos agregados se apresentavam mais viáveis do que células cultivadas em monocamadas, hASC em esferóides foram mais eficientes na capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica após adição de meio de indução do que as cultivadas em monocamadas, além de produzir mais moléculas da MEC (Cheng, Wang e Young, 2012).

Objetivando obter membranas adequadas para a utilização na regeneração tecidual, a associação da quitosana com outros compostos são comumente empregadas, para permitir e melhorar a adesão e proliferação celular (Cheng, Wang e Young, 2012; Whu *et al.*, 2013). A combinação de quitosana com gelatina na produção de membranas é importante para melhorar as propriedades mecânicas do biomaterial bem como a adesão celular ao biomaterial (Cheng, Wang e Young, 2012; Whu *et al.*, 2013).

A adição de pequenas quantidades de gelatina aos biomateriais é capaz de promover melhora significativa na adesão de hASC à matriz de suporte (Cheng, Wang e Young, 2012). Nagahama e colaboradores demonstraram que osteoblastos cultivados em membranas de quitosana e gelatina foram capazes de aderir ao

biomaterial, demonstrando a bioatividade dessas membranas e sua potencial aplicação na engenharia tecidual (Nagahama *et al.*, 2009).

No presente trabalho, o desenvolvimento de membranas de quitosana-gelatina (3:1) permitiram a adesão de hASC, que permaneceram com sua morfologia fibroblastóide preservada quando cultivadas nos diferentes biomateriais, mesmo as células cultivadas em membranas reticuladas com glutaraldeído 0,02%, que tiveram uma aderência menor e crescimento mais lento, alcançando a confluência mais tardiamente, quando comparado as membranas não reticuladas e reticuladas com TPP 0,1% e 1%, que apresentaram densidade de adesão e proliferação semelhantes, demonstrando dessa maneira que, as membranas em questão, alcançaram um perfil de adesão celular favorável para o seu uso na engenharia tecidual.

O fato do perfil de adesão das hASC aos biomateriais de quitosana 1% ter sido diferente daqueles produzidos pelas membranas de quitosana:gelatina (3:1), confirma que a adição de gelatina na composição de biomateriais facilita o crescimento e adesão celular, permitindo a produção de um biomaterial com ótimas propriedades para o uso na engenharia tecidual. A gelatina serve como um substrato para adesão, diferenciação e proliferação celular, enquanto a quitosana exibe várias atividades biológicas devido sua estrutura possuir características similares aos glicosaminoglicanos (Thein-Han *et al.*, 2009)

O perfil de adesão celular nas membranas sem reticular corrobora com os encontrados por Zhang e colaboradores, em que hASC cultivadas em membranas de quitosana-gelatina (3:1) aderiram e proliferam bem, alcançando 100% de confluência após 5 dias de cultivo (Zhang *et al.*, 2006).

Foi possível observar a partir da microscopia eletrônica de varredura a presença de várias moléculas na superfície das células e de prolongamentos citoplasmáticos que promovem a adesão celular. As células-tronco podem interagir com biomateriais a partir de receptores de superfície, tais como as integrinas e moléculas de adesão celular (Marklein e Burdick, 2010).

Para avaliar a citotoxicidade de vários biomateriais aplicados na engenharia de tecidos, é utilizado o ensaio de MTT, e o valor da absorbância pode fornecer indícios de proliferação celular (Shafiee *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Hajiabbas *et al.*, 2015). Kim *et al.* demonstraram que fibroblastos cultivados em membranas de quitosana e gelatina sem reticular e reticuladas com proantocianidina demonstraram

um aumento da adesão e proliferação, enquanto que membranas reticuladas com glutaraldeído promoveram uma diminuição na adesão e proliferação dos fibroblastos em cultivo, demonstrando que proantocianidina, diferente do glutaraldeído, não foi tóxico (Kim *et al.*, 2005).

No entanto, podemos demonstrar, que apesar da menor taxa de proliferação celular, as hASC cultivadas em membranas reticuladas com glutaraldeído 0,02%, foram capazes de aderir e se proliferar, mantendo-se viáveis no decorrer do tempo avaliado, demonstrando que neste caso o glutaraldeído não é tóxico. O fato de a proliferação celular ter sido menor para o glutaraldeído quando comparado às membranas não reticuladas ou reticuladas com TPP 0,1% e 1%, pode ser devido ao tempo maior que as células levam para se aderir, e não por que o glutaraldeído tem efeito tóxico sobre as células.

Os resultados dos ensaios de adesão, viabilidade e proliferação celular demonstraram que as membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não, produzidas no presente trabalho, podem ser fontes de biomaterial adequado, com boa adesão celular e propriedades de proliferação que permitem a sobrevivência e manutenção de hASC, porém, para que se usa com maior segurança, mais teste devem ser realizados.

Zhang *et al.* demonstraram em seu estudo, que hASC cultivadas em membranas de Quitosana e Gelatina eram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos quando cultivadas com meio indutor (Zhang *et al.*, 2006), nós demonstramos que não apenas hASC cultivadas em membranas sem reticular, como também as semeadas em membranas reticuladas com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% e TPP 1%, preservavam sua capacidade de diferenciar em células das linhagens adipogênicas e osteogênicas após cultivadas com meios de diferenciação específico. Como o objetivo desses materiais, é seu possível uso na medicina regenerativa, pode-se sugerir uma futura aplicação terapêutica na reconstituição de tecido mole e no reparo ósseo.

A combinação de hASC com um biomaterial adequado, pode beneficiar pacientes com número reduzidos de precursores osteoblástico ativos, com osteoporose, bem como acelerar o reparo de fraturas em pacientes idosos submetidos a procedimentos ortopédicos (Gimble e Guilak, 2003).

Existe necessidade do desenvolvimento de técnicas para tratamento de pacientes com lesões nos tecidos moles, as quais são extensos espaços vazios no

interior do tecido adiposo subcutâneo, podendo ser causada por lesão traumática, ressecção oncológica ou cicatrizes (Handel, Hammer e Hoefler, 2012), para que a associação de células-tronco com biomateriais seja bem sucedida é preciso uma fonte ideal de células, adesão e viabilidade celular, rápida vascularização do transplante, crescimento do tecido e todo o local do implante e no caso de regeneração de tecido mole, o potencial de diferenciação na linhagem adipogênica (Halberstadt *et al.*, 2002; Gimble e Guilak, 2003).

A biocompatibilidade de um biomaterial pode ter grande impacto a curto e longo prazo na engenharia de tecidos, pois para ser utilizado na área biomédica, um polímero não deve produzir uma reação adversa, além de ter a habilidade de desencadear em um organismo resposta apropriada para uma aplicação específica (Brito *et al.*, 2009).

Após a implantação de biomateriais, ocorrem reações como lesão, interações material-sangue, formação de uma matriz provisória, inflamação aguda e crônica, desenvolvimento de tecido de granulação, reação de corpo estranho e formação de cápsula fibrosa (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008)

A indução de uma pequena resposta inflamatória e formação de cápsula fibrótica mínima são necessárias para o sucesso do biomaterial na engenharia tecidual (Halberstadt *et al.*, 2002).

Neste trabalho foi avaliada a implantação de membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não na região subcutânea de ratos, o qual desencadeou uma resposta inflamatória caracterizada como reação de corpo estranho. Após dois dias da implantação dos biomateriais, foi observada uma inflamação aguda, com abundante presença de células inflamatórias, porém com o passar do tempo houve uma diminuição da reação tecidual, progredindo para uma inflamação crônica, com formação de cápsula fibrosa em torno do biomaterial, sendo observada a presença de células mononucleares e células gigantes próximas às membranas. Brito *et al.* encontraram resultados semelhantes aos nossos quando testaram o implante subcutâneo de membranas de quitosana (Brito *et al.*, 2009). No entanto, em nosso estudo, observamos que ocorreu quadro de hemorragias nos animais implantados com membranas de quitosana-gelatina reticulados com TPP, e a hemorragia foi maior, quanto maior a concentração do TPP, esse quadro pode representar um risco para o sucesso do implantes deste material.

A presença de células gigantes é característica de resposta do organismo à introdução de material estranho, uma vez que essas células são capazes de envolver e fagocitar pequenas partículas que não pertencem ao organismo receptor (Brito *et al.*, 2009).

Sabe-se que macrófagos exercem papel fundamental, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e também enzimas proteolíticas, como metaloproteínases, responsáveis por degradar o material. Além disso, os macrófagos ativados se fundem formando células gigantes multinucleadas, que contribuem para manutenção do ambiente pró-inflamatório bem como fagocitam as partículas de biomaterial degradado (Anderson, Rodriguez e Chang, 2008; Van Putten *et al.*, 2013).

Após 4 semanas do implante subcutâneo do biomaterial, Kim e colaboradores observaram completa degradação dos filmes de quitosana e gelatina, e pouca degradação do filme reticulado com proantocianidina (Kim *et al.*, 2005). O que não está de acordo com o encontrado em nosso estudo, que após quatro semanas do implante as membranas continuavam presentes no tecido subcutâneo, não sendo, portanto totalmente degradadas.

A adesão celular é um parâmetro importante na engenharia tecidual. Os biomateriais, por terem suas propriedades de superfície (composição química, topografia, rugosidade, energia de superfície) possuem a chave para o controle da adesão, proliferação e orientação das células em cultivo, assim o conceito de biocompatibilidade deve ser também focado nas características de interação entre a célula e o biomaterial, dessa maneira, a matriz de suporte deve conter características morfológicas importantes (Lofti, 2013).

A caracterização das membranas pelo MEV demonstrou que mesmo após a reticulação das membranas de quitosana-gelatina (3:1), não houve diferença significativa na microestrutura das membranas, que se apresentaram com uma superfície plana e lisa, sem a presença de poros, sendo, portanto, caracterizadas como membranas densas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Marreco *et al.* e Wrobel *et al.*, bem como com os encontrados no trabalho de Fidèles 2010, que mesmo após reticulação, as membranas de quitosana continuaram apresentando superfície lisa e densa (Marreco *et al.*, 2004; Fidèles, 2010; Wrobel *et al.*, 2014)

Sabe-se que as propriedades de superfície de materiais, tais como a sua estrutura química, são essenciais para a adesão e proliferação de células e, a superfície lisa e densa encontrada nas membranas de quitosana-gelatina (3:1), não mostraram propriedades negativas que limitariam o seu uso na engenharia tecidual.

A rugosidade da superfície de biomateriais tem sido alvo de muitos estudos, sendo um fator decisivo no processo de adesão celular a matriz de suporte, estudos demonstraram que fibroblastos aderem a superfície de biomateriais de titânio através de finos prolongamentos citoplasmáticos, apresentando forma achatada e se espalhavam sobre a superfície de biomateriais lisos, no entanto, em superfícies ásperas, rugosas a morfologia das células foi afetada pelas ranhuras da superfície, além disso, os fibroblastos apresentaram maior proliferação e adesão quando cultivados em superfícies lisas (Lofti, 2013). Células epiteliais demonstram melhor adesão em biomateriais que possuem superfície lisa e plana do que quando são cultivadas em superfícies rugosas (Räisänen *et al.*, 2000).

Os resultados de FTIR para as membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas ou não, com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% e TPP 1% são compatíveis com os encontrados em vários estudos utilizando esse tipo de biomaterial (Thein-Han *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2011; Baldino *et al.*, 2015). Foram encontrados picos característicos da quitosana e da gelatina em todos os espectros, a ausência do pico referente ao  $\text{NH}_3$ , que aparece  $\sim 154 \text{ cm}^{-1}$ , pode ser devido provavelmente a interação entre o grupo  $\text{NH}_3$  da quitosana e o  $-\text{COO}-$  do ácido acético, e o não aparecimento do pico  $1706 \text{ cm}^{-1}$ , é provavelmente devido a ausência de ácido acético livre, demonstrando dessa maneira que todo o solvente foi evaporado no processamento das membranas (Osman, 2003; Fernandes *et al.*, 2011).

Em espectros de membranas compostas por quitosana e TPP aparece uma nova banda entre  $1215 \text{ cm}^{-1}$  e  $1223 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde ao alongamento de  $\text{P}=\text{O}$  nos íons fosfato, bem como ocorre o aparecimento de um pico em  $1630 \text{ cm}^{-1}$ , picos  $890 \text{ cm}^{-1}$  e  $1240 \text{ cm}^{-1}$  são característicos de poli-íons  $\text{P}-\text{OH}$  e  $\text{P}=\text{O}$  (Wu *et al.*, 2005; Piérog, Gierszewska e Drużyńska, 2010; Yu *et al.*, 2013). Porém em nossos resultados não conseguimos observar a presença exata desses picos, que podem estar mascarados por picos semelhantes presentes na quitosana e/ ou na gelatina, o que torna difícil uma caracterização detalhada das membranas (Poon, Wilson e Headley, 2014).

Ao analisar os espectros, observamos a presença do pico  $1592\text{ cm}^{-1}$  apenas nas membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com glutaraldeído 0,02%, a presença de um pico em torno de  $1590\text{ cm}^{-1}$  corresponde a formação de imina (C=N), estrutura presente na base de Schiff's formada na reação dos grupos aminos da Quitosana e aldeído do glutaraldeído (Baldino *et al.*, 2015). Demonstrando dessa forma que ocorreu a reticulação das membranas de quitosana-gelatina pelo glutaraldeído.

Um biomaterial adequado para regeneração tecidual deve conter elevado teor de água para fornecer um espaço para crescimento celular, difusão de nutrientes e secreção de matriz (Whu *et al.*, 2013). Foi relatado no estudo de Mao e colaboradores, uma relação de absorção de água muito mais baixa em matrizes de suportes 3D, porosas, de quitosana-gelatina reticuladas com glutaraldeído quando comparadas as não reticuladas (Mao *et al.*, 2003). Kim e colaboradores observaram que filmes de Quitosana e gelatina reticulados com glutaraldeído e proantocianidina tiveram intumescimento menor do que os filmes não reticulados, indicando que a capacidade de absorção de água foi afetada pela presença de reticulantes (Kim *et al.*, 2005)

No presente trabalho também foi possível observar que membranas de quitosana-gelatina (3:1) reticuladas com glutaraldeído 0,02%, apresentavam uma menor absorção de água em todos os tempos avaliadas, ao ser compara com as membranas não reticuladas, bem com membranas reticuladas com diferentes concentrações de TPP. Além disso as membranas reticuladas com as diferentes concentrações de TPP apresentaram absorção de água menor do que as não reticuladas, demonstrando dessa forma, que esse tipo de reticulação também afeta a capacidade de absorção de água pelas membranas.

Normalmente, é esperado que o biomaterial atue como um suporte temporário e, quando o novo tecido é formado, ele deve ser degradado, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de biomateriais que degradam ao longo de uma escala de tempo que corresponda a formação do tecido maduro funcional (Smith *et al.*, 2009; Marklein e Burdick, 2010). A degradação do biomaterial permite a infiltração de células e a síntese e distribuição de MEC e o perfil de degradação ideal é aquele em que ocorre diminuição das propriedades mecânicas do biomaterial a média que ocorre a síntese de MEC pelas células (Marklein e Burdick, 2010).

Enzimaticamente, a quitosana pode ser degradada por enzimas que são capazes de hidrolisar ligações glicosamina-glicosamina, glicosamina-Nacetilglicosamina e Nacetilglicosamina-Nacetilglicosamina (Dasha *et al.*, 2011). A quitosana é considerada biodegradável e em geral a lisozima é a principal responsável pela degradação da quitosana no corpo humano, a lisozima está presente em muitos tecidos sendo secretada através da lágrima, saliva, sangue e leite além de ser liberada e utilizada por células fagocíticas durante a resposta inflamatória a um corpo estranho (Pillai, Willi e Sharma, 2009).

A partir da avaliação da capacidade de degradação das diferentes membranas de quitosana-gelatina (3:1), sem reticular, reticuladas com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% e TPP 1 %, na presença de lisozima em concentrações fisiológicas, foi observado uma grande degradação das membranas nos primeiros sete dias, tanto em contato com lisozima, quanto em contato apenas com PBS, isso ocorreu, possivelmente, devido a perda de gelatina, que devido ao seu alto grau de hidrofiliabilidade, ela se dissolve facilmente em meio aquoso. Nossos resultados estão de acordo com os de Thein-Han e colaboradores, que ao comparar matrizes de suporte apenas de quitosana e de quitosana associada a gelatina, demonstraram que suportes de quitosana-gelatina degradaram drasticamente nos primeiros sete dias, o que não acontecer com os suportes apenas de quitosana, podendo dessa maneira concluir a perda da gelatina (Thein-Han *et al.*, 2009).

A degradação devido a presença da lisozima começou entre a quarta e oitava semana, já que na oitava semana houve perda significativa de massa das membranas tratadas com lisozima quando comparada com as tratadas apenas com PBS em todas as membranas de quitosana-gelatina (3:1) em estudo, isso ocorreu provavelmente porque a quitosana começou a sofrer degradação significativa pela lisozima a partir da quarta semana. Porém, foi possível observar que as membranas reticuladas com TPP e sem reticular tiveram uma redução de massa similar e significativamente maior do que aquelas reticuladas com glutaraldeído. Bem como observado no presente trabalho, Kim e colaboradores demonstraram que a reticulação com glutaraldeído reduziu significativamente a degradação dos filmes, ocorrendo menor taxa de degradação nos filmes de quitosana e gelatina não reticulados, provavelmente devido a reticulação poder restringir o acesso dos sítios digestivos ou obstruir a penetração de proteases (Kim *et al.*, 2005).

A quitosana é degradada principalmente pela lisozima, presente em vários fluidos corporais e tecidos humanos, e o inchaço, devido absorção de água e a degradação da quitosana envolve a protonação dos grupos amino e relaxamento mecânico das cadeias de quitosana, porém, devido a natureza hidrofílica da Quitosana a difusão de água nas matrizes de quitosana é mais rápida do que a degradação (Thein-Han *et al.*, 2009).

A reticulação tem propriedades de reduzir a degradação dos biomateriais (Kim *et al.*, 2005), porém, observamos que apenas a reticulação por glutaraldeído alterou a taxa de degradação das membranas não reticuladas, demonstrando dessa maneira uma maior eficiência da reticulação por glutaraldeído, quando comparada a do TPP em diferentes concentrações.

Para que biomateriais formulados a partir da associação de quitosana e gelatina sejam úteis na regeneração tecidual eles devem ser biocompatíveis e possuir propriedades mecânicas favoráveis, e a formulação de estruturas instáveis desses polímeros tem sido uma limitação para sua aplicação clínica, com isso, o desenvolvimento de métodos de reticulação tem sido realizada para tentar melhorar a estabilidade mecânica e estrutural dos biomateriais (Kim *et al.*, 2005). Propriedades mecânicas, como por exemplo, o módulo de elasticidade, podem provocar efeitos significativos no comportamento das células-tronco, além disso, os biomateriais devem fornecer propriedades mecânicas necessárias para oferecer temporariamente um suporte estrutural para que o novo tecido se forme (Smith *et al.*, 2009; Cosson *et al.*, 2015).

*In vitro*, as matrizes de suporte devem possuir resistência mecânica suficiente para resistir às pressões hidrostáticas e para manter os espaços necessários para o crescimento das células e da produção da matriz, já *in vivo* as propriedades mecânicas devem corresponder as do tecido em questão, de modo que a mobilização do sítio de lesão possa ser possível (Salgado, Coutinho e Reis, 2004).

A partir das análises dos ensaios mecânicos realizados em nosso trabalho, foi possível concluir que o processo de reticulação altera as propriedades mecânicas das membranas, demonstrando que a reticulação, em geral, promove um aumento na tensão máxima e na elasticidade, bem como a redução da deformação das membranas em estudo.

A engenharia tecidual tem mostrado grande potencial para enfrentar os problemas do transplante de órgãos, servindo como uma fonte potencialmente

inesgotável de tecidos e órgãos e evitando a necessidade de imunossupressão através da utilização de células autólogas (Katari, Peloso e Orlando, 2014).

O sucesso da engenharia tecidual depende de matrizes que suportem o volume do tecido a ser regenerado e interaja com moléculas de adesão específicas, com fatores de crescimento, guiando a migração celular, e estimulando sua expansão e diferenciação (Arosarena, 2005).

A busca de novas matrizes de suporte tem se tornado uma área de pesquisa ativa e em constante mudança, isso devido a grandes variações que podem ocorrer nas propriedades dos biomateriais, na taxa de degradação, absorção de água, no tipo celular utilizado, no tecido a ser regenerado (Arosarena, 2005).

A quitosana tem sido, atualmente, um dos polímeros mais estudados para produção de biomateriais, sendo um biopolímero extremamente versátil, biocompatível, hidrofílico, biodegradável, não imunogênico, similar aos glicosaminoglicanos da MEC, além de possuir grupamentos reativos que permitem interações com outras moléculas e com a superfície celular (Yuan *et al.*, 2004). Apesar das existências de grandes perspectivas no uso da quitosana como biomaterial para a engenharia tecidual, a transferência dos conhecimentos adquiridos para sua aplicação ainda é um grande desafio (Lieder *et al.*, 2013).

Utilizando a técnica de evaporação de solvente, foi possível obter uma fina membrana lisa, sem poros, capazes de proporcionar a adesão e proliferação celular, mesmo após a utilização dos reticulantes glutaraldeído e TPP. A reticulação com glutaraldeído foi mais eficiente do que a reticulação utilizando TPP, já que o glutaraldeído foi capaz de alterar significativamente as propriedades físicas e químicas das membranas, e apesar de ser considerado um composto tóxico, ele se mostrou com melhor biocompatibilidade ao ser comparado com as membranas reticuladas com TPP. Para confirmar o potencial dessas membranas na medicina regenerativa, é necessária a realização de outros estudos mais detalhados, além disso, é preciso uma pesquisa mais a fundo para determinar qual tipo de tecido e regeneração esse biomaterial seria eficaz.

## 7. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que membranas desenvolvidas a partir da combinação de quitosana (0,7%) e gelatina (0,7%) em uma proporção de 3:1 pelo método de evaporação de solvente reticuladas ou não com glutaraldeído 0,02%, TPP 0,1% ou TPP 1% apresentaram estrutura adequada para permitir a colonização celular e diferenciação em linhagens osteogênicas e condrogênicas, não se apresentando tóxicas para as hASCs. Pode-se considerar que as membranas de quitosana-gelatina (3:1) não reticuladas e reticuladas com glutaraldeído 0,02% são indutoras de pouca reação inflamatória, sendo, portanto, biocompatíveis *in vivo* podendo dessa maneira ser indicativo seu uso favorável como biomaterial, indicando também que apesar de estudos demonstrarem que o glutaraldeído é um reticulante tóxico, nas concentrações utilizadas em nosso trabalho, ele se demonstrou mais viável ao ser comparado com o TPP, considerado menos tóxico. Foi ainda possível observar que o glutaraldeído possui um efeito reticulante mais eficiente do que o TPP, sendo capaz de alterar características importantes das membranas, porém levando a uma menor adesão e proliferação celular. A combinação dessas metodologias serão úteis para viabilizar a utilização desses biomateriais na medicina regenerativa, bem como para o desenvolvimento de estudos futuros.

## 8. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, pode-se traçar algumas questões que precisam ainda ser investigadas:

- Inserir fatores de crescimento ou outras moléculas nas membranas com objetivo de funcionalizá-las e melhorar ainda mais a capacidade de adesão e proliferação celular
- Confirmar a viabilidade e avaliar a distribuição celular utilizando o ensaio de Calceína-AM
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e proliferação celular durante a diferenciação osteogênica e adipogênica
- Avaliar a atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica
- Avaliar a expressão de marcadores de células específicos durante a indução da diferenciação
- Avaliação de formação de tecido após implante subcutâneo a partir de membranas cultivadas com células previamente induzidas a diferenciação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBIBU, D. et al. Textile cell-free scaffolds for in situ tissue engineering applications. **J Mater Sci Mater Med**, v. 27, n. 3, p. 63, Mar 2016. ISSN 1573-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26800694> >.

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. **Stem Cells Dev**, v. 13, n. 4, p. 436-48, Aug 2004. ISSN 1547-3287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15345137> >.

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **Int J Biol Macromol**, v. 43, n. 5, p. 401-14, Dec 2008. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18838086> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162407> >.

ANDERSSON, H.; VAN DEN BERG, A. Microfabrication and microfluidics for tissue engineering: state of the art and future opportunities. **Lab Chip**, v. 4, n. 2, p. 98-103, Apr 2004. ISSN 1473-0197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15052347> >.

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

BALDINO, L. et al. Complete glutaraldehyde elimination during chitosan hydrogel drying by SC-CO<sub>2</sub> processing. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 103, p. 70-76, 2015.

BEPPU, M.; BABA, T.; KAMIZAWA, C. **Effect of organic solvents as gelating agents on performance of chitosan membranes for ultrafiltration**. Kobunshi Ronbunshu. 50: 35-40 p. 1993.

BEPPU, M. M. et al. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 301, p. 126-130, 2007.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 57, n. 1, p. 19-34, Jan 2004. ISSN 0939-6411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729078> >.

BEYER NARDI, N.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **Handb Exp Pharmacol**, n. 174, p. 249-82, 2006. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16370331> >.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. **AAPS PharmSciTech**, v. 7, n. 2, p. E50, 2006. ISSN 1530-9932. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16796367> >.

BIGI, A. et al. Biomimetic growth of hydroxyapatite on gelatin films doped with sodium polyacrylate. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 752-6, 2000. ISSN 1525-7797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11710207> >.

BOOS, A. M. et al. The potential role of telocytes in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Semin Cell Dev Biol**, Jan 2016. ISSN 1096-3634. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26805441> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641289> >.

BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S336-44, Feb 2010. ISSN 1097-6825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20061008> >.

BRITO, M. K. M. et al. Chitosan inclusions in the subcutaneous space of rats: clinic, histologic and morphometric evaluation. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 1, p. 35-40, 2009.

CALVO, P. et al. Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. **Pharm Res**, v. 14, n. 10, p. 1431-6, Oct 1997. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358557> >.

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Mol Med**, v. 7, n. 6, p. 259-64, Jun 2001. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378515> >.

CASTEILLA, L. et al. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. **World J Stem Cells**, v. 3, n. 4, p. 25-33, Apr 2011. ISSN 1948-0210. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607134> >.

CHAO, A. C. et al. Enzymatic grafting of carboxyl groups on to chitosan--to confer on chitosan the property of a cationic dye adsorbent. **Bioresour Technol**, v. 91, n. 2, p. 157-62, Jan 2004. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592745> >.

CHEN, M. C.; YEH, G. H. C.; CHIANG, B. H. **ANTIMICROBIAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF METHYLCELLULOSE AND CHITOSAN FILMS CONTAINING A PRESERVATIVE**. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 20, n. 5, p. 379-390, 1996

CHEN, X. G. et al. Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 21, p. 5915-8, Oct 2002. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358459> >.

CHENG, M. et al. Studies on nerve cell affinity of biodegradable modified chitosan films. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 14, n. 10, p. 1155-67, 2003. ISSN 0920-5063. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661885> >.

CHENG, N. C.; WANG, S.; YOUNG, T. H. The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities. **Biomaterials**, v. 33, n. 6, p. 1748-58, Feb 2012. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22153870> >.

COSSON, S. et al. Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine. **Stem Cells Transl Med**, v. 4, n. 2, p. 156-64, Feb 2015. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25575526> >.

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 2006. ISSN 0021-9533. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684817> >.

DASH, M. et al. Chitosan: A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DASHA, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 981-1014, 2011.

DE ASSIS GONSALVES, A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 3, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

DE COPPI, P. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 100-6, Jan 2007. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17206138> >.

DI MARTINO, A.; SITTINGER, M.; RISBUD, M. V. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 30, p. 5983-90, Oct 2005. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894370> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

DUREJA, H.; TIWARY, A. K.; GUPTA, S. Simulation of skin permeability in chitosan membranes. **Int J Pharm**, v. 213, n. 1-2, p. 193-8, Feb 2001. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165107> >.

**FERNANDES, L. L.** et al. **Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering.** **Polímeros**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2011.

FIDÉLES, T. B. **Filmes Reticulados de Quitosana para Aplicação como Biomaterial.** 2010. 72 Programa de pós-graduação em Ciência e engenharia de Materiais., Universidade Federal de Campina Grande

FISCHBACH, G. D.; FISCHBACH, R. L. Stem cells: science, policy, and ethics. **J Clin Invest**, v. 114, n. 10, p. 1364-70, Nov 2004. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545983> >.

GAO, W.; LAI, J. C.; LEUNG, S. W. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. **Front Physiol**, v. 3, p. 321, 2012. ISSN 1664-042X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934070> >.

GARCIA-OLMO, D. et al. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. **Int J Colorectal Dis**, v. 24, n. 1, p. 27-30, Jan 2009. ISSN 0179-1958. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18696086> >.

GEPSTEIN, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. **Circ Res**, v. 91, n. 10, p. 866-76, Nov 2002. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433831> >.

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v. 5, n. 5, p. 362-9, 2003. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14578098> >.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F.; BUNNELL, B. A. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. **Stem Cell Res Ther**, v. 1, n. 2, p. 19, 2010. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20587076> >.

GIRI, T. K. et al. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 439-449, 2012.

GREENWOOD, H. L. et al. Regenerative medicine and the developing world. **PLoS Med**, v. 3, n. 9, p. e381, Sep 2006. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968130> >.

GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1009-14, Feb 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834815> >.

HAJIABBAS, M. et al. Chitosan-gelatin sheets as scaffolds for muscle tissue engineering. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 43, n. 2, p. 124-32, Apr 2015. ISSN 2169-141X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195583> >.

HALBERSTADT, C. et al. A hydrogel material for plastic and reconstructive applications injected into the subcutaneous space of a sheep. **Tissue Eng**, v. 8, n. 2, p. 309-19, Apr 2002. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12031119> >.

HANDEL, M.; HAMMER, T. R.; HOEFER, D. Adipogenic differentiation of scaffold-bound human adipose tissue-derived stem cells (hASC) for soft tissue engineering. **Biomed Mater**, v. 7, n. 5, p. 054107, Oct 2012. ISSN 1748-605X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22972360> >.

HELMUS, M. N.; GIBBONS, D. F.; CEBON, D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. **Toxicol Pathol**, v. 36, n. 1, p. 70-80, Jan 2008. ISSN 1533-1601. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337223> >.

HIPP, J.; ATALA, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. **Stem Cell Rev**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2008. ISSN 1550-8943. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286392> >.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J R Soc Interface**, v. 3, n. 10, p. 589-601, Oct 2006. ISSN 1742-5689. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971328> >.

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

JAYAKUMAR, R. et al. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. **Biotechnol Adv**, v. 28, n. 1, p. 142-50, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19913083> >.

K, O. Z. A. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993–999, 2003.

KATARI, R. S.; PELOSO, A.; ORLANDO, G. Tissue engineering. **Adv Surg**, v. 48, p. 137-54, 2014. ISSN 0065-3411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25293612> >.

KHOR, H. L. et al. Preliminary study of a polycaprolactone membrane utilized as epidermal substrate. **J Mater Sci Mater Med**, v. 14, n. 2, p. 113-20, Feb 2003. ISSN 0957-4530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348482> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766037> >.

KIM, I. Y. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 1, p. 1-21, 2008 Jan-Feb 2008. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884325> >.

KIM, S. et al. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 75, n. 2, p. 442-50, Nov 2005. ISSN 1552-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16047322> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568970> >.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 2013. 928.

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

LIEDER, R. et al. Solution casting of chitosan membranes for in vitro evaluation of bioactivity. **Biol Proced Online**, v. 15, n. 1, p. 11, 2013. ISSN 1480-9222. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24192423> >.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Rev**, v. 7, n. 2, p. 269-91, Jun 2011. ISSN 1558-6804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20853072> >.

LOFTI, M. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. 2013. 586.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504529> >.

MARKLEIN, R. A.; BURDICK, J. A. Controlling stem cell fate with material design. **Adv Mater**, v. 22, n. 2, p. 175-89, Jan 2010. ISSN 1521-4095. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20217683> >.

MARRECO, P. R. et al. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 71, n. 2, p. 268-77, Nov 2004. ISSN 1552-4973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15455369> >.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **J. Chem. Educ.**, v. 67, n. 11, p. 938, 1990.

MIRONOV, V.; VISCONTI, R. P.; MARKWALD, R. R. What is regenerative medicine? Emergence of applied stem cell and developmental biology. **Expert Opin Biol Ther**, v. 4, n. 6, p. 773-81, Jun 2004. ISSN 1471-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174961> >.

MOREIRA, J. E.; DODANE, V.; REESE, T. S. Immunoelectronmicroscopy of soluble and membrane proteins with a sensitive postembedding method. **J Histochem Cytochem**, v. 46, n. 7, p. 847-54, Jul 1998. ISSN 0022-1554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632744> >.

MUZZARELLI, R. A. Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and

supercritical drying. **Mar Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1510-33, 2011. ISSN 1660-3397. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131955> >.

MUZZARELLI, R. A.; BARONTINI, G.; ROCCHETTI, R. Isolation of lysozyme on chitosan. **Biotechnol Bioeng**, v. 20, n. 1, p. 87-94, Jan 1978. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877> >.

NAGAHAMA, H. et al. Preparation, characterization, bioactive and cell attachment studies of alpha-chitin/gelatin composite membranes. **Int J Biol Macromol**, v. 44, n. 4, p. 333-7, May 2009. ISSN 1879-0003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428463> >.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 102, p. 47-90, 2006. ISSN 0724-6145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17089786> >.

OKAMOTO, R.; WATANABE, M. Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 7, p. 286-90, Jul 2003. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900215> >.

OSMAN, Z. A. K. FTIT studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993-999, 2003.

PACHECO, L.; GARCIA, V. D. **Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2008-2015)**. Registro Brasileiro de Transplantes - Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. 21: 88 p. 2015.

PILLAI, C. K. S.; WILLI, P.; SHARMA, P. C. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

PILLAI, O.; PANCHAGNULA, R. Polymers in drug delivery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 5, n. 4, p. 447-51, Aug 2001. ISSN 1367-5931. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470609> >.

PIÉROG, M.; GIERSZEWSKA, M. D.; DRUŻYŃSKA, J. THE EFFECT OF IONIC CROSSLINKING ON THERMAL PROPERTIES OF HYDROGEL CHITOSAN MEMBRANES. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 15, 2010.

POON, L.; WILSON, L. D.; HEADLEY, J. V. Chitosan-glutaraldehyde copolymers and their sorption properties. **Carbohydr Polym**, v. 109, p. 92-101, Aug 2014. ISSN 1879-1344. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24815406> >.

QIAN, Y. F. et al. Cross-linking of gelatin and chitosan complex nanofibers for tissue-engineering scaffolds. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 22, n. 8, p. 1099-1113, 2011. ISSN 1568-5624. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615315> >.

RICHARDSON, S. C.; KOLBE, H. V.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. **Int J Pharm**, v. 178, n. 2, p. 231-43, Feb 1999. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10205643> >.

RÄISÄNEN, L. et al. Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. **J Biomed Mater Res**, v. 49, n. 1, p. 79-87, Jan 2000. ISSN 0021-9304. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10559749> >.

SABATINI, F. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Lab Invest**, v. 85, n. 8, p. 962-71, Aug 2005. ISSN 0023-6837. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924148> >.

SALGADO, A. J.; COUTINHO, O. P.; REIS, R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromol Biosci**, v. 4, n. 8, p. 743-65, Aug 2004. ISSN 1616-5187. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15468269> >.

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 2011. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887742> >.

SHARMA, A.; MONDAL, K.; GUPTA, M. N. Some studies on characterization of threephase pationed chitosan. **Carbohydr. Pol**, v. 52, p. 433-438, 2002.

SMITH, I. O. et al. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, n. 2, p. 226-36, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 1939-0041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049793> >.

SUH, J. K.; MATTHEW, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2589-98, Dec 2000. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071608> >.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **J R Soc Interface**, v. 6 Suppl 3, p. S311-24, Jun 2009. ISSN 1742-5662. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324684> >.

THEIN-HAN, W. W. et al. Chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering: physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP-buffalo embryonic stem cells. **Acta Biomater**, v. 5, n. 9, p. 3453-66, Nov 2009. ISSN 1878-7568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460465> >.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, Nov 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556> >.

TOMA, J. G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 9, p. 778-84, Sep 2001. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11533656> >.

TRINDADE, M. C. et al. Intermittent hydrostatic pressure inhibits matrix metalloproteinase and pro-inflammatory mediator release from human osteoarthritic chondrocytes in vitro. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, n. 9, p. 729-35, Sep 2004. ISSN 1063-4584. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325639> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376130> >.

VIMAL, S. et al. Chitosan tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles: preparation, characterization and application for gene delivery in shrimp. **Acta Trop**, v. 128, n. 3, p. 486-93, Dec 2013. ISSN 1873-6254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23906611> >.

WANG, B. Y. et al. Electrospun polylactide/poly(ethylene glycol) hybrid fibrous scaffolds for tissue engineering. **J Biomed Mater Res A**, v. 100, n. 2, p. 441-9, Feb 2012. ISSN 1552-4965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22105865> >.

WANG, H. F., Y. E. YAN, Y. **Surface modification of chitosan membranes by alkane vapor plasma**. Journal of Material Chemistry. 11: 1374-1377 p. 2001.

WHU, S. W. et al. In vitro and in vivo evaluation of chitosan-gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 33, n. 5, p. 2855-63, Jul 2013. ISSN 1873-0191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23623106> >.

WROBEL, S. et al. In vitro evaluation of cell-seeded chitosan films for peripheral nerve tissue engineering. **Tissue Eng Part A**, v. 20, n. 17-18, p. 2339-49, Sep 2014. ISSN 1937-335X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24606318> >.

WU, Y. et al. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **Int J Pharm**, v. 295, n. 1-2, p. 235-45, May 2005. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848008> >.

YU, S. H. et al. Tripolyphosphate Cross-Linked Macromolecular Composites for the Growth of Shape- and Size-Controlled Apatites. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 27-40, 2013.

YUAN, Y. et al. The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4273-8, Aug 2004. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15046917> >.

ZHANG, L. et al. Compatibility of Chitosan-Gelatin Films with Adipose Tissue Derived Stromal Cells. **TSINGHUA SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 11, n. 4, p. 421-426, 2006.

ZONARI, A. A. C. **Utilização de polímero natural polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato para promover a vascularização e regeneração da pele a partir de princípios da engenharia de tecidos**. 2013. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-28, Apr 2001. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456> >.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Apresentação em Congresso

Apresentação de pôster no XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular & VIII International Symposium on Extracellular Matrix. 22 – 25/11/2015

**Nathália Alves Rodrigues Lima**, Joyce Esposito Souza, Alfredo Miranda de Goes. HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS CULTIVED IN CHITOSAN MATRIZ SUPPORT. 2015

### 10.2. Trabalho Premiado

Menção Honrosa na XXIV Semana de Iniciação Científica / PRPQ – UFM. 19 – 23/20/2015.

Joyce Esposito de Souza, **Nathália Alves Rodrigues Lima**, Thaís Malta Boscatti, Tadeu Henrique de Lima, Rodrigo Lambert Oréfice

### 10.3. Co-orientação concluída

Co-orientadora na banca de defesa da monografia de conclusão do Curso de Ciências biológicas da aluna Joyce Esposito de Souza. Produção e caracterização de biomateriais produzidos a partir de quitosana para aplicação na engenharia de tecidos. 09/12/2015

## 10.4. Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Utilização de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo na engenharia de tecidos

**Pesquisador:** Alfredo Miranda de Goes

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 21176413.9.0000.5149

**Instituição Proponente:** PRO REITORIA DE PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 501.189

**Data da Relatoria:** 18/12/2013

#### Apresentação do Projeto:

Dois dos principais obstáculos para a aplicação clínica dos produtos da engenharia de tecidos, especialmente no campo da medicina regenerativa óssea, refere-se à falta de vascularização que ocorre no interior do implante in vivo e ao uso do soro fetal bovino (SFB) comumente utilizado como suplemento dos meios de cultura celular. Uma estratégia promissora na tentativa de favorecer a vascularização no interior do implante seria a utilização de células endoteliais associadas à matrizes biológicas ou sintéticas.

Os objetivos desse estudo são estabelecer o cultivo de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASCs) em meio de cultura suplementado com soro alogênico humano (SH) ou plasma humano (PH) em substituição ao soro fetal bovino (SFB), promover o cultivo dessas células em diferentes biomateriais, e avaliar a capacidade de diferenciação endotelial ou osteogênica das referidas células na presença dos meios de cultura acrescidos dos fatores indutores endoteliais ou osteogênicos, respectivamente.

O soro e o plasma humanos que serão utilizados neste projeto serão cedidos pela pesquisadora Thaís Maria da Mata Martins (Projeto: Identificação e caracterização de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo e fibroblastos da pálpebra - Número CAAE: 02887512.6.0000.5149)- As hASCs serão cedidas pela pesquisadora Ana Cláudia Chagas de Paula (Projeto: Utilização de

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 501.189

células-tronco humanas do tecido adiposo cultivadas em matriz tridimensional de polihidroxibutirato para regeneração do tecido ósseo - Número CAAE: 11668613.7.0000.5149).

Serão 20 participantes (10 doadores de lipoaspirado e 10 doadores de sangue), terá financiamento próprio, não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco, e propõe dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário**

Estabelecer o cultivo de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASCs) em meio de cultura suplementado com soro alógeno humano (SH) ou plasma humano (PH) em substituição ao soro fetal bovino (SFB), assim como promover o cultivo dessas células em diferentes matrizes, biológicas ou sintéticas e, avaliar a capacidade de diferenciação endotelial ou osteogênica dessas células.

**Objetivos secundários:**

1. Avaliar a viabilidade das hASCs cultivadas em diferentes matrizes, biológicas ou sintéticas; 2. Induzir a diferenciação endotelial das hASCs em meio suplementado com SH ou PH; 3. Induzir a diferenciação osteogênica das hASCs em meio suplementado com SH ou PH; 4. Avaliar a capacidade de diferenciação endotelial das hASCs; 5. Avaliar a capacidade de diferenciação osteogênica das hASCs

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A condução dos experimentos planejados neste projeto prevê riscos mínimos para a saúde dos manipuladores, já que está de acordo com as normas de biossegurança e será rigorosamente controlada. Não existem riscos associados aos procedimentos adotados neste estudo com o uso do material de origem humana, porque estes serão obtidos de pesquisadores que já tiveram os seus projetos previamente aprovados no Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Benefícios:**

O estudo poderá contribuir para o aprimoramento dos meios de cultura celular utilizados para a expansão de células potencialmente interessantes para posterior uso clínico e na minimização do uso de elementos de origem animal no cultivo de células importantes para terapia celular humana. Ainda, poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias que favoreçam a vascularização no interior do produto da engenharia de tecidos, principalmente no campo da regeneração óssea.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad SI 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 501.189

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é exequível e tem relevância científica. Permitirá o aprimoramento dos meios de cultura celular para posterior uso clínico. Ainda, permitirá o estabelecimento de estratégias que favoreçam a vascularização no interior do produto da engenharia de tecidos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

Folha de Rosto adequada

Parecer consubstanciado da Câmara Departamental e Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e UFMG - adequado

Projeto de pesquisa completo

Termo de doação de plasma e soro do projeto e Identificação e caracterização de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo e fibroblastos da pálpebra - Número CAAE: 02887512.6.0000.5149

Termo de doação de lipoaspirado do projeto e Utilização de células-tronco humanas do tecido adiposo cultivadas em matriz tridimensional de polihidroxibutirato para regeneração do tecido ósseo - Número CAAE: 11668613.7.0000.5149

**Recomendações:**

Diante do exposto, s.m.j., sou pela aprovação do projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. SI 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 501.189

BELO HORIZONTE, 19 de Dezembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Maria Teresa Marques Amaral**  
**(Coordenador)**

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br