



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**“CARACTERIZAÇÃO DE SCAFFOLDS A BASE DE
COLÁGENO TIPO I ANIÔNICO VISANDO TRATAMENTO
DE LESÕES NA PELE”**

Jessica Valéria de Campos

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis

Coorientador:

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciatori

Bolsista (CAPES) – 88882.426503/2019-01

**São Carlos – SP
2022**

JESSICA VALÉRIA DE CAMPOS

“CARACTERIZAÇÃO DE *SCAFFOLDS* A BASE DE COLÁGENO
TIPO I ANIÔNICO VISANDO TRATAMENTO DE LESÕES
NA PELE”

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis

Coorientador:

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciatori

São Carlos

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Jessica Valéria de Campos, realizada em 22/02/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Aparecido Chinelatto (USP)

Prof. Dr. André Vessoni Alexandrino (UNICEP)

Profa. Dra. Carolina Caliani Oliveira (InSitu)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar fé e força para continuar meu trabalho nos momentos difíceis.

À minha família, principalmente aos meus pais, por todo amor e paciência. Por serem meu modelo e meu alicerce na vida.

Ao meu orientador Odílio Benedito Garrido de Assis, pela grande atenção e contribuição para a realização deste trabalho. Pela amizade, ensinamentos e conselhos que nunca serão esquecidos, e sempre me guiarão nos próximos desafios que enfrentarei.

Ao professor Dr. Cláudio Alberto Torres Suazo (*In memoriam*), que iniciou a orientação deste trabalho e delineou os objetivos a serem alcançados. Pela amizade e conhecimento compartilhados no início de meu doutorado.

À professora Dra. Fernanda Perpétua Casciatori, por ter assumido, na ausência do Prof. Cláudio, a coorientação deste trabalho e pelo apoio e ensinamentos oferecidos.

Às técnicas de laboratório Joana Dias Bresolin, Viviane Faria Soares e Adriana Thomazi pela imensa atenção e paciência, pelos ensinamentos e colaboração para desenvolvimento do trabalho.

Às minhas amigas de laboratório Juliana de Sá da Silva e Liseth Viviana González Gil, Genoveva Flores Nuna e Patrícia Brassolatti por toda ajuda e atenção no desenvolvimento dos experimentos de cultivo celular.

À professora Dra. Fernanda Aníbal por disponibilizar a estrutura de seu laboratório quando necessitei. E por todo ensinamento e conhecimento compartilhado.

À empresa Jhaady Industria, Comércio, Importação e Exportação, Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, pela produção e fornecimento dos *scaffolds* de colágeno.

Às amigas de pós-graduação Camila Pereira Sabadini e Bianca Cruz Pachane, e às Professoras Heloisa Sobeiro Selistre de Araujo e Gerson Jhonatan Rodrigues pelo auxílio fornecido e por cederem gentilmente insumos fundamentais para a conclusão do trabalho.

Ao Laboratório de Biofotônica do Grupo de Óptica do IFSC (USP) e ao Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina - USP) por fornecerem gentilmente as linhagens celulares.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dispensado na leitura deste trabalho, contribuindo com melhorias para finalização do mesmo.

Agradeço à EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Instrumentação pela infraestrutura disponibilizada.

E a todos que contribuíram com meu trabalho, meus sinceros agradecimentos!

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

PORTARIA Nº 206, DE 4 DE SETEMBRO DE 2018

CONSIDERANDO o constante dos autos do processo nº 23038.013648/2018-51, resolve:

Art. 1º Os trabalhos produzidos ou publicados, em qualquer mídia, que decorram de atividades financiadas, integral ou parcialmente, pela CAPES, deverão, obrigatoriamente, fazer referência ao apoio recebido.

Art. 2º Para fins de identificação da fonte de financiamento fica autorizada a utilização do código 001 para todos os financiamentos recebidos.

Art. 3º Deverão ser usadas as seguintes expressões,
"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

De Campos, Jessica Valéria. **Caracterização de scaffolds a base de colágeno tipo I aniônico visando tratamento de lesões na pele.** 2022. Tese de doutorado (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2022.

RESUMO

Lesões na pele podem atingir diferentes intensidades do tecido, sendo as mais profundas aquelas que atingem todas as camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme), prejudicando o processo de autocura do tecido. Para essas, torna-se imprescindível o uso de curativos que auxiliam a cicatrização da região. A necessidade de curativos que simulem o ambiente tecidual da pele tem impulsionado estudos, sendo uma das principais áreas associadas à engenharia de tecidos, com o desenvolvimento crescente do uso de biomateriais para confecção de estruturas conhecidas como *scaffolds*. O colágeno tipo I, em razão das excelentes propriedades biológicas como biocompatibilidade, biodegradabilidade e afinidade celular, tem sido amplamente empregado no processamento de *scaffolds* para diversas aplicações, e principalmente para a regeneração da pele. No presente trabalho, os *scaffolds* foram confeccionados em parceria com a empresa Jhaady Indústria e Comércio (São Carlos, SP) empregando colágeno tipo I extraído de serosa suína, por quatro tempos de extração (24, 48, 72 e 96 horas) pelo método de hidrólise seletiva, e utilizando três meios de solubilização (tampão fosfato-salino 10 vezes concentrado, solução fosfato 1 vez concentrado e ácido acético), seguido por liofilização, originando oito diferentes tipos de *scaffolds* nomeados como S24hPB, S24hPBf, S48hPB, S48hPBf, S72hf, S72hAc, S96hf e S96hAc, assinalados de acordo com o tempo de extração e solução de solubilização utilizada. As avaliações físico-químicas dos *scaffolds* e de amostras de produto comercial Chondro-Gide (Geistlich Pharma, Suíça), forneceram dados de microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilitando investigar a estrutura com respeito a presença, distribuição e tamanho dos poros, bem como a porosidade, além da temperatura necessária para desnaturação (Td) do colágeno por meio de calorimetria exploratória diferencial (DSC), de análises de capacidade de hidratação e hidrofilição pela medida de ângulos de contato. A parte biológica, referente aos estudos de cultivos *in vitro*, consistiu primeiramente em analisar os oito *scaffolds* produzidos para este trabalho, através da inoculação de 1×10^6 células estromais mesenquimais TERT (hCEMs-TERT) e cultivos durante 8, 12, 72, 168 e 336 horas, seguidos de análises de contagem de células por hemocitômetro, de nutrientes (glicose e lactato) e da estimativa de crescimento nos *scaffolds* por quantificação de nutrientes, que em conjunto permitiram indicar quatro *scaffolds* (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf) como os mais eficientes no cultivo celular realizado. Em seguida, essas amostras e a comercial (Chondro-Gide) foram testadas com queratinócitos e fibroblastos, permitindo observar a adesão e crescimento celular na superfície por análise em MEV, e a distribuição das células ao longo das matrizes de cada amostra por microscopia de fluorescência confocal. Além disso, os dados quantitativos de crescimento celular demonstraram que todas as amostras apresentam eficiência semelhante ou superiores, como S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf, na adesão e crescimento celular do que a Chondro-Gide. Dessa forma, nosso estudo apresenta materiais com características físico-químicas e biológicas adequadas para o crescimento celular e indicados para a utilização em engenharia de tecidos, em particular no tratamento de lesões de pele.

Palavras-chave: Queratinócitos, fibroblastos, células estromais mesenquimais, engenharia de tecidos, estrutura tridimensional.

De Campos, Jessica Valéria.. **Characterization of anionic type I collagen-based scaffolds for the treatment of skin lesions.** 2022. PhD Thesis (Biotechnology Post-graduation Program) – UFSCar, São Carlos, 2022.

ABSTRACT

Skin lesions can reach different intensities along the tissue, being the deepest those that affect all layers of the skin (epidermis, dermis and hypodermis), hampering the self-healing natural process. These make it essential use dressings to help the healing of the region. The need for dressings that simulate the tissue environment of the skin has driven studies in the field, being one of the main areas associated with tissue engineering, with a growing development in the use of biomaterials for making compatible structures such as the *scaffolds*. Type I collagen, due to its excellent biological properties such as biocompatibility, biodegradability and cell affinity, has been widely used in the processing of *scaffolds* for various applications, and mainly for skin regeneration. In the present work, the *scaffolds* were prepared in partnership with the company Jhaady Indústria e Comércio (São Carlos, SP) using type I collagen extracted from serous swine, in four extraction times (24, 48, 72 and 96 hours) by the method of selective hydrolysis, and using the casting technique in three different suspension medium (phosphate buffered saline 10 times concentrated, phosphate solution once concentrated and acetic acid), followed by lyophilization, giving rise to eight different types of *scaffolds* named S24hPB, S24hPBf, S48hPB, S48hPBf, S72hf, S72hAc, S96hf and S96hAc, according to the extraction time and suspension solution used. The physical-chemical evaluations of the scaffolds and samples of a commercial product Chondro-gide (Geistlich Pharma, Switzerland), provided data from scanning electron microscopy (SEM) making it possible to investigate the structure regarding the presence, distribution and size of pores, as well as porosity, in addition to the temperature required for denaturation (Td) of collagen by means of differential scanning calorimetry (DSC), in addition to analyzes of hydration capacity and hydrophilicity by contact angles measurements. The biological part, related to in vitro growing studies consisted in the inoculation of 1×10^6 mesenchymal stromal cells (MSCs) and cultures for 8, 12, 72 and 168 hours, associated with methods of analysis of cell counting by hemocytometer, analysis of nutrients (glucose and lactate) and scaffolds growth estimation by nutrient quantification, which together allowed us to selected four scaffolds (S48hPB, S48hPBf, S72hf and S96hf), as the most efficient in the cell culture growth. These scaffolds and the commercial sample (Chondro-Gide) were also tested with keratinocytes and fibroblasts, allowing observing cell adhesion and growth on the surface through SEM analysis, and the distribution of cells along the matrices of each sample by confocal fluorescence microscopy. In addition, quantitative cell growth data demonstrated that all samples show similar or higher efficiencies in cell adhesion and growth than Chondro-Gide, as samples S48hPB, S48hPBf, S72hf and S96hf. Thus, our study presents materials with physicochemical and biological characteristics suitable for cell growth and indicated for use in tissue engineering, in particular in the treatment of skin lesions.

Keywords: Keratinocytes, fibroblasts, mesenchymal stromal cells, tissue engineering, three-dimensional structure.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- Introdução

Capítulo 2 – Revisão da Literatura

Figura 2.1 Estrutura das camadas da pele humana.....	18
Figura 2.2 Representação do processo de cicatrização de lesões na pele, mostrando as células envolvidas em cada fase do processo.....	20
Figura 2.3. Representação esquemática da formação da fibra de colágeno e aminoácidos da cadeia alfa, glicina (GLY), prolina (PRO) e hidroxiprolina (HYP).....	27
Figura 2.4. Esquematização da hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos Asn e Gln do colágeno.....	28
Figura 2.5. Proliferação e diferenciação das células estromais mesenquimais (CEM)	31

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Figura 3.1. Representação da reação enzimática do método MTT.....	43
Figura 3.2. Resumo do procedimento genérico seguido na avaliação das características biológicas dos <i>scaffolds</i>	45

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Figura 4.1. Aparência geral de amostras cortadas dos <i>scaffolds</i> avaliados e nomenclatura de identificação.....	51
Figura 4.2. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i>	53
Figura 4.3. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das seções transversais dos <i>scaffolds</i>	54
Figura 4.4. Valores estimados dos tamanhos médios, máximos e mínimos dos poros de cada <i>scaffold</i>	56
Figura 4.5. Valores referentes à porosidade de cada <i>scaffold</i> segundo método de análise de imagens empregando o software Image J.....	57
Figura 4.6. Valores referentes à porosidade de cada <i>scaffold</i> pelo método de deslocamento de líquidos.....	58

Figura 4.7. Capacidade de hidratação avaliada para cada scaffold.....	60
Figura 4.8. Curva de DSC ilustrativa do padrão colágeno, com a identificação dos pontos de transição térmica.....	63
Figura 4.9. Valores de Td (início da temperatura de desnaturação) e de ΔH (entalpia de transformação) das amostras analisadas por DSC.....	64
Figura 4.10. Temperatura de desnaturação (Td) em função do tempo de hidrólise alcalina.....	65
Figura 4.11. Degradação dos <i>scaffolds</i> de colágeno ao longo de 2 horas de imersão das amostras em colagenase.....	67
Figura 4.12. Morfologia típica das células cultivadas em meio α -MEM suplementado: A. CEMs e B. Fibroblastos.....	69
Figura 4.13. Curvas de crescimento das células em meio α -MEM suplementado.....	69
Figura 4.14. Morfologia típica dos queratinócitos cultivados em meio RPMI-1640 suplementado.....	70
Figura 4.15. Curvas de crescimento dos queratinócitos em meio RPMI-1640 suplementado.....	71
Figura 4.16. Viabilidade celular dos <i>scaffolds</i> analisados pelo método MTT.....	73
Figura 4.17. Valores de atividade enzimática da LDH, indicando o tempo de morte celular das CEMs.....	75
Figura 4.18. Número de células em suspensão quantificadas por hemocítômetro nos tempos de 8 e 12 horas de cultivo.....	77
Figura 4.19. Desempenho dos <i>scaffolds</i> na adesão celular das CEMs durante as primeiras 12 horas de cultivo.....	78
Figura 4.20. Curvas das concentrações de glicose e lactato para o cultivo de CEMs nos <i>scaffolds</i> ao longo de 168 horas.....	80
Figura 4.21. Resultados dos experimentos realizados em placas de poliestireno de 24 poços tratadas para promover a adesão celular.....	82
Figura 4.22. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{cel/gli}$ utilizando dados das CEMs.....	83
Figura 4.23. Estimativas do crescimento celular nos <i>scaffolds</i>	85
Figura 4.24. Fator de expansão celular de cada <i>scaffold</i> analisado no tempo de 168 horas.....	86
Figura 4.25. Número de células viáveis e não viáveis presentes nas suspensões quantificadas por hemocítômetro no tempo de 12 horas de cultivo das CEMs.....	87

Figura 4.26. Desempenho dos <i>scaffolds</i> na adesão celular das CEMs.....	88
Figura 4.27. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo de CEMs nos <i>scaffolds</i> durante 336 horas.....	89
Figura 4.28. Resultados dos experimentos para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para CEMs.....	91
Figura 4.29. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{cel/gli}$ utilizando dados das CEMs.....	92
Figura 4.30. Estimativas do crescimento celular nos <i>scaffolds</i>	94
Figura 4.31. Fator de expansão celular de CEMs para cada <i>scaffold</i> analisado nos tempos de 168 e 336 horas.....	95
Figura 4.32. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x.....	97
Figura 4.33. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs. Obtidas no aumento de 250x.....	98
Figura 4.34. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs. Obtidas no aumento de 500x.....	99
Figura 4.35. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs.....	100
Figura 4.36. Imagens geradas por MEV das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs.....	101
Figura 4.37. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs por 168 hs. Obtidas no aumento de 100x.....	103
Figura 4.38. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs por 336 hs. Obtidas no aumento de 100x.....	104
Figura 4.39. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs por 168 hs. Obtidas no aumento de 250x.....	105
Figura 4.40. Números de células viáveis e não viáveis da suspensão quantificadas por hemocítmetro no tempo de 12 horas de cultivo de queratinócitos.....	106
Figura 4.41. Desempenho dos <i>scaffolds</i> na adesão celular de queratinócitos em cada experimento.....	107

Figura 4.42. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo com queratinócitos nos <i>scaffolds</i> ao longo de 336 horas.....	108
Figura 4.43. Resultados do experimento para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para queratinócitos.....	109
Figura 4.44. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{cel/gli}$ utilizando dados dos experimentos com queratinócitos.....	110
Figura 4.45. Estimativas do crescimento celular dos queratinócitos nos <i>scaffolds</i> ...	112
Figura 4.46. Fator de expansão celular de cada <i>scaffold</i> analisado nos tempos de 168 e 336 horas.....	113
Figura 4.47. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 100x.....	114
Figura 4.48. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 250x.....	115
Figura 4.49. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos ao longo de 168 horas.....	117
Figura 4.50. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos ao longo de 336 horas.....	118
Figura 4.51. Número de células viáveis e não viáveis da suspensão quantificadas por hemocítômetro no tempo de 12 horas de cultivo de fibroblastos.....	120
Figura 4.52. Desempenho dos <i>scaffolds</i> na adesão celular de fibroblastos em cada experimento.....	121
Figura 4.53. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo de fibroblastos ao longo do cultivo nos <i>scaffolds</i> durante 336 horas.....	122
Figura 4.54. Resultados do experimento para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para fibroblastos.....	123
Figura 4.55. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{cel/gli}$ utilizando dados do experimento com fibroblastos.....	124
Figura 4.56. Estimativas do crescimento celular dos fibroblastos nos <i>scaffolds</i>	126
Figura 4.57. Fator de expansão celular dos fibroblastos de cada <i>scaffold</i> analisado nos tempos de 168 e 336 horas.....	127

Figura 4.58. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos. Obtidas no aumento de 100x.....	128
Figura 4.59. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 250x.....	129
Figura 4.60. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos ao longo de 168 horas.....	130
Figura 4.61. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos ao longo de 336 horas.....	131
Figura 4.62. Imagens em MEV dos <i>scaffolds</i> em meio de cultura durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x.....	133
Figura 4.63. Imagens em MEV dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x.....	134
Figura 4.64. Imagem em MEV da Chondro-Gide. (A) Amostra em meio de cultura, (B) cultivada com queratinócitos durante 72 horas.....	135

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Tabela 3.1. Identificação dos <i>scaffolds</i> conforme o tempo de extração do colágeno e a solução de solubilização.....	36
Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura α -MEM e RPMI-1640.....	41
Tabela 3.3. Tempos de lavagem em PBS para cada scaffold.....	42

Capítulo 4 – Resultados e discussão

Tabela 4.1. Capacidade de hidratação (%) dos <i>scaffolds</i>	60
Tabela 4.2. Valores de ângulos de contato dos <i>scaffolds</i> em água.....	62
Tabela 4.3. Espessura dos <i>scaffolds</i>	68
Tabela 4.4. Viabilidade celular.....	73
Tabela 4.5. Relação de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) em 168 horas de cultivo.....	81
Tabela 4.6. Número de células totais nas suspensões de cada amostra.....	84
Tabela 4.7. Relação de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) em 72, 168 e 336 horas de cultivo.....	90
Tabela 4.8. Número de células totais nas suspensões de cada amostra.....	93
Tabela 4.9. Relação da produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) durante o cultivo de queratinócitos.....	109
Tabela 4.10. Número de células totais nas suspensões de cada amostra.....	110
Tabela 4.11. Relação da produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) durante o cultivo de fibroblastos.....	123
Tabela 4.12. Número de células totais nas suspensões de cada amostra.....	124
Tabela 4.13. Comparação do número de células aderidas (%) entre os <i>scaffolds</i> e Chondro-Gide.....	135
Tabela 4.14. Comparação das características físico-químicas dos <i>scaffolds</i> e Chondro-Gide.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEM	Célula Estromal Mesenquimal
CEM-TERT	Célula Estromal Mesenquimal humana - Transcriptase Reversa da Telomerase
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FE	Fator De Expansão De Células
HaCaT	Linhagem celular de queratinócitos humanos
HDFn	Linhagem de fibroblastos humanos
LDH	Lactato desidrogenase
MEC	Matriz Extracelular
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
PVA	Acetato de Polivinila
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
TD	Início da Temperatura de desnaturação
TERT	Transcriptase Reversa da Telomerase
TG	Temperatura de transição vítrea
TONSET	Início da Temperatura de desnaturação
YSI MBS	<i>Multiparameter Bionalytical System, Yellow Springs Instruments</i>
YCEL/GLI	Fator de rendimento células a partir do consumo de glicose
YLAC/GLI	Relações de produção de lactato e consumo de glicose
$Y_{x/s}$	Fator de rendimento de células a partir do consumo de nutrientes
ΔH	Entalpia de transformação
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máxima de crescimento

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução.....	16
Capítulo 2 – Revisão da Literatura.....	18
2.1 Pele.....	18
2.2 Lesões de pele e o processo de cicatrização.....	19
2.3 Curativos para lesões de pele.....	22
2.4 Engenharia de tecidos.....	23
2.4.1 <i>Scaffolds</i>	24
2.4.2 Biomateriais.....	25
2.4.3 Células na engenharia de tecidos de pele.....	28
2.4.3.1 Queratinócitos e Fibroblastos.....	28
2.4.3.2 Células estromais mesenquimais.....	30
2.5 Cultivo de células animais <i>in vitro</i>	32
2.6 Justificativa.....	34
2.7 Objetivos.....	35
2.7.1 Objetivos Gerais.....	35
2.7.2 Objetivos específicos.....	35
Capítulo 3 – Materiais e Métodos.....	36
3.1 <i>Scaffolds</i>	36
3.1.1 Produção de <i>scaffolds</i> de colágeno.....	36
3.1.2 Chondro-Gide.....	37
3.2 Caracterizações físico-químicas.....	37
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	37
3.2.2 Porosidade.....	37
3.2.3 Capacidade de hidratação (entumescimento).....	38
3.2.4 Ângulo de contato – Teste de molhabilidade.....	39
3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	39
3.2.6 Estabilidade biológica <i>in vitro</i> (colagenase).....	40
3.3 Etapa biológica.....	40
3.3.1 Procedimento para realização dos cultivos celulares.....	40
3.3.2 Linhagens celulares.....	40
3.3.3. Meio de Cultura.....	41
3.3.4. Alteração de pH e hidratação dos <i>scaffolds</i>	42
3.3.5 Ensaio de Citotoxicidade dos <i>Scaffolds</i>	42
3.3.6 Atividade metabólica.....	44
3.3.7 Ensaio de proliferação celular nos <i>scaffolds</i>	44
3.3.7.1 Células estromais mesenquimais-TERT (hCEMs-TERT).....	45
3.3.7.2 Queratinócitos e Fibroblastos.....	46
3.3.8 Quantificação da adesão celular.....	46
3.3.9 Métodos analíticos bioquímicos.....	47
3.3.9.1 Quantificação de glicose e lactato.....	47
3.3.9.2 Estimativa do número de células nos <i>scaffolds</i> a partir da quantificação de nutrientes.....	48
3.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos <i>scaffolds</i> com adesão celular.....	49
3.3.11 Microscopia de fluorescência confocal.....	50
3.4 Análise estatística.....	50
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....	51
4.1 Caracterizações físico-químicas.....	51
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.1.2 Medida de Porosidade.....	55

4.1.3	Capacidade de hidratação.....	58
4.1.5	Ângulo de contato (hidrofilicidade).....	61
4.1.5	Calorimetria Exploratória Diferencial.....	62
4.1.6	Estabilidade biológica do colágeno (Colagenase).....	66
4.2	Etapa biológica.....	68
4.2.1	Células em cultivo.....	68
4.2.2	Citotoxicidade.....	71
4.2.3	Atividade metabólica.....	74
4.2.4	Cultivo <i>in vitro</i> de CEMs nos <i>scaffolds</i>	76
4.2.4.1	Adesão celular.....	76
4.2.4.2	Quantificação de glicose e lactato.....	78
4.2.4.3	Estimativa do número de células aderidas aos <i>scaffolds</i> através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$).....	81
4.2.5	Réplica do cultivo <i>in vitro</i> de CEMs nos <i>scaffolds</i>	86
4.2.5.1	Adesão celular.....	86
4.2.5.2	Quantificação de glicose e lactato.....	88
4.2.5.3	Estimativa do número de células aderidas aos <i>scaffolds</i> através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$).....	90
4.2.5.4	Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> cultivados com CEMs.....	95
4.2.6	Cultivo <i>in vitro</i> de queratinócitos nos <i>scaffolds</i>	105
4.2.6.1	Adesão celular.....	106
4.2.6.2	Quantificação de glicose e lactato.....	108
4.2.6.3	Estimativa do número de células aderidas aos <i>scaffolds</i> através do consumo de glicose ($Y_{cel/gli}$).....	110
4.2.6.4	Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos.....	114
4.2.6.5	Microscopia de Fluorescência Confocal dos <i>scaffolds</i> cultivados com queratinócitos.....	116
4.2.7	Cultivo <i>in vitro</i> de fibroblastos nos <i>scaffolds</i>	120
4.2.7.1	Adesão celular.....	120
4.2.7.2	Quantificação de glicose e lactato.....	123
4.2.7.3	Estimativa do número de células aderidas aos <i>scaffolds</i> através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$).....	125
4.2.7.4	Microscopia eletrônica de varredura dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos.....	129
4.2.5.5	Microscopia de fluorescência confocal dos <i>scaffolds</i> cultivados com fibroblastos.....	131
4.2.8	Discussão Final.....	134
Capítulo 5 – Conclusões.....		139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		141

Capítulo 1 – Introdução

As lesões de pele ocorrem geralmente nas camadas mais superficiais do tecido, levando ao processo comum de cicatrização. Entretanto, quando as lesões acometem camadas mais profundas, o processo de cicatrização espontânea é comprometido, sendo também prejudicado por demais comorbidades presentes no paciente, como diabetes mellitus, obesidade, idade avançada, desnutrição, dentre outros, levando à formação de feridas crônicas (ENOCH; LEAPER, 2008). À medida que a sociedade global está envelhecendo e a incidência das doenças crônicas crescendo, é provável que a ocorrência dessas lesões crônicas se intensifique (NIU et al., 2018).

Estudos apontam que nos EUA cerca de 7 milhões de pacientes com lesões cutâneas crônicas e mais de 2 milhões com feridas por queimaduras apresentam um processo de cicatrização anormal, sendo necessários cuidados especiais constantes e por longos períodos (PARANI et al., 2016; SINNO; PRAKASH, 2013). Na Europa, os gastos com o tratamento de lesões consomem em torno de 2 a 4% do orçamento destinado à saúde (FAROKHI et al., 2018). Diante disso, o elevado custo financeiro somado ao dano à saúde da população têm estimulado estudos em busca por solucionar os problemas para esse tipo de lesão, levando ao desenvolvimento de curativos que sejam eficientes em reduzir e auxiliar o processo de cicatrização (MOSTAFALU, 2018).

Estudos têm demonstrado que curativos ideais à cicatrização da pele devem apresentar essencialmente biocompatibilidade ao tecido, boa porosidade e degradabilidade, além de fornecer um ambiente úmido na interface da ferida, remover exsudatos adicionais, permitir a troca de gases, dentre outros requisitos (KESSLER, GRANDE, 2008; HUTMACHER, WOODFIELD, LEWIS, 2008; WITZLER et al., 2019). No entanto, os curativos tradicionais disponíveis comercialmente não apresentam esse conjunto de propriedades mencionado, e aqueles que apresentam são de alto custo, dificultando seu uso pela população, principalmente através dos órgãos de saúde pública.

Neste contexto, a biotecnologia tem atuado de forma essencial através da Engenharia de Tecidos, baseada em conhecimentos nas áreas de engenharia de materiais, ciências biológicas e médicas, dentre outras, buscando por associar a confecção de estruturas tridimensionais semelhantes à matriz extracelular do tecido

e o crescimento *in vitro* de células (BELLINI, 2012; SILVA, 2008). Dessa forma, as matrizes tridimensionais, mais conhecidas por *scaffolds*, têm sido preferencialmente produzidas por polímeros naturais devido às suas propriedades físico-químicas, sendo o colágeno a proteína de maior interesse em razão de ser a principal proteína presente na pele e ao baixo custo de produção (PONTEL; BOABAID, 2019).

Neste cenário, este trabalho foi dedicado a avaliar *scaffolds* de colágeno tipo I aniônico e compará-los a uma amostra comercial (Chondro-Gide) quanto às suas propriedades físico-químicas e biológicas, com o objetivo de identificar os materiais com melhores porosidades, capacidades de hidratação, estabilidade térmica e estrutural diante à ação da colagenase, além de suas eficiências na promoção da adesão e proliferação de células estromais mesenquimais, queratinócitos e fibroblastos, tendo em vista a possibilidade do emprego clínico-regenerativo.

Capítulo 2 – Revisão da Literatura

2.1 Pele

A pele consiste no maior órgão do corpo humano, representando aproximadamente 16% da massa corporal. Revestindo toda a superfície do corpo, esse órgão age como uma barreira de proteção contra impactos mecânicos, desidratação, entrada de toxinas e microrganismos. A pele é formada por três camadas, epiderme, derme e hipoderme, que são detalhadas na Figura 2.1 (KORRAPATI et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; RAHMATI et al., 2020).

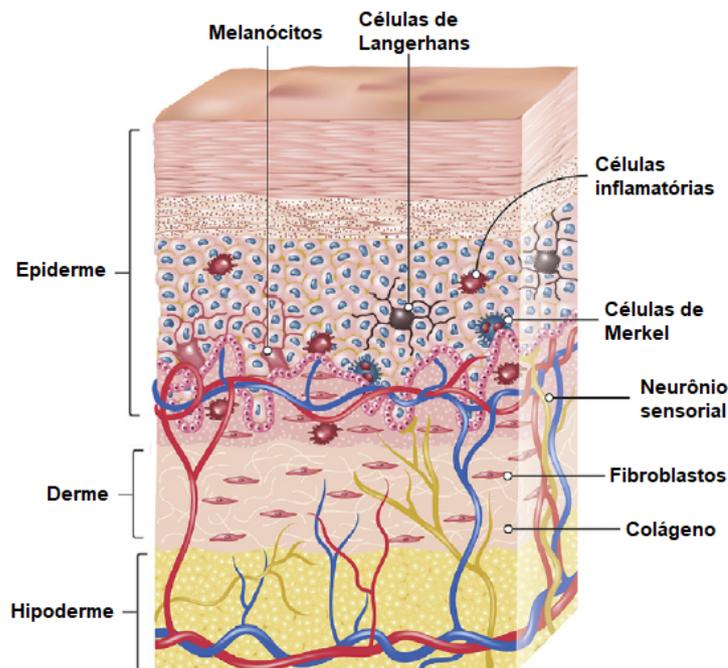


Figura 2.1 Estrutura das camadas da pele humana (fonte: adaptado de RAHMATI et al., 2020).

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo composta principalmente por queratinócitos, que apresentam forma cuboide e possuem um citoesqueleto repleto e disperso de filamentos de queratina (FUCHS, 1990). Além dessas, outras células estão presentes, como os melanócitos, que são células com produção de melanina; as células de Langerhans, com função imunológica; células de Merkel, com ação na percepção sensorial; dentre outras. A epiderme atua como uma barreira contra microrganismos e impactos externos, além de promover uma manutenção da hidratação (METCALFE; FERGUSON, 2007; PEREIRA et al., 2013).

Abaixo da epiderme está situada a derme, camada que contém matriz extracelular (MEC) vascularizada rica em colágeno, elastina e glicosaminoglicanos (GAGs). Os fibroblastos são os principais tipos celulares presentes, capazes de sintetizar componentes da MEC (Matriz Extracelular) importantes no processo de cicatrização de lesões (METCALFE, FERGUSON, 2007).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, composta basicamente por tecido adiposo vascularizado, e fornece funções de proteção mecânica e de termorregulação do corpo (METCALFE, FERGUSON, 2007; PEREIRA et al., 2013; RAHMATI et al., 2020).

2.2 Lesões de pele e o processo de cicatrização

Diversas razões podem ser a causa de lesões na pele, como queimaduras, traumas físicos ou químicos, infecções, doenças crônicas (úlceras diabéticas ou de pressão e estase venosa), dentre outras. Basicamente, as lesões cutâneas podem ser definidas como rupturas na estrutura dérmica (YILDIRIMER, THANH, SEIFALIAN, 2012), podendo ser classificadas como agudas ou crônicas, dependendo do tempo necessário para a sua completa cicatrização. Também podem ser categorizadas conforme a profundidade, sendo que lesões superficiais ou de primeiro grau atingem somente a epiderme, enquanto as lesões de espessura parcial ou de segundo grau agridem as camadas da epiderme e derme. Lesões consideradas de espessura total ou de terceiro grau são aquelas que atingem as três camadas (epiderme, derme e hipoderme) (PAUL, SHARMA, 2004; RAHMATI et al., 2020).

As lesões classificadas como superficiais são comumente restauradas através do processo de autocura do tecido, ocorrendo a reepitalização em torno de 7 a 10 dias. Todavia, algumas condições patológicas como diabetes, obesidade e outras doenças podem prejudicar o processo de cicatrização. Além disso, a degradação de camadas mais profundas da pele, em lesões de espessuras parcial e/ou total, provoca a ausência ou baixa presença de componentes epiteliais regenerativos, prejudicando o processo de autocura, o que torna a cicatrização dessas lesões um processo complexo (PAUL, SHARMA, 2004; RAHMATI et al., 2020), o qual utiliza várias vias celulares e moleculares para a reparação das camadas danificadas, com interações entre células, componentes da matriz extracelular (MEC), citocinas e

fatores de crescimento. Em geral, este processo de cicatrização ocorre em quatro fases: hemostasia, inflamatória, proliferativa e remodelação, representadas na Figura 2.2 (ENOCH, LEAPER, 2008; JANIS, HARRISON, 2014; BROUGHTON, JANIS, ATTINGER, 2006).

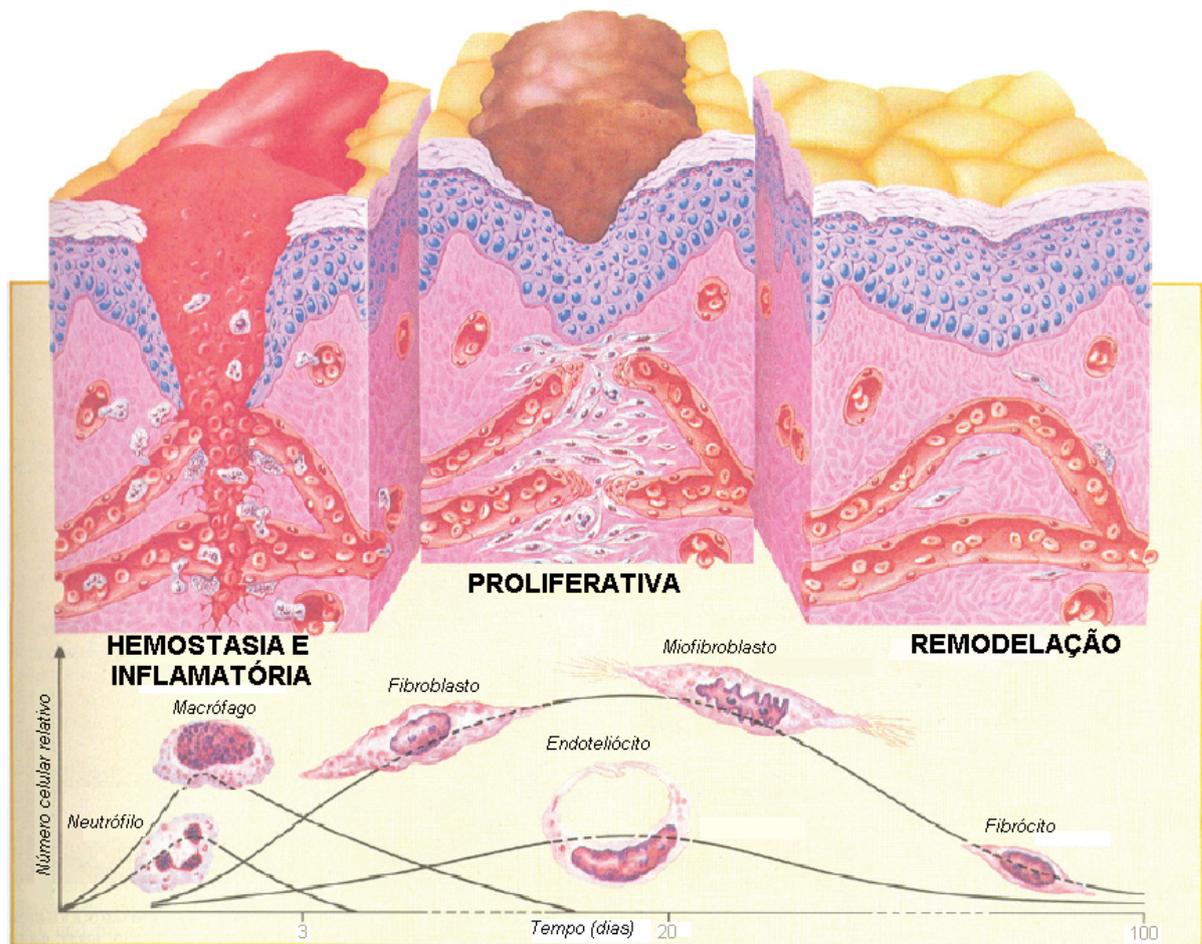


Figura 2.2 Representação do processo de cicatrização de lesões na pele, mostrando as células envolvidas em cada fase do processo (fonte: adaptado de Gray et al., 2010)

Logo após ocorrer a lesão, o processo de cicatrização inicia pela formação de um coágulo de fibrina e de uma matriz provisória no local da lesão. Tal mecanismo é importante para controlar o sangramento da região. Essa fase é denominada de hemostasia e se completa após algumas horas. Nessa etapa, diferentes cascatas de coagulação são iniciadas, e a formação do coágulo é desencadeada pelo acúmulo de plaquetas na região. As plaquetas liberam fatores de crescimento que promovem a migração celular, liberando citocinas e fatores de crescimento que ativam o processo inflamatório (REINKE, SORG, 2012).

Na fase de inflamação, as células do sistema imune são ativadas levando à infiltração de neutrófilos e macrófagos na lesão, que atuam no combate de substâncias estranhas presentes no local (MOHANDAS et al., 2018; REINKE, SORG, 2012). A presença de neutrófilos é essencial no início da cicatrização devido ao seu papel de fagocitar e secretar proteases que combatem microrganismos e auxiliam na degradação do tecido necrosado. Os macrófagos também são importantes para o processo de “limpeza”, realizando a fagocitose de patógenos e detritos celulares, bem como na secreção de fatores de crescimento e citocinas, que promovem a migração celular e síntese de MEC (matriz extracelular) por células da pele (REINKE, SORG, 2012).

Basicamente, a fase de proliferação pode ser definida pela fibroplasia, angiogênese e reepitalização (ISAAC et al., 2010), e tem como finalidade o recobrimento da superfície da lesão, que ocorre através da restauração da rede vascular e formação do tecido de granulação (ENOCH, LEAPER, 2008; MOHANDAS et al., 2018). Na fibroplasia, os fibroblastos migram até a região da lesão, onde ocorre rápida proliferação celular e síntese de colágeno e outros componentes da matriz. Os fibroblastos também se diferenciam em miofibroblastos, que se ligam às fibras de colágeno e realizam a contração da ferida (ENOCH, LEAPER, 2008; ISAAC et al., 2010; REINKE, SORG, 2012). Na angiogênese há a formação de novos vasos sanguíneos, que são essenciais para nutrir e oxigenar os tecidos em crescimento. O processo de reepitalização é caracterizado pela migração e proliferação de células epiteliais sobre o tecido de granulação, que buscam regenerar a estrutura da pele e suas funções. Esse processo requer uma superfície úmida e vascularizada, ocorrendo rapidamente em lesões superficiais; entretanto, em feridas mais profundas, a reepitalização é mais lenta devido à necessidade da lesão ser preenchida pelo tecido de granulação (ENOCH, LEAPER, 2008; ISAAC et al., 2010).

A remodelação é a última fase do processo de cicatrização, sendo responsável pelo aumento gradual da resistência do tecido à medida que a fase progride, com início do processo em aproximadamente 21 dias após a lesão e duração em até 1 ou 2 anos. Nessa fase, ocorre a substituição do colágeno tipo III recém-produzido pelo colágeno tipo I, onde as fibrilas que eram desorganizadas se tornam alinhadas em uma orientação específica, promovendo maior resistência mecânica ao tecido. Ao final do processo, as fibras de colágeno amadurecem e a

lesão cicatriza com formação de uma cicatriz (BROUGHTON, JANIS, ATTINGER, 2006; ISAAC et al., 2010; JANIS, HARRISON, 2014).

Em geral, o processo de cicatrização da maioria das lesões ocorre normalmente. No entanto, em feridas mais profundas, que atingem as camadas da derme e hipoderme, o processo de cicatrização espontânea é gravemente comprometido. Em outros casos, a cicatrização pode sofrer interferências devido a alguns fatores, como diabetes mellitus, obesidade, idade avançada, desnutrição, dentre outros, levando à formação de feridas crônicas (ENOCH; LEAPER, 2008). Essas lesões são mais propensas a infecções secundárias e podem levar à necrose do tecido. Por isso, a aplicação de curativos é importante para auxiliar e/ou estimular o processo de cicatrização e proteção da lesão (ISAAC et al., 2010; MOHANDAS et al., 2018).

2.3 Curativos para lesões de pele

Os curativos mais tradicionais empregados no tratamento de lesões de pele superficiais normalmente utilizam gazes ou algodão, pomadas e ataduras. Eles atuam como uma barreira de proteção à lesão contra a entrada de microrganismos. Entretanto, esses materiais apresentam grande absorção de exsudados, gerando um ambiente com pouca umidade, o que interfere no processo de cicatrização. Além disso, com o ambiente mais seco, o curativo pode aderir à ferida, dificultando sua remoção e gerando incômodo ao paciente, ou até mesmo causar danos ao tecido renovado (PEREIRA et al., 2013). Um curativo eficaz, além de proteger a lesão, deve promover um ambiente ideal para o processo de cura do tecido, sendo biocompatível e de fácil manipulação, assim como deve absorver exsudados sem desidratar a lesão, permitir a troca de gases e fluidos, apresentar propriedades mecânicas adequadas e proteger a ferida contra infecções secundárias.

Em lesões mais complexas, que danificam as camadas da derme e/ou hipoderme, o processo de cicatrização é prejudicado, sendo necessário um tratamento mais complexo. Atualmente, o procedimento é baseado no uso de enxertos de pele humana, podendo ser autólogos ou não. Esses enxertos possuem tecido conjuntivo e promovem desenvolvimento de vasos sanguíneos. No entanto, esses tratamentos apresentam algumas falhas. Em enxertos autólogos, a disposição do tecido doador pode ser limitada, além de haver dependência da condição clínica

dos pacientes e da disponibilidade de doadores. No caso de aloenxertos, derivados de cadáveres, estes podem apresentar problemas de segurança relacionados a transmissão de doenças e a rejeição imunológica (HUANG, FU, 2010; METCALFE, FERGUSON, 2007). Além disso, há necessidade do uso contínuo de agentes imunossupressores para prevenir a rejeição do tecido transplantado, podendo gerar efeitos colaterais como infecções viral e bacteriana e carcinogênese (TABATA, 2009).

Segundo especialistas, a busca por curativos mais eficientes para a cicatrização de lesões profundas tem refletido no mercado mundial de tratamento de feridas de pele, com estimativa de valores da ordem de 15 a 22 bilhões de dólares até 2024 (SEN, 2019). Neste contexto, o desenvolvimento de curativos confeccionados estrategicamente com biomateriais, visando auxiliar a cicatrização e promover a regeneração do tecido lesionado, tem sido um campo de pesquisa atrativo da medicina regenerativa, conhecido como engenharia de tecidos.

2.4 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma área de pesquisa que tem por objetivo o desenvolvimento de materiais funcionais que atuem na cicatrização e reformulação de tecidos diversos. Os mais efetivos são aqueles materiais que possibilitam o desenvolvimento *in vitro* de estruturas “substitutas” que permitem sua posterior implantação *in vivo*, com o propósito de reparar e recuperar a funcionalidade dos tecidos e órgãos danificados (ZHANG, HU, ATHANASIOU, 2009; NEREM et al., 2006).

Os estudos básicos em engenharia de tecidos envolvem o uso de forma isolada ou da combinação de células, fatores estimuladores e materiais biocompatíveis (MARLOVITS et al., 2006). O uso de células humanas em aplicações clínicas teve início por volta de 1980, utilizando fibroblastos e queratinócitos para a cicatrização da pele. Desde então, diversos estudos têm sido desenvolvidos, principalmente na área de dermatologia (IKADA, 2006).

As estratégias mais recentes envolvem o cultivo de células em estruturas tridimensionais, como fibroblastos, queratinócitos ou células estromais mesenquimais (CEMs) (MARLOVITS et al., 2006). Os materiais para estes fins são designados como *scaffolds*, suportes ou membranas.

2.4.1 Scaffolds

Scaffold é, contudo, a designação genérica em inglês utilizada para definir um suporte poroso capaz de fornecer um ambiente adequado ao cultivo e crescimento de células (O'BRIEN, 2011), e foi adotada como termo corrente neste trabalho.

É desejável que um *scaffold* seja capaz de reproduzir características da MEC (Matriz Extracelular) em termos de estrutura, composição química e propriedades mecânicas que favoreçam as atividades biológicas como adesão, proliferação, diferenciação e interação célula-célula (STOOP, 2008). Assim, o material utilizado em sua confecção deve atender a vários critérios, como propriedades mecânicas adequadas, capacidade de degradação, biocompatibilidade, ser atóxico, ter superfície quimicamente adequada para proliferação celular, boa capacidade de absorção e porosidade apropriada (KESSLER, GRANDE, 2008; HUTMACHER, WOODFIELD, LEWIS, 2008; WITZLER et al., 2019).

O *scaffold* deve apresentar propriedades mecânicas equivalentes ao tecido nativo, fornecendo um suporte com características superficiais e resistência apropriada ao processo de cicatrização (HADISI, NOURMOHAMMADI, MOHAMMADI, 2015). Além disso, a degradação deve ocorrer à medida que as células se multipliquem e produzam MEC até que substitua o material do *scaffold* (GROVER, CAMERON, BEST, 2012). A biocompatibilidade do material também é uma propriedade importante para que não ocorra resposta inflamatória ou tóxica quando implantado (FREYMAN, YANNAS, GIBSON, 2001).

Além disso, é fundamental que os produtos de degradação do *scaffold* sejam atóxicos, não causando efeitos sistêmicos ou adversos ao organismo (DASKALOVA et al., 2014). A superfície do *scaffold* deve ser quimicamente adequada à adesão, proliferação e diferenciação celular, podendo ocorrer através da presença de moléculas ou regiões específicas que facilitem ou melhorem a bioatividade (WITZLER et al., 2019).

A importância de uma estrutura porosa e interconectada da matriz está relacionada com elevada capacidade de intumescimento, melhor fornecimento no transporte de nutrientes e gases para as células, assim como favorecimento da migração celular e proliferação interna (HOLLISTER, 2005). Estudos descrevem porosidades adequadas em torno de 90%, com tamanhos de poros entre 20 e 200

μm (CHAN et al., 2016; CHANDIKA et al., 2015; FREYMAN, YANNAS, GIBSON, 2001; GROVER, CAMERON, BEST, 2012; XINGANG et al., 2013).

A estrutura porosa, além disso, é importante para que os produtos de degradação sejam atóxicos, não causando efeitos sistêmicos ou adversos ao organismo (DASKALOVA et al., 2014). A superfície do *scaffold* deve ser quimicamente adequada à adesão, proliferação e diferenciação celular, podendo ocorrer através da presença de moléculas ou regiões específicas que facilitem ou melhorem a bioatividade (WITZLER et al., 2019).

A capacidade de intumescimento de um *scaffold* é decisiva para seu desempenho na manutenção da umidade da região da ferida, evitando a desidratação e morte celular, além de contribuir para desbridamento autolítico, processo que promove a degradação do tecido necrótico. A umidade local é importante para manter as células viáveis, que liberam fatores de crescimento, produzem MEC e estimulam a proliferação celular (GENEVRO, 2017).

A importância de uma estrutura porosa e interconectada da matriz está relacionada com elevada capacidade de absorção e pode ser obtida através de diversas técnicas, sendo a mais comum a liofilização (POWELL, BOYCE, 2006; FREYMAN, YANNAS, GIBSON, 2001; GARCIA, MARTINS, PLEPIS, 2019).

2.4.2 Biomateriais

Biomateriais podem ser definidos como uma substância, ou um conjunto destas, de origem sintética ou natural, a ser usado como um tratamento, prolongamento ou substituição de um tecido ou órgão do corpo (HELMUS; TWEDEN, 1995) e diversos tipos podem ser utilizados na formulação dos *scaffolds*, sendo comumente mais empregados os polímeros naturais ou sintéticos biodegradáveis ou bioabsorvíveis (GRIFFITH, 2000). A escolha do material a ser utilizado dependerá do destino da aplicação e das similaridades físico-químicas e biológicas do material com o tecido a ser substituído (OGAWA, 2002).

A principal vantagem em utilizar polímeros sintéticos é a facilidade em produzir materiais com as propriedades bem definidas, como taxa de degradação, microestrutura e propriedades mecânicas. No entanto, quando degradados, eles podem liberar substâncias tóxicas às células, além de ser ausente de grupos

funcionais, o que diminui a atividade celular e podem promover respostas imunológicas (STOPPEL et al., 2015).

Dentre os polímeros naturais (polissacarídeos, proteínas e seus derivados), o colágeno tem sido o mais estudado em razão de suas excelentes propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa resposta imunológica, baixa toxicidade e alta afinidade celular. Segundo Pontel e Boabaid (2019), o colágeno é o biomaterial ideal para a engenharia de tecidos, considerando a sua capacidade de biodegradabilidade, que exclui a necessidade de uma segunda cirurgia para coleta e remoção do enxerto. Outro fator importante é sua característica hemostática natural, que promove a agregação plaquetária, facilitando a cicatrização da lesão, além de apresentar baixa imunogenicidade, simples manipulação e ausência na formação de queloides na cicatriz (ZAHEDI, BOZON, BRUNEL, 1998; GROSSI, 2004).

O colágeno é a principal proteína da MEC e a mais abundante nos mamíferos (corresponde a 25% do total das proteínas). Além de conferir a função de resistência estrutural ao tecido, o colágeno auxilia na adesão, diferenciação, migração e proliferação celular (VELOSA, TEODORO, YOSHINARI, 2003).

Atualmente, são conhecidos 28 tipos de colágeno, sendo os mais estudados os tipos I, II e III, conhecidos como colágenos formadores de fibrilas (CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016; LI et al., 2019). No presente trabalho, o colágeno tipo I foi escolhido como material básico na confecção dos *scaffolds*.

O colágeno tipo I é o mais abundante no corpo humano, compondo pele, ossos, dentina, córnea, vasos sanguíneos, fibrocartilagem e tendões. Sua estrutura é caracterizada pela presença de duas fitas de cadeias polipeptídicas idênticas (cadeias α_1) e uma cadeia α_2 , enroladas entre si, formando uma tripla hélice (Figura 2.3). As cadeias da tripla hélice são estabilizadas através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas (LODISH et al., 2000). Sua estrutura primária é caracterizada pela repetição de três aminoácidos, glicina-X-Y (Gly-X-Y), onde X e Y normalmente são prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hyp).

Por ser versátil, o colágeno possibilita a elaboração de *scaffolds* em diversos tamanhos, espessuras, formas e porosidades, permitindo a aplicação em diferentes órgãos, como pele, cartilagem, ossos, entre outros (GEORGE, ONODERA, MIYATA, 2008).

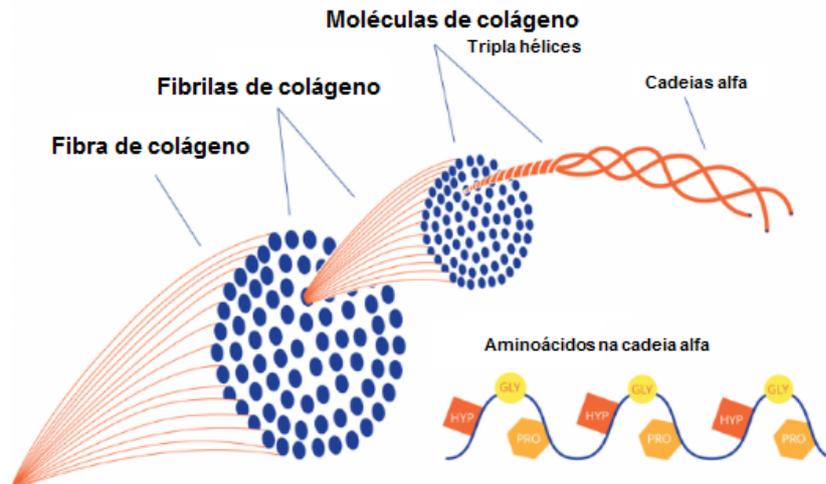


Figura 2.3. Representação esquemática da formação da fibra de colágeno e aminoácidos da cadeia alfa, glicina (GLY), prolina (PRO) e hidroxiprolina (HYP) (Adaptado de NIJHUIS et al., 2019).

No corpo, a formação das fibras do colágeno ocorre em pH próximo a 7,0, condição que promove a máxima interação eletrostática entre as moléculas de colágeno, formando uma estrutura com uma resultante de carga em zero, conhecida por colágeno nativo. Colágenos modificados estruturalmente, com moléculas carregadas positiva e negativamente, podem ser obtidos por meio de modificações da resultante de cargas, ou seja, alterando o equilíbrio eletrostático. Essas modificações estruturais podem alterar as propriedades físico-químicas das fibras, refletindo em suas características de biocompatibilidade, estabilidade térmica e biodegradabilidade, além da possibilidade de promover uma estrutura com tamanhos de poros variados, devido à repulsão eletrostática causada entre as moléculas carregadas negativamente (BET, GOISSIS, LACERDA, 2001).

Uma das modificações que o colágeno pode sofrer é a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina (Asn) e glutamina (Gln) (Figura 2.4), obtendo um colágeno com cargas negativas em pH 7,4, conhecido como colágeno aniônico. Essas modificações promovem maior biocompatibilidade, diminuindo quase que totalmente a resposta inflamatória do tecido, como demonstrado por Goissis et al. (2000).

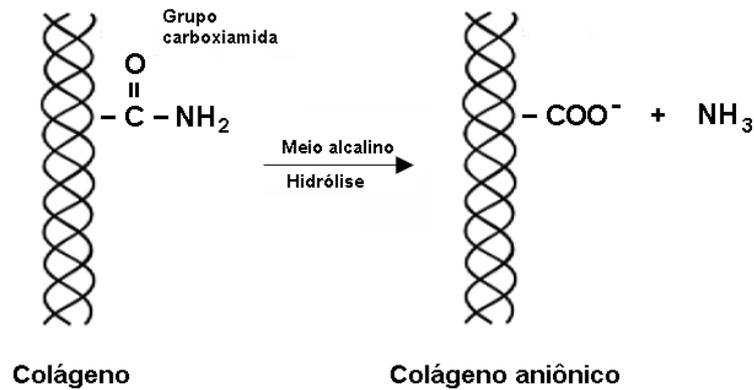


Figura 2.4. Esquematização da hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas dos resíduos Asn e Gln do colágeno.

2.4.3 Células na engenharia de tecidos de pele

Após a elaboração do *scaffold* com o biomaterial desejado, a etapa seguinte é identificar uma fonte celular ideal, que deve ser facilmente isolada, com capacidade de expansão e capaz de sintetizar MEC específica da pele.

A pele humana é composta por diversos tipos celulares dispostos nas três camadas. Na epiderme, os queratinócitos estão presentes em grande maioria, mas essa camada também apresenta melanócitos, células de Langerhan e células de Merkel. A derme é constituída especialmente por fibroblastos e MEC, e a hipoderme apresenta principalmente células do tecido adiposo (SIERRA-SÁNCHEZ et al., 2021).

Grande parte dos estudos que visam a reconstituição da pele, utilizam queratinócitos e fibroblastos humanos devido à maior presença dessas células nas camadas da pele (BALAURE et al., 2019; BACAKOVA et al., 2019; DILL, MORGELIN, 2020; GILOTRA et al., 2018). No entanto, o uso de células estromais mesenquimais (CEMs) apresenta vantagens como alta capacidade de proliferação e por serem derivadas de diversos tecidos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical, entre outros (KIM et al., 2011; SANANTA et al., 2020; SHOKRGOZAR et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

2.4.3.1 Queratinócitos e Fibroblastos

Os queratinócitos são células arredondadas presentes em toda camada da epiderme, com importante papel como barreira protetora contra agressões físicas e

químicas e de manutenção da permeabilidade à água (GRAGNANI, 2010). Os queratinócitos foram o primeiro tipo de célula cutânea a ser isolado e estudado, sendo utilizados inicialmente no desenvolvimento de materiais substitutos de pele, em especial para o tratamento de queimaduras.

Souto et al. (2006), em estudo *in vitro* pela inoculação de queratinócitos e melanócitos em uma matriz de colágeno bovino, confirmaram a formação de pele composta por derme e epiderme.

Os fibroblastos apresentam morfologia alongada e são as principais células presentes na derme. Esse tipo de célula é importante para o processo de cicatrização de feridas por produzirem proteínas da matriz, incluindo os colágenos tipos I e III, fibronectina e proteoglicanos, sendo responsáveis pela reepitalização e formação de cicatriz (METCALFE, FERGUSON, 2007).

George, Onodera e Miyata (2008), ao avaliarem a proliferação de fibroblastos em *scaffolds* à base de colágeno, relataram a eficiente adesão e proliferação pela estrutura do material. Em estudo com membranas à base de gel de colágeno e nanopartículas de óxido de zinco, Balaure et al. (2019), demonstraram ação bactericida e boa biocompatibilidade para serem cultivadas com fibroblastos *in vitro*, verificando sucesso de sua aplicação na cicatrização de feridas em ratos em até 21 dias. Bukzem (2018) produziu membranas à base de carboximetilquitosana (CMQ) visando o tratamento de lesões de pele. Em seu estudo, foram realizados diversos testes físico-químicos das amostras, demonstrando que estas exibiram elevadas porosidade e capacidade de hidratação e nenhuma atividade citotóxica aos fibroblastos testados, tornando-as promissoras para área de cicatrização da pele. Massimino (2020), preparou *scaffolds* compostos por diversos componentes, dentre eles, o composto por colágeno aniônico apresentou características adequadas para a regeneração da pele, por possuírem porosidade adequada, alta capacidade de absorção, não serem citotóxicos, e por promovem a adesão, proliferação e crescimento de fibroblastos.

Os fibroblastos também são frequentemente empregados para avaliar a biocompatibilidade de diversos materiais, investigando sua capacidade em induzir ou não a morte ou alteração funcional das células, determinando então se o material é citotóxico (FRESHNEY, 1989).

2.4.3.2 Células estromais mesenquimais

O termo “células-tronco mesenquimais”, proposto por Caplan na década de 90, ganhou popularidade até os tempos atuais. Em 2000, o termo foi alterado para “células estromais mesenquimais” pelo Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT - *International Society for Cellular Therapy*), com o intuito de tornar o termo mais fidedigno à sua real definição (BIANCO, ROBEY, SIMMONS, 2008).

As células estromais mesenquimais (CEMs) são células multipotentes adultas, não hematopoiéticas e capazes de autorrenovação, ou seja, se multiplicam permanecendo em seu estado indiferenciado, além de serem capazes de se diferenciarem em várias linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos e adipócitos e de demais tipos celulares como células cardíacas, neuronais, hepáticas, dérmicas, entre outras (Figura 2.5) (CAPLAN, BRUDER, 2001; WEI et al., 2013).

Os critérios que definem uma CEM, de acordo com o ISCT, são: a aderência à superfície; a expressão de antígenos de superfície, sendo positivos ($\geq 95\%$) para CD105, CD73 e CD90 e negativos ($\leq 2\%$) para CD45, CD34, CD14 e HL-DR; e o potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (DOMINICI et al, 2006).

As CEMs possuem divisão celular assimétrica, onde uma única célula gera duas células filhas diferentes, uma delas idêntica à progenitora (indiferenciada) e outra relacionada com o processo de diferenciação, mantendo então constante a quantidade de CEMs e gerando células diferenciadas para o tecido em que estão presentes. Essa capacidade de autorrenovação e de replicação está envolvido com o comprimento dos telômeros, que é reduzido em cada divisão celular e está relacionado ao tempo de vida celular (GODARA, NORDON, MCFARLANDO, 2008).

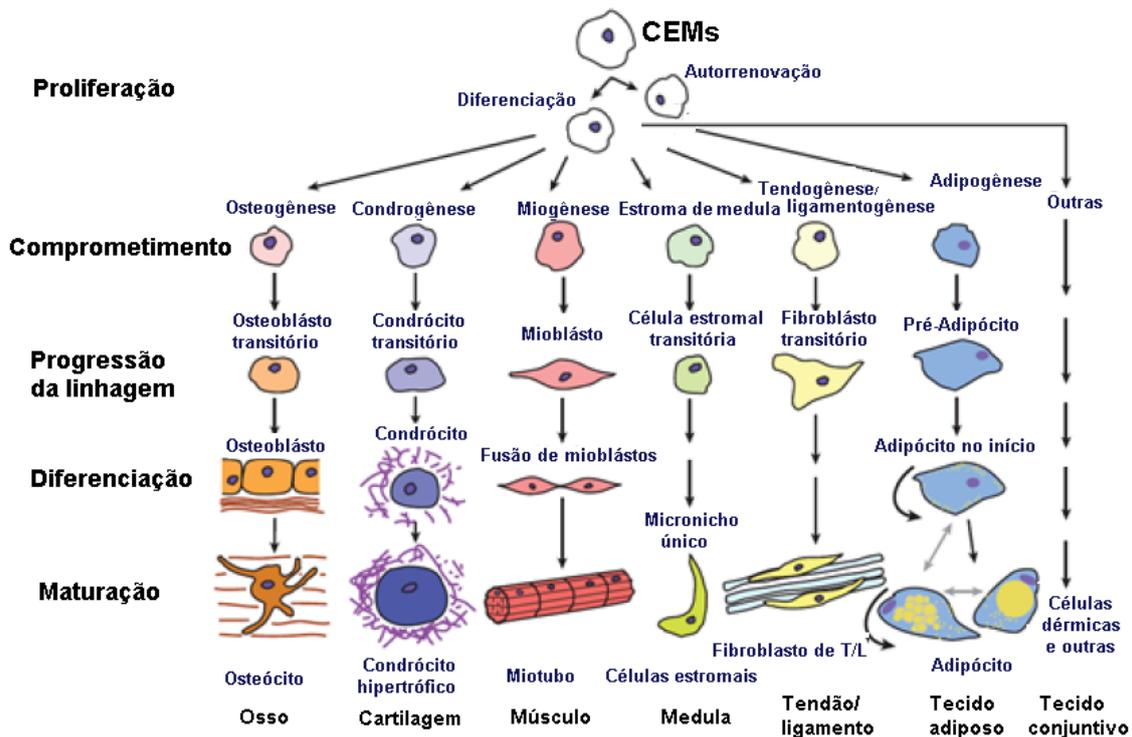


Figura 2.5. Proliferação e diferenciação das células estromais mesenquimais (CEMs). (Adaptado de Schop, 2010).

A linhagem de células estromais mesenquimais humanas TERT (hCEMs-TERT) é derivada da medula óssea e imortalizada pela expressão da subunidade catalítica da enzima telomerase, a hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*), a qual inibe o encurtamento dos telômeros que ocorre após cada ciclo celular, gerando uma linhagem de células capazes de se expandirem indefinidamente (ALLSOPP, HARLEY, 1995), mantendo seu caráter multipotente de autorrenovação e capacidade de diferenciação durante várias passagens (ABDALLAH et al., 2005). Por essas características, é uma linhagem utilizada em diversas pesquisas (FLORES LUNA et al., 2020; SANCHES, 2010).

Em estudo conduzido por Shokrgozar e colaboradores (2012), *scaffolds* compostos por colágeno e quitosana foram produzidos e analisados quanto a sua capacidade de diferenciação de CEMs *in vitro* e cicatrização de queimaduras de pele em ratos. Os autores relatam êxito na diferenciação das CEMs em queratinócitos, quando cultivadas com meio de diferenciação celular, e na cicatrização da pele com formação de derme e epiderme após 14 dias.

Em *scaffolds* de colágeno, Kim e colaboradores (2011), cultivaram CEMs por 72 horas até a implantação em lesões de pele em ratos. Foi observado que, ao longo de 7 dias, os *scaffolds* acompanhados das células promoveram a cicatrização

mais rápida das lesões, quando comparados aos *scaffolds* implantados sem células e ao controle (sem *scaffold* e sem células).

2.5 Cultivo de células animais *in vitro*

Quando cultivadas *in vitro*, as células animais apresentam alterações significativas em suas funções metabólicas por estarem em um ambiente diferente daquele quando encontradas *in vivo*. No ambiente *in vitro*, as células consomem em excesso as fontes de carbono, nitrogênio e energia, resultando em maior produção de resíduos metabólitos, que inibem o crescimento celular (MORAES et al., 2008). A glicose atua como a fonte de carbono e de energia mais comum em meios de cultura, enquanto a glutamina é em geral a fonte de nitrogênio e eventualmente também de carbono, quando na ausência de glicose. Lactato e amônia são os metabólitos mais comuns e com maior potencial inibidor do cultivo.

No processo de crescimento e manutenção celular, as células podem utilizar, para a geração de energia (ATP), as vias metabólicas da glicólise e a fosforilação oxidativa. Sucintamente, a via da glicólise proporciona a geração de apenas 2 mols de ATP e 2 mols de lactato, enquanto a fosforilação leva a produzir 36 mols de ATP por mol de glicose consumida (LIU e MA, 2014).

Segundo Liu e Ma (2014), a “escolha” da via metabólica pelas células influencia no cultivo. A utilização da glicólise por longos períodos pode aumentar a proliferação celular através da maior produção de fatores de crescimento, antioxidantes, angiogênicos e anti-apoptóticos e diminuir o estresse oxidativo e a senescência celular. Por outro lado, a via da fosforilação oxidativa produz radicais livres intracelulares, favorecendo a senescência celular. Dessa forma, o consumo de glicose e a produção de lactato são parâmetros para manutenção do crescimento celular e identificação de qual via metabólica está sendo utilizada. Esses parâmetros foram avaliados por Schop e colaboradores (2009), que relataram que o acúmulo de lactato nos cultivos leva à acidificação do meio de cultura, causando inibição do crescimento celular em valores acima de 35,4 mM.

Outro fator importante para a manutenção do cultivo é a concentração de oxigênio dissolvido no meio, por ser um dos nutrientes fundamentais para os ciclos metabólicos aeróbicos, podendo ser um fator limitante ao sucesso de estudos *in vitro*. Em condições com cerca de 20% de saturação de oxigênio dissolvido e não

ocorrendo o esgotamento de glicose, as células podem proliferar utilizando a rota de glicólise anaeróbica. Já em condições de normóxia (atmosfera com 21% de O₂), a proliferação celular ocorre utilizando a rota de fosforilação oxidativa, que é mais eficiente em termos energéticos. Entretanto, a permanência por um período prolongado na rota de fosforilação oxidativa gera aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS – Reactive Oxygen Species) no interior das células, levando à senescência e morte celular (PARK et al., 2013; BIGARELLA, LIANG, GHAFARI, 2014).

2.6 Justificativa

Acidentes decorrentes de queimaduras são frequentes, com altos registros de morbidade e mortalidade em todo o mundo (SMOLLE et al., 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 130 mil mortes por ano decorram de lesões por queimaduras (MOCK et al., 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde aponta que cerca de um milhão de novos casos de queimaduras ocorrem por ano no país, com aproximadamente 2.500 óbitos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Esses e outros tipos de lesões podem afetar as vítimas de várias maneiras, desde seu bem-estar emocional até limitações funcionais, refletindo diretamente em sua qualidade de vida. Além disso, a necessidade de tratamentos em longo prazo, com trocas de curativos, procedimentos cirúrgicos, dentre outros, gera elevado custo socioeconômico, para as vítimas e para o sistema de saúde (SMOLLE et al., 2017), revelando a necessidade de novos produtos e tratamentos mais eficazes associados a menores custos.

Neste contexto, o desenvolvimento e a caracterização de *scaffolds* de colágeno tipo I para o tratamento de lesões de pele é o propósito desse estudo. Espera-se que o produto processado possa contribuir de forma efetiva na cicatrização tecidual, considerando as propriedades biológicas do colágeno no favorecimento da adesão, crescimento celular e regeneração do tecido lesado.

2.7 Objetivos

2.7.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho foi planejado para ser conduzido em duas partes, com o intuito de investigar a potencial aplicação de *scaffolds* à base de colágeno tipo I na regeneração de lesões dérmicas. A primeira parte foi conduzida visando à caracterização físico-química dos materiais. A segunda consistiu em conduzir cultivos *in vitro* de células estromais mesenquimais, queratinócitos e fibroblastos sobre esses *scaffolds*, de forma a estabelecer condições que mimetizassem com maior fidelidade as características da matriz extracelular da pele.

A parte relativa aos materiais e sua caracterização foi realizada junto aos laboratórios da Embrapa Instrumentação em São Carlos. A parte da avaliação biológica, relativa aos cultivos de células, foi conduzida no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC), do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

2.7.2 Objetivos específicos

- Definir parâmetros para a confecção de *scaffolds* a base de colágeno tipo I;
- Realizar a caracterização estrutural e físico-química dos *scaffolds*;
- Avaliar o desempenho dos *scaffolds* em relação a adesão e crescimento *in vitro* da linhagem de células estromais mesenquimais TERT (CEMs-TERT);
- Avaliar o desempenho dos *scaffolds* em relação a adesão e crescimento *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos;
- Comparar o desempenho do material desenvolvido neste trabalho com amostra comercial, o *scaffold* Chondro-Gide da Geistlich Pharma (Suíça), em condições laboratoriais *in vitro*.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1 Scaffolds

3.1.1 Produção de scaffolds de colágeno

Os *scaffolds* de colágeno tipo I aniônico foram fornecidos pela empresa Jhaady Indústria e Comércio (São Carlos, SP), sendo produzidos em parceria com este projeto, considerando as características previamente desejadas.

A metodologia de extração do colágeno e produção dos *scaffolds* é de propriedade intelectual da empresa Jhaady, que preserva a divulgação de detalhes do processo. De uma maneira geral, o colágeno tipo I empregado foi extraído de serosa suína (parte externa do intestino delgado) utilizando processo de hidrólise seletiva (em solução contendo sais sulfatos e cloretos e hidróxidos de metais alcalinos e terrosos) por períodos variáveis de 24, 48, 72 e 96 horas, seguido de lavagens até estabilização do pH. A confecção dos *scaffolds* foi realizada em placas de Petri de 9 cm, para as quais três diferentes meios de solubilização foram separadamente empregados, a saber: ácido acético (1%), tampão fosfato-salino 10 vezes concentrado (PBS 10x) e solução fosfato 1 vez concentrado e posterior secagem. Os *scaffolds* foram então liofilizados para obtenção de uma estrutura porosa. Para este trabalho, foram produzidos oito tipos de amostras, conforme identificadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Identificação dos *scaffolds* conforme o tempo de extração do colágeno e a solução de solubilização

Identificação	Tempo de extração (horas)	Solução de solubilização
S24hPB	24	PBS
S24hPBf	24	PBS e fosfato
S48hPB	48	PBS
S48hPBf	48	PBS e fosfato
S72hf	72	fosfato
S72hAc	72	Ácido acético
S96hf	96	Fosfato
S96hAc	96	Ácido acético

3.1.2 Chondro-Gide

Scaffold de origem comercial Chondro-Gide® (Geistlich) composta por colágenos tipos I e III, de origem suína, foi utilizada para análise comparativa. A amostra foi gentilmente fornecida pelos cirurgiões Dr. Diego Escudeiro de Oliveira e Dr. Pedro Baches Jorge, ambos lotados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – SP. Este material já é de uso médico, aplicado na recuperação de injúrias diversas, seja em pele ou articulações.

3.2 Caracterizações físico-químicas

A análise físico-química teve o objetivo de avaliar as estruturas dos diversos materiais processados, permitindo relacionar algumas propriedades como porosidade, molhabilidade e estabilidade térmica às condições mais adequadas em relação às propriedades biológicas.

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As superfícies e seções transversais dos *scaffolds* foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL, modelo JSM 6510. Amostras foram cortadas nas dimensões de 5 x 5 mm. Para observações das seções transversais, os *scaffolds* foram imersos em nitrogênio líquido e fraturados com o auxílio de um bisturi. As amostras foram fixadas em suportes metálicos e recobertas com ouro. As imagens foram geradas sob potência de feixe de 20 kV.

3.2.2 Porosidade

O tamanho dos poros e a porosidade relativa dos *scaffolds* foram estimados diretamente por meio das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) através do software Image J (Wayne Rasband, National Institute of Health, EUA), em três regiões distintas, contando 200 poros para cada amostra (n = 3).

Adicionalmente, com o objetivo de comparação, as porosidades volumétricas foram também determinadas pelo método de deslocamento de líquido, segundo procedimentos descritos por IKEDA et al., 2014 e LI et al., 2015. As amostras secas foram inicialmente pesadas e imersas em etanol sob ação de vácuo durante 15 minutos para forçar a entrada do líquido nos poros. Os *scaffolds* foram então retirados e o excesso de líquido removido com o auxílio de papel toalha, após o que foram novamente pesados. A porosidade dos *scaffolds* foi estimada segundo a relação:

$$P(\%) = \frac{m_f - m_o}{\rho * v} * 100$$

sendo: P (%) a porosidade volumétrica em porcentagem; m_f a massa final (mg); m_o a massa inicial (mg); ρ a densidade aparente do etanol e v o volume da amostra (mL) de scaffold, calculado através das medidas de espessura, comprimento e largura de cada amostra.

3.2.3 Capacidade de hidratação (entumescimento)

Para determinar a capacidade de hidratação dos *scaffolds*, esses foram cortados nas dimensões de 5 x 5 mm, secos em estufa e pesados. Posteriormente, cada amostra foi imersa em 2 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) em pH 7,4 na temperatura ambiente ($26,0 \pm 2,0$ °C) durante os tempos de 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas, seguido da transferência para um papel filtro, permitindo a absorção do líquido remanescente. Por fim, as amostras foram novamente pesadas. As capacidades de hidratação (expressas em porcentagem) foram estimadas segundo a seguinte relação:

$$\text{Capacidade de hidratação}(\%) = \frac{\text{massa final} - \text{massa inicial}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

3.2.4 Ângulo de contato – Teste de molhabilidade

O grau de hidrofiliabilidade dos *scaffolds* foi determinado por análises da medida do ângulo de contato com água deionizada (*sessile water drop method*) em equipamento KSV CAM 101 (KSV instruments, Finlândia), com a câmera CCD (KGV-5000). Sobre a face porosa de cada amostra foram dispostas gotas de volumes próximos a 3 μL . O ângulo de contato foi estabelecido pela aquisição das imagens da interação entre a gotícula e a superfície do scaffold. Os valores finais representam a média de seis medidas em cada superfície, de acordo com norma ASTM D5725-99.

3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial foram realizadas para a avaliação da estabilidade estrutural e para estimar as temperaturas de transição vítrea, de início do processo de desnaturação e a variação de entalpia (ΔH), que está associada à transição de alteração da estrutura de tripla-hélice original do colágeno (desnaturação irreversível).

As análises foram conduzidas em duplicata em equipamento DSC modelo TA Instruments Q100 (TA Instruments, New Castle, DE, EUA) em amostras entre 5,0 e 6,0 mg, seladas em recipientes de alumínio. Foi realizado o procedimento padrão de rampa de aquecimento, de -60 a 180 $^{\circ}\text{C}$, na razão de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ sob atmosfera dinâmica de ar e N_2 com vazão de 50 mL/min . Para as análises, foram considerados os valores obtidos diretamente nas curvas, segundo a metodologia apresentada por Canevaloro (2004) e frequentemente empregada na caracterização das degradações de estruturas de colágeno (ANGELE et al., 2004; POPESCU et al., 2008; SUN e LEUNG, 2008). A temperatura de desnaturação foi considerada como a T_{onset} , identificada pelo ponto de intersecção entre a tangente da inflexão da curva e o limite superior de temperatura (linha de base). Para a medida da entalpia, foi considerada a área delimitada pelas temperaturas T_{onset} e T_{endset} do evento endotérmico relativo à desnaturação.

3.2.6 Estabilidade biológica *in vitro* (colagenase)

Para determinar a estabilidade biológica *in vitro* dos *scaffolds*, foi utilizada uma solução de colagenase 0,1% (Sigma-aldrich). Os *scaffolds* foram cortados nas dimensões de 5 x 5 mm, pesados e imersos em solução de colagenase, mantendo-se em incubadora a 37°C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com água deionizada, congeladas, liofilizadas e então pesadas novamente. A porcentagem de degradação do colágeno foi determinada pela seguinte equação:

$$\text{Degradação do colágeno(\%)} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{massa inicial}} \times 100$$

3.3 Etapa biológica

3.3.1 Procedimento para realização dos cultivos celulares

Todos os procedimentos de manipulação das células e preparo de material foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares - LATECC (Nível de Biossegurança NB2) em câmara de biossegurança Classe II (LABCONCO Purifier Class II – Biosafety Cabinet – Delta Series, Labconco Corporation, Missouri, EUA).

3.3.2 Linhagens celulares

Nesse trabalho, foram utilizadas três linhagens celulares: hCEM-TERT, HaCaT (queratinócitos) e HDFn (fibroblastos).

As células estromais mesenquimais hTERT (Células Estromais Mesenquimais humanas - Transcriptase Reversa da Telomerase) foram graciousamente cedidas pelo Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Faculdade de Medicina - USP - Ribeirão Preto - Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular - Processo HCRP 920/2009).

A linhagem celular HaCaT (human keratinocyte cell line) foi adquirida através do banco de células do Rio de Janeiro. A linhagem celular HDFn

(human fibroblast cell line) foi gentilmente fornecida pelo Laboratório de Biofotônica do grupo de Óptica do IFSC (USP – São Carlos).

3.3.3. Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado nos cultivos das CEMs e fibroblastos foi o meio básico α -MEM sem fenol (*Minimum Essential Medium*) (Cultilab), suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 1% v/v de antibiótico (penicilina: 10.000 U/mL e estreptomicina: 10.000 μ g/mL), glicose, glutamina, arginina, tampão hepes e bicarbonato de sódio. Para os queratinócitos foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino, 1% v/v de antibiótico (penicilina: 10.000 U/mL e estreptomicina: 10.000 μ g/mL), glutamina e bicarbonato de sódio.

Na Tabela 3.2 são apresentadas as quantidades presentes nos meios de cultura α -MEM e RPMI-1640.

Tabela 3.2. Composição dos meios de cultura α -MEM e RPMI-1640.

Componentes	Quantidade	Fabricante
α-MEM em pó	10,2 g/L	Cultilab, EUA
Soro Fetal Bovino	0,1 L	HyClone, EUA
Arginina	0,4358 g	Sigma-Aldrich, EUA
Glicose	1,0 g	Sigma-Aldrich, EUA
Glutamina	0,3654 g	Sigma-Aldrich, EUA
Bicarbonato de sódio	2,2 g	Cultilab, EUA
Hepes	2,6 g	Gibco, EUA
Penicilina e Streptomicina	0,01 L	Gibco, EUA
Água purificada no sistema Milli-Q	1 L	Millipore, Alemanha
RPMI-1640	16,36g/L	Cultilab, EUA
Soro Fetal Bovino	0,1 L	HyClone, EUA
Glutamina	0,3654 g	Sigma-Aldrich, EUA
Bicarbonato de sódio	2,2 g	Cultilab, EUA
Penicilina e Streptomicina	0,01 L	Gibco, EUA
Água purificada no sistema Milli-Q	1 L	Millipore, Alemanha

Os meios de cultura foram esterilizados pelo sistema de filtração em membrana de resina com poros de 0,22 μ m (Millipore, Alemanha).

3.3.4. Alteração de pH e hidratação dos *scaffolds*

Inicialmente, foi realizada a esterilização das superfícies dos *scaffolds* em luz ultravioleta durante 30 minutos. Posteriormente, estes foram cortados nas dimensões de 5 x 5 mm e alocados em placas de 24 poços não revestidos.

A correção do pH foi necessária para promover um ambiente adequado para as células. Para tanto, os mesmos foram imersos em PBS durante os períodos de 1 e 2 dias, tempos necessários para que os *scaffolds*, apresentados na Tabela 3.3, atingissem pH de aproximadamente 7,4.

Tabela 3.3. Tempos de lavagem em PBS para cada scaffold

Tempos de lavagem com PBS				
1 dia	S24hPB	S24hPBf	S72hAc	S96hAc
2 dias	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf

Após esse período, as amostras foram imersas durante 30 minutos em meio de cultura em pH 7,4. Esse procedimento foi realizado anteriormente ao cultivo celular, visando a absorção do meio e seus nutrientes, possibilitando o estabelecimento de um ambiente mais adequado ao crescimento celular.

3.3.5 Ensaio de Citotoxicidade dos *Scaffolds*

A análise de citotoxicidade foi realizada segundo o estudo de Bellini (2012), utilizando as CEMs e queratinócitos, com base no teste de atividade mitocondrial pelo método MTT. Este consiste em um método colorimétrico que mensura a atividade da enzima mitocondrial desidrogenase, no qual o reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) é reduzido em formazan (Figura 3.1), um reagente de coloração azul escura, que pode ser detectado no comprimento de onda de 570 nm. Esse método pode ser usado para determinar indiretamente a densidade celular em função da atividade mitocondrial das células viáveis (DOYLE, GRIFFITHS, 1998).

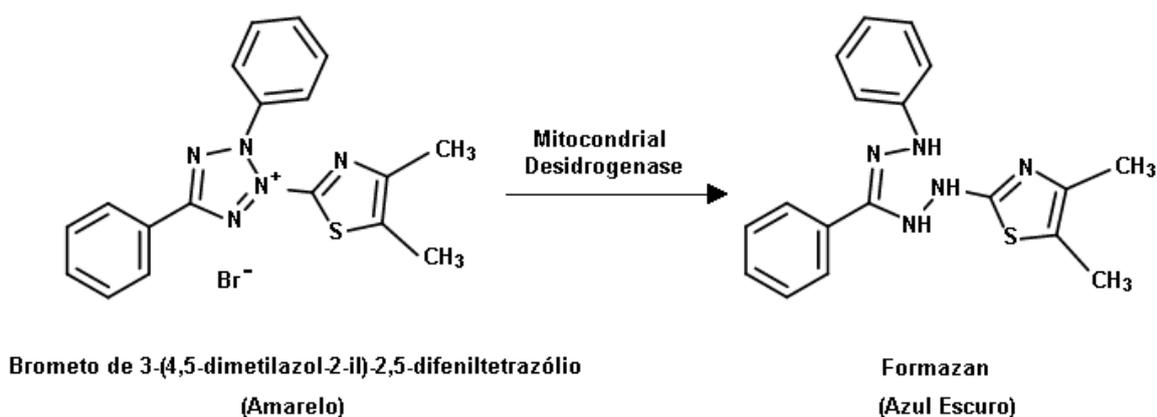


Figura 3.1. Representação da reação enzimática do método MTT.

Para avaliar a potencial ação citotóxica faz-se necessária a extração de componentes presentes nessas amostras. Dessa forma, foram produzidos extratos dos *scaffolds*, que foram cortados nas dimensões de 5 x 5 mm e mantidos em 2 mL de meio α -MEM ou RPMI-1640, respectivos para as CEMs e queratinócitos, durante 24 horas em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle negativo, foi utilizado o meio de cultivo com as células, e para controle positivo foi adicionado ao meio de cultura o extran (5%), um detergente de alta toxicidade para as células.

Alíquotas de 100 μ L de suspensão contendo 1×10^5 células/mL em meio de cultura foram transferidas para uma placa de 96 poços (TPP), e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Após o período, o meio foi removido e substituído por 100 μ L de cada extrato, mantendo a placa em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ durante 24 horas. Decorrido o período, os extratos foram removidos e os poços da placa foram lavados com 100 μ L de PBS, e então adicionados 100 μ L de meio de cultura contendo 10 μ L de MTT a 5 mg/mL em PBS. Após o período de 4 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foram adicionados 100 μ L de solução de 10% de TritonTM X-100 em isopropanol acidificado (kit Sigma - Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), para que os cristais resultantes da reação fossem dissolvidos. As amostras foram homogeneizadas e a leitura realizada em espectrofotômetro na absorvância em 570 nm. As medidas foram feitas em quadruplicata. A viabilidade celular para cada *scaffold* foi obtida por comparação aos poços do grupo controle negativo, e subtraindo o

valor da absorbância do branco (poço contendo somente o meio de cultivo, sem células), de acordo com a equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{média das absorbâncias da amostra}}{\text{média das absorbâncias do controle negativo}} \times 100$$

3.3.6 Atividade metabólica

A atividade metabólica dos cultivos em cada um dos *scaffolds* foi analisada utilizando a atividade da lactato desidrogenase (LDH), que permite estimar o número de células tanto pelo LDH citoplasmático, quanto pelo LDH citoplasmático liberado no meio de cultivo pelas células lisadas (não viáveis).

A atividade metabólica do cultivo das CEMs foi determinada pela análise de alíquotas das suspensões das amostras, como um indicador de morte celular. Para tal, foram adicionadas alíquotas iguais de solução de ácido láctico, de NAD⁺ e de cloreto de tetrazólio (kit Sigma, Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Desta forma o NAD⁺ é reduzido pela LDH liberada pelas células no sobrenadante (células não viáveis) à NADH. O NADH foi empregado na conversão estequiométrica do corante tetrazólio, formando um derivado de formazan vermelho. Posteriormente, a solução foi centrifugada (400 xg) durante 5 minutos, sedimentando os restos celulares. O sobrenadante foi utilizado para análise espectrofotométrica, em placa de 96 poços, no comprimento de onda de 492 nm (Multiskan FC - Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Os dados foram apresentados como média e desvio padrão.

3.3.7 Ensaios de proliferação celular nos *scaffolds*

As células foram primeiramente expandidas em garrafas de cultura estática (frascos T), contendo meio de cultura α -MEM (CEMs e fibroblastos) ou RPMI-1640 (queratinocitos) em incubadora a 37°C e 5% CO₂ em atmosfera umidificada. A substituição de metade do meio de cultura das garrafas contendo CEMs foi realizada a cada 72 horas, para garantir que não ocorresse esgotamento dos nutrientes. Com base em experimentos preliminares, foi

determinado que a troca de meio dos queratinócitos e fibroblastos deveria ser feita a cada 24 horas, considerando que em maior período foi medido o esgotamento de glicose, inviabilizando o cultivo.

Ao atingir uma confluência em torno de 80% da superfície do frasco, foi realizada a desadesão das células através do método de tripsinização utilizando a enzima TrypLE (1% para hCEMs-TERT e 3% para HaCaT e HDFn), seguido do cultivo das células nos *scaffolds*.

3.3.7.1 Células estromais mesenquimais-TERT (hCEMs-TERT)

Para o ensaio de proliferação das CEMs, foram avaliadas todas as oito amostras confeccionadas para este trabalho, permitindo selecionar as quatro que apresentaram os melhores resultados.

Após o tempo de hidratação dos *scaffolds*, o meio de cultura presente em cada poço de cultivo foi retirado. Em concordância com demais estudos (CHANDIKA et al., 2015; JAKOBSEN et al., 2010), adotou-se o gotejamento cuidadoso de 100 μ L de suspensão contendo 1×10^6 células em cada amostra (1×10^7 células/mL), seguidos de incubação das placas a 37 °C e 5 % de CO₂ durante 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de meio de cultura α -MEM em cada poço de cultivo. Novamente, as placas foram incubadas a 37 °C, sendo coletadas amostras com 8, 12, 72 e 168 horas de cultivo. Sucintamente, o procedimento genérico seguido na avaliação das características biológicas segundo o esquema da Figura 3.2.

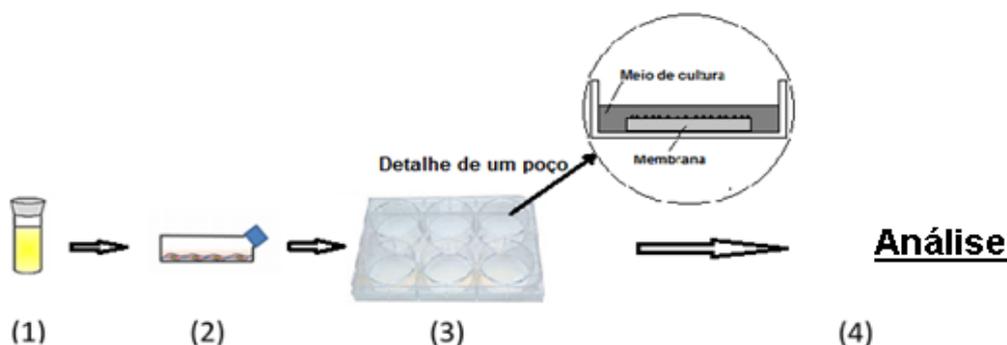


Figura 3.2. Resumo do procedimento genérico seguido na avaliação das características biológicas dos *scaffolds*. 1) Retirada e descongelamento de criotubo com CEMs; 2) Ativação e expansão das CEMs em frascos T; 3) Inoculação das CEMs nos *scaffolds*, alocados em placas de poços, para adesão e proliferação em cultivo em 3D com duração aproximada de 8, 12, 72 e 168 horas, e 4) Análises bioquímicas.

Posteriormente foi realizado um novo experimento para verificação dos dados obtidos, utilizando o mesmo procedimento do ensaio de proliferação, mas com extensão do tempo de cultivo para 336 horas.

3.3.7.2 Queratinócitos e Fibroblastos

Após identificar os quatro melhores *scaffolds* para a proliferação e crescimento celular (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf), estes foram cultivados com queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (HDFn), seguindo o protocolo estabelecido no tópico anterior (3.3.7.1), da mesma forma como foi realizado para as CEMs, sendo importante ressaltar que para os queratinócitos foi utilizado o meio RPMI-1640 suplementado.

3.3.8 Quantificação da adesão celular

A adesão das células nos *scaffolds* foi avaliada através da contagem de células da suspensão do cultivo por hemocítômetro. O método empregado foi o da exclusão por azul de tripan (Gibco - Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) que consiste na contagem de células coradas e não coradas no hemocítômetro (câmara de Neubauer) (LO-Laboroptik, Lancing, Inglaterra). O corante azul de tripan é capaz de atravessar somente a membrana de células não viáveis, corando-as e assim possibilitando a diferenciação entre células viáveis e não viáveis.

A densidade celular total da suspensão é obtida pelo somatório do número de células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas), multiplicado pelo volume de um quadrante de câmara de Neubauer e pelo fator de diluição, como demonstrado pela equação:

$$Células.mL^{-1} = \frac{\sum N}{\sum Q} \times \frac{1}{10^{-4} mL} \times fa$$

Sendo: $\sum N$: Somatório do número de células viáveis e não viáveis em cada quadrante de contagem (Q);

ΣQ : Somatório do número de quadrantes contados;

fd: fator de diluição da solução com amostra e corante azul de tripan.

Nas primeiras 12 horas de cultivo ocorre o processo de adesão celular, antes de iniciar a fase de proliferação. É importante investigar esse período para avaliar a quantidade de células que realizam adesão aos *scaffolds*, sendo assim possível calcular o número de células aderidas após 12 horas de cultivo, segundo a relação:

$$\frac{\text{Número de células aderidas}}{\text{Número de células inoculadas}} = \frac{\text{número de células aderidas}}{\text{número de células remanescentes na suspensão}}$$

A eficiência da adesão celular durante as 12 horas iniciais de cultivo pôde ser calculada dividindo o número de células aderidas pelo número de células inoculadas em cada amostra (1×10^6 células por amostra).

$$\text{Eficiência de adesão} = \frac{\text{Número de células aderidas}}{\text{Número de células inoculadas}}$$

3.3.9 Métodos analíticos bioquímicos

3.3.9.1 Quantificação de glicose e lactato

Durante os experimentos, foram separadas alíquotas de 300 μL das amostras dos sobrenadantes, que foram mantidas em congelador a -20°C para posterior análise de glicose e lactato. As análises foram realizadas através do analisador bioquímico YSI MBS (*Multiparameter Bionanalytical System*, Yellow Springs Instruments, EUA).

O método de análise é baseado na produção de peróxido de hidrogênio pela enzima oxidase que está imobilizada nas membranas do equipamento YSI. Com a presença do substrato, o peróxido de hidrogênio é oxidado em um ânodo de platina, produzindo elétrons em uma taxa proporcional à quantidade de substrato, definindo então a concentração do substrato analisado.

3.3.9.2 Estimativa do número de células nos *scaffolds* a partir da quantificação de nutrientes

O número de células foi estimado através de modelo matemático baseado em $Y_{x/s}$ (fator de rendimento de células a partir do consumo de nutrientes). No momento dos experimentos de cultivo, alíquotas contendo 1×10^5 células foram inoculadas em placas de 24 poços e cultivadas durante 7 dias em condições similares aos experimentos dos *scaffolds*. Durante esse período, amostras de três poços eram coletadas diariamente para a contagem de células com hemocitômetro. Alíquotas da suspensão foram retiradas e congeladas para posterior análise de nutrientes em YSI. A quantidade de células geradas por crescimento foi diretamente relacionada com a proporção de nutriente consumida nesse processo. Deste modo, pode-se definir matematicamente $Y_{x/s}$ como:

$$Y_{x/s} = \frac{N_t - N_0}{n_{s0} - n_{st}}$$

Sendo:

$Y_{x/s}$: fator de rendimento de células a partir do consumo de glicose, em cél/mol

N_t : número de células depois de um tempo t de cultivo

N_0 : número de células no início do cultivo

n_{s0} : número de mols de glicose no início do cultivo

n_{st} : número de mols de glicose após um tempo t de cultivo

Empregando a equação anterior, a quantidade de células totais (aderidas aos *scaffolds* e em suspensão) pôde ser estimada através do seguinte arranjo:

$$N_t = N_0 + Y_{x/s} (n_{s0} - n_{st})$$

O número de células aderidas foi definido como o número células totais (N_t) subtraído pelo número de células em suspensão. Para obter os valores de

$Y_{x/s}$, foram cultivadas 1×10^5 células/poço em placas de 12 poços tratados e foram calculados seus valores ao longo de 168 e 336 horas, possibilitando quantificar o número de células nas matrizes a partir da quantificação de nutrientes (consumo de glicose) pelo YSI-7100 MBS.

O crescimento dos cultivos foi expresso pelo fator de expansão de células (FE), obtido pela razão:

$$FE = \frac{N_{m\acute{a}x}}{N_i}$$

Sendo:

$N_{m\acute{a}x}$: número máximo de células aderidas aos *scaffolds*;

N_i : número inicial de células aderidas aos *scaffolds*.

3.3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos *scaffolds* com adesão celular

Com o objetivo de avaliar qualitativamente a distribuição da matriz extracelular (MEC) e, eventualmente, a morfologia das células aderidas, amostras de *scaffolds* cultivados foram imersas em 2 mL de solução de Karnovsky, composta por paraformaldeído (2%) e fixador de glutaraldeído (2,5%) em solução tampão de cacodilato 0,05 M e CaCl 0,001M (pH 7,2), por 1 hora. Em seguida, foi feita lavagem com tampão cacodilato 0,05 M (pH 7,2), e desidratação das amostras utilizando uma série de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70 e 90%) durante 10 minutos e em acetona (P.A.) por 30 minutos.

As amostras foram então congeladas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente liofilizadas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (L101 Liotop), sob vácuo por 24 horas. Para a observação microscópica, as amostras liofilizadas foram fixadas em suporte metálico, recobertas com fina camada de ouro e observadas em microscópio eletrônico (MEV, JEOL, modelo JSM 6510), na potência do feixe de 20 kV.

Essa análise foi conduzida nos oito *scaffolds* cultivados com CEMs com tempo de 72, 168 e 336 horas de cultivo. Para os queratinócitos e fibroblastos, foram geradas imagens somente para o tempo de cultivo de 72 horas.

3.3.11 Microscopia de fluorescência confocal

Para uma melhor observação da distribuição dos queratinócitos e fibroblastos ao longo da estrutura dos *scaffolds*, esses foram analisados por microscopia de fluorescência confocal.

Após os períodos de 168 e 336 horas de cultivo celular, as amostras foram duplamente lavadas em PBS, fixadas durante 15 minutos em paraformaldeído 4%, novamente limpas com PBS e imersas em DAPI por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e, após a retirada do excesso de líquido em papel filtro, foram acomodadas em lâminas e cobertas com lamínulas, ambas contendo meio de montagem Prolong. As amostras foram analisadas no sistema de microscopia LSM 780 no microscópio Axio Observer (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), nas objetivas 10x (0,3 N.A.) e 40x (imersão a óleo, 1.4 N.A.), com excitação do DAPI no laser em 405 nm.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram comparados por análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey com nível de significância $\alpha = 0,05$, com auxílio do *software* Microcal OriginLab v.9.0.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1 Caracterizações físico-químicas

Os oito tipos de *scaffolds* obtidos foram nomeados segundo o tempo de extração do colágeno e o solvente utilizado em sua diluição, sendo ilustrativamente exibidos na Figura 4.1. Essas imagens correspondem às aparências gerais das amostras cortadas, anteriores aos ensaios biológicos. Embora diferenças visíveis nas diversas superfícies sejam identificadas, elas foram mais bem caracterizadas nas análises subsequentes.



Figura 4.1. Aparência geral de amostras cortadas dos *scaffolds* avaliados e nomenclatura de identificação.

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um material apropriado para emprego na regeneração de tecidos deve apresentar uma estrutura porosa que possibilite boa circulação de células, nutrientes e remoção de resíduos metabólicos (CAMARERO-ESPINOSA et al., 2016; TAMADDON et al., 2017). Para avaliar essa característica, foram utilizadas as imagens geradas por MEV. Tamanho dos poros, sua distribuição pela superfície e a interconectividade puderam ser avaliadas, conforme aspectos observados nas superfícies e seções transversais, apresentadas nas Figuras 4.2 e 4.3 respectivamente.

As heterogeneidades indicadas nas imagens macrométricas (Figura 4.1) são mais bem identificadas nas imagens obtidas por MEV, nas quais é possível observar superfícies e porosidades aparentes distintas, dependendo da formulação, com heterogeneidade nas distribuições de tamanhos de poros, seja em sua superfície (Figura 4.2) ou em seu interior (Figura 4.3). Nas amostras S24hPB e S48hPBf, a estrutura superficial apresenta aspecto bastante irregular, com regiões porosas e regiões contínuas (gerando um selamento superficial de uma fração dos poros), principalmente para a amostra S24hPB (Fig. 4.2 e 4.3 (A)). Segundo DAVIDENKO et al. (2010), heterogeneidade na estrutura porosa de *scaffolds* a base de colágenos, como selamento e recobrimento de poros na superfície, é um efeito comum e normalmente atribuído a uma solubilidade ou dispersão irregular de colágeno em solubilização durante a preparação e secagem. Contudo, pela análise da superfície de fratura (Figura 4.3), a estrutura interior apresenta-se mais homogênea e com poros interconectados, o que é determinante para garantir a penetração das células e transporte dos fluidos. No entanto, os poros se apresentam pequenos e pouco definidos, podendo interferir na passagem das células e nutrientes.

A condição de porosidade superficial mais homogênea é encontrada na amostra S96hf (Figura 4.2G). Nesta, os poros são uniformemente distribuídos sobre a superfície com tamanhos e formatos similares. Contudo, essa regularidade não é totalmente observada em seu interior (Fig. 4.3G). A superfície de fratura indica poros pequenos associados a espaços vazios de maiores dimensões.

Com respeito ao aspecto superficial das amostras S72hf, S96hf e S96hAc, estas são semelhantes aos *scaffolds* a base de colágeno encontradas na literatura (CALABRESE et al., 2017; GULOTTA et al., 2018; MASSIMINO, 2020), caracterizadas por uma distribuição uniforme de poros superficiais e interconectados em seu interior, sendo por alguns autores referidas como “estrutura de favo de mel”.

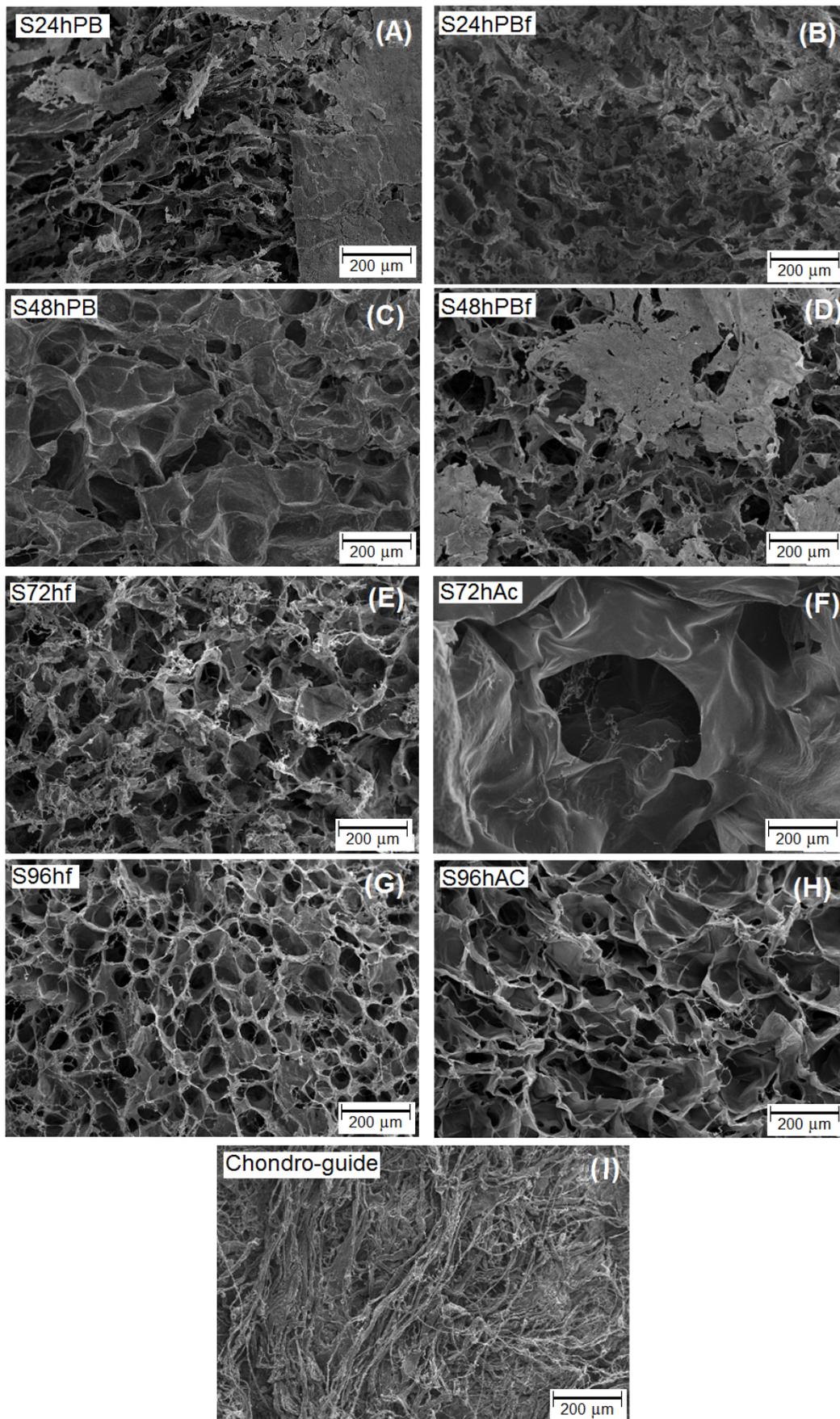


Figura 4.2. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds*. A. S24hPB, B. S24hPBf, C. S48hPB, D. S48hPBf, E. S72hf, F. S72hAc, G. S96hf, H. S96hAC e I: Chondro-Gide.

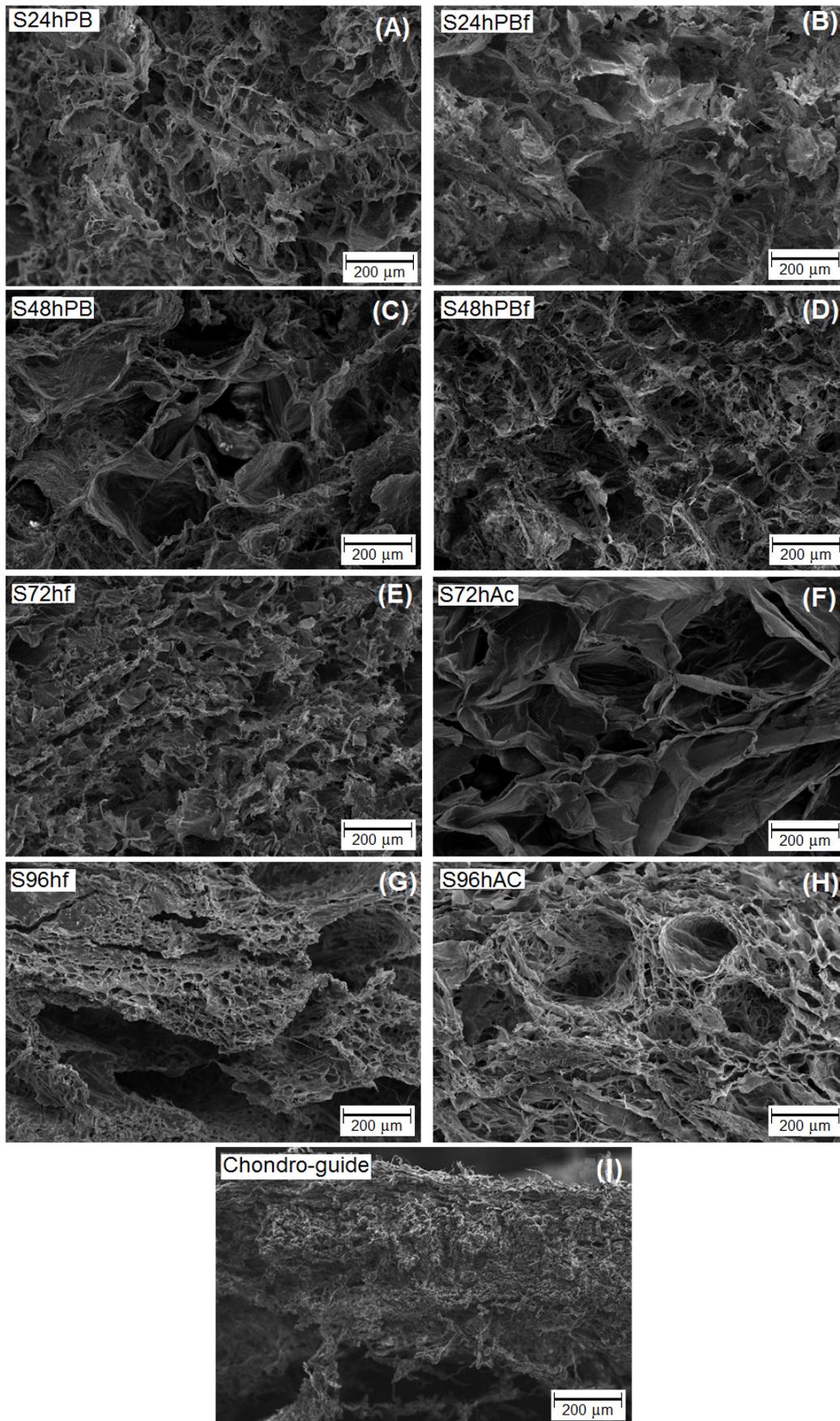


Figura 4.3. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das seções transversais dos *scaffolds*. A. S24hPB, B. S24hPBf, C. S48hPB, D. S48hPBf, E. S72hf, F. S72hAc, G. S96hf, H. S96hf e I: Chondro-Gide.

Cabe observar que o material comercial (Chondro-gide), embora também processado com colágeno tipo I (de origem suína), tem uma estrutura totalmente distinta dos obtidos neste trabalho (Figuras 4.2I e 4.3I). Este apresenta uma superfície fibrosa de baixa porosidade aparente e interior de aspecto granular com poros indistinguíveis na ampliação obtida (Fig 4.2(I)). Essas diferenças devem-se provavelmente ao método de fabricação e origem da matéria inicial, além de indicar a possibilidade de um processo que não faz uso de solubilização total das fibras de colágeno, assim como a ausência de liofilização, que é um procedimento determinante e referência para o estabelecimento de uma porosidade interna.

4.1.2 Medida de Porosidade

A porosidade dos *scaffolds* gerada pelo processo de liofilização tem início no congelamento da solução polimérica formando cristais de água que se expandem na solução. O congelamento faz com que as cadeias poliméricas se concentrem na região entre os cristais de gelo, moldando assim os poros. Quando o gelo é removido por sublimação, os espaços que eram ocupados pelos cristais permanecem na estrutura, formando uma arquitetura com poros interconectados, semelhante à de uma esponja ou favo de mel (WANG et al., 2017).

A porosidade tem influência na absorção de exsudados, na proliferação e adesão celular e na angiogênese (IACOB et al., 2018). Murphy e O'Brien (2010), estudaram a influência do tamanho dos poros na atividade celular, relatando que poros muito pequenos limitam a migração celular e a distribuição ou remoção de produtos residuais, resultando em regiões necróticas no interior da estrutura. Em contrapartida, poros em dimensões maiores reduzem a área superficial total, diminuindo a região disponível para que ocorra adesão das células.

Em estudos conduzidos por Gulotta et al. (2018) e Xingang et al. (2013), contemplando análises *in vitro* e *in vivo*, foram demonstrados que *scaffolds* com tamanhos médios de poros entre 100 e 300 μm , de formatos ovalados e em matrizes com porosidade volumétrica superior a 90% são os ideais para o crescimento celular. Grover, Cameron e Best (2012) reportaram porosidade de

65 a 75% em scaffolds de colágeno, gelatina e/ou elastina, enquanto Chan et al. (2016), reportam que scaffolds com porosidades próximas a 74% foram capazes de induzir eficiente neovascularização.

Assim, neste trabalho, foi avaliada a porosidade dos *scaffolds* através da análise das imagens obtidas por MEV utilizando o software Image J. A análise foi feita em diversas regiões superficiais das amostras, o que possibilitou estimar o tamanho dos vazios e a porosidade relativa, considerando a área ocupada pelos poros com relação à área ocupada pela matéria contínua. Os dados estão compilados na Figura 4.4, com representação gráfica da estimativa dos tamanhos médios, máximo e mínimo dos poros de cada amostra.

Os resultados da análise de imagens indicam que os *scaffolds* S24hPB, S48hPB, S72hf e S96hf apresentam um mesmo padrão de distribuição de tamanho de poros (dimensões máximas entre 304 e 313 μm). Da mesma forma, as amostras S24hPBf, S48hPBf e S96hAC apresentaram dimensões máximas entre 207 e 248 μm . As maiores dimensões de poros foram identificadas nas amostras S72hAc em 680 μm , ou seja, superiores aos tamanhos indicados como ideais pela literatura.

O *scaffold* comercial da Chondro-gide apresenta os menores tamanhos médios de poros (29 μm), com predomínios de poros de dimensões não superiores a 120 μm .

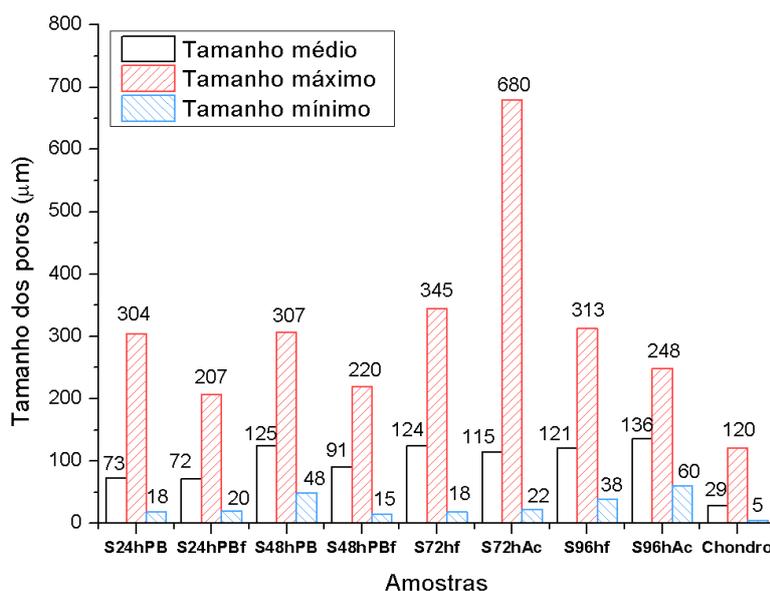


Figura 4.4. Valores estimados dos tamanhos médios, máximos e mínimos dos poros de cada scaffold.

A estimativa da porosidade total por análise de imagem não é uma medida ideal e deve ser considerada apenas como um indicativo útil para comparações individuais (COSKUN, WARDLAW 1995). Levando em consideração a proporção de poros, os valores resultam em porcentagens de vazios (porosidade relativa sobre as superfícies analisadas) entre 44,58 e 66,28% (Figura 4.5). As análises estatísticas mostram que a amostra comercial, embora com estrutura distinta das matrizes de colágeno processadas, não difere de forma estatisticamente significativa com respeito à porosidade medida. Em contrapartida, a amostra S24hPB foi a única que apresentou valores de porosidade abaixo dos demais. A baixa porosidade da superfície da amostra S24hPBf indica a formação de filme ou fase contínua selando parte dos poros superficiais, o que foi confirmado pelas imagens por MEV (Figura 4.2 (A)). Embora em seu interior os poros estejam abertos e interconectados (Figura 4.3 (A)), essa redução de poros na superfície pode resultar em um impeditivo para a livre penetração de células e de nutrientes para a estrutura interna.

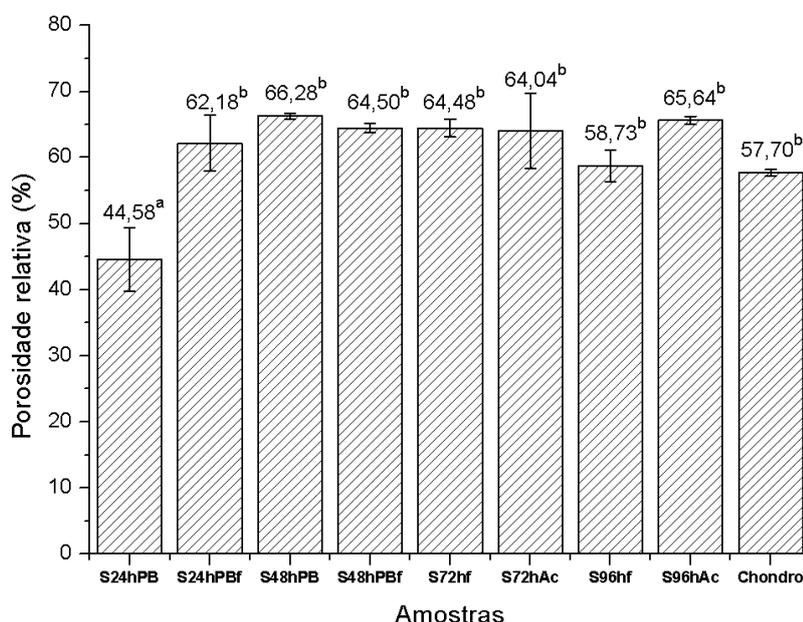


Figura 4.5. Valores referentes à porosidade de cada *scaffold* segundo método de análise de imagens empregando o software Image J. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

Valores mais confiáveis podem, contudo, ser estimados pelo ensaio de imersão em etanol sob vácuo, que indicam a proporção de preenchimento em todo o volume da matriz polimérica. Os valores obtidos estão apresentados na

Figura 4.6. Nestas medidas, a porosidade volumétrica apresenta uma variação mais significativa entre as amostras, com porosidades entre 55,44 e 84,45%, valores similares ou superiores aos encontrados por Grover, Cameron e Best (2012) e Chan e et al. (2016). A mínima porosidade nos *scaffolds* processados foi de 55,44% para a formulação S24hPB. As máximas foram atingidas para S48hPB e S96hf, respectivamente de 80,15 e 84,45%. Os dois últimos não apresentaram diferença estatisticamente significativa de porosidade, que está próxima à considerada ideal pela literatura (90%) (CHANDIKA et al., 2015; XINGANG et al., 2013).

Cabe salientar que, pela medida por imersão, o *scaffold* comercial apresenta baixa porosidade volumétrica (33,60%), o que está em concordância com as observações microscópicas, apresentadas nas Figuras 4.2 e 4.3, nas quais é possível visualizar uma baixa existência de poros em formatos definidos.

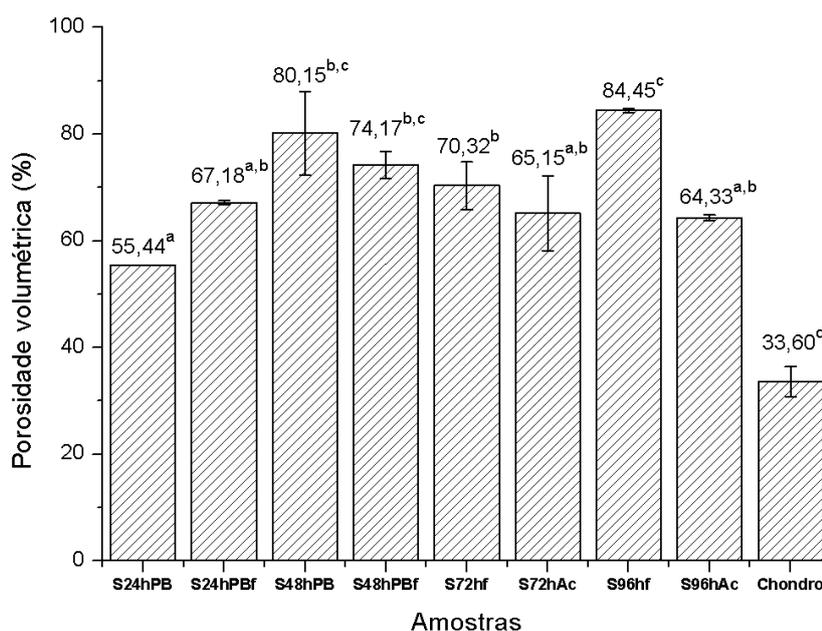


Figura 4.6. Valores referentes à porosidade de cada *scaffold* pelo método de deslocamento de líquidos. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

4.1.3 Capacidade de hidratação

A cicatrização de lesões ocorre de forma mais lenta quando expostas ao ar, em consequência da desidratação da região e formação de crosta ou escara, que atua como uma barreira mecânica para a migração celular,

prolongando assim o processo de cicatrização (PAUL, SHARMA, 2004). Deste modo, a aplicação de um *scaffold* capaz de promover o equilíbrio de umidade na região evitará a formação de crostas, facilitando a migração celular e, conseqüentemente, promovendo cicatrização mais rápida. Adicionalmente, é desejável que o *scaffold* seja capaz de absorver o acúmulo de exsudados e substâncias citotóxicas da região da lesão (MI et al., 2001).

Para estimar e comparar essas características, as amostras foram avaliadas quanto à capacidade de hidratação em meio tampão ao longo do tempo. Os resultados apresentados na Figura 4.7 e Tabela 4.1 mostram que as amostras apresentaram valores entre 277,33 e 1962,22%. Os dados indicam que a amostra S72hAc apresenta a maior taxa de hidratação (1962 ± 213 %), semelhante ao encontrado por Garcia (2019) (1489% em membranas com mesmo tempo de hidrólise), seguido por S96hAc (1434 ± 413 %), ambas medidas após 24 horas de imersão. Cabe ressaltar que as amostras que resultaram na maior taxa de hidratação apresentam a mesma porosidade volumétrica, de aproximadamente 65% (Figura 4.6). Além disso, esses dados indicam que o ácido acético utilizado na solubilização do colágeno para produção dos *scaffolds* pode ter influenciado na hidrofiliabilidade do material, assim como o tempo de extração do colágeno. Quanto maior o tempo de hidrólise do colágeno, maior a presença de cargas negativas, aumentando a polaridade e por consequência a hidrofiliabilidade do material, refletindo na capacidade de absorção da amostra. Essas observações estão em concordância com as medidas apresentadas por Rodrigues (2011), que demonstrou que quanto maior o tempo de hidrólise do colágeno, mais grupos carboxílicos são formados, gerando um aumento da quantidade de água absorvida.

Os *scaffolds* que apresentaram maiores capacidades de hidratação também foram aqueles com estruturas mais regulares, como pode ser observado nas figuras apresentadas na seção 4.1.1. Isso corrobora, portanto, que uma matriz mais bem definida possui mais espaços livres no interior de sua estrutura, permitindo maior absorção e incorporação de água (WAHID et al., 2016).

As menores capacidades de absorção de tampão foram obtidas para as amostras S24hPB e S24hPBf (335,81 e 277,33%), o que provavelmente

também deve estar relacionado ao tempo de hidrólise do colágeno. Amostras hidrolisadas em apenas 24 horas caracterizaram-se como menos hidrofílicas, como será demonstrado no tópico a seguir (4.1.5).

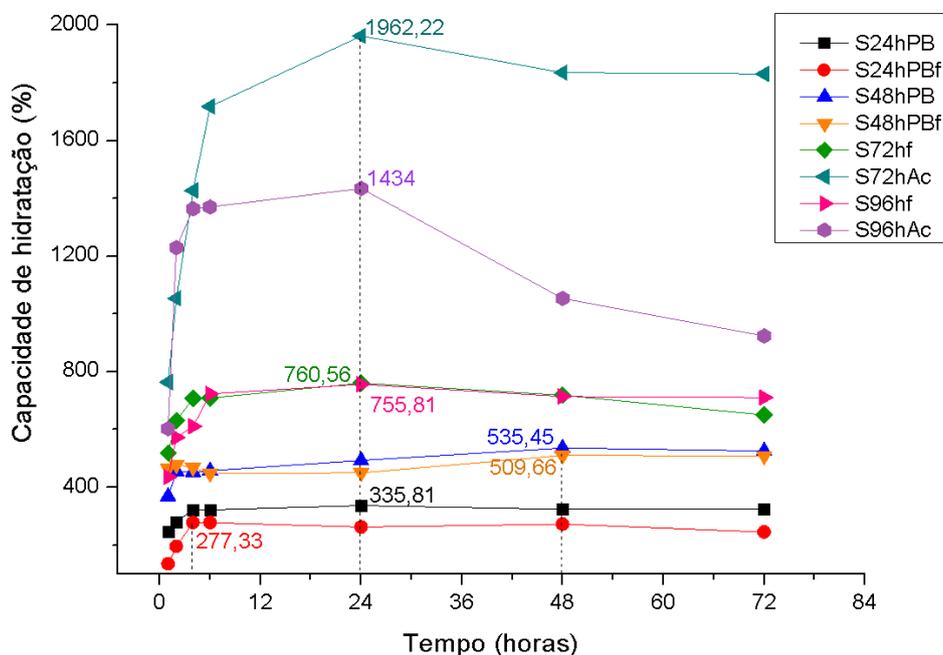


Figura 4.7. Capacidade de hidratação avaliada para cada scaffold.

Tabela 4.1. Capacidade de hidratação (%) dos *scaffolds*

Amostra	Tempo para absorção máxima (horas)	% Capacidade de absorção
S24hPB	24	335,81
S24hPBf	4	277,33
S48hPB	48	535,45
S48hPBf	48	509,66
S72hf	24	760,56
S72hAc	24	1962,22
S96hf	24	755,81
S96hAc	24	1434,01

Valores de absorção bem próximos aos encontrados para a amostra S96hAc foram apresentados por Nocera et al. (2018) em *scaffolds* produzidos a partir de colágeno de tendão bovino. A capacidade de absorção (1437%) foi atribuída à presença de poros de altas dimensões (500 μm). No entanto, Massimino (2020) relatou que absorção de 4899% pode ser obtida em *scaffolds* de colágeno aniônico com 72 horas de hidrólise mesmo com poros de dimensões inferiores, entre 96 e 149 μm .

Fica evidente que a capacidade de hidratação de um material não depende somente da porosidade, como também de sua afinidade à água (hidrofilicidade).

4.1.5 Ângulo de contato (hidrofilicidade)

A medida de ângulo de contato indica a hidrofilicidade de um material que envolve a interação (molhabilidade) de um líquido (normalmente água) com uma superfície. A molhabilidade é diretamente relacionada à presença de grupos polares e apolares. Arbitrariamente, considera-se como referência que ângulos medidos entre $90^\circ < \theta < 180^\circ$ definem uma amostra de características hidrofóbicas, enquanto $0^\circ < \theta < 90^\circ$ definem o material como hidrofílico (BERG, 1993).

Pelos resultados obtidos, dispostos na Tabela 4.2, tem-se que os menores ângulos são os da amostra S72hf e S72hAc, indicando maior hidrofilicidade resultante destas formulações. Esses dados estão de acordo com as medidas de hidratação, reforçando o efeito determinante da presença de um maior número de grupos polares em sua estrutura.

As amostras S24hPB e S48hPBf apresentam valores de ângulos superiores a 100° , indicando predominância de grupos apolares em sua estrutura, o que corrobora as inferiores taxas de hidratação apresentadas por essas formulações (Figura 4.7). Entretanto, a característica hidrofóbica da amostra S96hAc, determinada pelo valor de ângulo de contato acima de 100° , demonstra que, para esse scaffold, a porosidade de 64,33% (item 4.1.2) é o fator determinante para alta capacidade de hidratação em 1434% (item 3.1.3). Por outro lado, observa-se que a solubilização em ácido acético promove uma alteração significativa na hidrofilicidade da matriz ao longo do tempo de hidrólise, com ângulo de $40,4^\circ$ para 72 horas (S72hAc) e de $104,2^\circ$ para 96 horas (S96hAc). Contudo, essas amostras apresentam porosidades estatisticamente semelhantes (Figura 4.6) e foram as que mais absorveram água nos ensaios de imersão (Figura 4.7), sugerindo que as características de porosidade são tão determinantes na hidratação quanto a hidrofilicidade ou hidrofobicidade da estrutura do colágeno.

Tabela 4.2. Valores de ângulos de contato dos *scaffolds* em água

Amostra	Ângulo de contato (Θ)
S24hPB	106,7 \pm 12,7
S24hPBf	94,3 \pm 7,1
S48hPB	83,0 \pm 6,2
S48hPBf	115,3 \pm 4,6
S72hf	34,3 \pm 1,0
S72hAc	40,4 \pm 4,4
S96hf	85,7 \pm 3,1
S96hAc	104,2 \pm 4,1
Chondro-gide	56,7 \pm 27,1

4.1.5 Calorimetria Exploratória Diferencial

A estabilidade térmica dos *scaffolds* foi estimada por análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), que determina o fluxo de calor entre a amostra e um material de referência termicamente inerte, enquanto ambos são submetidos a uma variação de temperatura. Com base nas curvas geradas pela análise, foi possível, para algumas amostras, identificar as temperaturas de transição vítrea (T_g) e de início de desnaturação (T_{onset}), assim como realizar o cálculo de entalpia de transformação.

Esses pontos estão identificados na curva genérica da Figura 4.8, segundo CANEVALORO (2004) e com ilustração descritiva no site Análises Térmicas (<http://www.analisestermicas.com.br/como-analisar-usando-analise-termica-diferencial-dta/>).

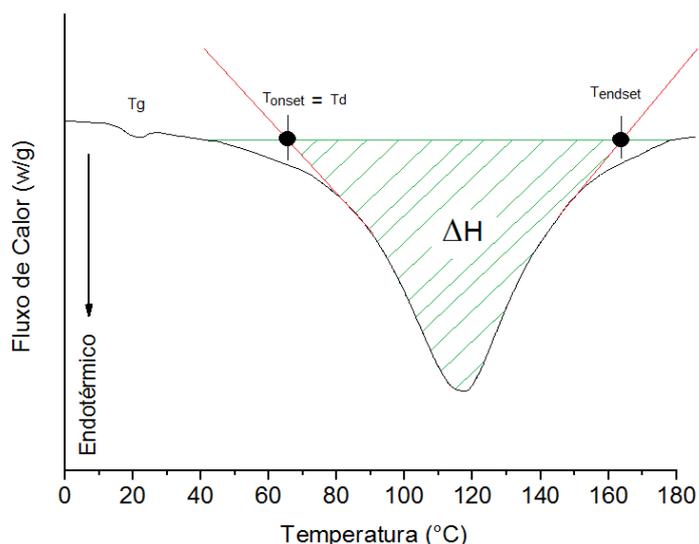


Figura 4.8. Curva de DSC ilustrativa do padrão colágeno, com a identificação dos pontos de transição térmica, segundo CANEVALORO (2004).

Todas as amostras apresentaram perfis similares de comportamento térmico, com alterações principalmente no T_{onset} , considerado o início da desnaturação (T_d). Na Figura 4.9, os valores medidos estão representados, assim como as entalpias calculadas.

Por temperatura de desnaturação, entende-se aquela em que se dá início à ruptura de ligações de hidrogênio entre as cadeias polipeptídicas da estrutura tripla hélice do colágeno, separando-a ao longo do processo em espécies isoladas (BERNAL, STANLEY, 1987).

As propriedades térmicas das fibras de colágeno, contudo, são bastante variáveis e dependentes da fonte de extração, das técnicas de preparação empregada, da estrutura química e do grau de hidrolização, além do teor de umidade presente na estrutura 3D consolidada, o que dificulta comparações com dados da literatura (ADLER-NISSEN, 1986; GIL et al., 2005).

Os valores de T_d medidos nos *scaffolds* aqui avaliados variam de 51 °C para a amostra S96hf até 71 °C quando empregado ácido acético para solubilização (S96hAc). Esses são superiores aos normalmente encontrados na literatura, de aproximadamente 36 a 40 °C para colágenos tipo I de origem suína (NAGAI, SUZUKI, 2002; ERWANTO et al, 2003), embora BATISTA (2008) apresente valores similares (T_d entre 51 e 70 °C) para colágenos extraídos de serosa suína, cuja variação atribuiu-se ao grau de hidrólise e à mineralização. He et al. (2020) igualmente reportam T_d de 67 °C para

membranas preparadas com colágeno tipo I de origem suína e apontam para a grande variação de medida dos valores de desnaturação quando em fibras isoladas (de 37,8 °C) para a forma consolidada em estrutura de filme/membranas (de 67 °C). Essa diferença é atribuída às interações intermoleculares que favorecem a agregação das estruturas de colágeno, o que dificulta a desestruturação da tripla hélice, resultando em um aumento da resistência térmica e da viscosidade do material.

Garcia (2019) relatou a Td de 59,9 °C para *scaffolds* de colágeno aniônico com 72 horas de hidrólise alcalina e solubilização em ácido acético, dados semelhantes aos obtidos neste trabalho para os *scaffolds* com mesmo tempo de hidrólise e solução de solubilização (60,2 °C para S72hAc).

A temperatura de desnaturação em função do tempo de hidrólise alcalina é relatada por Rodrigues (2011), que mostra o aumento da instabilidade das membranas, ou seja, a diminuição de sua Td, à medida que se aumenta o tempo de hidrólise do colágeno. Essa comparação também foi realizada no presente estudo, podendo ser vista na Figura 4.10. A temperatura de desnaturação em 79,8 °C, medida para amostra comercial indica, aparentemente, um colágeno de baixo grau de hidrolização.

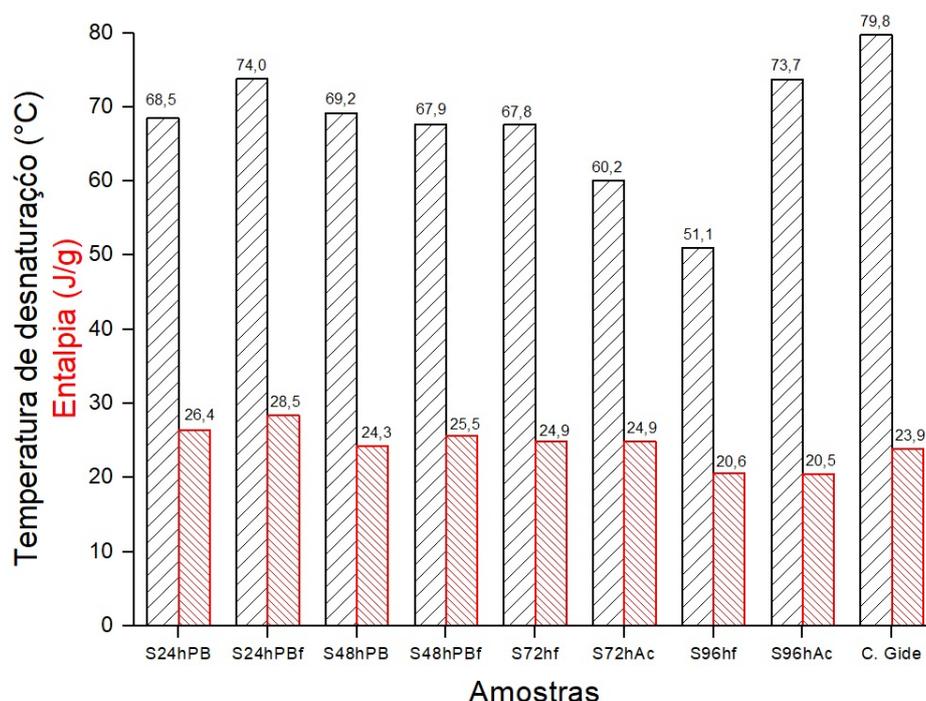


Figura 4.9. Valores de Td (início da temperatura de desnaturação) e de ΔH (entalpia de transformação) das amostras analisadas por DSC.

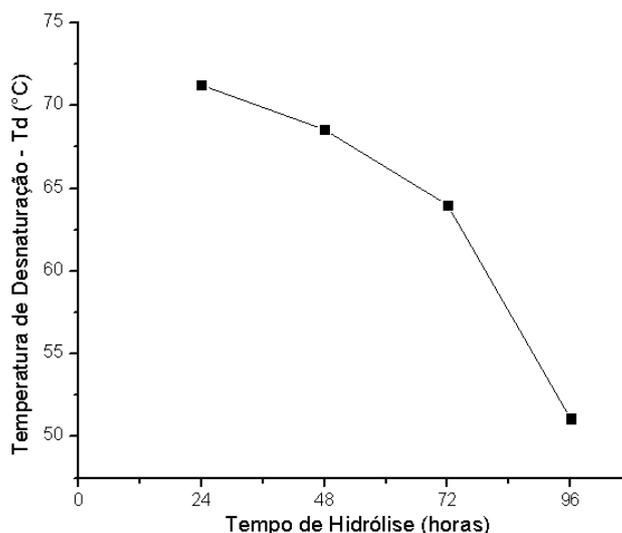


Figura 4.10. Temperatura de desnaturação (Td) em função do tempo de hidrólise alcalina. Para cada Td, foi realizada uma média entre os *scaffolds* dos mesmos grupos de tempo de hidrólise, com exceção do tempo em 96 horas, para o qual foi utilizado somente o S96hf.

Os valores de entalpia apresentaram poucas variações (Figura 4.9), com ligeira tendência de redução para os colágenos suspensos em ácido acético. Em geral, as entalpias não foram superiores a 29 J/g, inclusive para a amostra comercial, sendo esses valores inferiores aos apresentados por LIU et al. (2006), de aproximadamente 67 J/g para colágeno tipo I de origem suína. A título de comparação, KOMSA-PENKOVA et al. (2000) reportam entalpia de 50 J/g para colágenos tipo I de origem bovina.

Para estruturas de colágeno, podemos interpretar a temperatura de transição vítrea (T_g) como aquela na qual as moléculas fortemente ligadas passam a apresentar certa mobilidade, ou seja, a estrutura muda de um estado ordenado de tripla hélice para um estado menos ordenado (semi-amorfo). É um evento de baixa intensidade que precede a desnaturação.

Nem todas as amostras apresentaram claramente a T_g . Entre as que foram possíveis identificar, os valores não se alteram significativamente, com uma média de $50,14 \pm 5,27$ °C, próximos aos obtidos por Silva (2018), para materiais a base de colágeno suíno, embora a amostra da Chondro-gide apresente uma T_g superior, de 58,9 °C, indicando um maior ordenamento estrutural.

4.1.6 Estabilidade biológica do colágeno (Colagenase)

De um modo geral, um *scaffold* pode ser considerado como equivalente à MEC natural, devendo fornecer condições adequadas para adesão e proliferação celular, assim como para que as células possam sintetizar moléculas da matriz. Dessa forma, é importante que o material seja degradado à medida que ocorre a proliferação celular e a síntese da nova matriz, permitindo a regeneração tecidual ao longo da degradação do scaffold. Em vista disso, *scaffolds* com maior estabilidade biológica, ou seja, com menor taxa de degradação, são mais adequados em comparação aos mais degradáveis (AKILBEKOVA et al., 2018).

O processo de degradação enzimática ocorre em três etapas, sendo a adsorção e absorção da enzima, seguidas pela degradação do material. Inicialmente, a colagenase é adsorvida através da estrutura do scaffold, sendo em seguida absorvida pelo material, iniciando assim o processo de degradação (GARCIA, MARTINS, PEPLIS, 2019).

A ação enzimática nos *scaffolds* pode representar uma medida *in vitro* da taxa de degradação do material. Na Figura 4.11, encontram-se as taxas de degradação obtidas para as amostras desse trabalho. Nota-se que quatro amostras (S24hPBf, S72hAc, S96hf e S96hAc) apresentaram degradação total das estruturas após apenas 2 horas de exposição à colagenase, o que provavelmente está relacionado aos maiores tempos de hidrólise do colágeno (72 e 96 horas), interferindo na estabilidade estrutural e tornando essas amostras mais susceptíveis à degradação. É provável que a degradação da S24hPBf esteja relacionada à menor espessura da amostra (Tabela 4.3) e ao baixo tempo de absorção máxima (4 horas), como visto no tópico 4.1.3, o que facilita a dispersão e torna mais rápida a absorção da colagenase, acelerando sua degradação.

No estudo realizado por Rodrigues (2011), ficou demonstrada a relação direta entre o tempo da hidrólise das moléculas de colágeno e a sua degradação. É relatado que, ao longo de 24 horas de hidrólise, ocorre um aumento linear da taxa de degradação do material. Além disso, o autor apresenta uma taxa de degradação de 69,7% para membranas compostas por

colágeno hidrolisado durante 24 horas, valor próximo ao encontrado no presente experimento para S24hPB (76,7%).

As amostras S48hPB, S48hPBf e S72hf demonstraram que não houve diferença estatística entre elas (37,7, 36,9 e 39,0%, respectivamente), o que pode estar associado às suas similaridades de porosidade (Figura 4.6) e de tamanhos de poros (Figura 4.4), além do mesmo tempo de hidrólise do colágeno (amostras S48hPB e S48hPBf).

A amostra comercial (Chondro-Gide) foi a que apresentou menor taxa de degradação (29,9%), o que provavelmente está relacionado à estrutura mais cristalina do material, conforme indicado pela caracterização térmica e ao seu modo de processamento. Pode ser observado, nas imagens obtidas por MEV (Figuras 4.2 e 4.3), que se trata de uma estrutura composta por poros de pequenas dimensões (tamanhos médios de 29 μm , Figura 4.4) e pouco definidos, tanto na superfície quanto na seção transversal das amostras, além da baixa porosidade, de 33,60% (Figura 4.6). Apesar dessas características, a degradação da amostra comercial foi relativamente próxima à das amostras S48hPB, S48hPBf e S72hf.

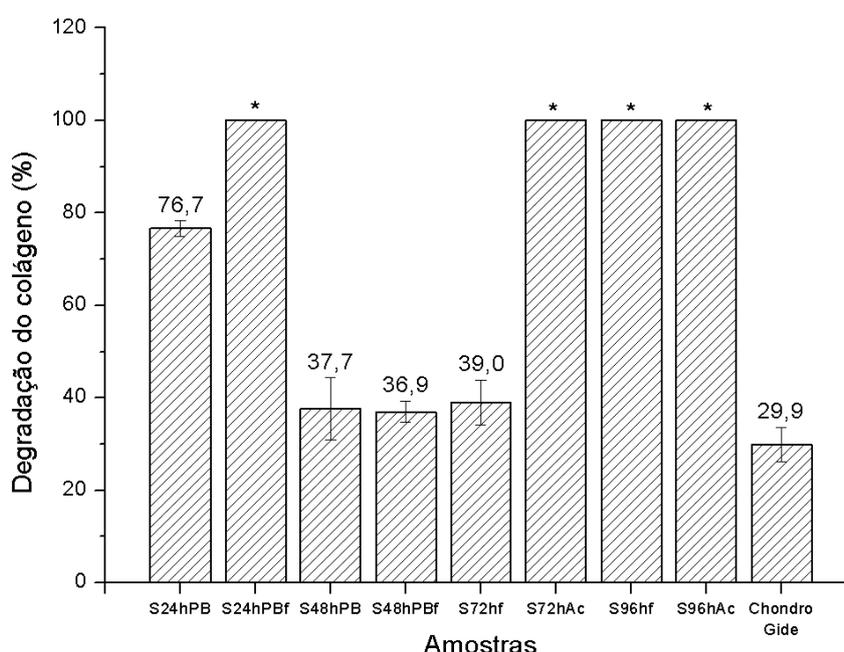


Figura 4.11. Degradação dos *scaffolds* de colágeno ao longo de 2 horas de imersão das amostras em collagenase. *Indica que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 4.3. Espessura dos *scaffolds*

Amostra	Espessura (mm)	d.p.
S24hPB	5,67	0,577
S24hPBf	4,67	0,764
S48hPB	5,67	0,577
S48hPBf	5,33	0,577
S72hf	6,00	0,023
S72hAc	5,83	0,763
S96hf	5,83	0,763
S96hAc	6,00	1,000
Chondro-Gide	1,00	0,001

4.2 Etapa biológica

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os perfis de crescimento das células estromais mesenquimais (CEMs) cultivadas nos oito *scaffolds* confeccionados para este trabalho, avaliando e comparando suas capacidades de conferir adesão e propiciar o crescimento celular. Também serão avaliados o crescimento e a proliferação dos queratinócitos e fibroblastos (das respectivas linhagens HaCaT e HDFn) nos quatro *scaffolds* que apresentaram os melhores resultados de crescimento com as CEMs.

4.2.1 Células em cultivo

Inicialmente, as CEMs e os fibroblastos foram cultivados em garrafas de cultivo com meio de cultura α -MEM suplementado. Uma análise preliminar de comportamento foi realizada a fim de padronizar as condições de cultivo. Ambas as células, CEMs e fibroblastos, cresceram de forma aderida, apresentando morfologia alongada, como pode ser visualizado na Figura 4.12.

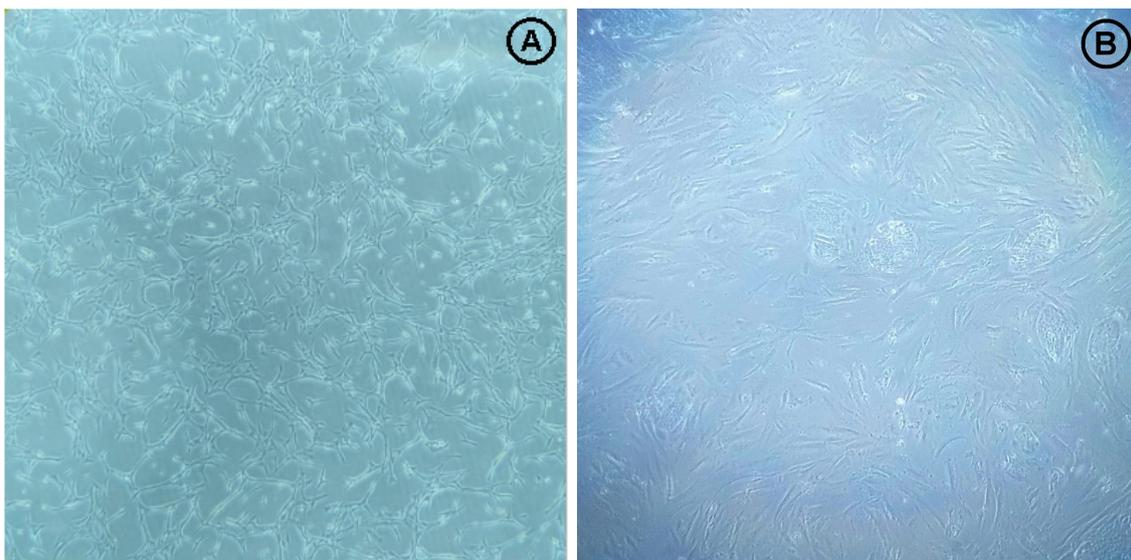


Figura 4.12. Morfologia alongada típica das células cultivadas em meio α -MEM suplementado: A. CEMs e B. fibroblastos.

Foram analisadas as curvas de crescimento das células inoculadas com concentração de 5×10^4 células/mL por poço em placas de 12 poços (TPP) contendo 2 mL de meio α -MEM suplementado. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 4.13.

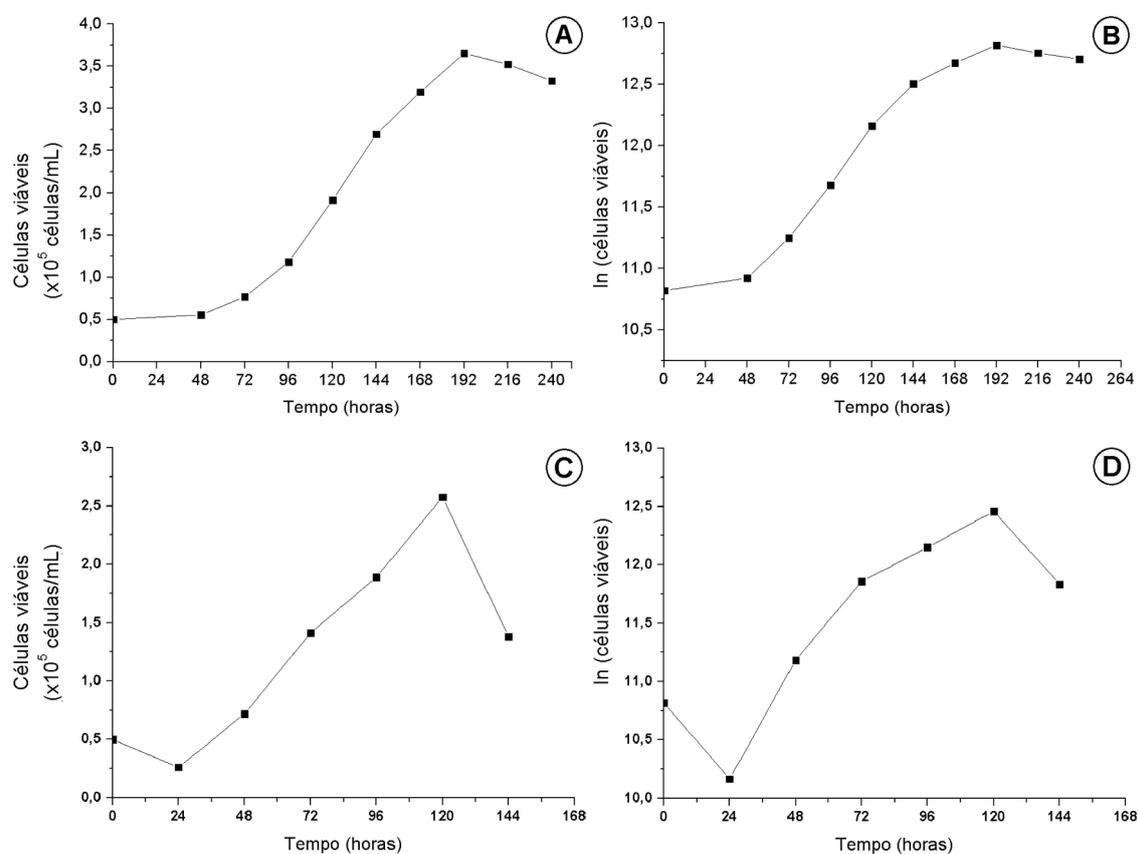


Figura 4.13. Curvas de crescimento das células em meio α -MEM suplementado: A. CEMs, C. fibroblastos; e curvas de crescimento linearizadas: B. CEMs e D. fibroblastos.

Nota-se que, para as CEMs, a cultura inicia a fase exponencial nas primeiras 48 horas, mantendo-se nesta até 120 horas de cultivo, momento em que ocorre uma queda no número de células viáveis decorrente da inibição por contato (superfície de cultivo do poço totalmente ocupada pelas células). Para os fibroblastos (HDFn), a fase exponencial ficou compreendida entre 24 e 120 horas de cultivo.

Dessa forma, calculando para CEMs, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi de $0,022 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 31,5 horas. Os fibroblastos apresentaram $\mu_{\text{máx}}$ de $0,024 \text{ h}^{-1}$, com tempo de duplicação de 29,0 horas.

Os queratinócitos foram cultivados em garrafas de cultivo com meio de cultura RPMI-1640 suplementado. Assim como realizado para as outras células, a análise de comportamento do cultivo foi realizada. Nota-se, na Figura 4.14, que as células cresceram de forma aderida, com característica morfológica arredondada.



Figura 4.14. Morfologia típica dos queratinócitos cultivados em meio RPMI-1640 suplementado.

Em condições similares às outras células, os queratinócitos foram cultivados (5×10^4 células/mL) em placas de poços com 2 mL de meio RPMI-1640 suplementado ao longo de 144 horas, construindo-se as curvas de crescimento exibidas na Figura 4.15.

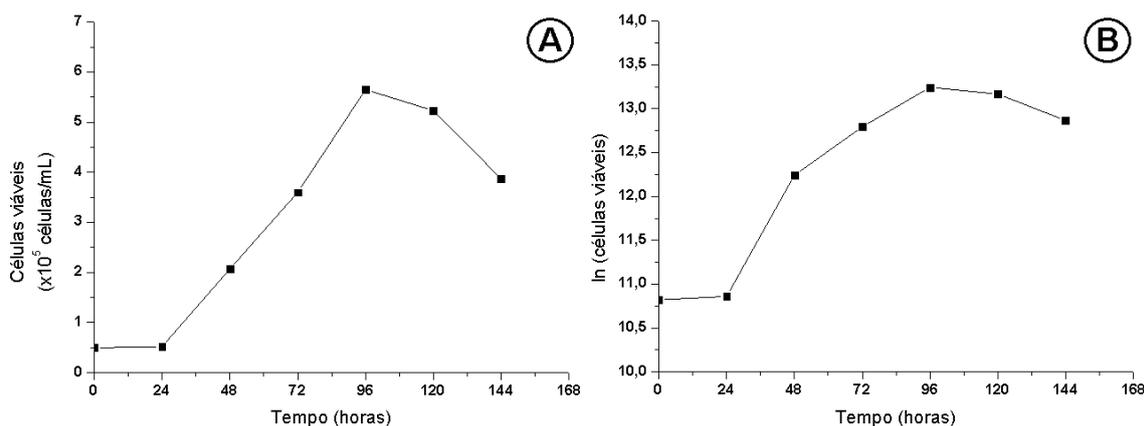


Figura 4.15. Curvas de crescimento dos queratinócitos em meio RPMI-1640 suplementado (A), e curva de crescimento linearizada (B).

Através da curva de crescimento linearizada (Figura 4.15B), é possível identificar a fase Log de crescimento, com início em 24 horas de cultivo, se estendendo até 96 horas. Dessa forma, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi calculada em $0,033 \text{ h}^{-1}$, sendo o tempo de duplicação da linhagem de 20,9 horas.

4.2.2 Citotoxicidade

Ensaio de citotoxicidade *in vitro* permitem avaliar materiais quanto à possibilidade de causarem efeitos tóxicos ou influenciarem nos processos de adesão, crescimento e diferenciação celular, indicando um ambiente adequado para o crescimento e desenvolvimento celular (SANTOS JR., 2001).

A avaliação dos efeitos que o material pode causar sobre as células, comparado à exposição de agentes tóxicos caracteriza os testes de citotoxicidade.

É conhecido que polímeros naturais como o colágeno não apresentam efeitos tóxicos (BARBOSA et al., 2019). No entanto, avaliações de citotoxicidade são indicadas uma vez que o processamento do material pode ocasionar a formação de resíduos potencialmente tóxicos. Dessa forma, foram realizadas análises indiretas dos *scaffolds* produzidos neste trabalho, comparando-os ao comercial (Chondro-Gide), e também às células expostas somente ao meio de cultivo (controle negativo) e ao agente tóxico extran (5%) em meio (controle positivo). A avaliação da citotoxicidade indireta consiste em extrair possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras

quando expostas em meio de cultura por determinado tempo. Esse tipo de análise foi preferido devido à natureza do material das amostras, no qual, quando utilizado o reagente MTT, não foi possível realizar a análise deste em suspensão, já que houve a retenção na estrutura das amostras, levando a leituras espectrofotométricas incorretas.

A análise foi realizada por método colorimétrico utilizando o indicador metabólico MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo). Neste ensaio, as células viáveis podem ser quantificadas, uma vez que reduzem o brometo de tetrazólio em cristais de formazan, um composto de coloração azul que ao ser quantificado por espectrofotometria, apresenta valores proporcionais ao número de células viáveis. Esse método é comumente utilizado para as análises de citotoxicidade, considerando que os cristais de formazan estão relacionados à atividade metabólica mitocondrial das células (KEONG, HALIM, 2009). Assim, quanto maior o valor de absorbância obtido, maior a quantidade de células viáveis presentes e conseqüentemente, menor a capacidade citotóxica do material.

Alguns pesquisadores classificam a citotoxicidade dos biomateriais em níveis de viabilidade celular, nomeando-os de não citotóxico à citotoxicidade intensa. Biomateriais que apresentam viabilidade celular menor que 30% são classificados como grau intenso de citotoxicidade, os entre 30 e 60% são de grau moderado, aqueles entre 60 e 90% são grau leve, e a viabilidade acima de 90% são considerados não citotóxicos (LÖNROTH, DAHL, 2003; SLETTEN, DAHL, 1999).

Os resultados obtidos para cada amostra foram calculados em comparação ao controle negativo (células somente com meio de cultivo). Na Figura 4.16 e Tabela 4.4 estão dispostos os resultados do ensaio dos queratinócitos (colunas em branco) e das CEMs (colunas azuis). Nota-se o índice de viabilidade celular para cada *scaffold*, onde a amostra Chondro-Gide e os demais *scaffolds* apresentaram resultados com altas porcentagens de viabilidade celular, indicando que todas exibem grau leve ou citotoxicidades ausentes para as células avaliadas.

Para que houvesse maior segurança na capacidade citotóxica de cada amostra, optamos por utilizar os menores valores de viabilidade celular obtidos entre as células testadas (Tabela 4.4). Dessa forma, as amostras S24hPB,

S24hPBf e S48hPB apresentaram valores entre 60 e 90%, indicando um grau leve de citotoxicidade. As demais amostras, S48hPBf, S72hf, S72hAc, S96hf, S96hAc e Chondro-Gide demonstraram não serem citotóxicas, com valores de absorbâncias acima de 90%. Os valores indicados como superiores a 100% para as amostras S96hf e S96hAc indicam que estas apresentaram maiores viabilidades celulares do que o controle negativo, onde as células foram cultivadas nas placas de poços contendo somente meio de cultivo.

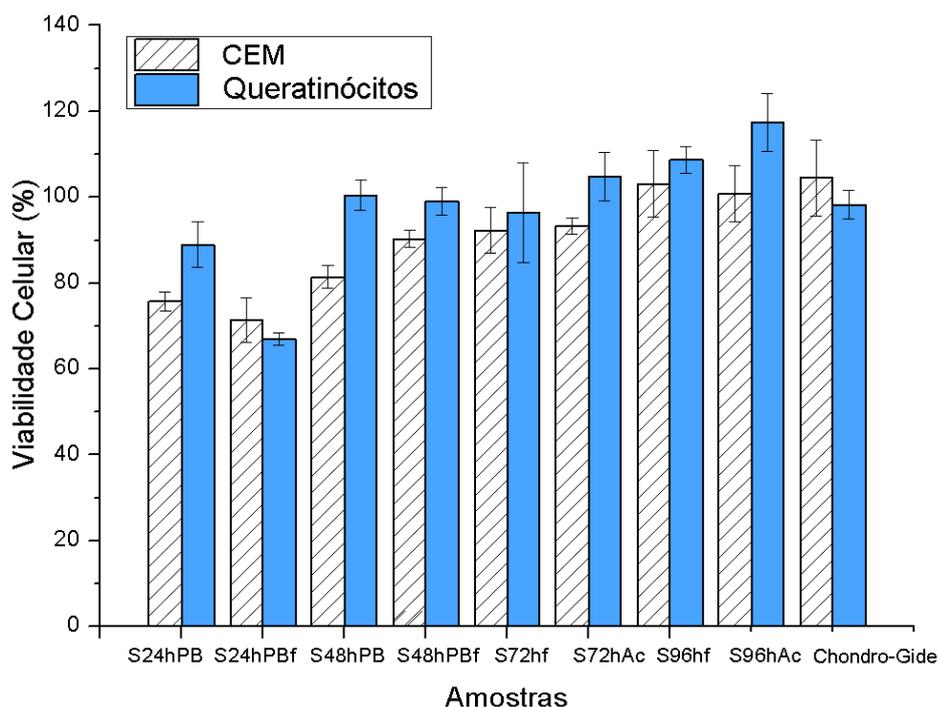


Figura 4.16. Viabilidade celular dos *scaffolds* analisados pelo método MTT. Em branco tachado: CEMs, e em azul: queratinócitos. Para cada amostra foi considerada a viabilidade celular para o maior valor obtido no ensaio de citotoxicidade.

Tabela 4.4. Viabilidade celular

Amostra	Viabilidade celular (%)	d.p.
S24hPB	75,7	2,28
S24hPBf	67,0	1,45
S48hPB	81,4	2,61
S48hPBf	90,2	1,48
S72hf	92,3	5,30
S72hAc	93,3	1,94
S96hf	103,1	7,76
S96hAc	100,9	6,55
Chondro-Gide	98,3	3,34

Para obter resultados mais confiáveis de citotoxicidade dos materiais, os valores apresentados na Tabela 4.4 foram os menores obtidos em cada amostra. Em posse desses dados é possível afirmar que os *scaffolds* analisados são ausentes ou apresentam quantidades baixas ou insuficientes de compostos que causem efeitos prejudiciais às células. Entretanto, quando comparados entre si, apresentam valores distintos de absorbâncias, indicando que alguns podem fornecer ambientes mais favoráveis para o crescimento celular, como para as amostras S48hPBf, S72hf, S72hAc, S96hf, S96hAc e Chondro-Gide, com maior viabilidade celular para ambas células testadas. Dessarte, as amostras seguiram para o teste da atividade metabólica.

4.2.3 Atividade metabólica

O ensaio LDH consiste basicamente na detecção da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada pela membrana plasmática danificada das células, podendo ser quantificada por espectrofotometria. Dessa forma, é possível determinar o número de células lisadas/não viáveis no cultivo ao longo do tempo, identificando em qual momento ocorreu maior perda de viabilidade ou morte celular.

A avaliação do tempo de morte celular para cultivos em *scaffolds* é importante para que se conheça a viabilidade das amostras ao longo do tempo, devendo-se investigar, em conjunto com outras análises, qual evento pode estar relacionado ao declínio do crescimento celular.

Na Figura 4.17, estão exibidos os resultados obtidos da atividade enzimática de LDH para cada *scaffold* e para o grupo controle (células cultivadas em placas de 6 poços). Nota-se que todos os *scaffolds* e o grupo controle apresentaram maior quantificação de lactato desidrogenase (LDH) no tempo de 72 horas, indicando esse período como o tempo de morte celular. Além disso, pode ser observado que, para as amostras S24hPB e S24hPBf, a atividade enzimática de LDH aumentou novamente em 336 horas, indicando que ocorreu novamente alta morte celular nesse tempo. Esse resultado pode estar correlacionado com os dados obtidos pelas imagens em MEV e de porosidade (tópicos 4.1.1 e 4.1.2, respectivamente), onde as imagens mostraram estruturas com poros pouco definidos, tanto na superfície quanto

nas seções transversais, característica que pode ter influenciado no transporte de oxigênio e de nutrientes através dos *scaffolds*, assim como na baixa porosidade (55,44%) calculada para S24hPB. Além disso, ambas as amostras foram classificadas com efeito citotóxico de grau leve (tópico 4.2.1), o que provavelmente acarretou maior morte celular.

No ensaio realizado para o grupo controle, foi possível obter resultados somente nos períodos de 12 e 72 horas, pois após esse período as células atingiram confluência e desaderiram da superfície dos poços, levando à morte celular e interferindo nos resultados.

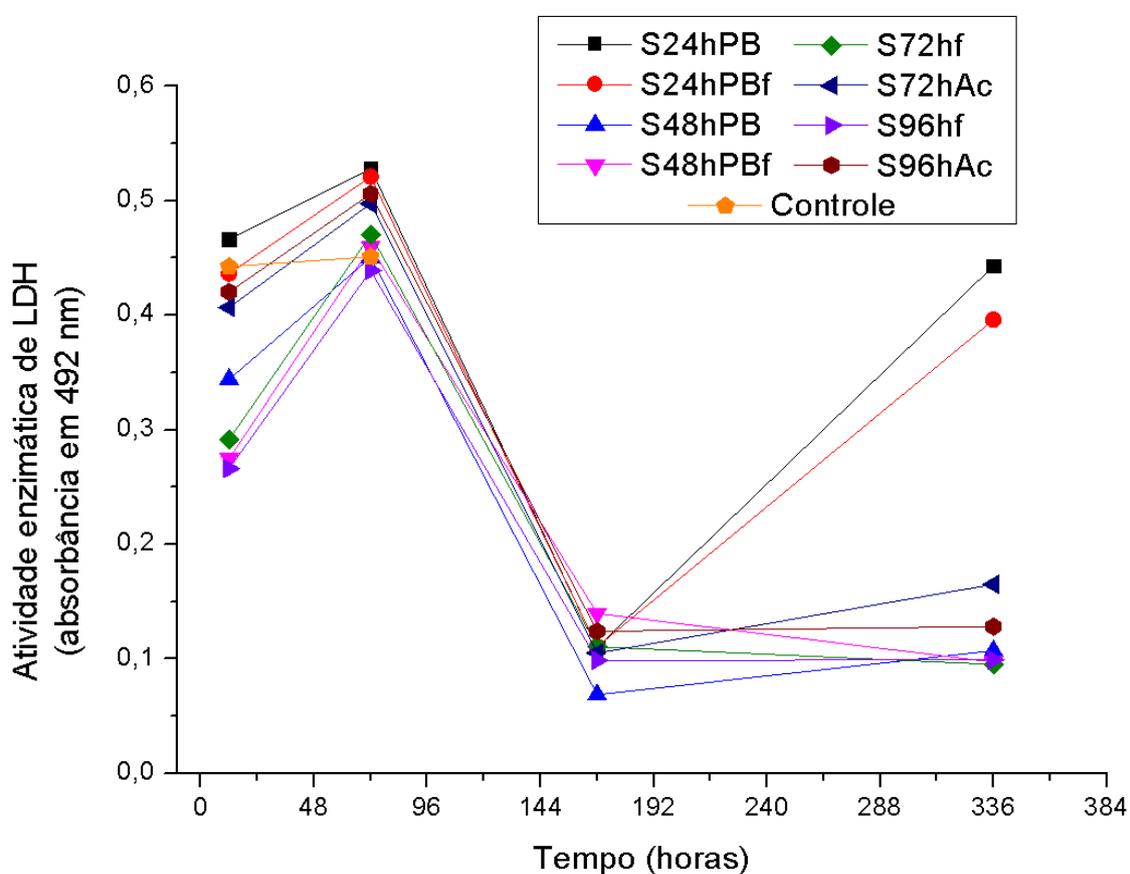


Figura 4.17. Valores de atividade enzimática da LDH, indicando o tempo de morte celular das CEMs. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

4.2.4 Cultivo *in vitro* de CEMs nos *scaffolds*

4.2.4.1 Adesão celular

Visando a formação tecidual, é necessário que as células realizem a adesão na superfície do *scaffold*, e posteriormente, sejam capazes de migrar e se proliferar através da matriz do material, dando continuidade ao processo de crescimento tecidual. Deste modo, o *scaffold* deve fornecer um ambiente adequado para que ocorram essas etapas (MOHAMMADI, 2015; PATEL; FISHER, 2008).

Para avaliar o desempenho dos *scaffolds* na adesão celular, as suspensões de cada amostra foram analisadas pela contagem de células em hemocitômetro, quanto ao número de células viáveis e não viáveis (Figuras 4.18 A e B), após 8 e 12 horas de cultivo.

As amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf apresentaram menores números de células viáveis e não viáveis presentes nas suspensões. Nas demais (S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc), os valores de células em suspensão foram duas vezes maiores que nas anteriores. Amostras que proporcionaram menores números de células em suspensão foram consideradas como as que apresentam, em princípio, as características mais favoráveis para a adesão celular.

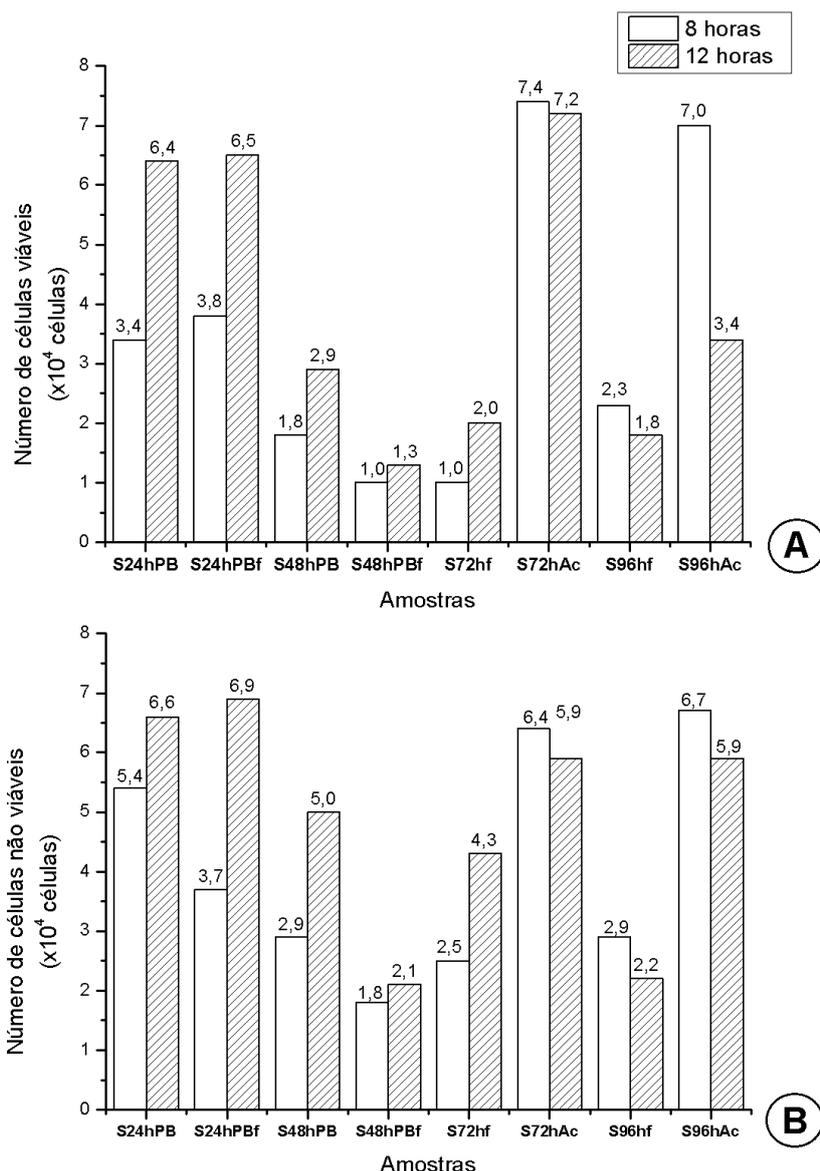
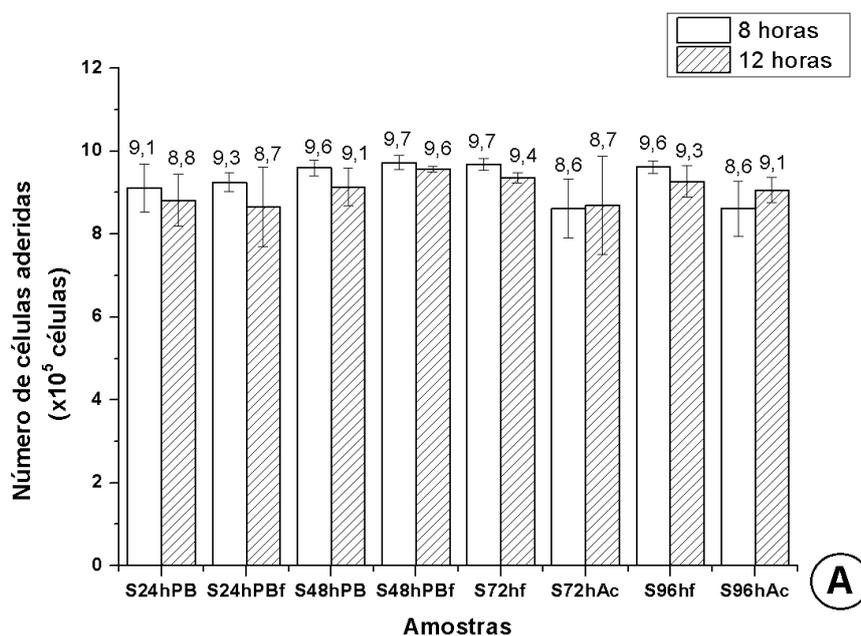


Figura 4.18. Número de células em suspensão quantificadas por hemocitômetro nos tempos de 8 e 12 horas de cultivo. A. Número de células viáveis, B. Número de células não viáveis.

O número de células aderidas foi estimado, bem como a eficiência de adesão (Figura 4.19), mostrando números semelhantes de células aderidas em todos os *scaffolds*. As amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf demonstraram maiores valores de células aderidas (com respectivamente $9,53 \times 10^5$, $9,72 \times 10^5$, $9,65 \times 10^5$ e $9,48 \times 10^5$ células após 8 horas de cultivo e $9,10 \times 10^5$, $9,58 \times 10^5$, $9,36 \times 10^5$, e $9,60 \times 10^5$ células após 12 horas), assim como maior eficiência de adesão celular (91,0, 95,8, 93,6 e 96,0%, respectivamente). Entretanto, nas análises estatísticas, os *scaffolds* não apresentaram diferenças significativas quanto ao número de células aderidas e às eficiências de adesão celular, mostrando que, estatisticamente, todos os *scaffolds* apresentaram

desempenho para cultivo semelhante quanto ao número de células aderidas e, conseqüentemente, quanto à capacidade de adesão de CEMs.



Eficiência de adesão celular (%)							
S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
88,2	86,6	91,3	95,8	93,6	86,9	92,8	90,6

Figura 4.19. Desempenho dos scaffolds na adesão celular das CEMs durante as primeiras 12 horas de cultivo. A. Estimativa do número de células aderidas em cada scaffold; B. Estimativa da eficiência de adesão celular para o tempo de 12 h.

A literatura apresenta várias referências que mostram que materiais com uma arquitetura porosa e interconectada são essenciais para emprego na medicina regenerativa, para que ocorra a adesão e a proliferação celular, a neovascularização e a difusão de nutrientes e metabólitos pela estrutura do material, eventos necessários para o processo de cicatrização de lesões (CHANDIKA et al., 2015; MURPHY e O' BRIEN, 2010). Além disso, Murphy e O'Brien (2010) sugerem que a área de superfície disponível na matriz também seja um fator fundamental para a fixação das células.

Desta forma, os dados de porosidade obtidos para os *scaffolds* no tópico 4.1.2 fundamentam a correlação entre a porosidade do material e a adesão celular.

4.2.4.2 Quantificação de glicose e lactato

Dentre as diversas vias metabólicas envolvidas no crescimento e na manutenção celular, a glicólise se destaca como principal fonte de carbono e energia para as células, com produção de lactato como metabólito, o qual apresenta potencial tóxico, podendo inibir o crescimento celular por reduzir o pH do meio (AMABLE e BUTLER, 2008; HASSEL, GLEAVE, BLUTER, 1991). Schop e colaboradores (2009) relataram a inibição do crescimento das CEMs em cultivos com acúmulo de lactato em concentrações acima de 35,4 mM. Em vista disso, o consumo de glicose e a produção de lactato podem ser utilizados como parâmetros que indicam a manutenção do crescimento celular (SCHOP et al., 2009).

As evoluções das concentrações de glicose e lactato no decorrer dos cultivos são exibidas na Figura 4.20, onde se observa que não houve o esgotamento de glicose e que as concentrações de lactato se mantiveram abaixo dos níveis inibitórios (SCHOP et al., 2009), em função das trocas de meio realizadas no tempo de 72 horas, indicados na Figura 4.20 pelo intenso aumento da concentração de glicose e a diluição de lactato. Nota-se também, na Figura 4.20, o declínio gradual da concentração de glicose e o crescimento da concentração de lactato, demonstrando o aumento no consumo de glicose e da produção de lactato pelas células, sendo maiores para as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf, sugerindo a presença de maiores densidades celulares nesses *scaffolds*.

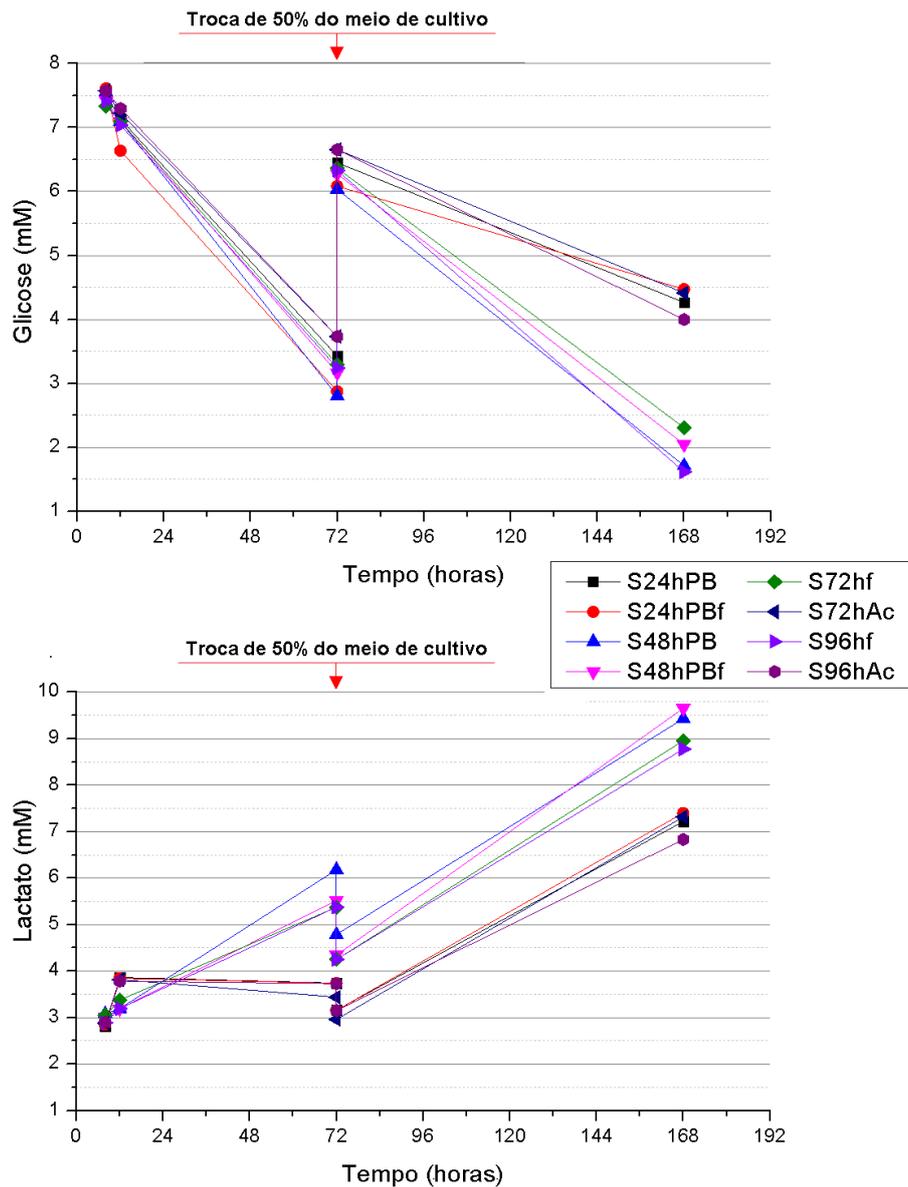


Figura 4.20. Curvas das concentrações de glicose e lactato para o cultivo de CEMs nos *scaffolds* ao longo de 168 horas.

As relações de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) permaneceram entre 0,96 e 1,45 $\text{mol}_{lac} \cdot \text{mol}_{gli}^{-1}$ (Tabela 4.5), sugerindo que as CEMs presentes em todos os *scaffolds* metabolizaram primariamente glicose através da rota de fosforilação oxidativa, uma vez que valores de $Y_{lac/gli}$ inferiores a 2,0 indicam essa rota preferencialmente como produção de energia (SCHOP et al., 2010).

Tabela 4.5. Relação de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) em 168 horas de cultivo.

Relação de produção de lactato e consumo de glicose – $Y_{lac/gli}$ ($mol_{lac} \cdot mol_{glic}^{-1}$)							
S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
1,36	1,45	0,96	1,02	1,12	1,31	0,97	1,05

4.2.4.3 Estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds* através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$)

Conforme mencionado anteriormente (tópico 4.2.4.2), a concentração de nutrientes no cultivo, como a glicose, pode ser relacionada à densidade celular. Desta forma, os dados de consumo de glicose foram empregados para obter o valor de $Y_{x/s}$. Vale ressaltar que o metabolismo celular se mantém constante quando as variações ambientais são pequenas, refletindo em um mesmo valor de $Y_{x/s}$. Dessa forma, as curvas padrão para determinação de $Y_{x/s}$ (Figura 4.21) foram obtidas por meio de cultivos em condições muito similares às dos cultivos nos *scaffolds*.

As estimativas dos números de células nos *scaffolds* durante os cultivos foram feitas com base nos valores de $Y_{x/s}$. Devido ao grande número de amostras a serem cultivadas (8 tipos de *scaffolds*, com $n = 3$ para cada *scaffold* em cada tempo de análise), os experimentos foram executados em dois grupos, A e B (grupo A: S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc e grupo B: S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf), havendo a necessidade de realizar dois conjuntos de experimentos para calcular os valores de $Y_{cél/glic}$. Assim, os resultados obtidos para estes grupos estão exibidos na Figura 4.21, apresentando a relação entre o número de células, a concentração de glicose e a concentração de lactato ao longo de 120 horas.

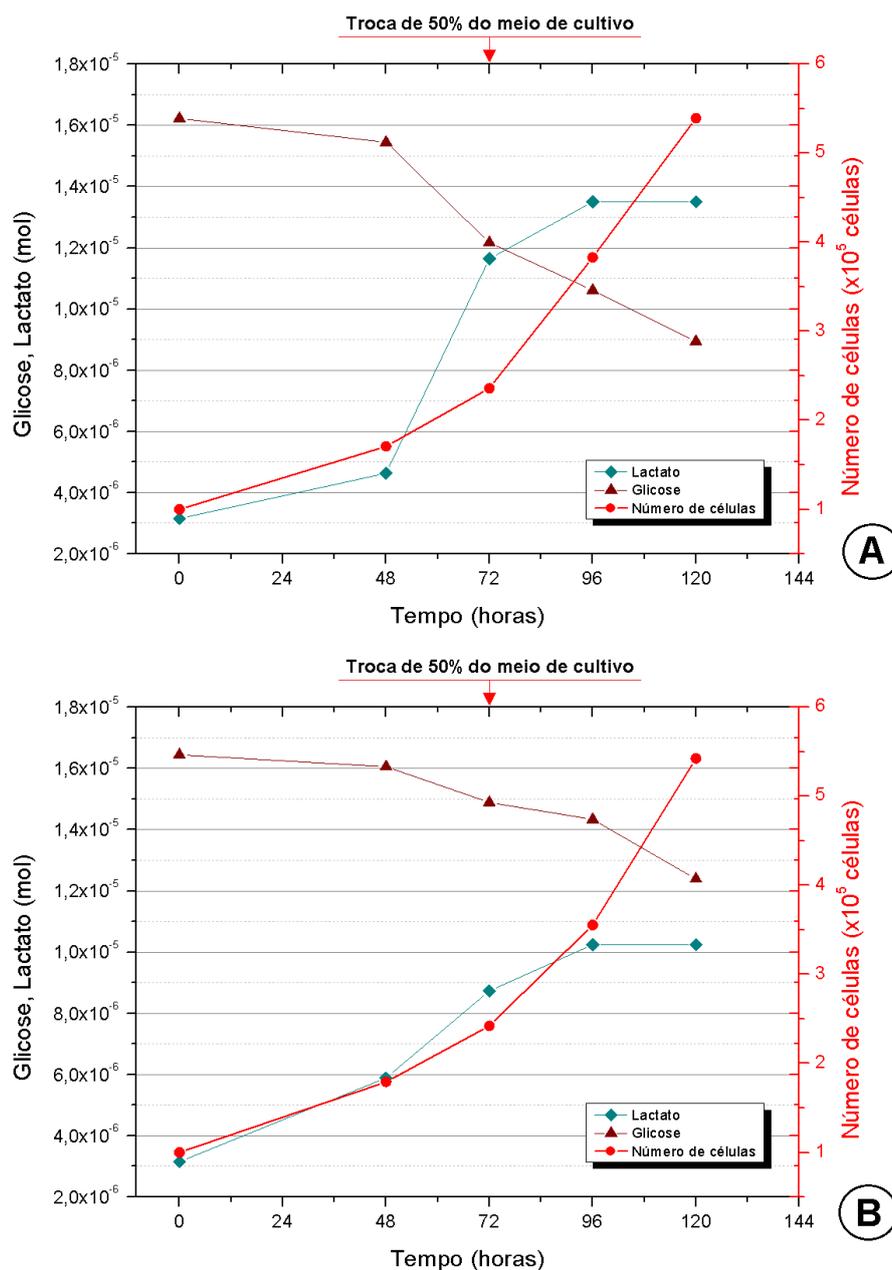


Figura 4.21. Resultados dos experimentos realizados em placas de poliestireno de 24 poços tratadas para promover a adesão celular. O número de células foi determinado por hemocitômetro e a quantificação de glicose e lactato através de medidas no analisador YSI-7100MBS. A. Experimento para o grupo A relacionado às amostras S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc. B. Experimento para o grupo B relacionado às amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf.

Os coeficientes de rendimento ($Y_{x/s}$) obtidos na fase de crescimento exponencial foram calculados através da equação do tópico 3.3.7.3. Valores de $Y_{\text{cel/glic}} = 7,128 \times 10^{10}$ e $8,348 \times 10^{10}$ células/mol de glicose consumida foram obtidos para os grupos A e B, respectivamente, como se demonstra na figura 4.22. Os coeficientes $Y_{\text{cel/glic}}$ mostraram-se bastante confiáveis, já que as correlações entre as variáveis apresentaram valores de 0,987 e 0,981. Dessa

forma, foi padronizada a utilização do coeficiente $Y_{\text{cel/glic}}$ como método confiável para a estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds*.

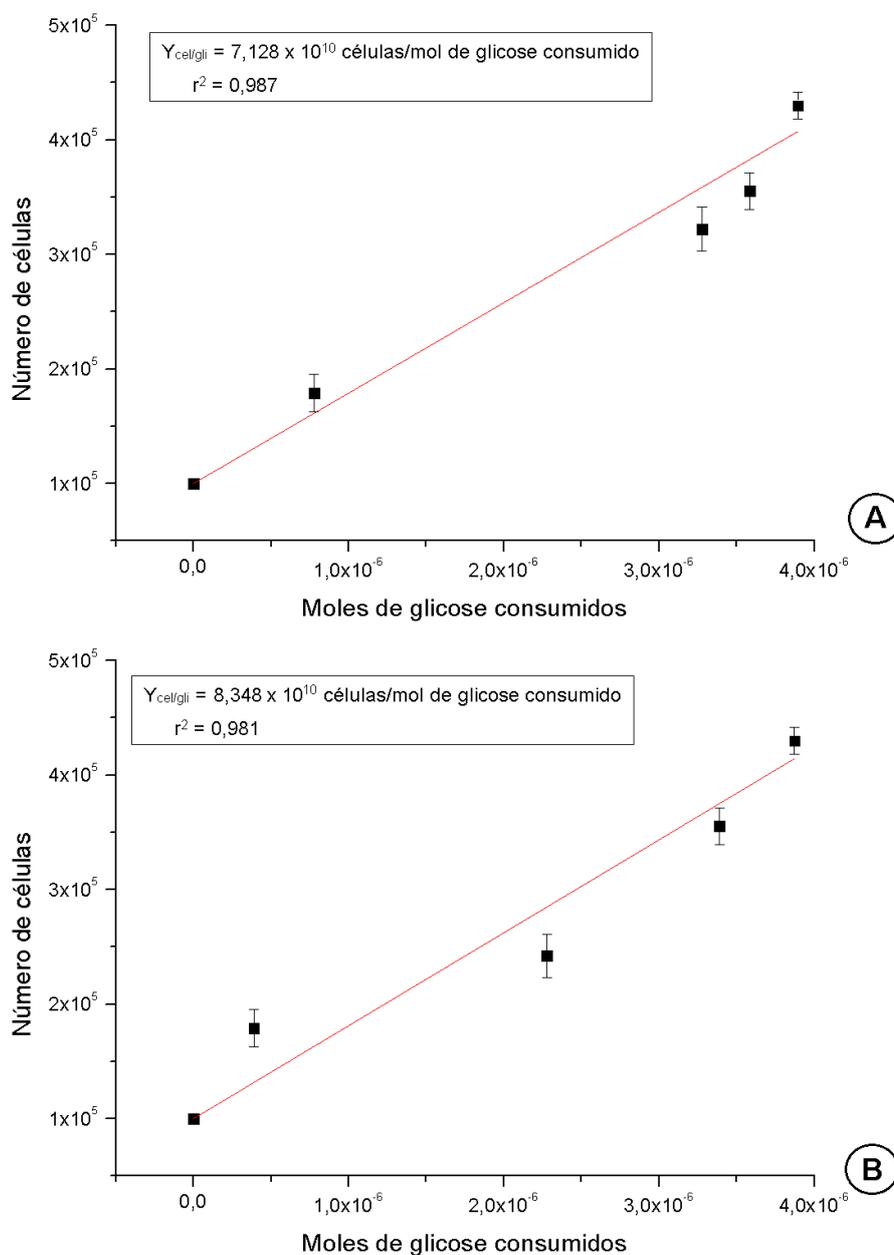


Figura 4.22. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{\text{cel/gli}}$ utilizando dados das CEMs. Onde A: grupo A (S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc), e B: grupo B (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf).

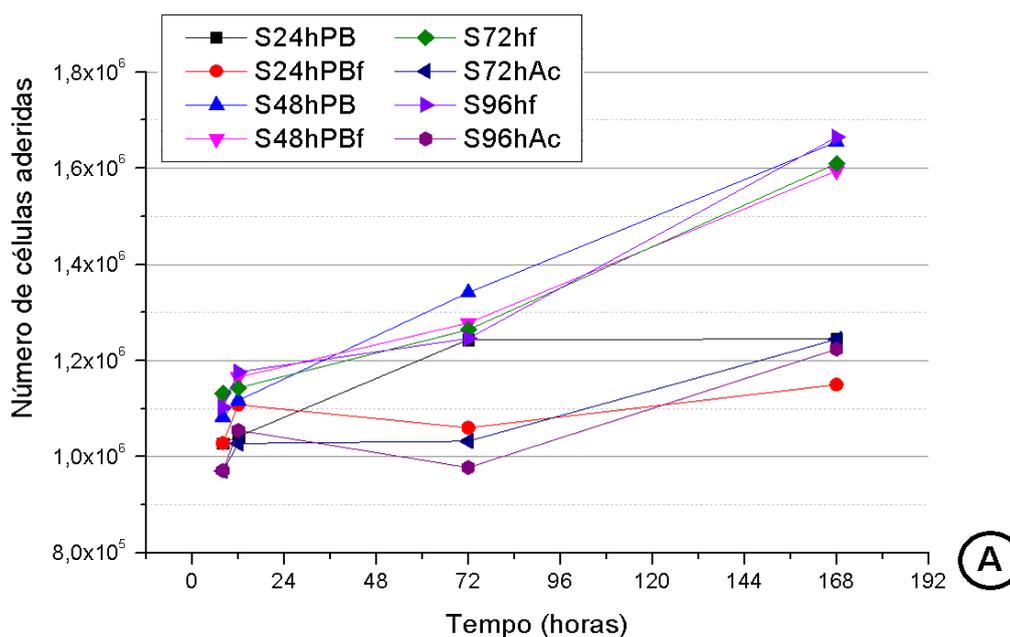
Deste modo, os números de células nas amostras foram estimados através dos valores obtidos de $Y_{\text{cel/glic}}$ na equação do tópico 3.3.7.3. Entretanto, através desta equação, são obtidos os números totais de células no cultivo, incluindo àquelas aderidas aos *scaffolds* e em suspensão. Desses valores

foram subtraídos dos números de células em suspensão para cada amostra, obtidos por contagem por hemocitômetro, disponíveis na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Número de células totais nas suspensões de cada amostra

Números totais de células em suspensão ($\times 10^4$ células)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
8	8,8 \pm 5,7	7,5 \pm 2,3	4,7 \pm 1,9	2,8 \pm 1,7	3,5 \pm 1,4	13,8 \pm 7,1	5,2 \pm 1,2	13,7 \pm 6,6
12	13,0 \pm 4,9	13,4 \pm 8,6	9,0 \pm 4,5	4,2 \pm 0,7	6,4 \pm 1,1	13,1 \pm 6,2	7,3 \pm 3,8	9,3 \pm 2,1
72	21,1 \pm 5,0	20,4 \pm 5,4	7,9 \pm 3,4	8,2 \pm 1,5	7,4 \pm 3,4	20,7 \pm 4,1	9,4 \pm 4,7	37,1 \pm 1,4
168	6,7 \pm 2,3	8,0 \pm 2,4	6,7 \pm 2,8	11,2 \pm 5,4	6,8 \pm 2,5	8,3 \pm 3,9	12,3 \pm 6,2	16,3 \pm 5,0

Nas curvas do crescimento celular na Figura 4.23, iniciadas às 8 horas de cultivo, quando as primeiras análises de adesão celular nas amostras foram realizadas, valores de adesão de cerca de 8,66 a 9,60 $\times 10^5$ células (disponíveis no item 4.2.1) foram obtidas após 12 horas de cultivo nos *scaffolds*. O crescimento celular pode ser observado ao longo do tempo em todas as amostras (Figura 4.23A), ocorrendo em maior intensidade no grupo B (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf), que demonstraram maiores números de células aderidas ao final do cultivo, sendo em 1,65, 1,59, 1,61 e 1,66 $\times 10^6$ células, respectivamente (Figura 4.23B).



Números de células aderidas aos scaffolds ($\times 10^6$ células)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
8	1,03 ^a	1,03 ^a	1,08 ^b	1,16 ^b	1,13 ^b	0,96 ^c	1,10 ^b	0,97 ^c
12	1,04 ^{a,b}	1,11 ^{a,b}	1,12 ^{a,b}	1,17 ^{a,b}	1,14 ^{a,b}	1,01 ^a	1,16 ^b	1,05 ^{a,b}
72	1,24 ^a	1,06 ^b	1,34 ^a	1,28 ^a	1,26 ^a	1,03 ^b	1,25 ^a	0,98 ^b
168	1,24 ^a	1,15 ^a	1,65 ^b	1,59 ^b	1,61 ^b	1,24 ^a	1,66 ^b	1,22 ^a

Figura 4.23. Estimativas do crescimento celular nos scaffolds. A. Curvas de crescimento das células aderidas ao longo do tempo de 168 horas, B. Valores das estimativas do número de células aderidas aos scaffolds.

Letras iguais nos valores de cada linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de células nos scaffolds (Tukey, $p < 0,05$).

O fator de expansão celular (FE) para cada scaffold (Figura 4.24) pôde ser calculado empregando, na equação do tópico 3.3.7.3, os dados estimados dos números de células aderidas nos tempos de 8 e 168 horas (disponíveis na Figura 4.23). Na Figura 4.24 estão representados os valores de FE para cada amostra, indicando o grupo B (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf) como o que proporcionou os maiores valores de expansão celular. A análise estatística permitiu identificar que existe diferença significativa entre dos dois grupos, confirmando que o FE celular foi maior para as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf, do grupo B.

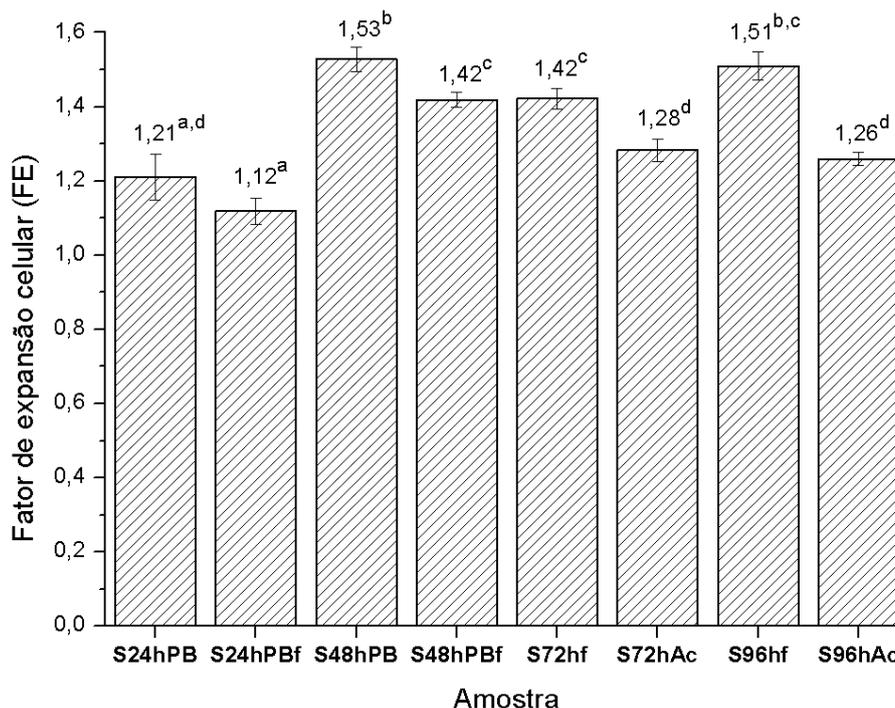


Figura 4.24. Fator de expansão celular de cada *scaffold* analisado no tempo de 168 horas. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

É interessante ressaltar que as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf exibiram melhores condições de poros superficial e interconectados (tópico 4.1.1), e maiores porosidades medidas (tópico 4.1.2), confirmando a influência desses fatores em favorecer os processos de adesão e crescimento celular.

4.2.5 Réplica do cultivo *in vitro* de CEMs nos *scaffolds*

4.2.5.1 Adesão celular

Para obter dados mais precisos e acompanhar a proliferação celular por um maior período, os experimentos com as CEMs foram novamente realizados ao longo de 336 horas de cultivo. Dessa forma, as suspensões de cada amostra foram novamente analisadas por contagem de células em hemocítômetro. Na Figura 4.25, são exibidos os números de células viáveis e não viáveis após 12 horas. Nota-se que as amostras S24hPB, S72hAc e S96hAc foram as que apresentaram maiores números de células totais em suspensão.

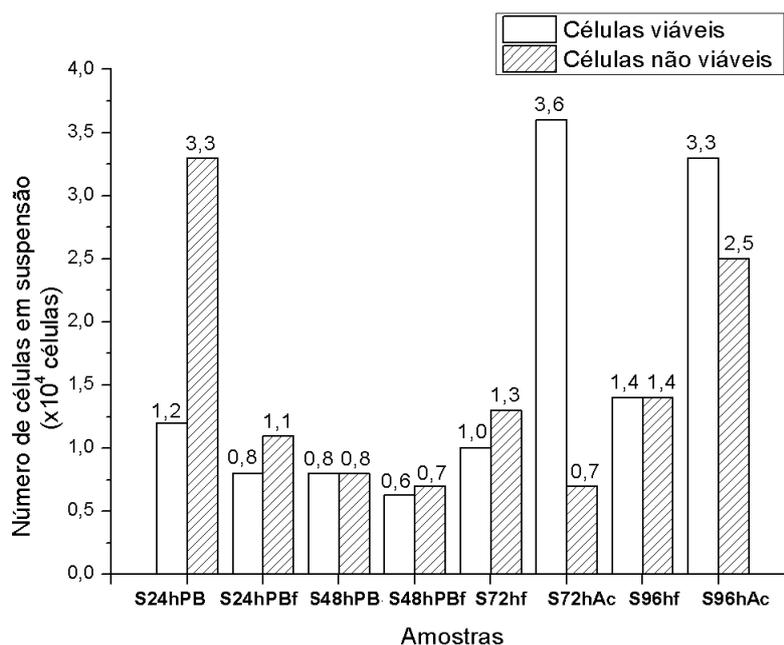
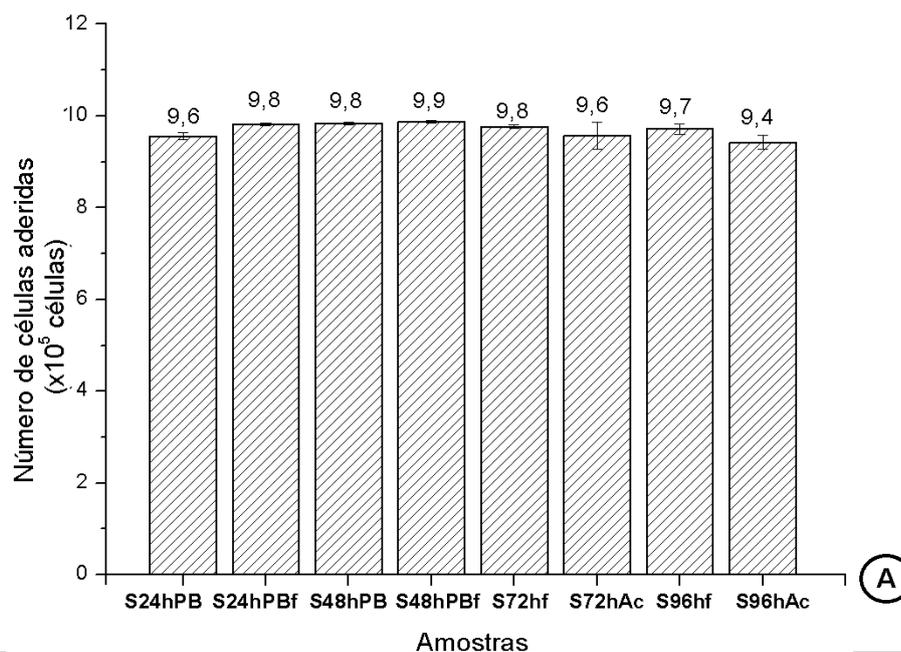


Figura 4.25. Número de células viáveis e não viáveis presentes nas suspensões quantificadas por hemocítometro no tempo de 12 horas de cultivo das CEMs.

Com os dados do número de células totais (viáveis e não viáveis), em cada scaffold, estimou-se o número de células aderidas e a eficiência de adesão em cada amostra para o tempo de 12 horas, sendo os resultados exibidos na Figura 4.26. Todas as amostras apresentaram valores semelhantes de células aderidas, entre $9,4$ e $9,9 \times 10^5$ células. Conseqüentemente, a eficiência de adesão apresentou valores próximos, entre 94,3 e 98,7%. Os dados demonstraram números estatisticamente semelhantes de células aderidas, indicando semelhança na capacidade de adesão das CEMs.



Eficiência de adesão celular (%)							
S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
95,6	98,1	98,5	98,7	97,7	95,7	97,2	94,3

Figura 4.26. Desempenho dos *scaffolds* na adesão celular das CEMs. A. Estimativa do número de células aderidas em cada *scaffold* em 12 horas; B. Eficiência de adesão celular para o tempo de 12 horas.

Os dados da Figura 4.26 apresentaram valores maiores do que aqueles obtidos nos cultivos do item anterior. Entretanto, as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf ainda apresentaram maiores números de células aderidas e eficiências de adesão, com exceção dos resultados obtidos para a amostra S24hPBf, que demonstrou maior capacidade de adesão em comparação às amostras S72hf e S96hf.

3.2.5.2 Quantificação de glicose e lactato

O consumo de glicose e a produção de lactato foram avaliados ao longo do cultivo de 336 horas, sendo os perfis de concentração dos nutrientes apresentados na Figura 4.27. Novamente, observou-se que não ocorreu esgotamento de glicose e que as concentrações de lactato permaneceram abaixo dos níveis inibitórios (SCHOP et al., 2009) em função das trocas de meio realizadas a cada 48 horas (iniciada em 72 horas de cultivo) indicados nas curvas pelo intenso aumento da concentração de glicose e diluição de lactato.

Nota-se que as curvas de glicose e lactato (Figura 4.27) apresentaram perfis semelhantes aos obtidos nos cultivos anteriores (Figura 4.20), com menores concentrações de glicose (ou seja, maior consumo) e maiores concentrações/produções de lactato para as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf ao final do cultivo (336 horas).

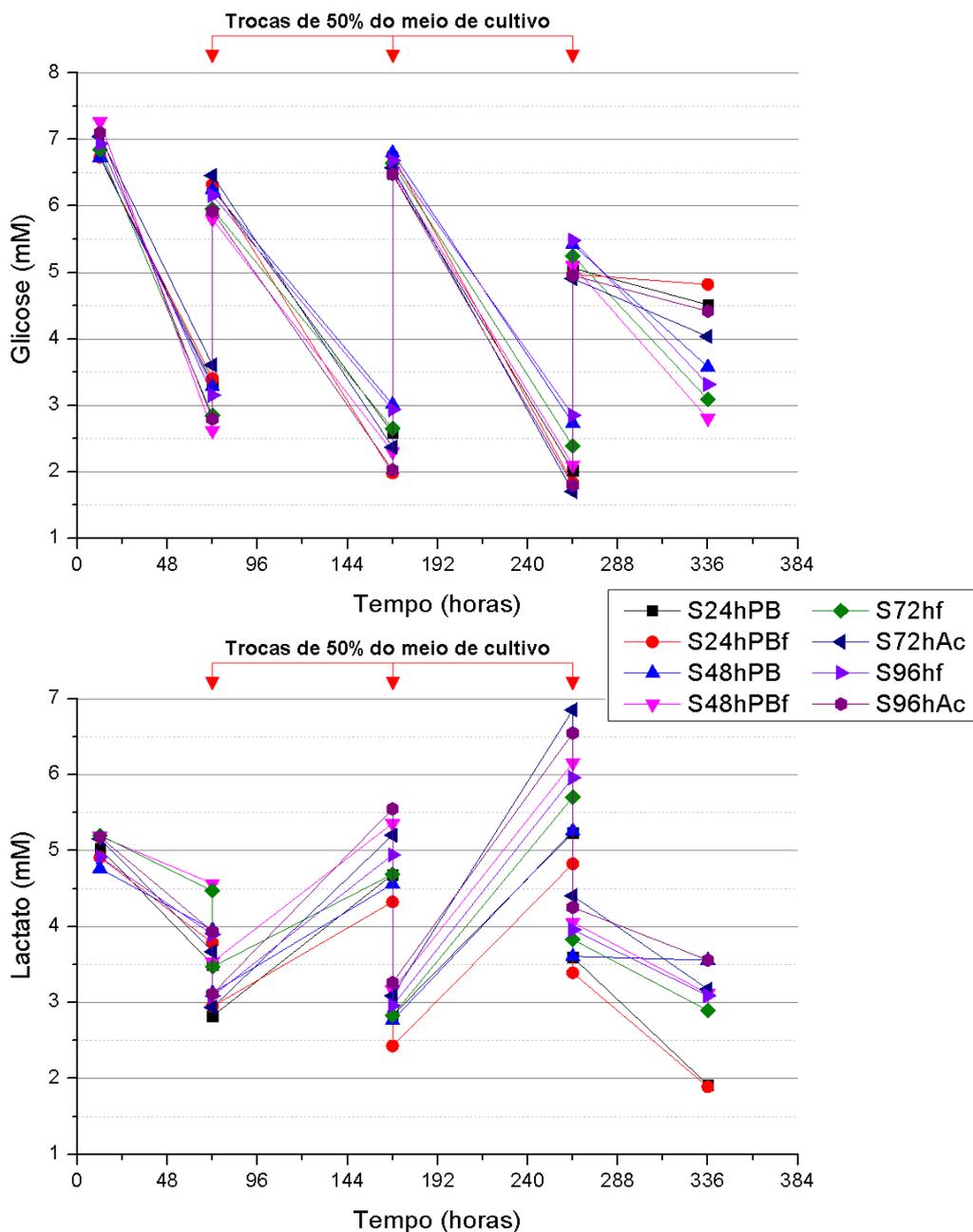


Figura 4.27. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo de CEMs nos *scaffolds* durante 336 horas.

A relação de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) para a maioria das amostras permaneceu menor que $2,0 \text{ mol}_{lac} \cdot \text{mol}_{gli}^{-1}$ durante todos

os períodos analisados (Tabela 4.7), demonstrando que as células utilizaram a rota de fosforilação oxidativa para metabolizar a glicose (SCHOP et al., 2010). No entanto, as amostras S24hPBf, S48hPB, S72hf, S72hAc e S96hf apresentaram valores de $Y_{lac/gli}$ acima de 2,0, indicando que as CEMs utilizaram a rota glicólise como produção de energia.

Tabela 4.7. Relação de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) em 72, 168 e 336 horas de cultivo

Relação de produção de lactato e consumo de glicose – $Y_{lac/gli}$ ($mol_{lac} \cdot mol_{gli}^{-1}$)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
72	1,86	2,32	2,47	1,85	2,24	2,09	2,02	1,70
168	1,02	0,78	0,90	1,04	0,85	1,12	1,18	1,29
336	0,81	1,42	1,54	1,02	1,02	1,53	1,15	2,26

4.2.5.3 Estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds* através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$)

Novamente, assim como no tópico 4.2.4.3, os dados das concentrações de glicose obtidos em experimentos realizados em paralelo ao cultivo nos *scaffolds* foram aplicados para obter-se o valor de $Y_{x/s}$. Dessa forma, as curvas para cálculo de $Y_{cel/gli}$ foram construídas em condições semelhantes, sendo os resultados correspondentes ao número de células, concentrações de glicose e de lactato ao longo de 96 horas (Figura 4.28).

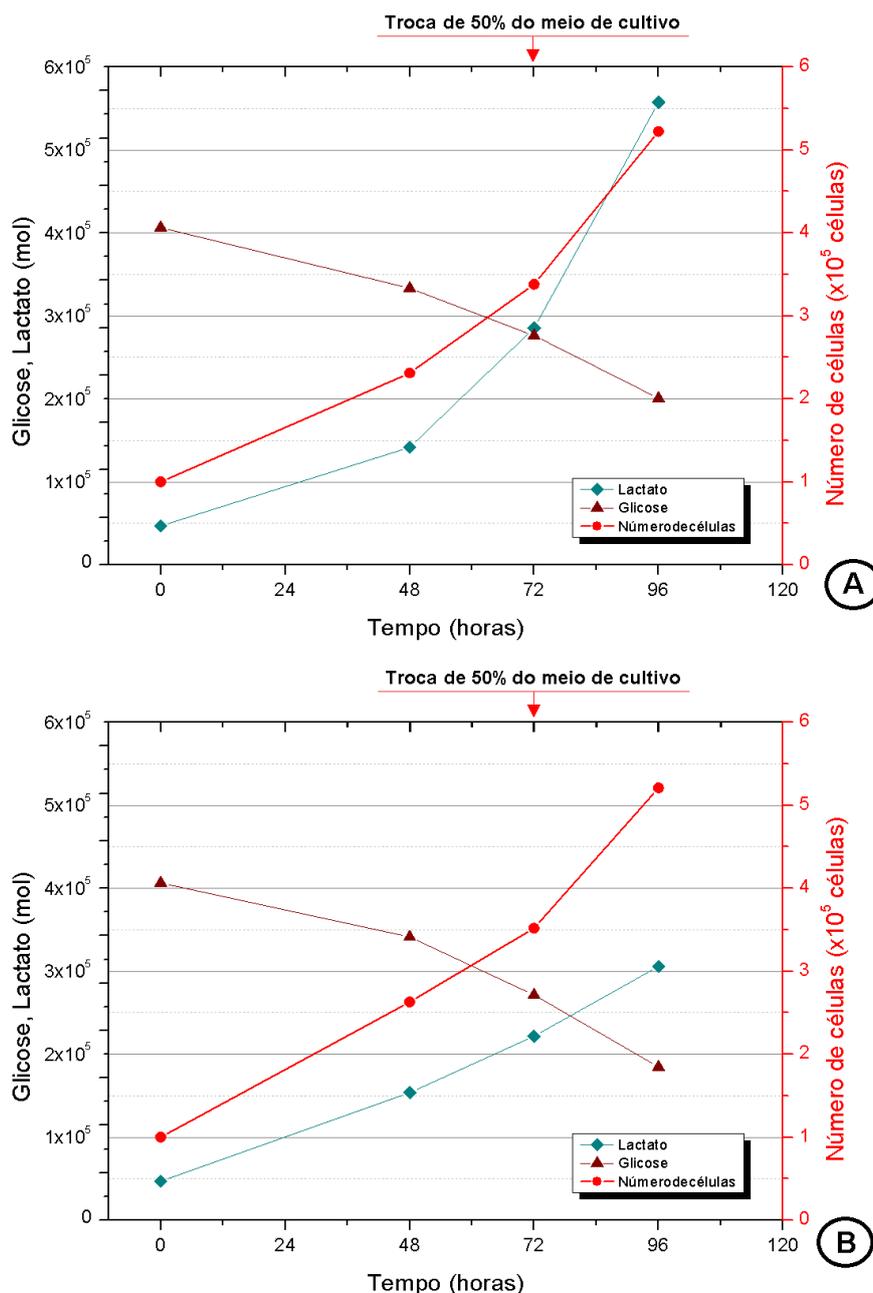


Figura 4.28. Resultados dos experimentos para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para CEMs. A. Experimento para o grupo A relacionado às amostras S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc. B. Experimento para o grupo B relacionado às amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf.

A partir dos dados gerados, os coeficientes de rendimento ($Y_{x/s}$) foram calculados (tópico 3.3.7.3) para os grupos A e B, obtendo-se os valores de $Y_{cel/glc} = 8,577 \times 10^{10}$ e $9,106 \times 10^{10}$ células/mol de glicose consumida, respectivamente para cada grupo (Figura 4.29). Os coeficientes $Y_{cel/glic}$ mostraram-se confiáveis, com correlações entre as variáveis apresentaram valores de 0,931 e 0,984. Dessa forma, foi padronizada a utilização do

coeficiente $Y_{\text{cel/glic}}$ como método confiável para a estimativa do número de células aderidas.

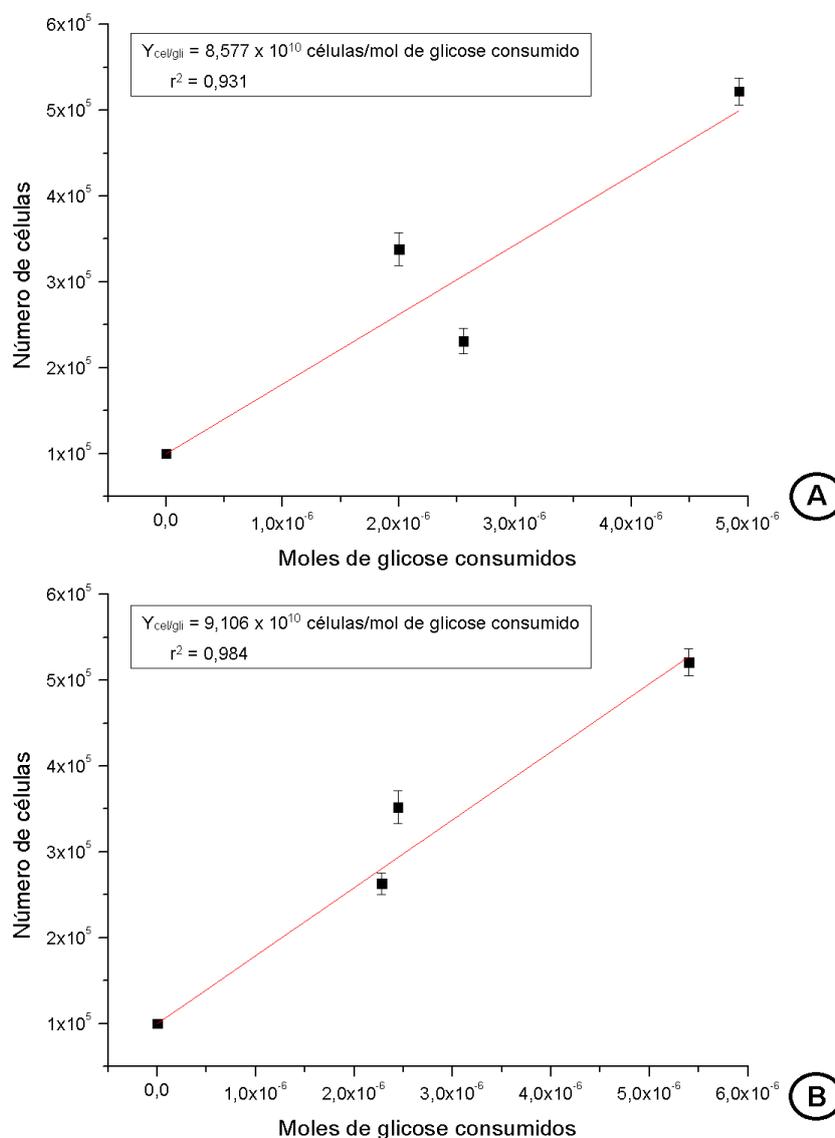


Figura 4.29. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{\text{cel/gli}}$ utilizando dados das CEMs. Onde A: grupo A (S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc), e B: grupo B (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf).

A partir do coeficiente de rendimento ($Y_{\text{cel/gli}}$) estimou-se o número de células totais (aderidas e suspensas) presentes nos cultivos e o número de células aderidas em cada *scaffold* por diferença, considerando que o número de células em suspensão, obtidos por contagem em hemocitômetro. Os resultados são apresentados na Tabela 4.8.

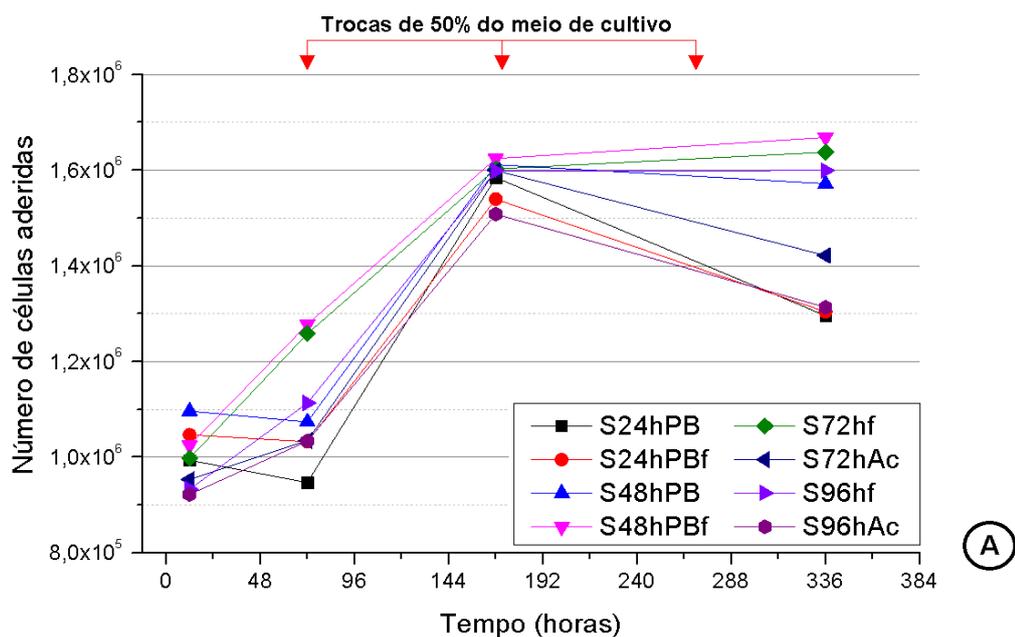
Tabela 4.8. Número de células totais nas suspensões de cada amostra.

Número de células totais nas suspensões ($\times 10^4$ células)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
12	4,4 \pm 2,6	1,9 \pm 1,1	1,6 \pm 0,9	1,3 \pm 0,7	2,3 \pm 1,7	4,3 \pm 0,9	2,8 \pm 1,2	5,8 \pm 0,3
72	5,5 \pm 1,0	2,5 \pm 0,4	2,5 \pm 0,1	2,4 \pm 0,6	1,6 \pm 0,7	4,5 \pm 0,9	2,6 \pm 0,4	9,0 \pm 0,3
168	4,9 \pm 0,3	3,7 \pm 0,01	1,2 \pm 0,1	1,3 \pm 0,07	1,6 \pm 0,05	4,4 \pm 0,02	2,6 \pm 0,03	4,5 \pm 0,03
336	4,1 \pm 0,9	3,0 \pm 1,3	1,6 \pm 0,9	0,9 \pm 0,7	0,9 \pm 1,1	1,4 \pm 0,1	1,4 \pm 1,2	4,0 \pm 0,5

Na Figura 4.30A, estão exibidas as curvas de crescimento celular iniciadas em 12 horas e finalizadas em 336 horas. Nota-se que todas as amostras apresentaram crescimento celular ao longo de 168 horas, entretanto, as amostras apresentaram números de células aderidas estatisticamente iguais para esse tempo de análise, com valores entre 1,51 e 1,62 $\times 10^6$ células aderidas (Figura 4.30B).

Ainda na Figura 4.30, pode ser observada uma queda do número de células após 168 horas de cultivo para todas as amostras do grupo A (S24hPB, S24hPBf, S72hAc e S96hAc), e as amostras do grupo B demonstraram crescimento (S48hPBf e S72hf) ou estabilidade (S48hPB e S96hf). É provável que essa queda esteja relacionada com a morte celular ocasionada por um ou mais fatores, como a maior espessura das membranas, o que pode dificultar a passagem de nutrientes através da matriz podendo levar ao estresse oxidativo.

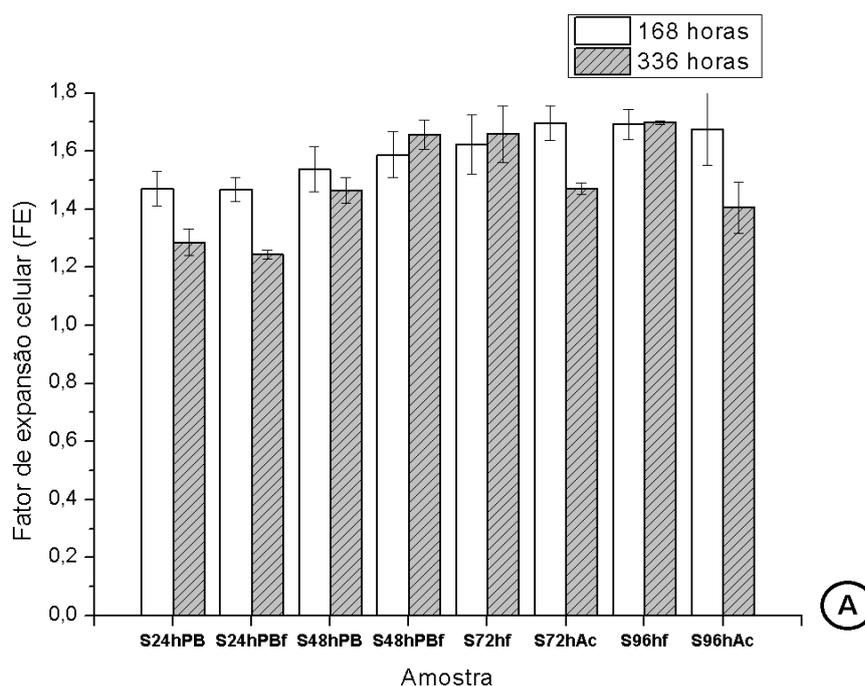
Em conformidade com os resultados encontrados no tópico 4.2.4.3, as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf (grupo B) exibiram melhores resultados de crescimento celular ao longo do cultivo, se estendendo até o final do experimento em 336 horas. Confirmando que essas são as indicadas para os experimentos de crescimento celular.



Números de células aderidas aos scaffolds ($\times 10^6$ células)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
12	0,99 ^{a,c}	1,05 ^{a,b}	1,10 ^b	1,02 ^{a,b,c}	0,99 ^{a,b,c}	1,09 ^c	0,93 ^c	0,92 ^c
72	0,95 ^a	1,03 ^a	1,07 ^{a,b}	1,28 ^b	1,26 ^b	1,03 ^a	1,11 ^{a,b}	1,03 ^a
168	1,58 ^a	1,54 ^a	1,61 ^a	1,62 ^a	1,60 ^a	1,58 ^a	1,60 ^a	1,51 ^a
336	1,30 ^a	1,30 ^a	1,57 ^b	1,67 ^b	1,64 ^b	1,42 ^c	1,60 ^b	1,31 ^a

Figura 4.30. Estimativas do crescimento celular nos scaffolds. A. Curvas de crescimento das células aderidas ao longo do tempo de 336 horas, B. Valores das estimativas de crescimento das células aderidas. Letras iguais nos valores de cada linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de células nos scaffolds (Tukey, $p < 0,05$).

Através dos dados de adesão celular o fator de expansão celular (FE) para cada scaffold foi obtido, conforme dados da Figura 4.31. Nota-se que as amostras do grupo B (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf) exibiram maiores valores de expansão celular em ambos os períodos avaliados.



Fator de expansão celular (FE)								
Tempo (horas)	S24hPB	S24hPBf	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S72hAc	S96hf	S96hAc
168	1,47 ^a	1,47 ^a	1,54 ^a	1,59 ^b	1,62 ^b	1,70 ^b	1,69 ^b	1,68 ^b
336	1,29 ^a	1,24 ^a	1,47 ^b	1,66 ^c	1,66 ^c	1,47 ^b	1,70 ^c	1,41 ^{a,b}

Figura 4.31. Fator de expansão celular de CEMs para cada *scaffold* analisado nos tempos de 168 e 336 horas. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

4.2.5.4 Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* cultivados com CEMs

As imagens realizadas em MEV dos *scaffolds* cultivados com CEMs após 72 horas estão apresentadas nas Figuras 4.32, 4.33 e 4.34 e 4.35. Na Figura 4.32, estão dispostas as imagens gerais em um aumento de x100, onde notam-se regiões com presença de células (indicadas pelas setas). Nas Figuras 4.32E e G, referentes às amostras S72hf e S96hf, apresentam-se regiões com maior quantidade de células, com maior concentração celular nas regiões de bordas entre os poros e presença de formação de uma rede abaixo das células, provavelmente MEC e fibras de colágeno. A maior quantidade de células nestas amostras corrobora com os dados de quantificação e produtividade celular. Entretanto, nas amostras S48hPB e S48hPBf (Figuras

4.32C e D) não são observadas grandes presenças de células, o que pode estar relacionado com as alterações superficiais observadas, considerando que essas amostras apresentam superfícies mais planas e com menor dispersão de poros. Também é possível que o método de tratamento das amostras e sua subsequente observação sob alto vácuo tenha prejudicado e/ou removido parte das células presentes nesses *scaffolds*.

Nota-se nas imagens da Figura 4.33, conforme indicado pelas setas, a distribuição de grande quantidade de células de morfologia esférica e com intensa presença de MEC, organizadas em aglomerados em algumas regiões nas Figuras 4.33A e B (amostras S24hPB e S24hPBf); aderidas nas bordas entre os poros sobre fibras de colágeno nas Figuras 4.33E e G (amostras S72hf, S96hf), e com menor quantidade de células na Figura 4.33H (S96hAc). Nas Figuras 4.33C e F é possível observar células mais dispersas, com aspectos alongados e prolongamentos que indicam adesão e acomodação das células sobre as superfícies nas amostras S48hPB e S72hAc.

As regiões com células aderidas aos *scaffolds* podem ser mais bem observadas nas Figuras 4.33, 4.34, 4.35 e 4.36, em aumentos superiores (imagens de x250, x500 e x1800). Nestas imagens, notam-se células aglomeradas aderidas às superfícies (Figuras 4.33B e 4.34B), sobre as fibras de colágeno (Figuras 4.33C e F e 4.35A e B) e intensa presença de provável matriz extracelular (MEC) (Figuras 4.33 e 4.34A e B). As setas vermelhas sinalizam os locais de ligação entre as células e as fibras de colágeno e as setas amarelas sinalizam a presença de células com morfologia alongada.

As imagens de MEV permitiram observar que as células assumem uma morfologia alongada ao aderirem em superfícies mais planas, como em S48hPB e S72hAc (Figuras 4.33C e F, e 4.34F), e morfologias mais esféricas quando aderidas nas superfícies entre os poros e/ou nas fibras de colágeno. A influência da rugosidade superficial na morfologia celular foi relatada no estudo de Jenkins e Little (2019), onde em superfícies mais planas as células apresentaram morfologias mais diversas, enquanto em superfícies rugosas foram predominantes as formas celulares esféricas. As diferenças morfológicas das CEMs podem estar relacionadas à adesão celular e/ou diferenciação sofrida pelas células.

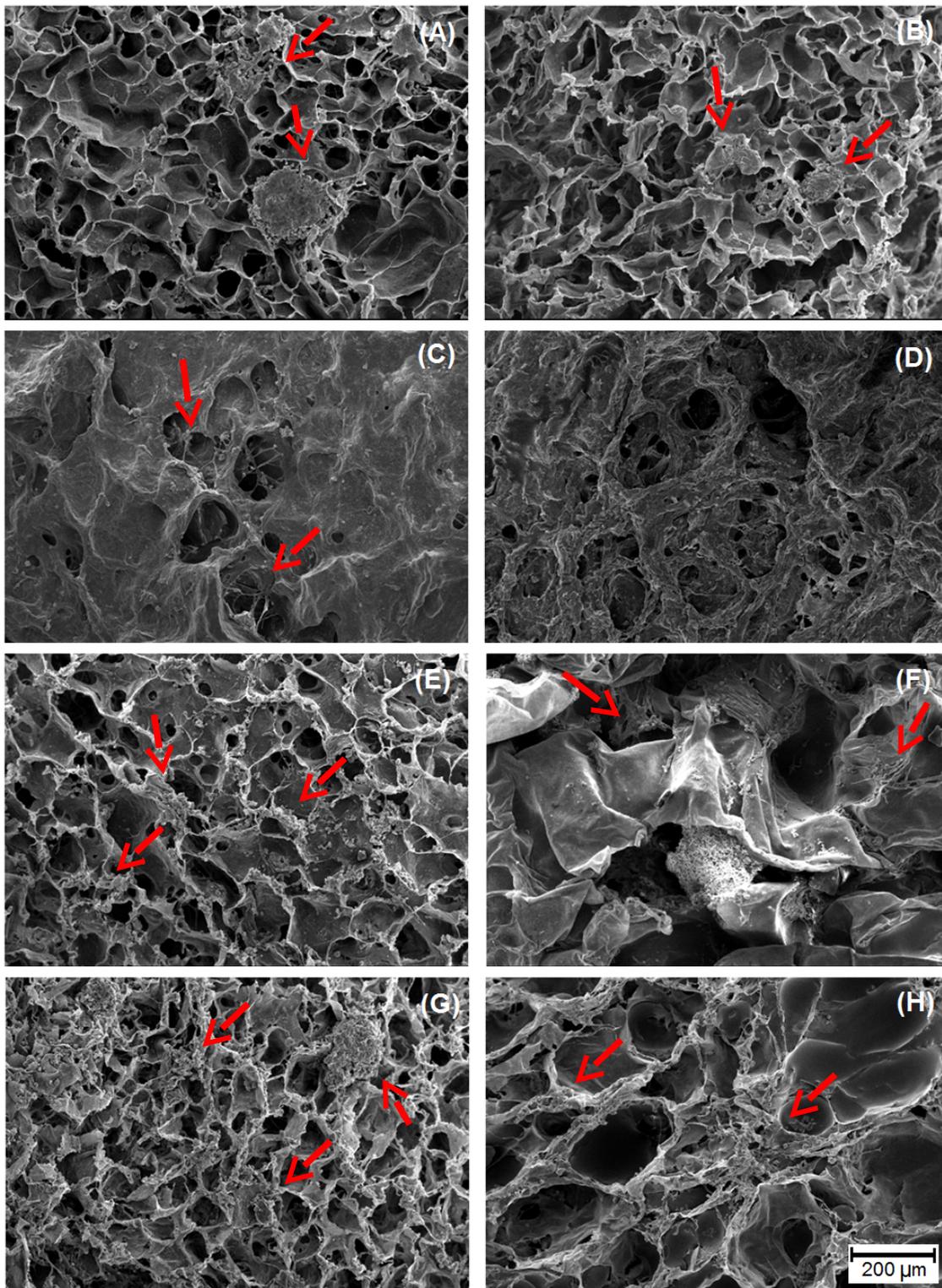


Figura 4.32. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com CEMs durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc. Realizadas com aumento de x100. As setas indicam regiões com presença de células aderidas.

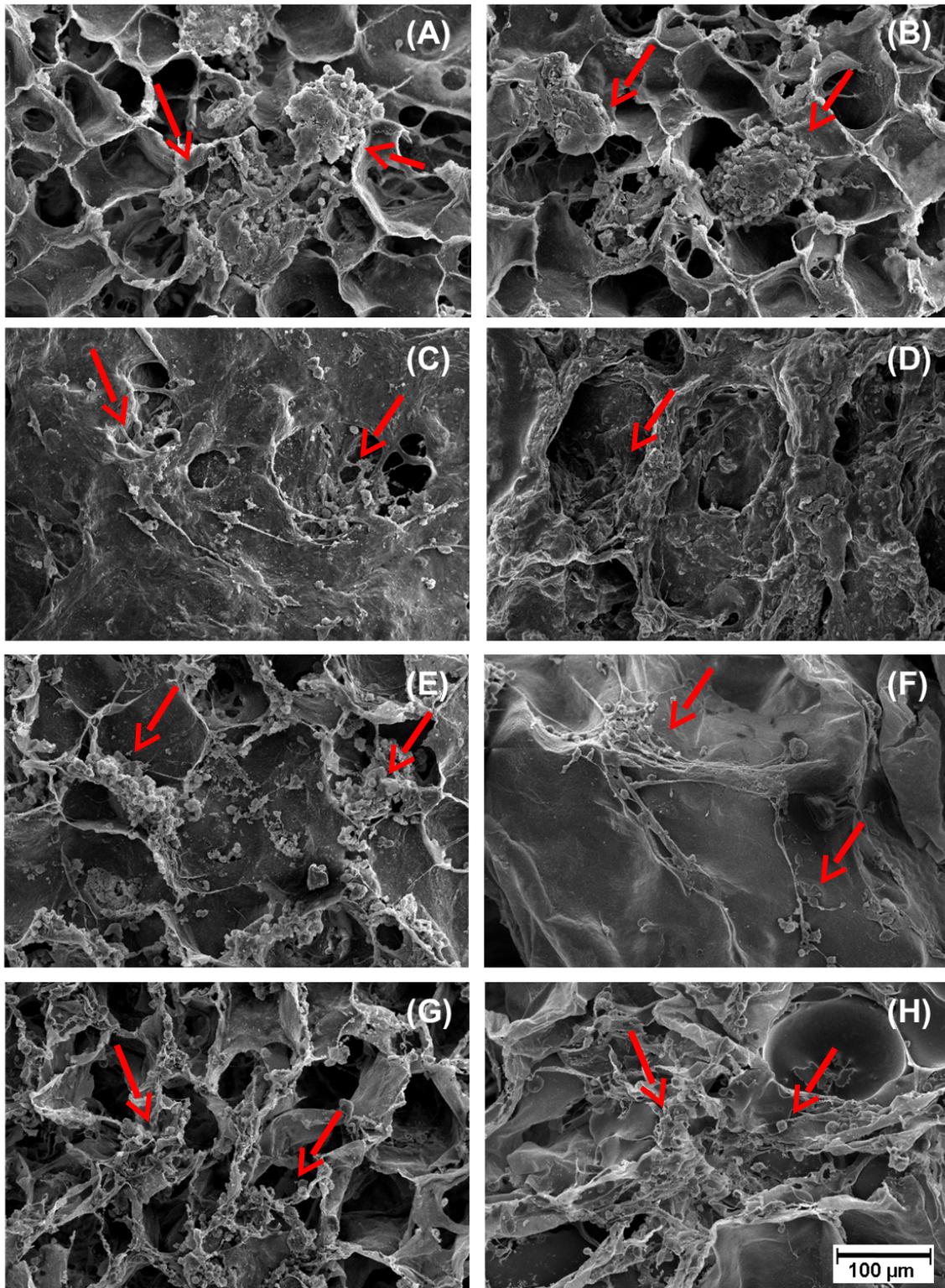


Figura 4.33. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com CEMs. Obtidas no aumento de 250x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc. Realizadas com aumento de x250. Setas indicam em: A e B = aglomerados celulares; C e F = células alongadas; E, G e H = células aderidas às fibras de colágeno. As setas indicam regiões com presença de células aderidas.

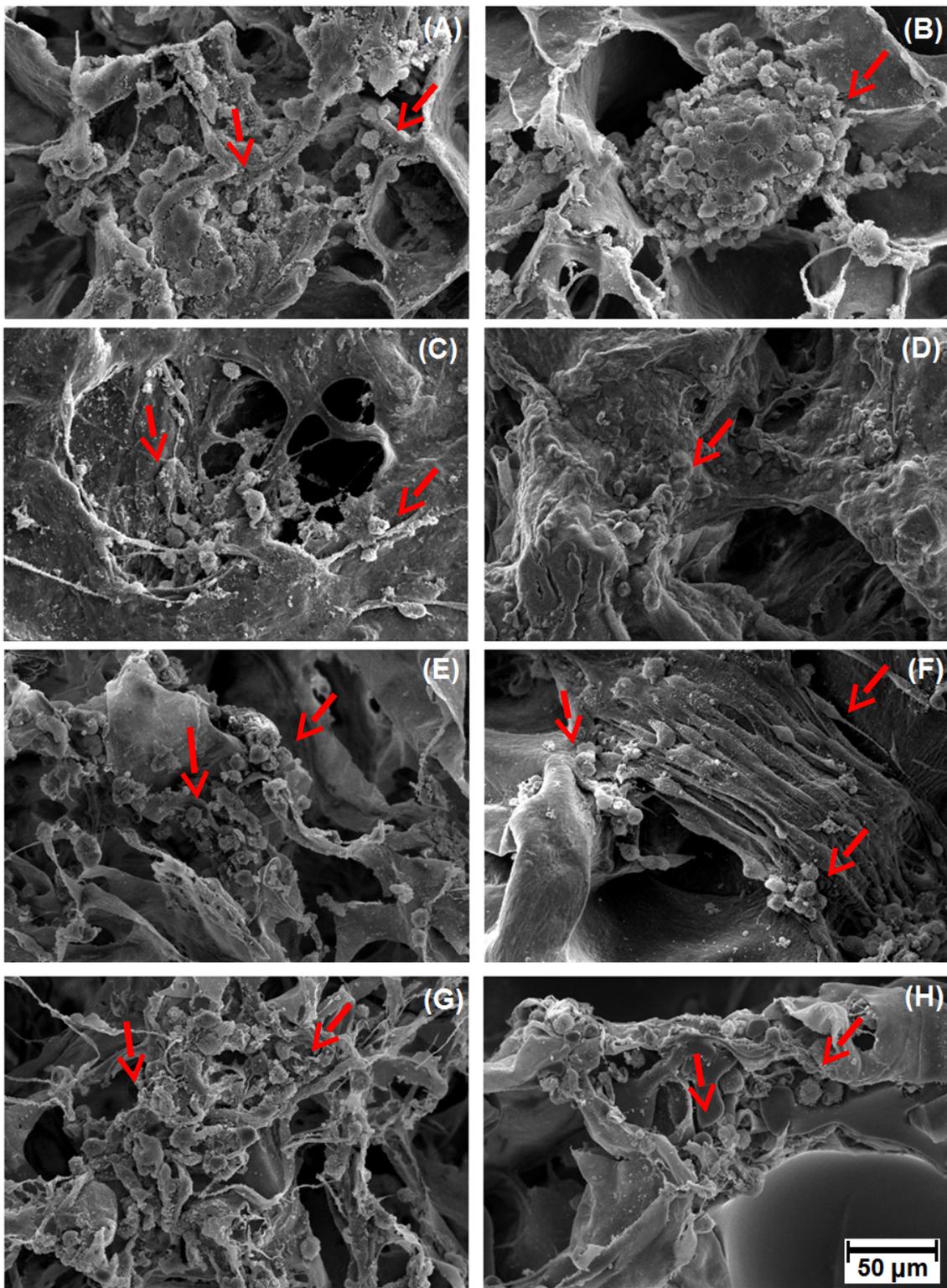


Figura 4.34. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com CEMs. Obtidas no aumento de 500x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc. As setas indicam regiões com presença de células aderidas.

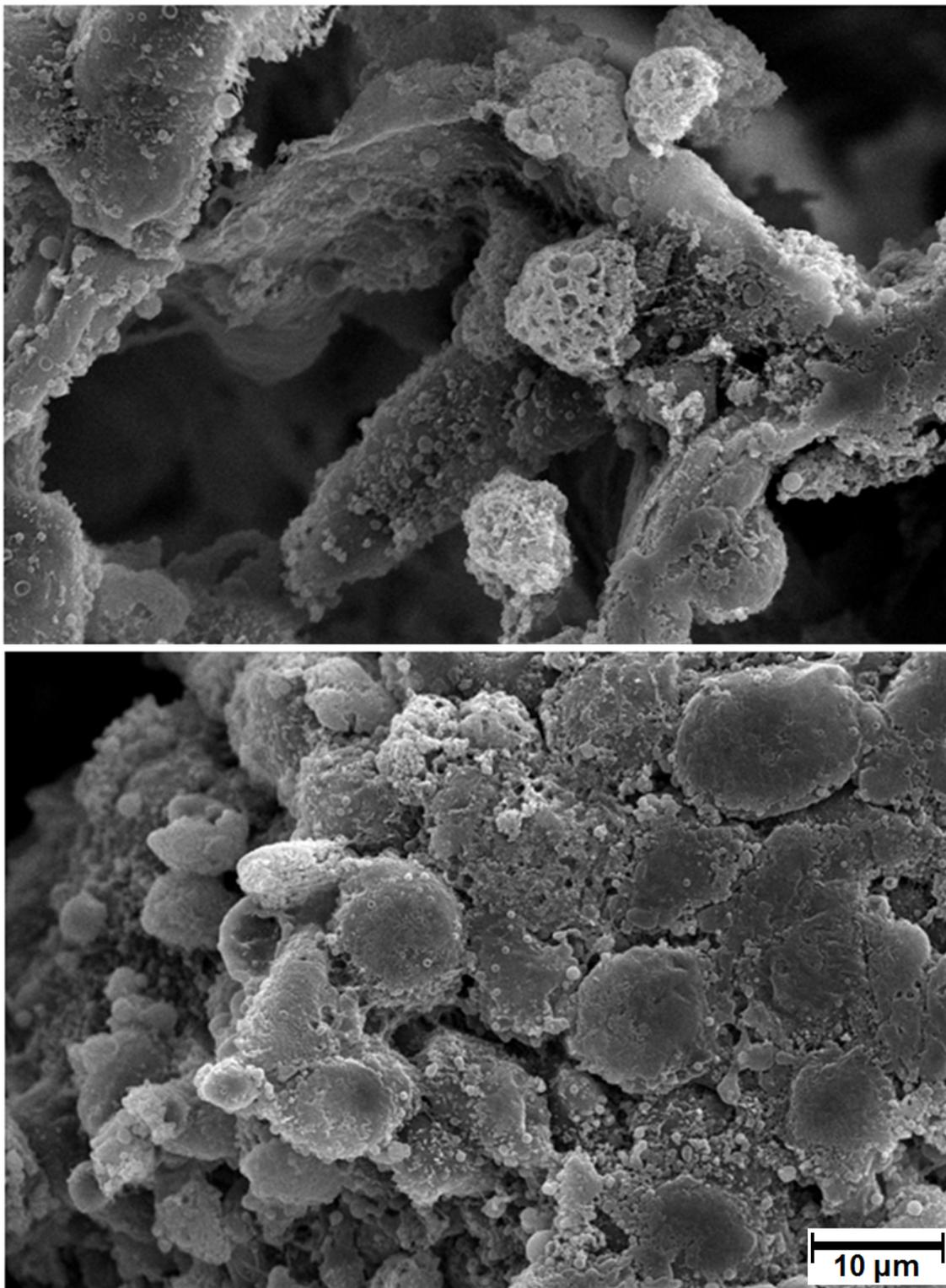


Figura 4.35. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com CEMs. Presença de MEC, obtidas em aumento de 1800x.

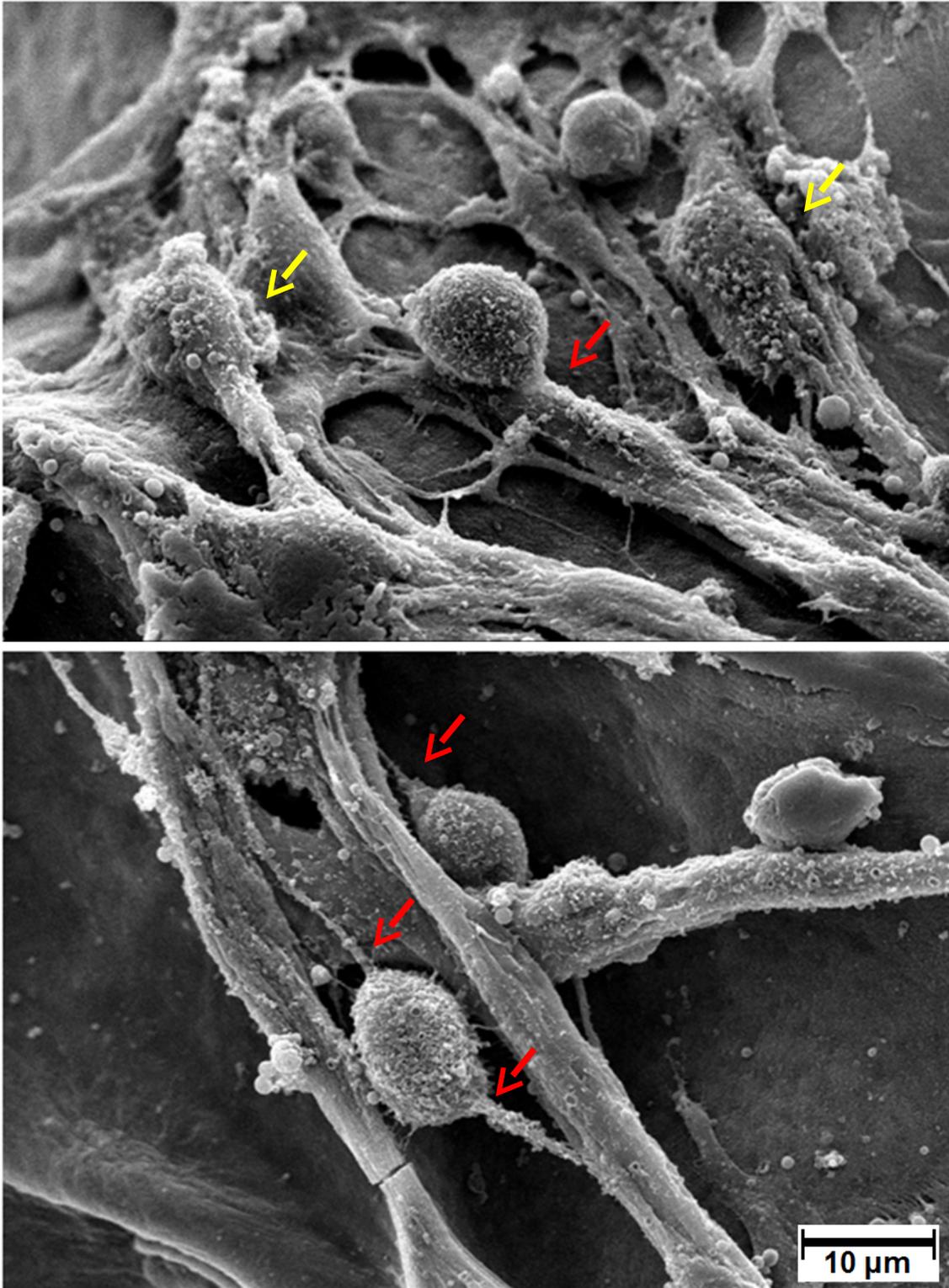


Figura 4.36. Imagens geradas por MEV das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com CEMs. Células aderidas às fibras de colágeno obtidas com aumento de 1800x. As setas vermelhas destacam as regiões de ligação entre as células e as fibras de colágeno, enquanto setas amarelas sinalizam células alongadas.

As imagens dos *scaffolds* cultivados com CEMs durante 168 e 336 horas estão exibidas nas Figuras 4.37 e 4.38, respectivamente. Nas figuras estão apresentadas imagens com aumentos de x100, que permitem visualizar a presença de células em algumas regiões (indicadas por setas). As Figuras 4.37E e G (amostras S72hf e S96hf) apresentam regiões com intensa presença de MEC, como pode ser mais bem observado nas Figuras 4.39A e B, com imagens em aumentos de 250x. A maior quantidade de MEC e conseqüentemente maior presença de células nessas amostras validam os resultados obtidos de quantificação e produtividade celular.

Nas Figuras 4.37 C e D, referentes às amostras S48hPB e S48hPBf do cultivo de 168 hs, notam-se superfícies mais planas, com menos dispersão de poros e ausentes de células, assim como observado nas imagens das Figura 4.32C e D (cultivo de 72 horas). Essas características são descritas como resultado do método de tratamento das amostras e a utilização de alto vácuo durante a observação microscópica.

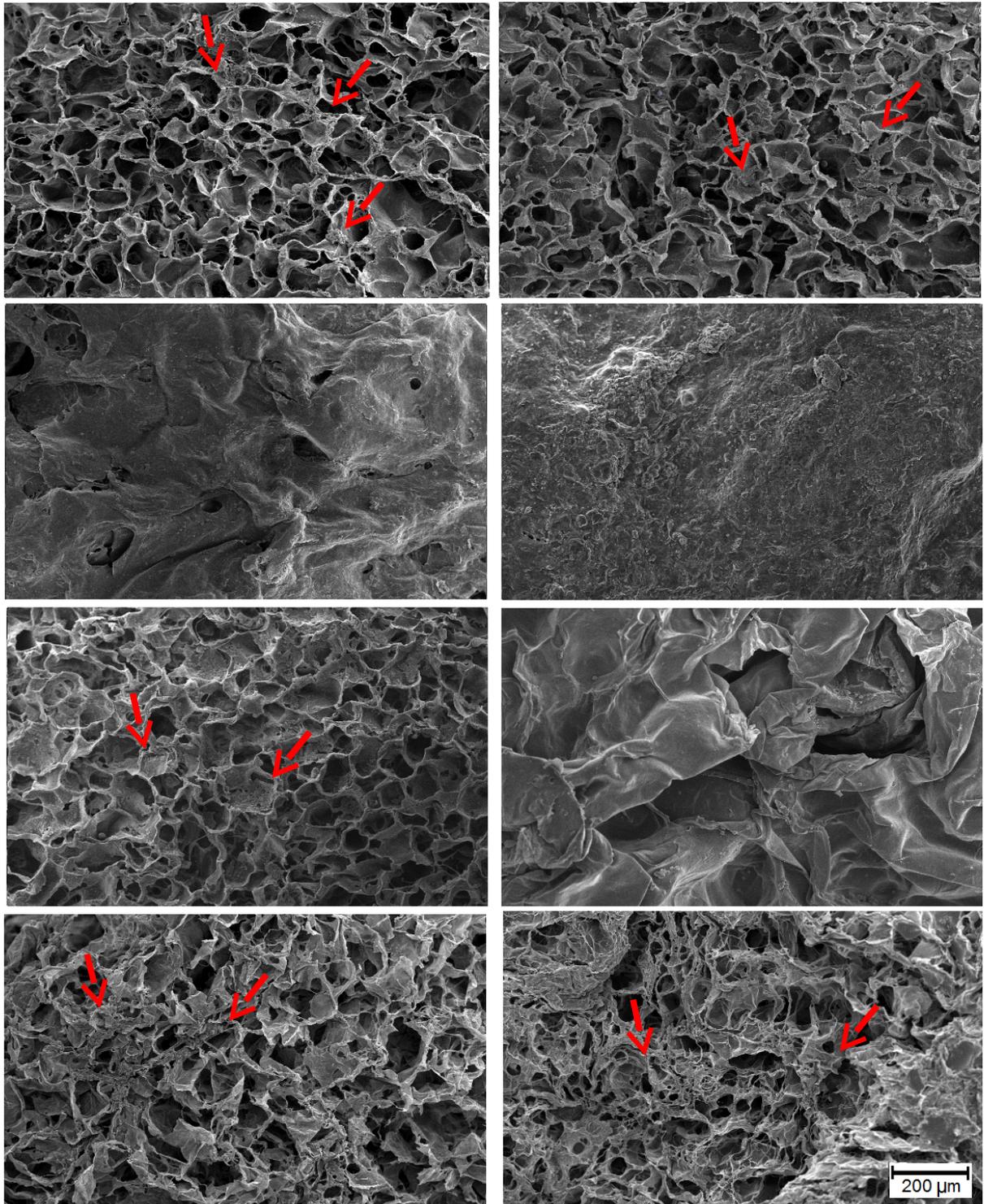


Figura 4.37. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos scaffolds cultivados com CEMs por 168 hs. Obtidas no aumento de 100x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc. As setas indicam regiões com presença de células aderidas.

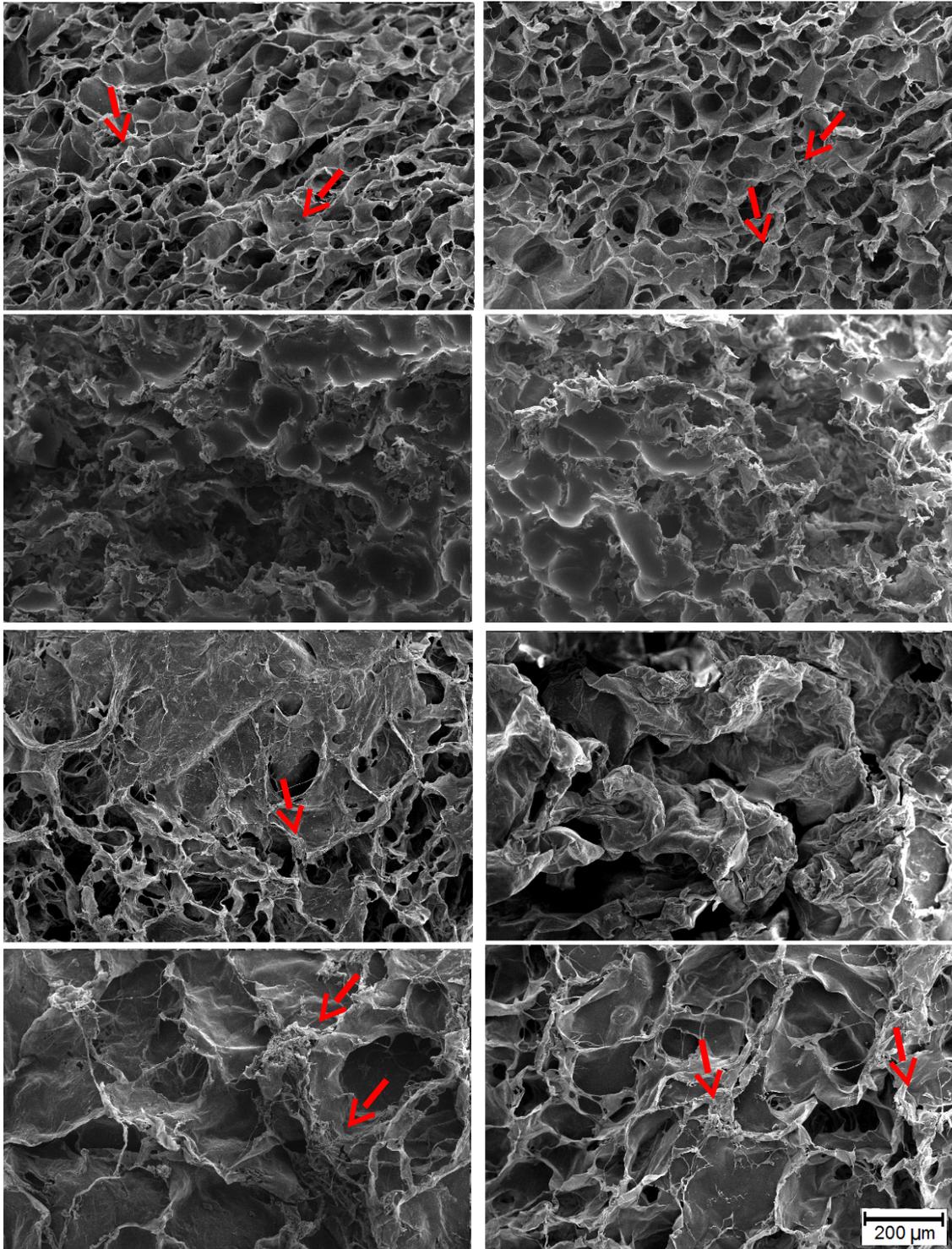


Figura 4.38. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos scaffolds cultivados com CEMs por 336 hs. Obtidas no aumento de 100x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc. As setas indicam regiões com presença de células aderidas.

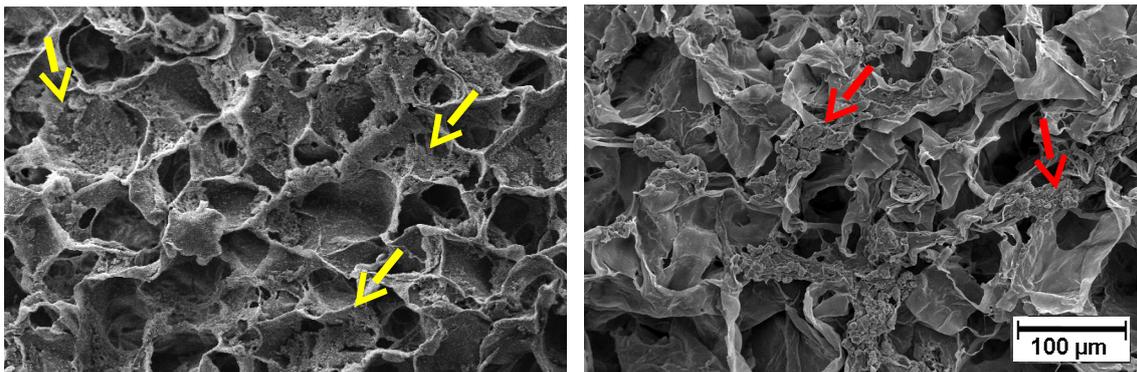


Figura 4.39. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos scaffolds cultivados com CEMs por 168 hs. Obtidas no aumento de 250x. A = S72hf e B = S96hf. Setas vermelhas indicam células aderidas, setas amarelas a presença de MEC.

A aplicabilidade das CEMs combinadas às estruturas tridimensionais a base de colágeno tem sido confirmada como fator ativo na promoção da recuperação do tecido da pele lesionada profundamente. Ravichandran e colaboradores (2013) demonstraram que *scaffolds* produzidos por nanofibras de PVA (Acetato de Polivinila) e colágeno hidrolisado promoveram a diferenciação *in vitro* de CEMs em queratinócitos, evidenciando o uso dessas células como alternativa eficaz para a recuperação de lesões de pele. No estudo de Shokrgozar et al. (2012), *scaffolds* de colágeno e quitosana cultivados com CEMs promoveram o crescimento e a diferenciação das células *in vitro*, as quais apresentaram morfologia esférica semelhante aos queratinócitos, e quando aplicadas *in vivo* estimularam a cura eficaz de queimaduras profundas em ratos.

Através das análises realizadas com as CEMs nos oito *scaffolds* confeccionados para este trabalho, foi possível selecionar os quatro que apresentaram os melhores conjuntos de resultados, sendo as amostras S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf, pertencentes ao grupo B. Dessa forma, essas amostras foram selecionadas para a análise do crescimento celular de queratinócitos e fibroblastos ao longo de 336 horas de cultivo.

4.2.6 Cultivo *in vitro* de queratinócitos nos *scaffolds*

Nas análises de cultivo de queratinócitos foi utilizada a linhagem celular HaCaT, realizando dois experimentos para obter maior confiabilidade nos resultados. Os dados obtidos são discutidos em conjunto neste mesmo tópico.

4.2.6.1 Adesão celular

Para avaliar a adesão dos queratinócitos foi necessário quantificar primeiramente o número de células totais presentes na suspensão de cada amostra, ou seja, aquelas que não foram capazes de aderir aos *scaffolds* após 12 horas do início do cultivo. Dessa forma, os números de células viáveis e não viáveis presentes na suspensão de cada amostra foram contados no hemocitômetro, e apresentados nas Figuras 4.40A e B, respectivamente.

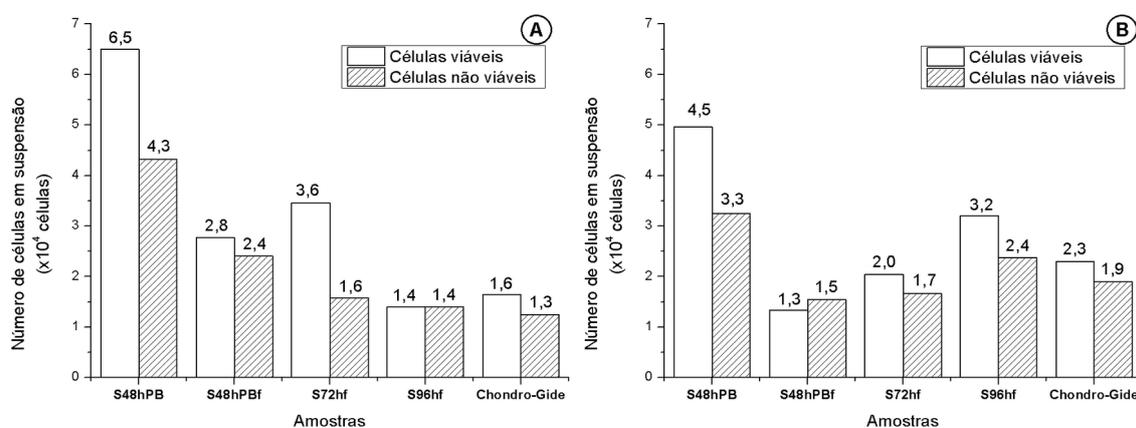


Figura 4.40. Números de células viáveis e não viáveis da suspensão quantificadas por hemocitômetro no tempo de 12 horas de cultivo de queratinócitos: A. Experimento 1, B. Experimento 2.

De acordo com os dados da Figura 4.40, para ambos os experimentos, a amostra S48hPB foi a que demonstrou maiores números de células viáveis e não viáveis nas suspensões. Desta maneira, os que apresentaram menores números de células nas suspensões foram considerados com melhores características para adesão celular, o que pode ser confirmado nas Figuras 4.41A e B. As amostras S48hPBf, S72hf, S96hf e Chondro-Gide apresentaram maiores números de células e, conseqüentemente, maior eficiência de adesão celular (Figura 4.41B), entretanto, as análises estatísticas demonstraram que não houve diferenças significativas quanto ao número de células aderidas entre as amostras, revelando que os cinco *scaffolds* apresentam um desempenho semelhante quanto ao número de células aderidas e eficiência da adesão de queratinócitos em 12 horas de cultivo.

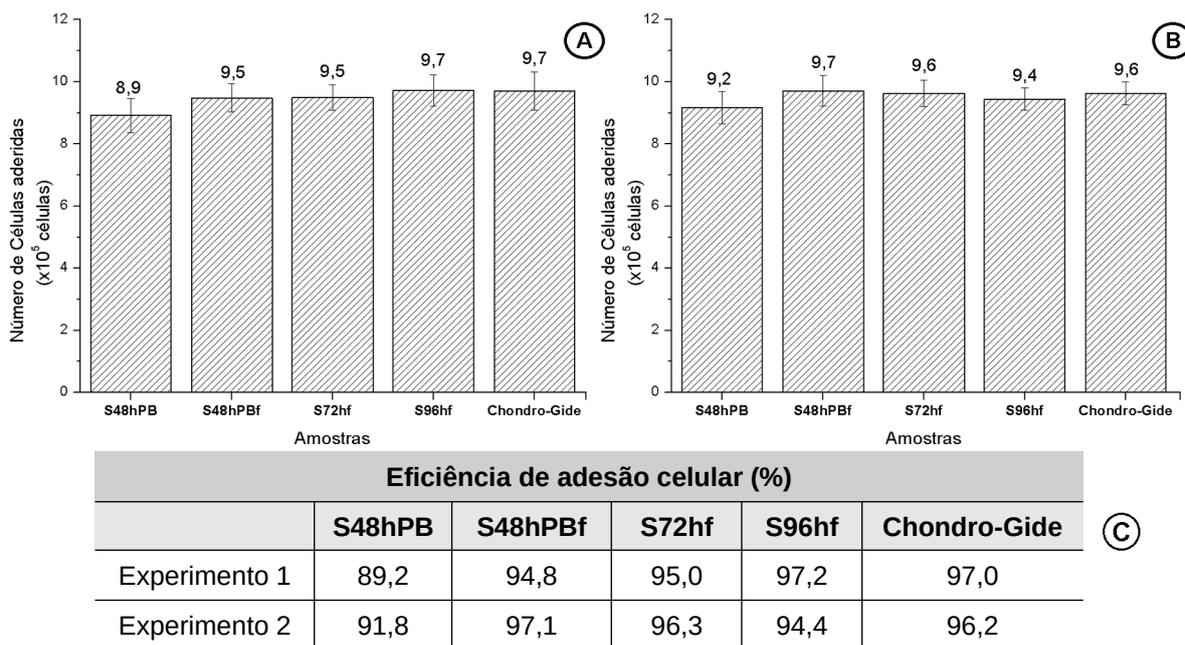


Figura 4.41. Desempenho dos *scaffolds* na adesão celular de queratinócitos em cada experimento. A e B. Estimativas do número de células aderidas em cada *scaffold* (A: experimento 1, B: experimento 2); C. Eficiência de adesão celular para o tempo de 12 horas.

4.2.6.2 Quantificação de glicose e lactato

O consumo de glicose e a produção de lactato pelos queratinócitos foram avaliados ao longo do cultivo em 336 horas, sendo exibidas as concentrações desses nutrientes na Figura 4.42. Estão identificados os momentos em que ocorreram as trocas de meio, o que promoveu o reajuste da concentração de glicose e diluição do lactato no cultivo, permitindo que não ocorresse o esgotamento de glicose e que as concentrações de lactato permanecessem abaixo do nível inibitório de 35,4mM (SCHOP; 2009).

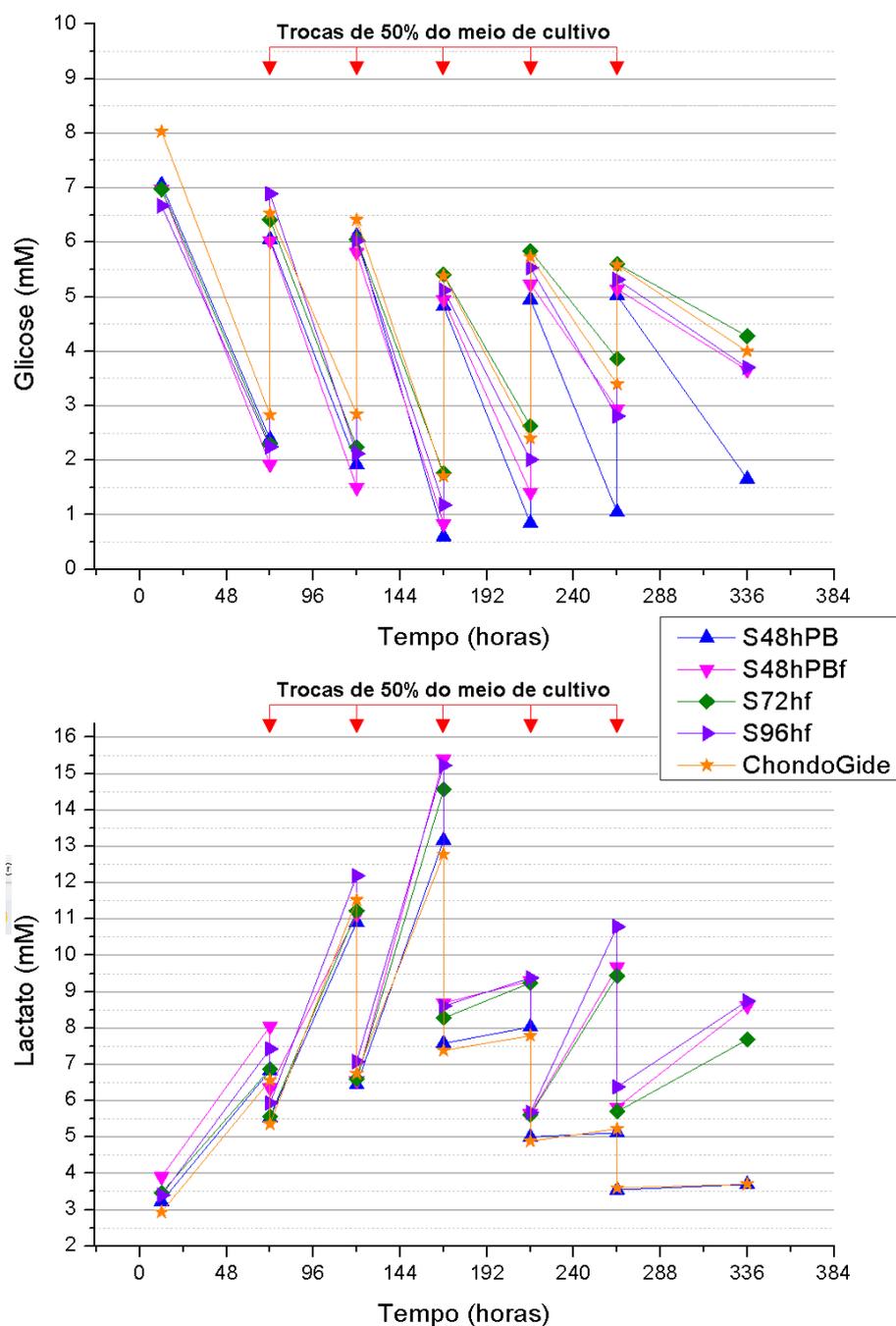


Figura 4.42. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo com queratinócitos nos *scaffolds* ao longo de 336 horas.

As relações de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) foram calculadas para todas as amostras, obtendo-se valores abaixo de 2,0 $mol_{lac}.mol_{gli}^{-1}$ (Tabela 4.9) para todas as amostras até o período de 168 horas, indicando que os queratinócitos metabolizaram primariamente a glicose utilizando a rota de fosforilação oxidativa, como já discutido. Para o tempo de 336 horas, foram obtidos valores bem abaixo do referencial nas amostras S48hPB e Chondro-gide. Entretanto, as demais amostras demonstraram

valores de $Y_{lac/gli}$ maiores que 2,0, indicando que as células presentes nos *scaffolds* S48hPBf, S72hf e S96hf, utilizaram a rota da glicólise como produção de energia.

Tabela 4.9. Relação da produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) durante o cultivo de queratinócitos

Relação de Produção de lactato e consumo de glicose – $Y_{lac/gli}$ ($mol_{lac} \cdot mol_{gli}^{-1}$)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
72	1,52±0,16	1,55±0,01	1,45±0,22	1,78±0,18	1,37±0,01
168	1,22±0,04	1,78±0,18	1,86±0,01	1,68±0,15	1,50±0,20
336	0,03±0,01	2,76±0,44	2,93±0,49	3,19±0,41	0,21±0,01

4.2.6.3 Estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds* através do consumo de glicose ($Y_{cel/gli}$)

Uma vez que o consumo de nutrientes do cultivo pode ser utilizado como parâmetro na quantificação celular (tópico 4.2.2), as concentrações de glicose foram utilizadas para obter o valor de $Y_{cel/gli}$ e assim determinar a densidade celular para cada amostra. Dessa forma, curvas padrão $Y_{cel/gli}$ foram realizadas em condições semelhantes às dos *scaffolds* (Figura 4.43).

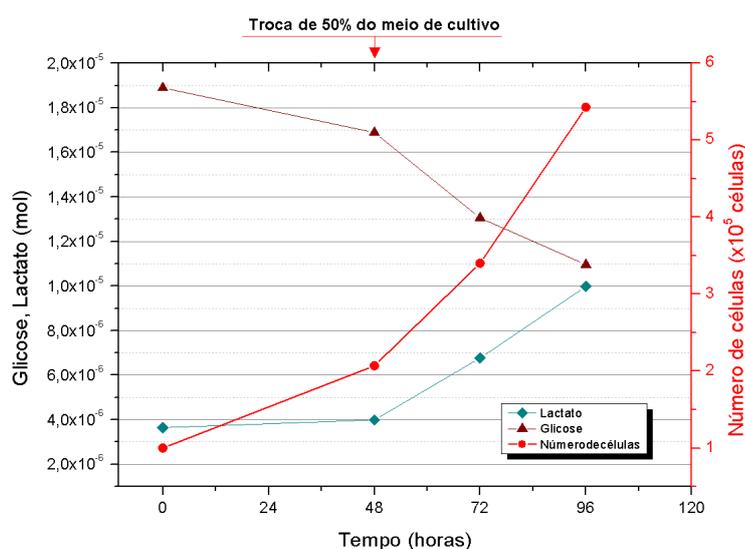


Figura 4.43. Resultados do experimento para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para queratinócitos.

A partir dos dados da Figura 4.43, o coeficiente de rendimento ($Y_{\text{cel/gli}}$) foi calculado (tópico 3.3.7.3) e o valor obtido foi $Y_{\text{cel/gli}} = 9,834 \times 10^{10}$ células/mol de glicose consumida (Figura 4.44), com coeficiente de confiabilidade $Y_{\text{cel/gli}}$ de $r^2 = 0,977$. Assim, o coeficiente $Y_{\text{cel/glic}}$ foi utilizado como método confiável para a estimativa do número de células.

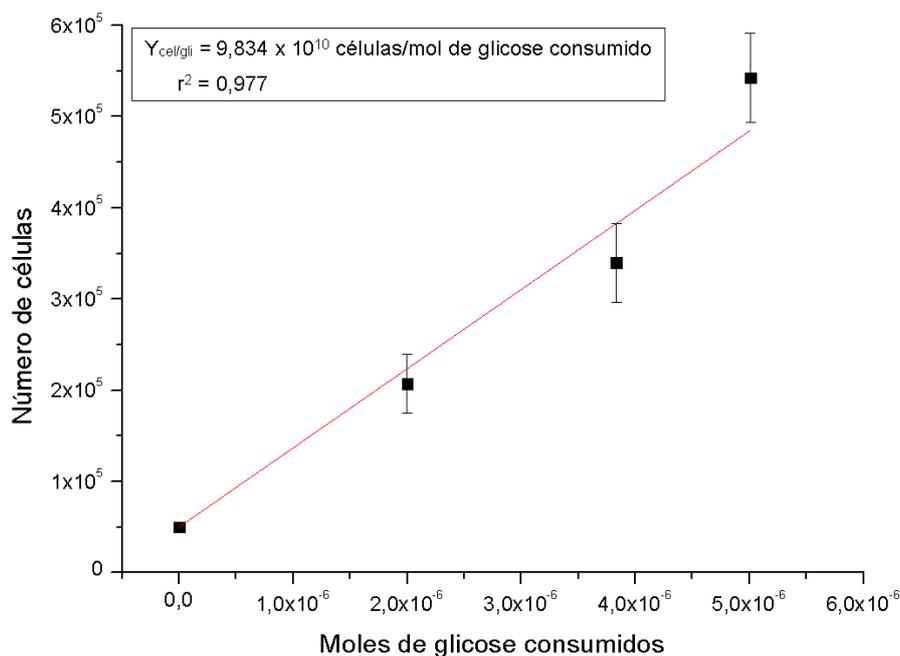


Figura 4.44. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{\text{cel/gli}}$ utilizando dados dos experimentos com queratinócitos.

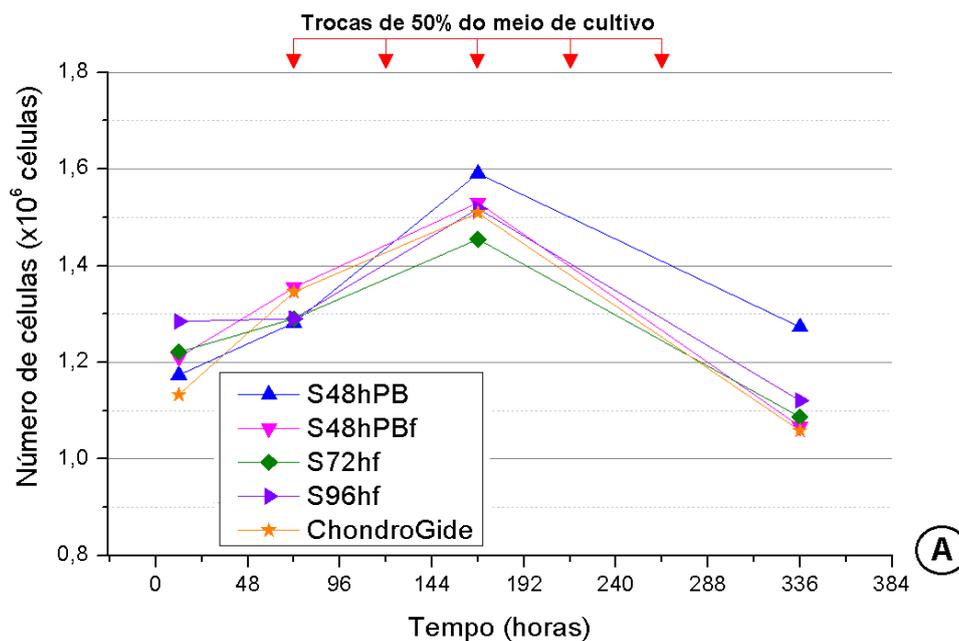
Assim, foi possível estimar os números totais de células dos cultivos, sendo aquelas aderidas e em suspensão. Os valores foram subtraídos os números de células das suspensões, obtidos pela contagem em hemocítômetro (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Número de células totais nas suspensões de cada amostra

Número de células totais em suspensão ($\times 10^4$ células)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
12	10,8 \pm 1,5	5,2 \pm 0,3	5,0 \pm 1,3	2,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3
72	1,3 \pm 0,4	2,9 \pm 0,8	3,8 \pm 1,0	3,8 \pm 1,8	1,7 \pm 0,5
168	2,4 \pm 0,7	3,0 \pm 0,6	2,8 \pm 0,5	5,7 \pm 1,5	2,3 \pm 0,8
336	4,2 \pm 1,3	2,6 \pm 1,5	2,5 \pm 1,3	3,9 \pm 1,2	4,3 \pm 0,9

Na Figura 4.45, estão as curvas de crescimento celular das células aderidas em cada *scaffold* (Figura 4.45A) e seus respectivos valores de adesão (Figura 4.45B). Nota-se que ocorre crescimento acentuado entre 12 e 168 horas de cultivo em todas as amostras, com valores máximos de densidades entre 1,45 e 1,59 x10⁶ células aderidas. Além disso, a amostra S48hPB apresentou maior número de células aderidas em comparação à comercial da Chondro-Gide (1,51 x 10⁶ células). Os demais *scaffolds* (S48hPBf, S72hf e S96hf) por sua vez, exibiram valores estatisticamente semelhantes ao da Chondro-gide, revelando que os *scaffolds* produzidos para este trabalho (S48hPB, S48hPBf, S72hf, S96hf) apresentam-se como alternativas promissoras para os estudos *in vivo* no tratamento de lesões de pele que acometem a camada da epiderme, já que os queratinócitos são células presentes nessa camada.

No entanto, após 168 horas, ocorreu queda do número de células até o tempo de 336 horas em todas as amostras, incluindo a Chondro-Gide. Este comportamento também foi observado para as células estromais mesenquimais (linhagem hCEMs-TERT) (tópico 4.2.5.3) e pode estar relacionado à espessura, característica relatada por diversos pesquisadores como um problema na difusão de nutrientes através da matriz (BIGARELLA, LIANG, GHAFARI, 2014).



Números de células aderidas aos <i>scaffolds</i> (x10 ⁶ células)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
12	1,17 ^a	1,21 ^{a,b}	1,22 ^{a,b}	1,28 ^b	1,13 ^a
72	1,28 ^a	1,35 ^b	1,29 ^{a,c}	1,29 ^{a,c}	1,35 ^{b,c}
168	1,59 ^a	1,53 ^{a,c}	1,45 ^b	1,52 ^{b,c}	1,51 ^{b,c}
336	1,27 ^a	1,07 ^b	1,09 ^b	1,12 ^b	1,06 ^b

Figura 4.45. Estimativas do crescimento celular dos queratinócitos nos *scaffolds*. A. Curvas de crescimento das células aderidas ao longo do tempo de 336 horas, B. Valores das estimativas de crescimento das células aderidas. Letras iguais nos valores de cada linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de células nos *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

O fator de expansão celular (FE) foi calculado e os valores exibidos na Figura 4.46 indicam que em 168 horas de cultivo a amostra S48hPB apresentou um valor estatisticamente igual ao da Chondro-Gide, e maior do que as demais, enquanto em 336 horas os valores diminuiram para todas. A análise estatística permitiu apontar que o S48hPB foi o que apresentou maior valor de expansão celular.

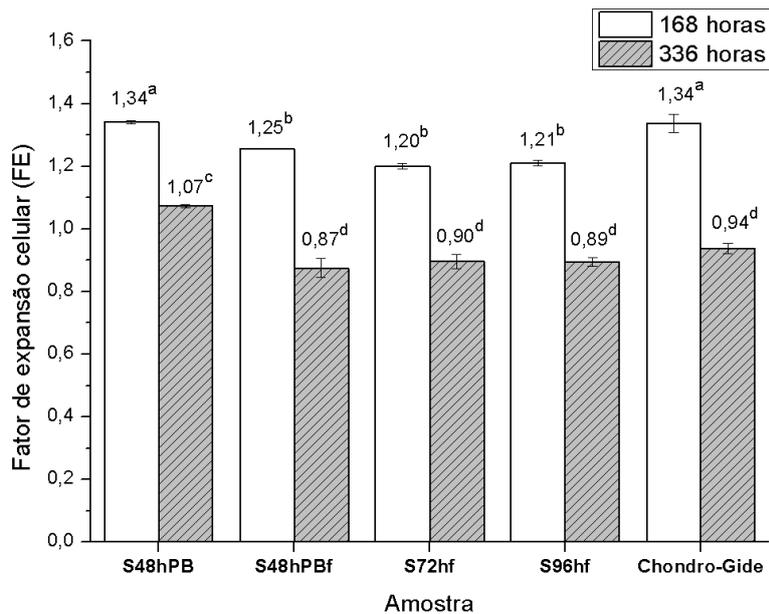


Figura 4.46. Fator de expansão celular de cada *scaffold* analisado nos tempos de 168 e 336 horas. Letras iguais indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre os *scaffolds* (Tukey, $p < 0,05$).

Em discordância com os ensaios de aderência celular, a amostra S48hPB demonstrou melhores eficiências nos processos ao longo de 168 e 336 horas de cultivo, sendo estatisticamente iguais ou até maiores do que os valores para a Chondro-Gide. Além disso, as demais amostras apresentaram valores de FE estatisticamente iguais ao da Chondro-Gide ao final do cultivo (336 horas), confirmando que todos os quatro *scaffolds* são potenciais alternativas para o estudo *in vivo* no tratamento de lesões epidérmicas.

4.2.6.4 Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* cultivados com queratinócitos

As imagens obtidas por MEV dos *scaffolds* (S48hPB, S48hPBf, S72hf, S96hf e Chondro-Gide) cultivados com queratinócitos por 72 horas estão dispostas nas Figuras 4.47 e 4.48.

Nota-se na Figura 4.47 em aumento de 100x que as amostras contêm regiões com intensa presença de células e matriz extracelular (MEC) (indicadas pelas setas), com maior ocorrência nas figuras 4.47 A, B e C, referentes a S48hPB, S48hPBf e S72hf, resultado esperado em razão dos valores estatisticamente semelhantes obtidos anteriormente para os dados de quantificação e produtividade celular. Na amostra comercial (Figura 4.47E), não

foram observadas células aderidas; entretanto, nota-se a intensa presença MEC em toda a superfície. A amostra S96hf não apresentou células aderidas e presença de MEC na superfície no material, divergindo dos resultados atingidos para o número de células aderidas a este material.

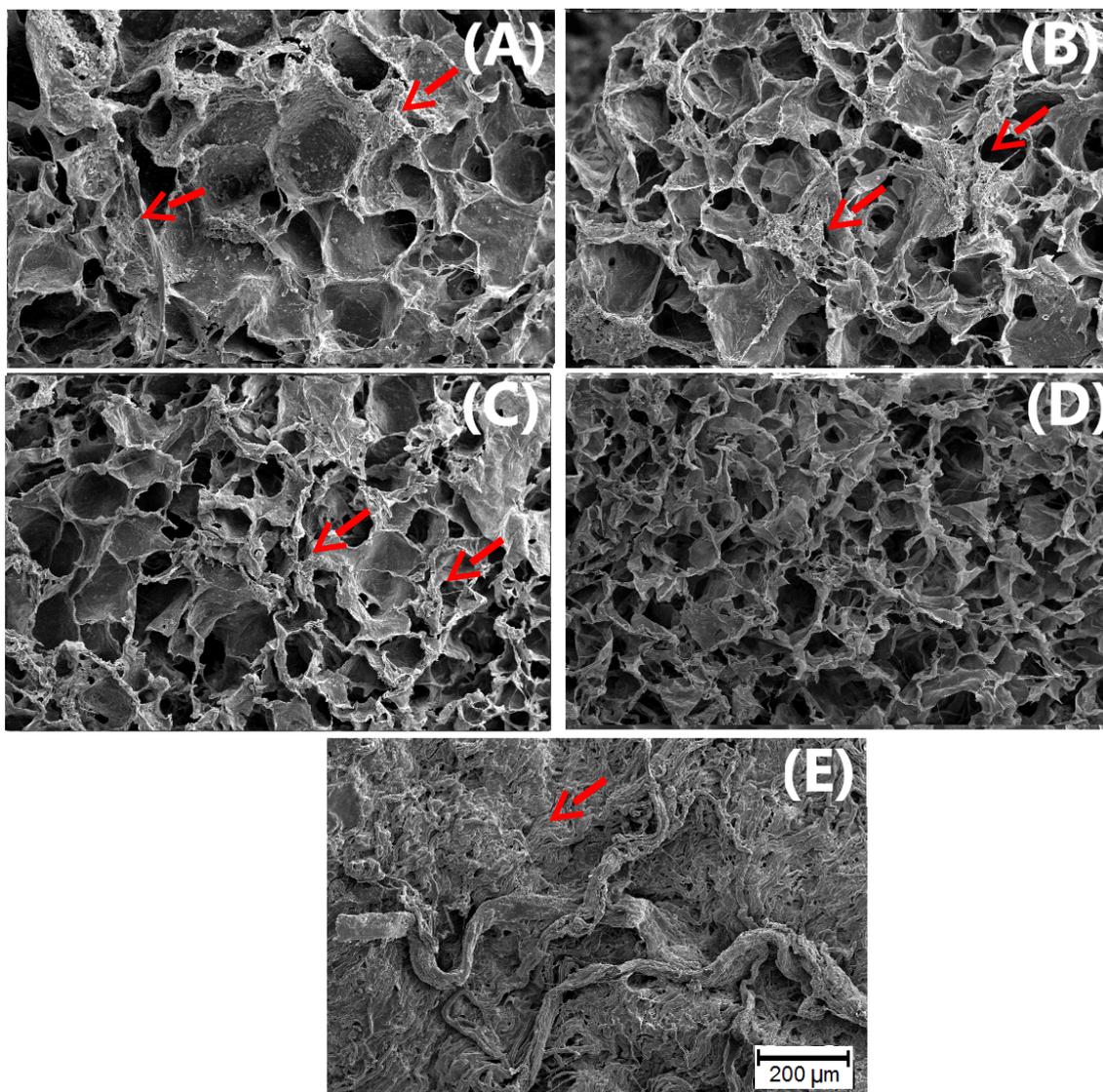


Figura 4.47. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos scaffolds cultivados com queratinócitos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 100x. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf, E = Chondro-Gide. As setas indicam regiões com células aderidas e presença de MEC

As regiões que apresentaram células aderidas e MEC foram analisadas no aumento de 250x, sendo disponibilizadas na Figura 4.48. Nessas imagens, estão destacadas as células aderidas às superfícies dos *scaffolds*, em grandes aglomerados e intensa presença de MEC (Figuras 4.48A e B) e em menores quantidades de células e MEC (Figuras 4.48 C e D). Nas imagens realizadas

para os quatro *scaffolds* selecionados, as células estão em grande parte cobertas por MEC; no entanto, é possível visualizar a morfologia arredondada das células, o que é uma característica da linhagem dos queratinócitos.

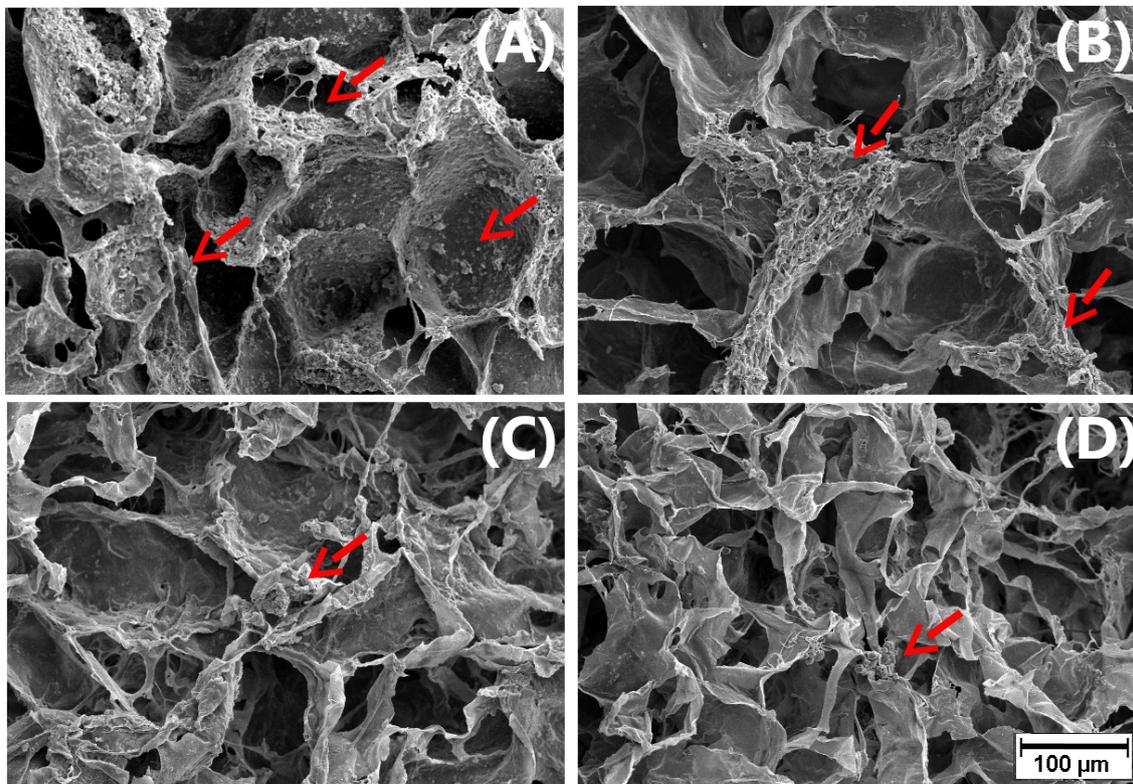


Figura 4.48. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas dos *scaffolds* cultivados com queratinócitos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 250x. A = S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf. As setas indicam regiões com células aderidas e presença de MEC

4.2.6.5 Microscopia de Fluorescência Confocal dos *scaffolds* cultivados com queratinócitos

A Microscopia Confocal foi utilizada para avaliar a distribuição de células no interior da estrutura porosa. As amostras foram tratadas com DAPI, um marcador celular fluorescente capaz de identificar o núcleo das células presentes nos *scaffolds*.

As imagens das amostras cultivadas com queratinócitos ao longo de 168 e 336 horas estão disponíveis nas Figuras 4.49 e 4.50, respectivamente. Nota-se nas figuras a presença de pontos de coloração azulada, que são os núcleos das células marcados com DAPI, atestando que todos os *scaffolds* promoveram a adesão e proliferação de queratinócitos através da matriz.

A Figura 4.49A, referente à amostra S48hPB, exibe intensa presença de células, corroborando com os dados obtidos de adesão e crescimento celular. A grande presença de células na Figura 4.49D referente à amostra S96hf é um dado substancialmente importante, uma vez que essa amostra apresentou uma estimativa do número de células aderidas semelhante à das outras amostras. Entretanto, esses dados divergem dos observados por MEV indicando que para essa amostra as células infiltraram e cresceram com maior intensidade do que na superfície da amostra.

Os *scaffolds* S48hPBf, S72hf e Chondro-Gide (Figuras 4.49B, C e E, respectivamente) apresentam quantidades de células semelhantes, o que está de acordo com os dados obtidos pela estimativa do número de células aderidas (tópico 4.2.6.3). Além da presença das células identificadas como pontos azuis (sinalizadas por setas vermelhas), essas imagens mostram outras estruturas, que podem ser identificadas como marcação pelo DAPI das fibras de colágeno ou devido à autofluorescência do colágeno (setas amarelas), dado também reportado nos estudos de Balaure e colaboradores (2019) e de Vashisth et al., (2016), nos quais ambos avaliaram a proliferação de fibroblastos em *scaffolds* de colágeno. As imagens da Figura 4.50 (B, C, D e E) também apresentam essas fibras marcadas em azul.

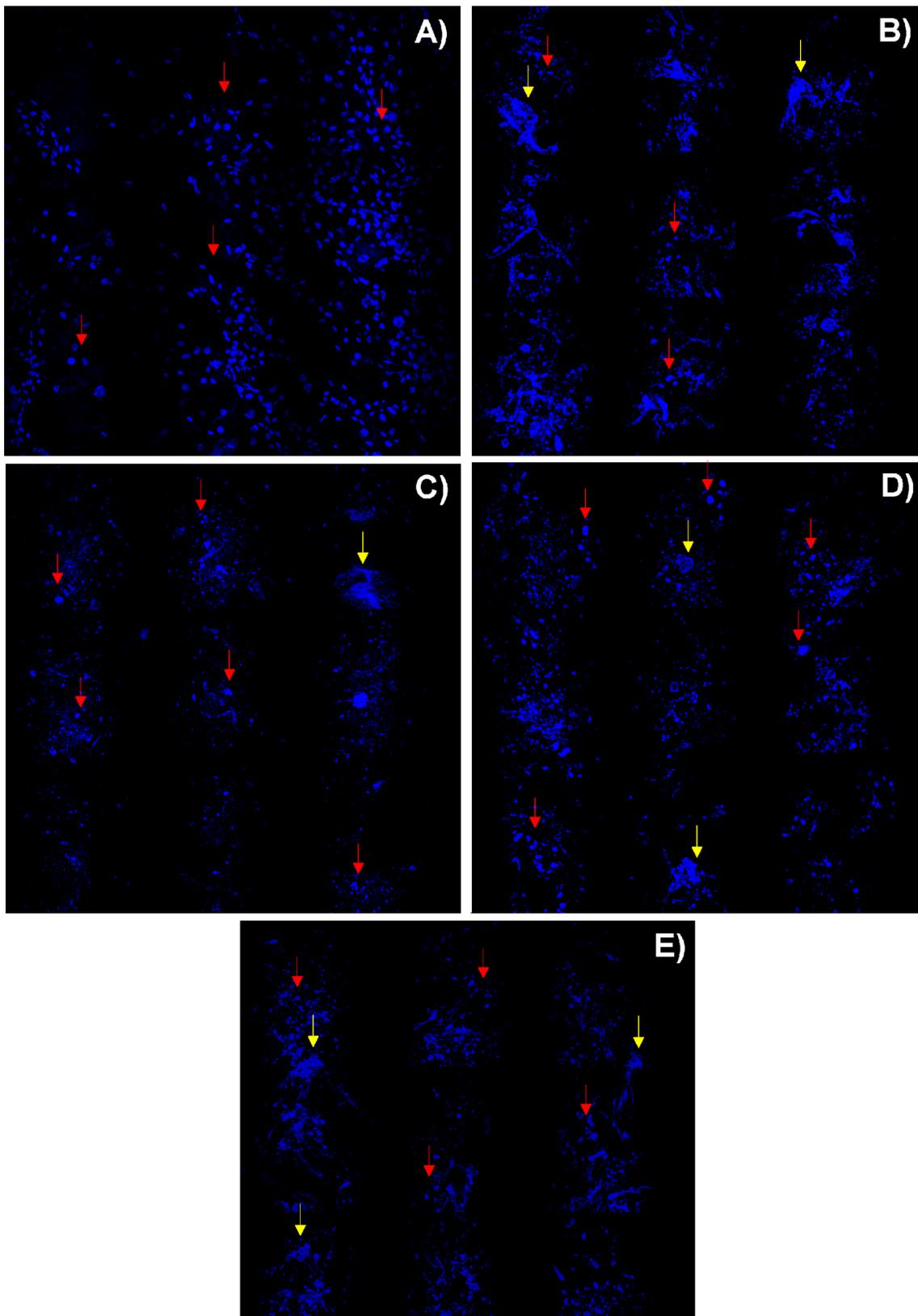


Figura 4.49. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos *scaffolds* cultivados com queratinócitos ao longo de 168 horas. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf e E = Chondro-Gide. Os pontos azuis são os núcleos das células corados com DAPI, sendo sinalizados com as setas vermelhas. As setas amarelas sinalizam regiões em que as fibras de colágeno do *scaffold* foi corada pelo DAPI.

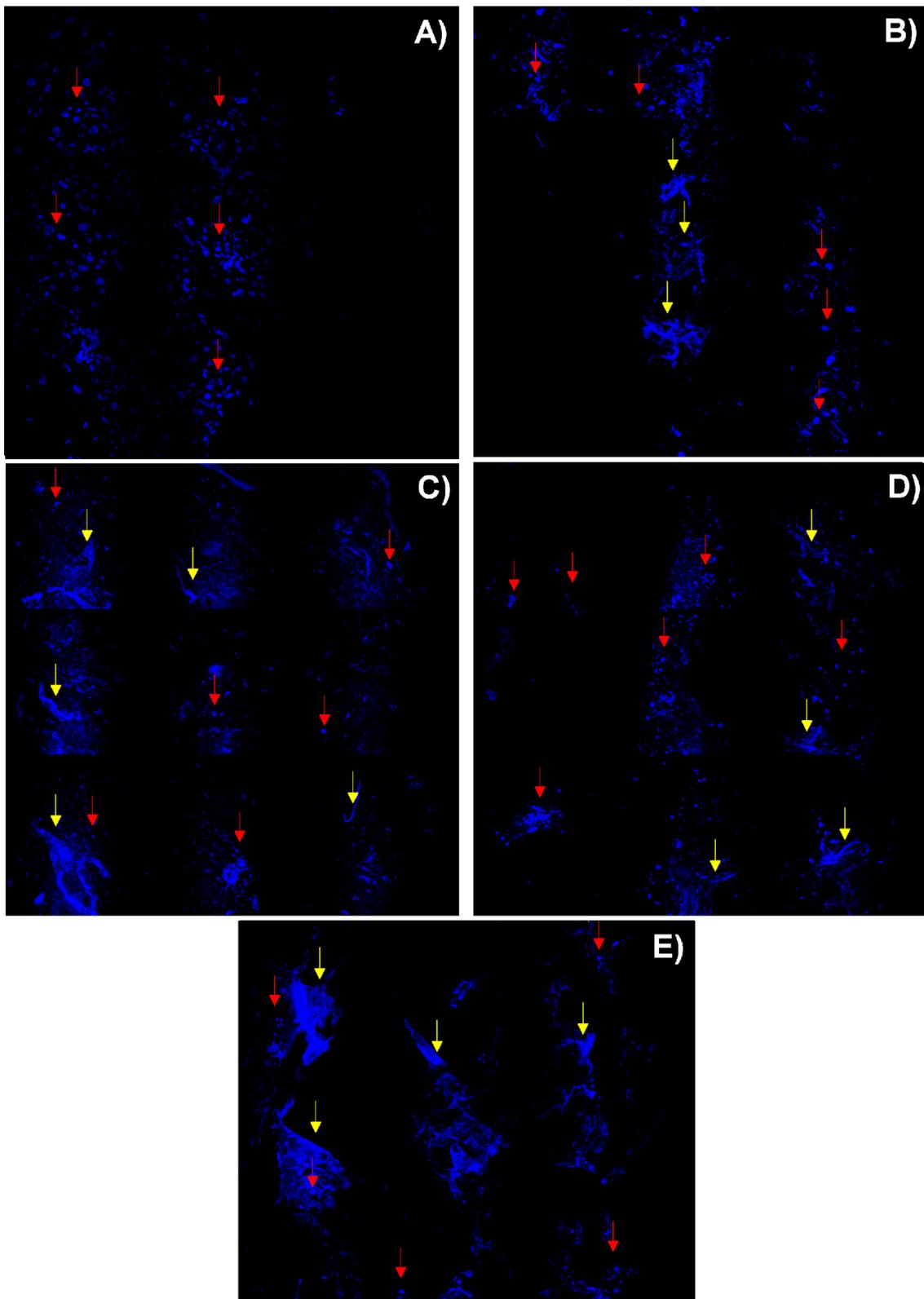


Figura 4.50. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura dos *scaffolds* cultivados com queratinócitos ao longo de 336 horas. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf e E = Chondro-Gide. Os pontos azuis são os núcleos das células corados com DAPI, sendo sinalizados com as setas vermelhas. As setas amarelas sinalizam regiões em que as fibras de colágeno do *scaffold* foi corada pelo DAPI.

Nota-se nas imagens da Figura 4.50 a presença de células (indicadas por setas vermelhas), confirmando a adesão e proliferação dos queratinócitos através de toda a matriz. A Figura 4.50A, correspondente à amostra S48hPB que apresentou a maior quantidade de células do que as demais amostras, em concordância com o maior número de células aderidas medidas no tempo de 336 horas de cultivo (tópico 4.2.6.3). As demais amostras (S48hPBf, S72hf, S96hf e Chondro-Gide) revelaram quantidades de células semelhantes e a presença das fibras de colágeno fluorescentes.

4.2.7 Cultivo *in vitro* de fibroblastos nos *scaffolds*

Dentre as células que participam do processo de cicatrização da pele, os fibroblastos têm um papel essencial na formação de MEC durante o processo de cicatrização do tecido lesionado. Dessa forma, fibroblastos (linhagem HDFn) foram testados nos *scaffolds* (S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf) para avaliar suas capacidades de adesão e proliferação nessas amostras.

4.2.7.1 Adesão celular

Para quantificar a adesão celular foi necessário realizar a contagem de células totais (viáveis e não viáveis) presentes na suspensão de cada amostra, ou seja, aquelas células que não se aderiram durante as primeiras 12 horas de cultivo. Esses valores estão disponibilizados na Figura 4.51, sendo possível observar que o *scaffold* S48hPB foi o que apresentou maior número de células em suspensão, seguido pelo S48hPBf.

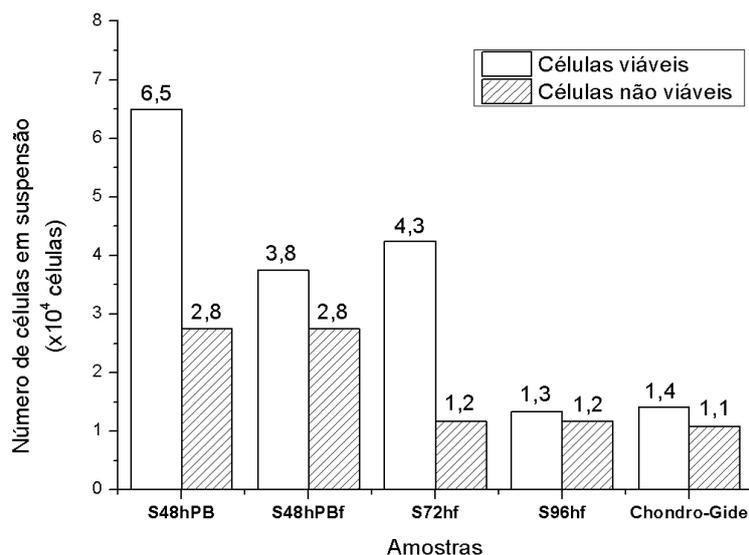
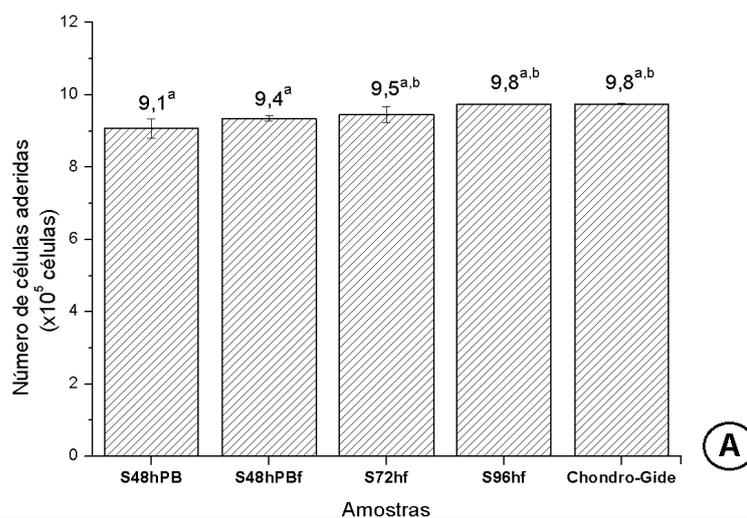


Figura 4.51. Número de células viáveis e não viáveis da suspensão quantificadas por hemocitômetro no tempo de 12 horas de cultivo de fibroblastos.

Com o número de células totais em suspensão, quantificam-se as células aderidas em cada *scaffold* permitindo calcular a eficiência de adesão celular (Figura 4.52). Nota-se na Figura 4.52A que todos apresentaram altas eficiências de adesão celular, sendo que as amostras S72hf, S96hf e a comercial (Chondro-Gide) demonstraram valores estatisticamente iguais, com maiores números de células aderidas, sendo 9,46, 9,75 e 9,75 x 10⁵ células, respectivamente, e portanto esses *scaffolds* demonstraram maior eficiência de adesão (Figura 4.52B).



Eficiência de adesão celular (%)				
S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
90,8	93,5	94,6	97,5	97,5

Figura 4.52. Desempenho dos *scaffolds* na adesão celular de fibroblastos durante as primeiras 12 horas de cultivo. A. Estimativa do número de células aderidas em cada scaffold; B. Eficiência de adesão celular para o tempo de 12 horas.

4.2.7.2 Quantificação de glicose e lactato

Os consumos de glicose e as produções de lactato foram novamente avaliados no cultivo dos fibroblastos ao longo de 336 horas, sendo disponibilizadas as concentrações desses nutrientes (Figura 4.53). Nessa figura estão sinalizados os momentos em que ocorreram as trocas de meio, possibilitando a regulação dos níveis de glicose e diluição do lactato no cultivo, impedindo o esgotamento de glicose e o acúmulo de lactato em nível inibitório de 35,4mM (SCHOP; 2009).

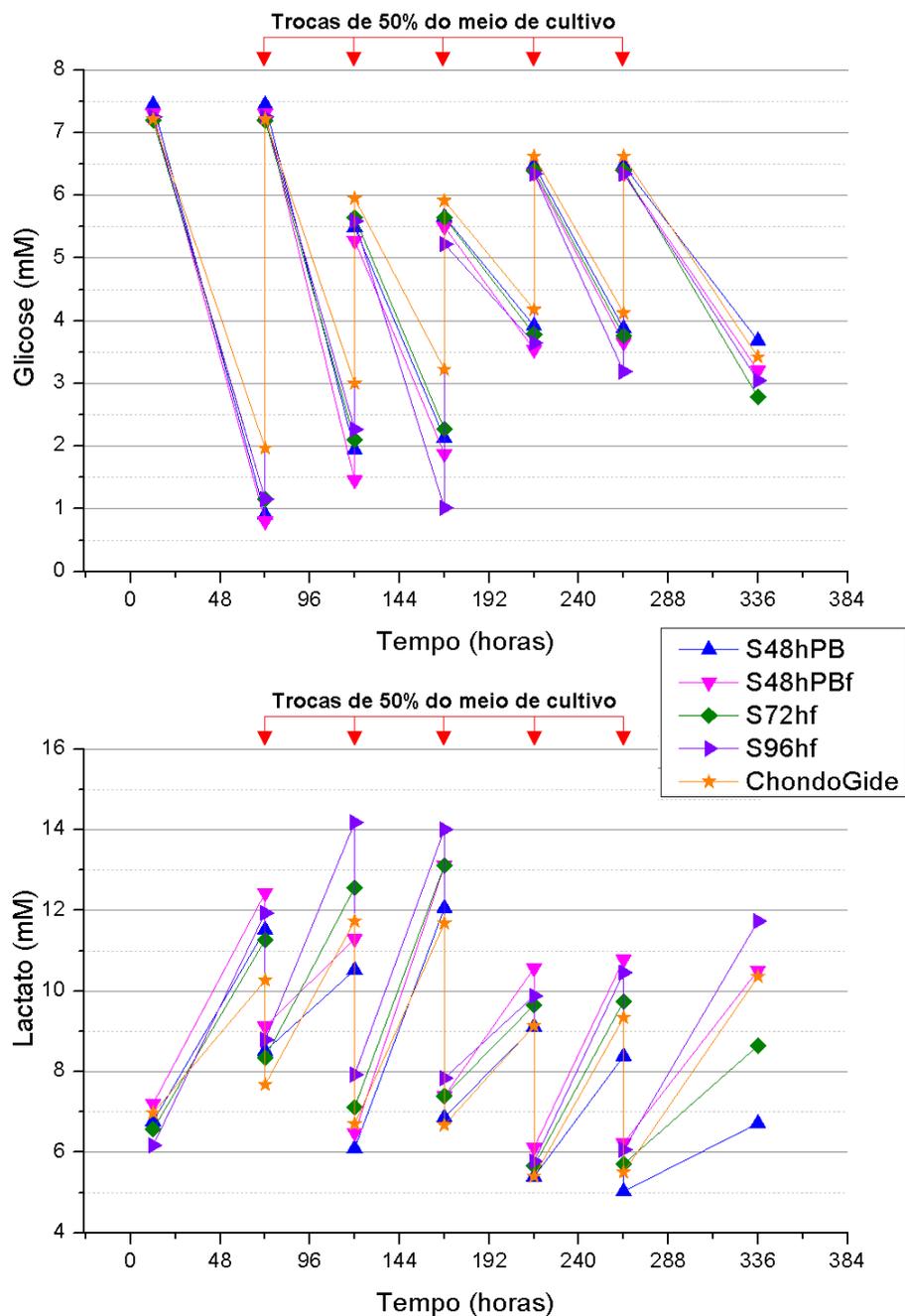


Figura 4.53. Curvas de concentrações de glicose e lactato para o cultivo de fibroblastos ao longo do cultivo nos *scaffolds* durante 336 horas.

As relações de produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) apresentaram valores abaixo de $2,0 \text{ mol}_{lac} \cdot \text{mol}_{gli}^{-1}$ (Tabela 4.11) para todas as amostras, indicando que os fibroblastos metabolizaram primariamente a glicose através da rota de fosforilação oxidativa.

Tabela 4.11. Relação da produção de lactato e consumo de glicose ($Y_{lac/gli}$) durante o cultivo de fibroblastos

Relação de Produção de lactato e consumo de glicose – $Y_{lac/gli}$ ($mol_{lac} \cdot mol_{gli}^{-1}$)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
72	1,13	1,19	1,15	1,33	1,03
168	1,84	1,99	1,77	1,44	1,59
336	0,94	1,43	1,19	1,40	1,52

4.2.7.3 Estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds* através do consumo de glicose ($Y_{x/s}$)

O consumo de nutrientes do cultivo foi utilizado para calcular o número de células presentes nos cultivos por meio das concentrações de glicose de cada amostra, utilizadas para obter o valor de $Y_{cel/gli}$ possibilitando estimar a densidade celular para cada amostra. As curvas padrão $Y_{cel/gli}$ foram construídas em condições semelhantes àsquelas realizadas para os *scaffolds* (Figura 4.54).

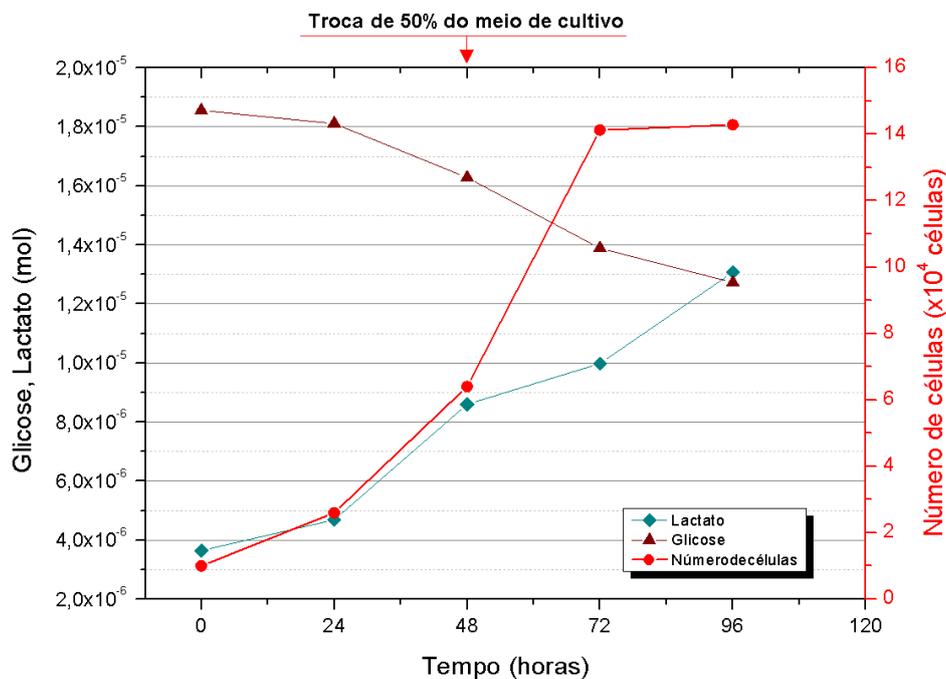


Figura 4.54. Resultados do experimento para calcular os valores de $Y_{cel/gli}$ para fibroblastos.

Com esses dados torna-se possível calcular o coeficiente de rendimento ($Y_{\text{cel/gli}}$), obtendo o valor de $Y_{\text{cel/gli}} = 3,720 \times 10^{10}$ células/mol de glicose consumida, com a confiabilidade de 0,988, como representado na Figura 4.55. Deste modo, o coeficiente $Y_{\text{cel/glic}}$ foi adotado como valor confiável para a estimativa do número de células aderidas aos *scaffolds*.

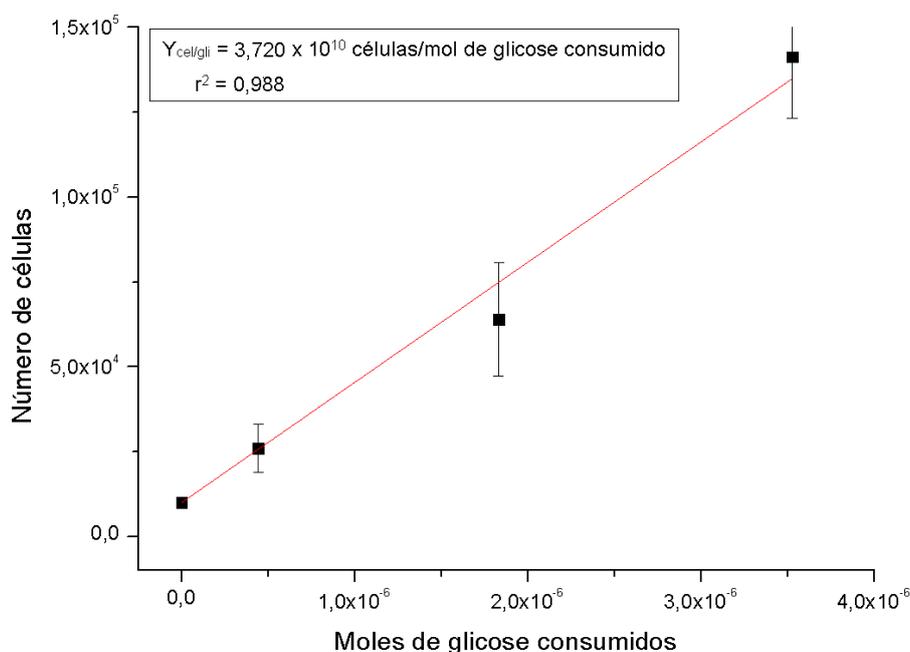


Figura 4.55. Determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{\text{cel/gli}}$ utilizando dados do experimento com fibroblastos.

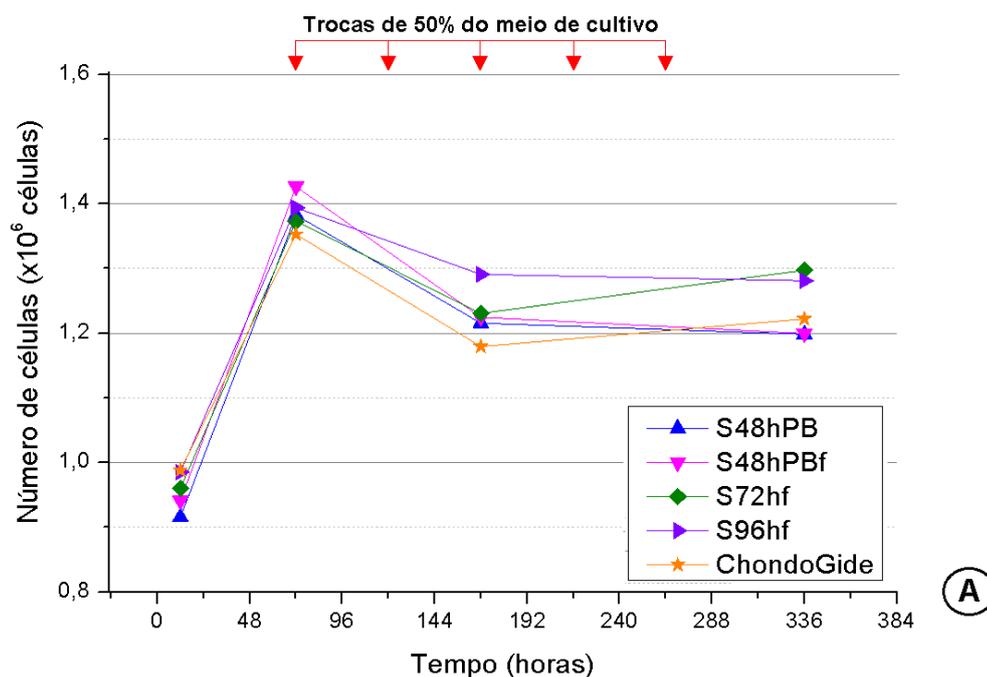
Para determinar os números de células aderidas faz-se necessário subtrair o número total de células obtido pelo número de células das suspensões, contados em hemocítômetro, resultados dispostos na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Número de células totais nas suspensões de cada amostra

Número de células totais em suspensão ($\times 10^4$ células)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
12	9,3 \pm 0,7	6,5 \pm 0,7	5,4 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2
72	4,2 \pm 0,8	1,3 \pm 0,7	3,8 \pm 0,9	1,7 \pm 0,2	4,2 \pm 0,1
168	2,4 \pm 0,8	2,4 \pm 0,8	2,3 \pm 0,9	2,2 \pm 0,8	1,5 \pm 0,1
336	10,3 \pm 3,8	9,9 \pm 0,8	6,1 \pm 0,6	5,9 \pm 0,7	11,8 \pm 0,8

Na Figura 4.56 temos as densidades de células aderidas estimadas, em curvas de crescimento celular (Figura 4.56A) e seus respectivos valores (Figura 4.56B). Na figura estão exibidas as curvas de crescimento celular das células aderidas em cada *scaffold* (Figura 4.56A e Tabela anexada). Nota-se um intenso crescimento da curva nas primeiras 72 horas de cultivo em todas as amostras, com valores máximos de densidades entre $1,35$ e $1,43 \times 10^6$ células aderidas. As amostras S48hPBf e S96hf apresentaram os maiores valores sendo estatisticamente superiores aos encontrados para a Chondro-Gide. Adicionalmente os demais *scaffolds* não diferem estatisticamente dos obtidos pela amostra comercial, evidenciando, novamente, a capacidade de adesão e proliferação celular em 72 horas de cultivo.

Após o período de 72 horas de cultivo, nota-se um declínio no número de células em todos os *scaffolds* até o tempo de 168 horas, momento no qual as amostras apresentaram estabilidade no crescimento celular até o final do cultivo.



Número de células aderidas aos scaffolds (x10 ⁶ células)					
Tempo (horas)	Amostras				
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
12	0,92 ^a	0,94 ^{a,b}	0,96 ^{b,c}	0,99 ^c	0,99 ^c
72	1,38 ^a	1,43 ^b	1,37 ^a	1,39 ^{a,b}	1,35 ^a
168	1,22 ^{a,b}	1,22 ^{a,b}	1,23 ^b	1,29 ^c	1,18 ^a
336	1,20 ^a	1,20 ^a	1,30 ^b	1,28 ^b	1,22 ^a

Figura 4.56. Estimativas do crescimento celular dos fibroblastos nos scaffolds. A. Curvas de crescimento das células aderidas ao longo do tempo de 336 horas (setas vermelhas indicam os momentos que ocorreram as trocas de meio de cultivo), B. Valores das estimativas de crescimento das células aderidas. Letras iguais nos valores de cada linha indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de células (Tukey, $p < 0,05$).

Na Figura 4.57 estão disponíveis os dados referentes ao FE apresentando valores estatisticamente semelhantes para S48hPB, S48hPBf e S96hf em 168 horas de cultivo e para S48hPB, S72hf e S96hf em 336 horas. Além disso, todas as amostras produzidas neste trabalho demonstraram maiores valores de FE ao encontrado para a Chondro-Gide, evidenciando que são potenciais alternativas para o estudo *in vivo* no tratamento de lesões de pele.

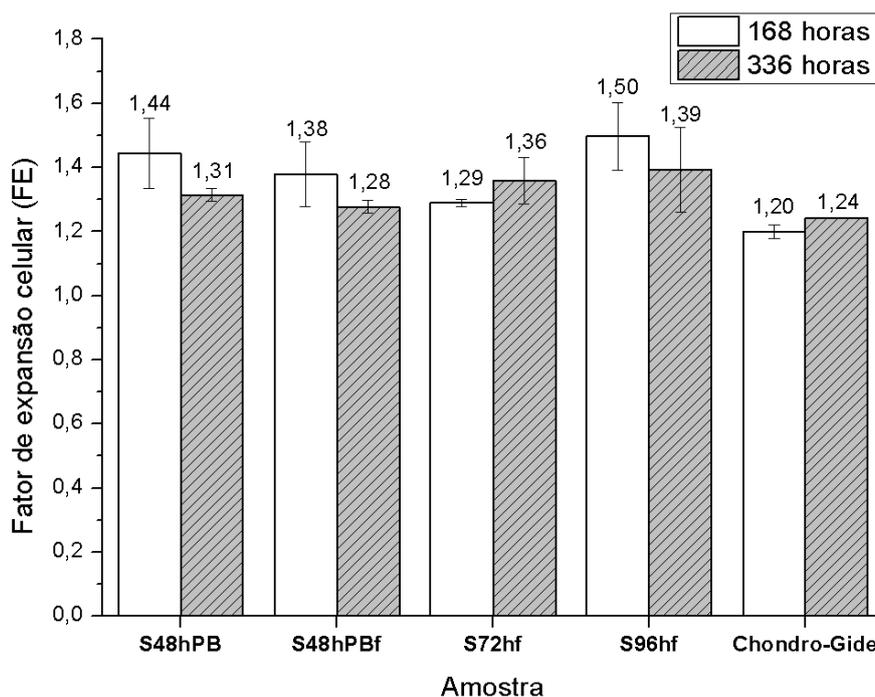


Figura 4.57. Fator de expansão celular dos fibroblastos de cada *scaffold* analisado nos tempos de 168 e 336 horas.

4.2.7.4 Microscopia eletrônica de varredura dos *scaffolds* cultivados com fibroblastos

Foram observados os *scaffolds* cultivados por 72 horas (Figuras 4.58 e 4.59), nos respectivos aumentos de 100x e 250x. Verifica-se na Figura 4.58 a intensa presença de MEC e de células em algumas regiões das imagens (indicadas pelas setas), sendo visualizadas em maior intensidade nas Figuras 4.58 B, C e D (amostras S48hPBf, S72hf e S96hf), que apresentaram maiores estimativas de células aderidas (tópico 4.2.7.3). A amostra Chondro-Gide, retratado na Figura 4.58E, apresenta a intensa presença de MEC sobre toda a superfície, indicando adequação e boa compatibilidade celular.

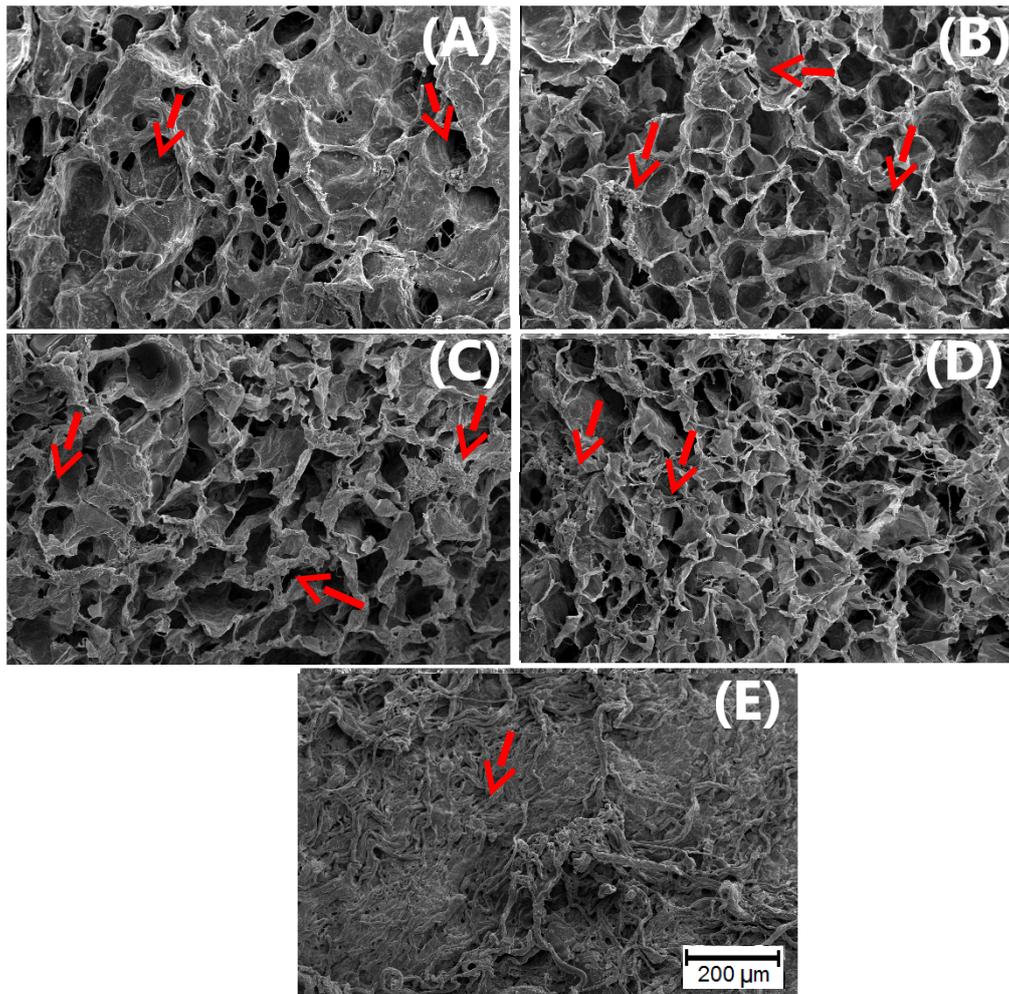


Figura 4.58. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas cultivadas com fibroblastos. Obtidas no aumento de 100x. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf, E = Chondro-Gide. As setas indicam regiões com células aderidas e presença de MEC

A Figura 4.59 apresenta as imagens realizadas no aumento de 250x, exibindo a presença de células em aglomerados e MEC em todas as amostras, porém, com menor intensidade na amostra S48hPB (Figura 4.59A). As demais revelam a presença de células arredondadas e recobertas por MEC em grande parte.

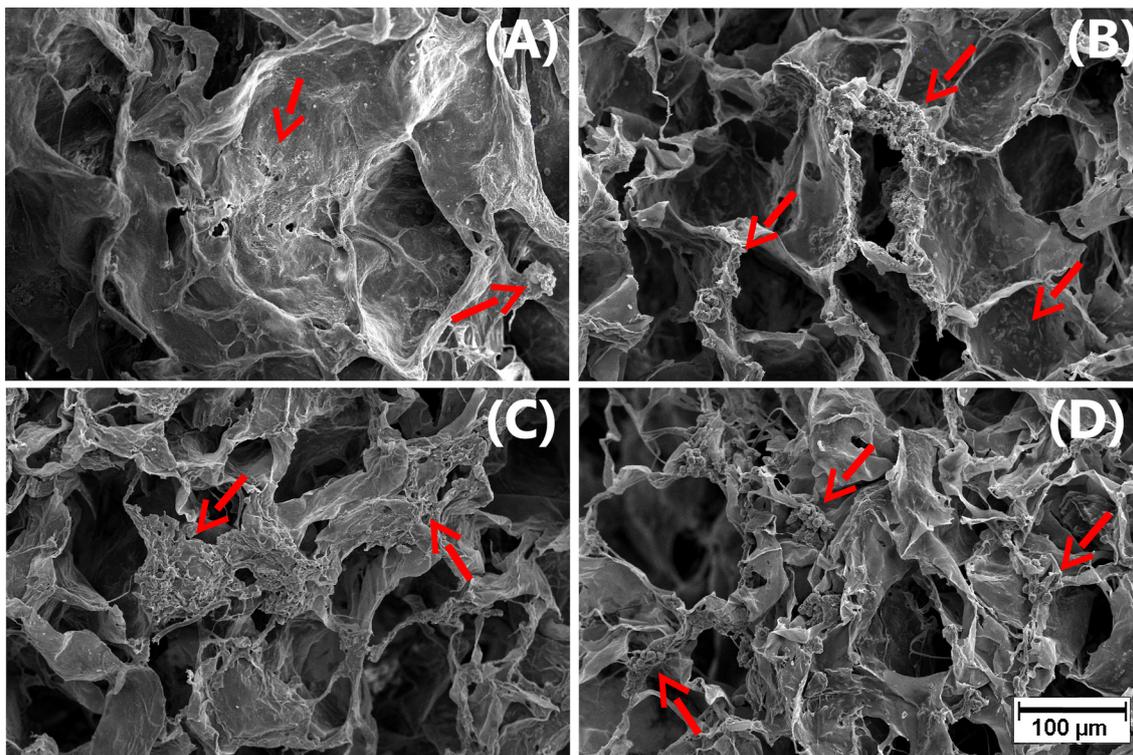


Figura 4.59. Imagens geradas por Microscopia Eletrônica de Varredura das superfícies porosas cultivadas com fibroblastos ao longo de 72 horas. Obtidas no aumento de 250x. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf. As setas indicam regiões com células aderidas e presença de MEC

4.2.5.5 Microscopia de fluorescência confocal dos *scaffolds* cultivados com fibroblastos

As imagens obtidas por Microscopia Confocal estão apresentadas nas Figuras 4.60 e 4.61. Nota-se a intensa presença de grandes estruturas em azul (setas amarelas), identificadas como fibras de colágeno autofluorescentes, característica comumente encontrada em alguns materiais.

Na Figura 4.60 relacionada ao cultivo de 168 horas, pode ser observada uma boa distribuição das células (indicadas pelas setas vermelhas) em todas as amostras, sendo a Figura 4.60D referente ao S96hf, a que apresentou maiores quantidades celulares, assim como nas estimativas de crescimento celular, conforme análises anteriores (tópico 4.2.7.3).

Em concordância com os resultados obtidos no tópico 4.2.7.3 para o crescimento celular em 336 horas, a Figura 4.61 confirma os dados relativos às amostras S72hf e S96hf (Figuras 4.61C e D, respectivamente), evidenciando a infiltração celular nas matrizes.

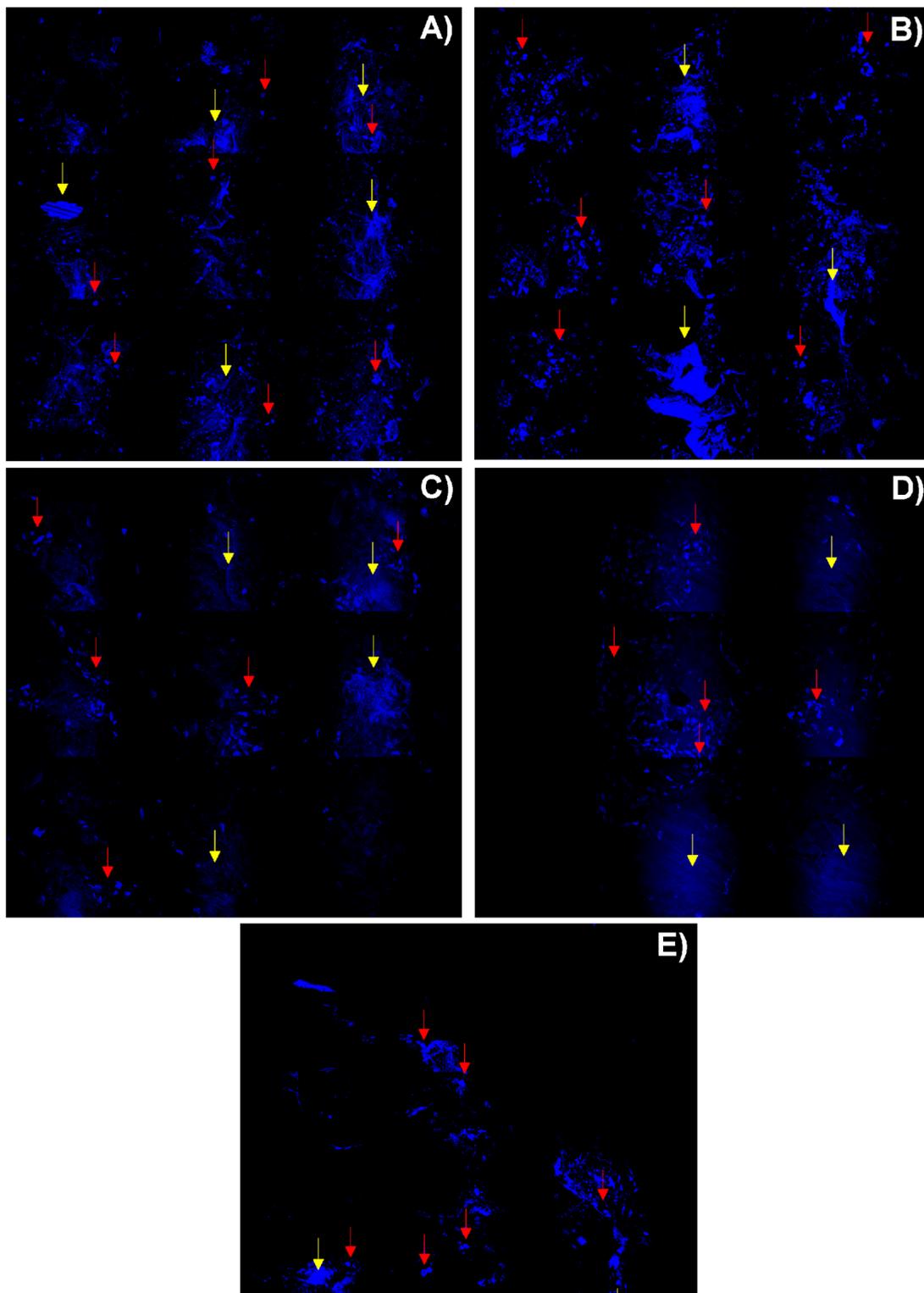


Figura 4.60. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura cultivadas com fibroblastos ao longo de 168 horas. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf e E = Chondro-Gide. Os pontos azuis são os núcleos das células corados com DAPI, sendo sinalizados com as setas vermelhas. As setas amarelas sinalizam regiões em que as fibras de colágeno do *scaffold* foi corada pelo DAPI.

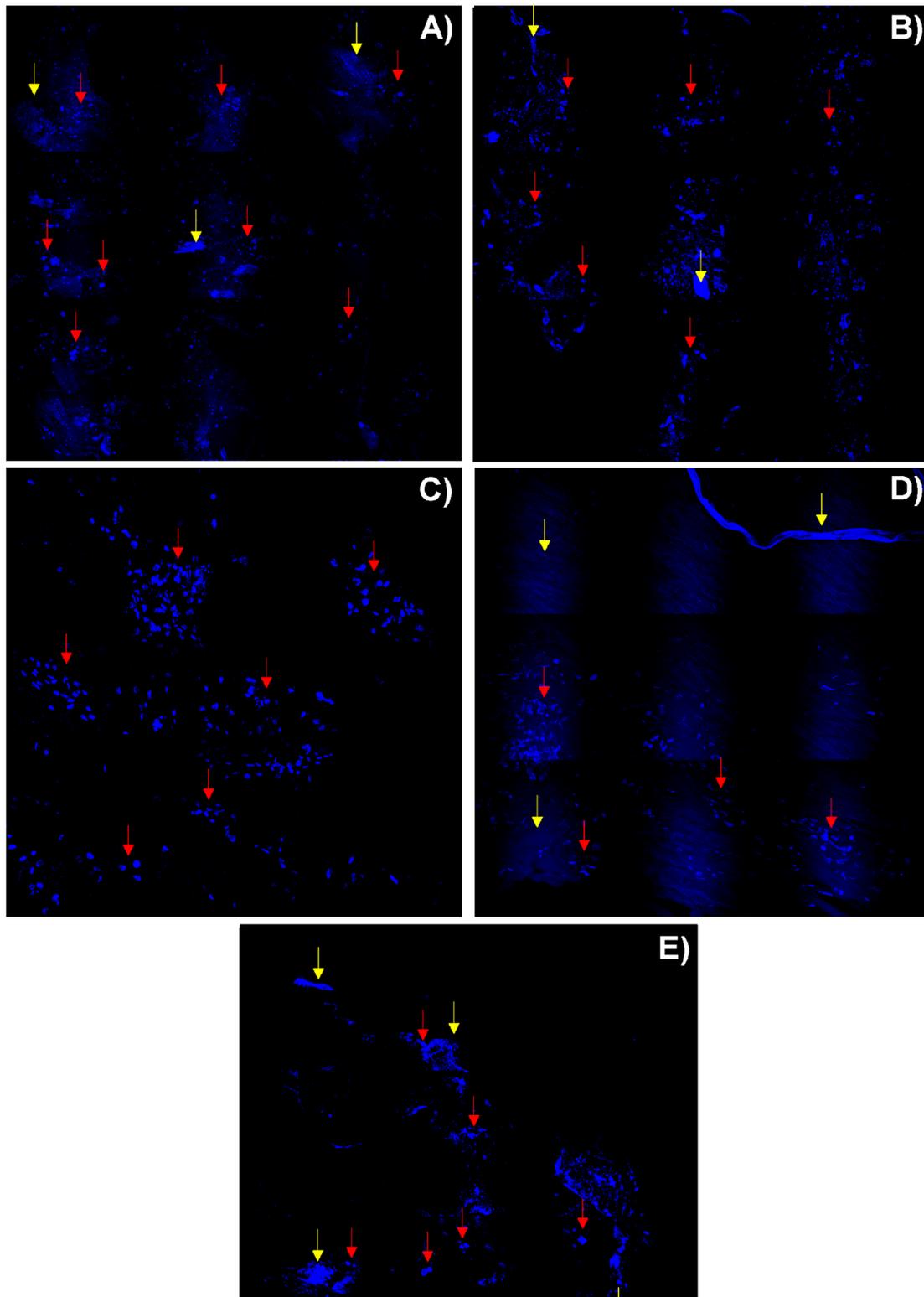


Figura 4.61. Imagens geradas por Microscopia de Fluorescência Confocal das células aderidas por toda estrutura cultivadas com fibroblastos ao longo de 168 horas. A= S48hPB, B = S48hPBF, C = S72hf, D = S96hf e E = Chondro-Gide. Os pontos azuis são os núcleos das células corados com DAPI, sendo sinalizados com as setas vermelhas. As setas amarelas sinalizam regiões em que as fibras de colágeno do *scaffold* foi corada pelo DAPI.

4.2.8 Discussão Final

Conforme discutido nos resultados anteriores, os *scaffolds* produzidos neste trabalho apresentaram uma resposta positiva aos processos de adesão e proliferação celular das CEMs, queratinócitos e fibroblastos.

Por comparações das imagens obtidas por MEV entre os *scaffolds* imersos em meio de cultura (Figura 4.62) e os que foram cultivados com as CEMs (Figura 4.63) durante 72 horas, notam-se regiões em que ocorreram a adesão e proliferação celular, comprovando que todos os *scaffolds* apresentaram capacidade em promover o crescimento celular, sendo mais intenso nas Figuras 4.63E e G, respectivas às amostras S72hf e S96hf. Para a Chondro-Gide, disponível na Figura 4.64, é possível observar a intensa formação de MEC sobre a estrutura do *scaffold* (Figura 4.64B).

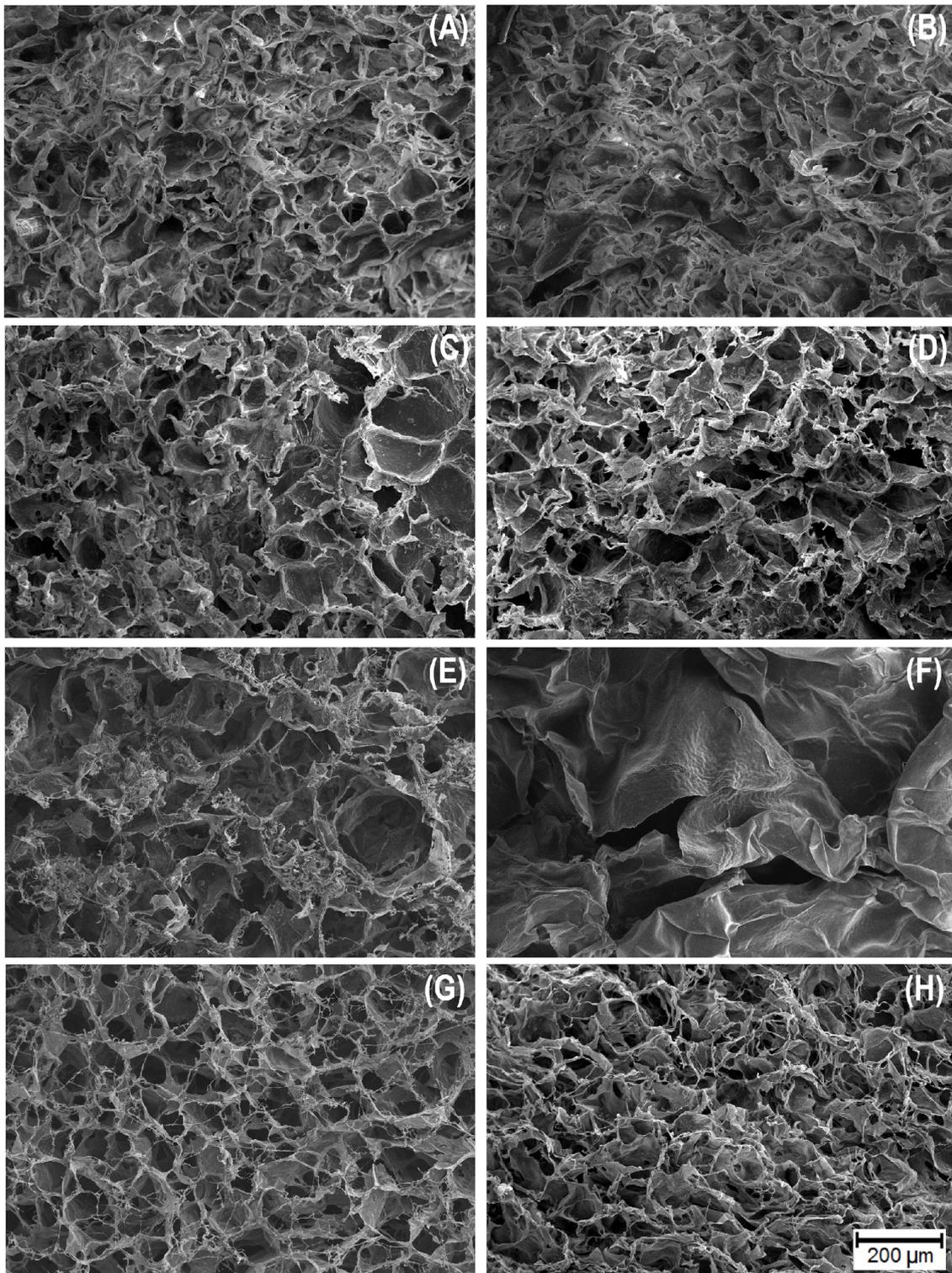


Figura 4.62. Imagens em MEV dos scaffolds em meio de cultura durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc.

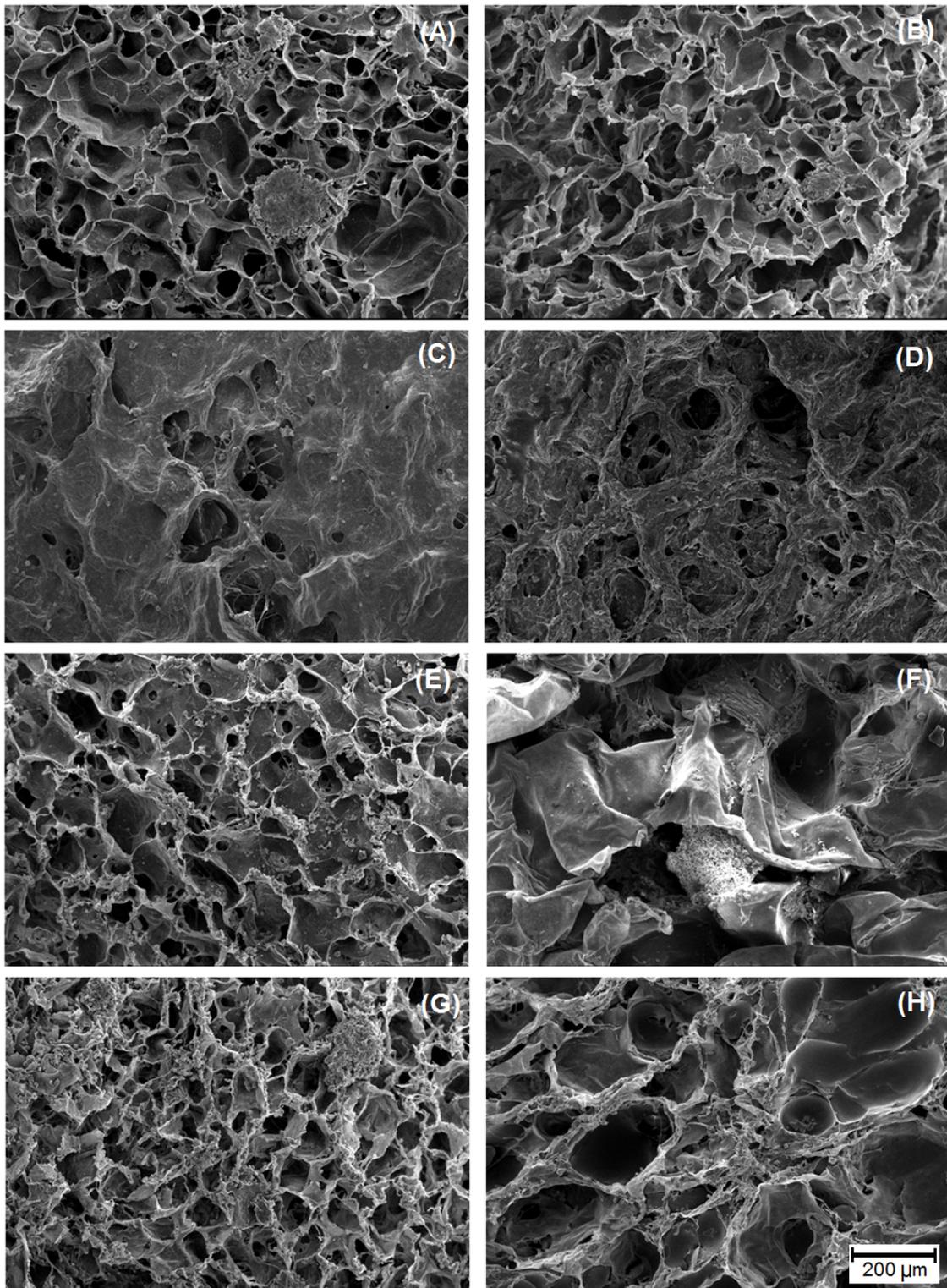


Figura 4.63. Imagens em MEV dos *scaffolds* cultivados com CEMs durante 72 horas. Obtidas no aumento de 100x. A = S24hPB, B = S24hPBf, C = S48hPB, D = S48hPBF, E = S72hf, F = S72hAc, G = S96hf, H = S96hAc.

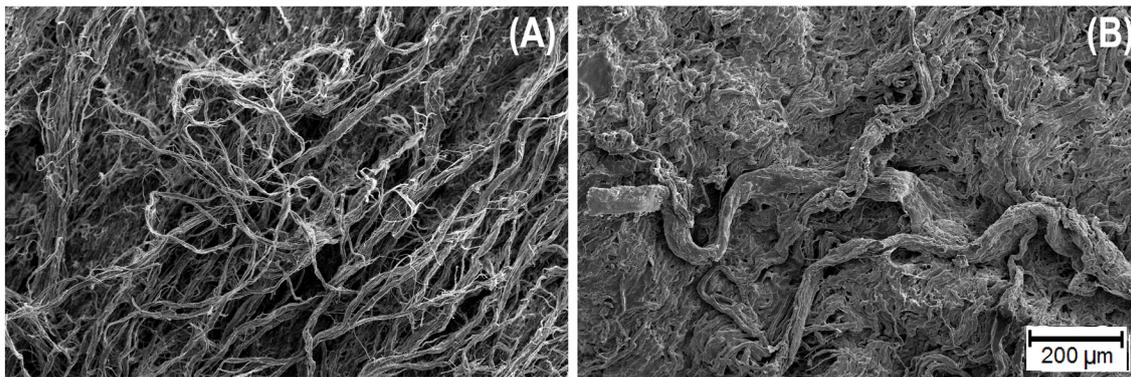


Figura 4.64. Imagem em MEV da Chondro-Gide. (A) Amostra em meio de cultura, (B) cultivada com queratinócitos durante 72 horas.

A Tabela 4.13 exibe a quantificação das células aderidas na amostra comercial (Chondro-Gide) e nos *scaffolds* produzidos para este trabalho. Tendo a Chondro-Gide como referência (considerando-a como 100%) temos que os *scaffolds* deste trabalho apresentam porcentagem igual ou até superior ao valor obtido pela Chondro-Gide. Cabe observar que as amostras S48hPB e S96hf referentes aos queratinócitos, e as S72hf e S96hf para os fibroblastos, resultaram em porcentagens de células aderidas comparativamente maiores que o produto comercial.

Tabela 4.13. Comparação do número de células aderidas (%) entre os *scaffolds* e Chondro-Gide

Amostras	Comparação do número de células aderidas (%)			
	Queratinócitos (HaCat)		Fibroblastos (HDFn)	
	168 h	336 h	168 h	336 h
S48hPB	105	120	103*	98*
S48hPBf	101*	101*	102*	98*
S72hf	96*	103*	104	107
S96hf	101*	106*	109	105
Chondro-Gide	100*	100*	100*	100*

* indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o número de células nos *scaffolds*

Na Tabela 4.14 temos um quadro geral comparativo das propriedades físico-químicas das amostras avaliadas, que são fundamentais na engenharia de tecidos no contexto da medicina regenerativa. Dos resultados gerais, depreende-se que as amostras S48hPB, S72hf e S96hf apresentaram um maior conjunto de características ideais (sinalizadas por "+").

Tabela 4.14. Comparação das características físico-químicas dos *scaffolds* e Chondro-Gide

Comparação das características físico-químicas dos <i>scaffolds</i>					
	S48hPB	S48hPBf	S72hf	S96hf	Chondro-Gide
Estrutura porosa definida			+	+	
Porosidade	+			+	
Tamanho dos poros	+	+	+	+	
Capacidade hidratação	+	+	+	+	*
Hidrofílico	+		+	+	+
Td	+	+	+	+	+
Degradação	+	+	+		+

Onde: (+): característica apropriada para um *scaffold* destinado à engenharia de tecidos no tratamento de lesões de pele

(*) não foi analisado.

De maneira geral, os resultados indicam que todos os *scaffolds* confeccionados para este trabalho apresentaram um conjunto de características que os tornam potenciais materiais a serem aplicados em lesões de pele. Em particular as amostras S48hPB, S72hf e S96hf resultaram em uma maior proliferação celular, bem como características físico-químicas superiores à Chondro-Gide.

Capítulo 5 – Conclusões

Pesquisas visando o desenvolvimento de biomateriais na área de engenharia de tecidos são de grande importância para a indústria biotecnológica ligada à área da saúde, assim como para a independência do Brasil na importação desses insumos para suprir sua demanda. Assim, fica evidente a relevância das análises em cultivo *in vitro* conduzidas neste projeto, visando caracterizar a proliferação de diferentes tipos celulares importantes no desenvolvimento de terapias para cicatrização de lesões na pele. Adicionalmente, as análises de cultivo *in vitro* realizados na amostra do *scaffold* comercial da Chondro-Gide que permitiam avaliar comparativamente as eficiências dos materiais desenvolvidos neste estudo.

Em relação às propriedades físico-químicas dos *scaffolds*, os dados obtidos foram semelhantes para todas as amostras analisadas, tendo a porosidade em especial como fator de seleção, considerando que a porosidade está relacionada com as diferenças no crescimento celular encontradas.

De acordo com as caracterizações, entre os parâmetros que se apresentaram ideais na produção dos *scaffolds* foram: o emprego de colágeno tipo I aniônico em tempos de 48, 72 e 96 horas de extração de serosa suína seguido de solubilização em PBS 10x, solução fosfato 1x e PBS 10x com solução fosfato 1x, com processo de formação de estrutura porosa obtido por liofilização.

As amostras designadas como S48hPB, S48hPBf, S72hf e S96hf foram as capazes de promover um ambiente mais apropriado para a adesão e crescimento das CEMs avaliadas nos períodos de 168 e 336 horas.

As análises realizadas com queratinócitos e fibroblastos demonstraram que todos os *scaffolds* promoveram crescimento celular semelhante ou até superior (S48hPB e S96hf para queratinócitos, e S72hf e S96hf para fibroblastos) que os medidos para a amostra comercial Chondro-Gide.

Os dados referentes às análises físico-químicas, associados aos de cultivo celular, corroboram com as referências da literatura, as quais relatam considerável influência positiva do maior grau de porosidade na adesão e crescimento celular, assim como no tamanho e distribuição dos poros, como observado com as amostras S48hPB, S72hf e S96hf com maiores porosidades

e proporcionalmente as maiores adesões e crescimento celular. Adicionalmente, essas amostras também apresentaram melhores características relativas à capacidade de absorção, hidrofiliabilidade, temperatura de degradação e degradação, qualificando-as como potenciais alternativas como materiais de baixo custo para o tratamento de lesões de pele.

Por fim, este trabalho gera perspectivas para estudos adicionais, nos quais alterações estruturais e/ou incorporação de outros materiais biocompatíveis possam ser agregados ao colágeno com o intuito de elevar a adequação dos *scaffolds* para o cultivo de células específicas. Cabe ressaltar a necessidade da realização de testes na condição *in vivo* para a confirmação da real habilidade desses materiais no tratamento de lesões de pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B. M. et al. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite [corrected] extensive proliferation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 326, n. 3, p. 527–38, 2005.

ADLER-NISSEN, J. Enzymatic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishers**, 1986.

AKILBEKOVA, D.; SHAIMERDENOVA, M.; ADILOV, S.; BERILLO, D. Biocompatible *scaffolds* based on natural polymers for regenerative medicine. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 114, p. 324–333, 2018.

ALLSOPP, R. C.; HARLEY, C. B. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. **Experimental cell research**, jul. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7628529>>

AMABLE, P.; BUTLER, M. Cell metabolism and its control in culture. In: CASTILHO, L. R. et al. (Eds.). **Animal Cell Technology: From Biopharmaceuticals to Gene Therapy**. NY: Taylor & Francis Group. p. 75–110, 2008.

ANGELE, P.; ABKE, J.; KUJAT, R.; FALTERMEIER, H.; SCHUMANN, D.; NERLICH, M.; KINNER, B.; ENGLERT, C.; RUSZCZAK, Z.; MEHRL, R.; MUELLER, R. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. **Biomaterials**. v. 25, p. 2831-2841, 2004.

ASTM (2008). American Society for Testing and Materials D5725-99. Standard test method for surface wettability and absorbency of sheeted materials using an automated contact angle tester (Withdrawn 2010). ASTM International.

BACAKOVA, M.; POJOROVA, J.; BROZ, A.; HADRABA, D., LOPOT, F.; ZAVADAKOVA, A.; VISTEJNOVA, L.; BENO, M.; KOSTIC, I.; JENCOVA, V.; BACAKOVA, L. A two-layer skin construct consisting of a collagen hydrogel reinforced by a fibrin-coated polylactide nanofibrous membrane. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5033-5050, 2019.

BALAURE, P. C.; HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M.; MOGOȘANU, G. D.; BĂLȘEANU, T. A.; STAN, M. S.; DINISCHIOTU, A.; VOLCEANOV, A.; MOGOANTĂ, L. In vitro and in vivo studies of novel fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D *scaffolds*. **International journal of pharmaceutics**. v. 557, p. 199-207, 2019.

BARBOSA, A. I.; COUTINHO, A. J.; LIMA, S. A. C.; REIS, S. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: Fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field. **Marine Drugs**, v. 17, n. 654, 2019.

BATISTA, T.M. **Mineralização in vitro de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos**. 2008. 115f. Tese (Doutorado em Ciências), IQSC, USP, São Carlos, 2008.

BELLINI, M. Z. **DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS LAMELARES E POROSAS DE XANTANA E QUITOSANA PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE LESÕES**

DE PELE. 2012, 172f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), , BAE, UNICAMP, Campinas, 2012.

BERG, J. C. Wettability. Surfactant Science Series, Marcel Dekker, Inc., 1993.

BERNAL, V. M.; STANLEY, D. W. Stability of bovine muscle connective tissue. **Journal of Food Science**, v. 52 p. 876-878, 1987.

BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagine and Glutamine Carboxamide Side Chains. **Biomacromolecules**. v. 2, p. 1074-1079, 2001.

BIANCO P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**. v. 2, p. 313–319, 2008.

BIGARELLA, C. L.; LIANG, R.; GHAFARI, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. **Development**, v. 141, n. 22, p. 4206–4218, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Queimados. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990-queimados>> . Acesso em: janeiro, 2021.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**. v. 117, n. 7S, 2006.

BUKZEM, A. D. L.; **Membranas porosas à base de carboximetilquitosana e poli(álcool vinílico) para o tratamento de lesões de pele**. 2018. 113f. Tese (Doutorado em Ciências) IQSC, USP, São Carlos, 2018.

CALABRESE, G.; FORTE, S.; GULINO, R.; CEFALÌ, F.; FIGALLO, E.; SALVATORELLI, L.; MANISCALCHI, E. T.; ANGELICO, G.; PARENTI, R.; GULISANO, M.; MEMEO, L.; GIUFFRIDA, R. Combination of collagen-based *scaffold* and bioactive factors induces adipose-derived mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation in-vitro. **Frontiers in Physiology**. v. 8, 2017.

CAMARERO-ESPINOSA, S.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; FOSTER, E. J.; WEDER, C. Cartilagem articular: da formação à engenharia de tecidos. **Biomaterials Science**. v. 4, p. 734-767, 2016.

CANEVALORO, S. “Técnicas de Caracterização de Polímeros”, Artliber Editora, S. Paulo, SP., 2004).

CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **TRENDS in Molecular Medicine**. v. 7, n. 6, 2001.

CHAN, E. S.; KUO, S-M.; KONG, A. M.; MORRISON, W. A.; DUSTING, G. J.; MITCHELL, G. M.; LIM, S. Y.; LIU, G-S. Three Dimensional Collagen *Scaffold* Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. **Plos One**. v. 11, n. 2, 2016.

CHANDIKA, P.;, KO, S. C.; OH, G. W.; HEO, S. Y.; NGUYEN, V. T.; JEON, Y. J.; LEE, B.; JANG, C. H.; KIM, G.; PARK, W. S.; CHANG, W.; CHOI, I. W.; JUNG, W. K. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated *scaffold* for skin tissue regeneration application. **Int J Biol Macromol**. n. 81. p. 504-513, 2015.

COSKUN, S. B.; WARDLAW, N. C. Influences of pore geometry, porosity and permeability on initial water saturation - An empirical method for estimating initial water saturation by image analysis. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 12, n. 4, p. 295-308, 1995.

DASKALOVA, A.; NATHALA, C. S. R.; BLIZNAKOVA, I.; STOYANOVA, E.; ZHELYAZKOVA, A.; GANZ, T.; LUEFTENEGGER, S.; HUSINSKY, W. Controlling the porosity of collagen, gelatin and elastin biomaterials by ultrashort laser pulses. **Applied Surface Science**, v. 292, p. 367-377, 2014.

DAVIDENKO, N.; CAMPBELL, J. J.; THIANA, E. S.; WATSON, C. J.; CAMERONA, R. E. Collagen-hyaluronic acid *scaffolds* for adipose tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.6, n. 10, p. 3957-3968, 2010.

DILL, V.; MÖRGELIN, M. Biological dermal templates with native collagen *scaffolds* provide guiding ridges for invading cells and may promote structured dermal wound healing. **Int Wound J**. v. 17, p. 618-630, 2020.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology**, John Wiley & Sons, Canadá, 1998.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**. v. 26, n. 2, p. 31-37. 2008.

ERWANTO, Y.; KAWAHARA, S.; KATAYAMA, K.; TAKENOYAMA, S.; FUJINO, H.; YAMAUCHI, K.; MORISHITA, T.; KAI, Y.; WATANABE, S.; MUGURUMA, M. Microbial Transglutaminase Modifies Gel Properties of Porcine Collagen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**. v. 16, n. 2, p. 269-276, 2003.

FAROKHI, M., MOTTAGHITALAB, F., FATAHI, Y., KHADEMHOSEINI, A.; KAPLAN, D. L. Overview of Silk Fibroin Use in Wound Dressings. **Trends Biotechnol.** v. 36, p. 907-922, 2018.

FLORES LUNA, G. L.; ANDRADE, A. L. M.; BRASSOLATTI, P.; BOSSINI, P. S.; ANIBAL, F. F.; PARIZPTTP, N. A.; LEAL, A. M. O. Biphasic Dose/Response of Photobiomodulation Therapy on Culture of Human Fibroblasts. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**. v. 38, n. 7, 2020.

FRESHNEY, R. I. Animal cell culture – A Practical Approach, IRL Press, p.329, 1989.

FREYMAN, T. M.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J. Cellular materials as porous *scaffolds* for tissue engineering. **Progress in Materials Science**. v. 46, p. 273-282, 2001.

FUCHS, E. Epidermal differentiation – the bare essentials. **Journal of Cell Biology**. v. 111, n.6, p. 2807-2814, 1990.

GARCIA, C. F.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Effects of grape seed extract on properties of type I collagen *scaffolds*. **International journal of advances in medical biotechnology**. v. 2, n. 2, 2019.

GENEVRO, G. M. **Desenvolvimento de materiais microestruturados a partir de biopolímeros para obtenção de curativos de alto desempenho**. 2017. 110F. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

GEORGE, J.; ONODERA, J.; MIYATA, T. Biodegradable honeycomb collagen *scaffold* for dermal tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2008. DOI: 10.1002/jbm.a.32277

GIL, E. S.; SPONTAK, R. J.; HUDSON, S. M. Effect of β -Sheet Crystals on the Thermal and Rheological Behavior of Protein-Based Hydrogels Derived from Gelatin and Silk Fibroin. **Macromolecular Bioscience**. v. 5, n. 8, p. 702-709, 2005.

GILOTRA, S.; CHOUHAN, D.; BHAEDWAJ, N.; NANDI, S. K.; MANDAL, B. B. Potential of silk sericin based nanofibrous mats for wound dressing applications. **Materials Science & Engineering C**. n. 90, p. 420–432, 2018.

GODARA, P.; MCFARLAND, C.D.; NORDON, R.E. Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 408-420, 2008.

GRAGNANI, A.; MORGAN, J. R.; FERREIRA, L. M. Experimental model of cultured keratinocytes. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, p. 4-14, 2003.

GRAY, H., et al. Gray's anatomy: the anatomical basis of medicine and surgery. Nova Iorque: Churchill Livingstone; 1995. p.395-416

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta mater**. v. 48, p. 263-277, 2000.

GROSSI, V. L. O. **Estudo comparativo em humanos da membrana de colágeno e do enxerto de tecido conjuntivo gengival no tratamento das recessões periodontais**. 2005. 131F. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

GROVER, C. N.; CAMERON, R. E.; BEST, S. M. **Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering**. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. v. 10, p. 62-74, 2012.

GULOTTA, F. Et al. Biomechanical evaluation of hMSCs-based engineered cartilage for chondral tissue regeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v. 86, p. 294–304, 2018.

HADISI, Z.; NOURMOHAMMADI, J.; MOHAMMADI, J. Composite of porous starch-silk fibroin nanofiber-calcium phosphate for bone regeneration. **Ceramics International**. v. 41, p. 10745-10754, 2015.

HASSELL, T.; GLEAVE, S.; BITLER, M.; Growth inhibition in animal cell culture. The effect of lactate and ammonia; *Appl. Biochem. Biotechnol*, v. 30, p. 29-41, 1991.

HE, L.; LAN, W.; ZHAO, Y.; CHEN, S.; LIU, S.; CEN, L.; CAO, S.; DONG, L.; JIN, R.; LIU, Y. Characterization of biocompatible pig skin collagen and application of collagen-based films for enzyme immobilization. **RSC Advances**. v. 10, p. 7170-7180, 2020.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. Materials Selection. In: Wise, D. L. **Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering**, part A, v. 1. Dekker, Marcel Inc, 1995. p. 27-59.

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

HUANG, S.; FU, X. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration. **Journal of Controlled Release**. v. 142, p. 149-159, 2010.

HUTMACHER, D.; WOODFIELD, T.; LEWIS, P. D. J. *Scaffold* design and fabrication. In: BLITTERSWIJK, C. V.; THOMSEN, P.; LINDAHL, A.; HUBBELL, J.; WILLIAMS, D. F.; CANCEDDA, R.; BRUIJN, J. D.; SOHIER, J. **Tissue Engineering**. Canadá: Academic Press, 2008. p. 403-454.

IACOB, A-T.; et al. Preparation, Characterization and Wound Healing Effects of New Membranes Based on Chitosan, Hyaluronic Acid and Arginine Derivatives. **Polymers**, v. 10, n. 607, 2018. doi:10.3390/polym10060607

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**. v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S. de; RÊGO, F. M. P. do; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**. v. 89, n. 3-4, p. 125-131, 2010. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v89i3/4p125-131. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revistadc/article/view/46294>. Acesso em: 25 jan. 2022.

IKEDA, T. et al. Fabrication and characteristics of chitosan sponge as tissue engineering scaffold. **Biomed Research International**, v. 2014, artigo ID 786892, 8p., 2014.

JAKOBSEN, R. B.; SHAHDADFAR, A.; REINHOLT, F. P.; BRINCHMANN, J. E. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. **Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc**. v. 18, p. 1407–1416, 2010.

JANIS, J. E.; HARRISON, B. Wound Healing: Part I. Basic Science. **Plast Reconstr Surg**. v. 133, n. 2, p. 199e-207e, 2014.

KEONG, L. C.; HALIM, A. S. In vitro models in biocompatibility assessment for biomedicalgrade chitosan derivatives in wound management. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.1300-1313, 2009.

KESSLER, M. W.; GRANDE, D. A. Tissue engineering and cartilage. **Organogenesis**, Nova Iorque, v. 4, p. 28-32, 2008.

KIM, C. H.; LEE, J. H.; WON, J. H.; CHO, M. K. Mesenchymal Stem Cells Improve Wound Healing In Vivo via Early Activation of Matrix Metalloproteinase-9 and Vascular Endothelial Growth Factor. **J Korean Med Sci**, v. 26, p. 726-733, 2011.

KOMSA-PENKOVA, R.; KOYNOVA, R.; KOSTOV, G.; TENCHOV, B. Discrete reduction of type I collagen thermal stability upon oxidation. **Biophysical Chemistry**. v. 83, n. 3, p. 185-195, 2000.

KORRAPATI, P. S.; KARTHIKEYAN, K.; SATISH, A.; KRISHNASWAMY, K. R.; VENUGOPAL, J. R.; RAMAKRISHNA, S. Recent advancements in nanotechnological strategies in selection, design and delivery of biomolecules for skin regeneration. **Materials Science and Engineering C**. v. 67, p. 747-765, 2016.

LI, L. et al. Hierarchical Structure and Mechanical Improvement of an n-HA/GCO-PU Composite *Scaffold* for Bone Regeneration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n. 40, p. 22618-22699, 2015.

LI, L.; YU, F.; ZHENG, L.; WANG, R.; YAN, W.; WANG, Z.; XU, J.; WU, J.; SHI, D.; ZHU, L.; WANG, X.; JIANG, Q. Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. **Journal of Orthopaedic Translation**. v. 17, p. 26-41, 2019.

LIU, Y.; GRIFFITH, M.; WATSKY, M. A.; FORRESTER, J. V.; KUFFOVA, L.; GRANT, D.; MERRETT, K.; CARLSSON, D. J. Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications. **Biomacromolecules**. v. 7, p. 1819-1828, 2006.

LIU, Y.; MA, T. Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. **Biotechnology progress**, 2014.

LÖNROTH, E. C.; DAHL, S. E. Cytotoxicity of liquids and powers of chemically different dental materials evaluated using dimethylthiazoldiphenyl tetrazolium and neutral red tests. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 61, n.1, p. 52-56, 2003.

MARLOVITS, S.; ZELLER, P.; SINGER, P.; RESINGER, C.; VECSEI, V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. **European Journal of Radiology**, v. 57, p. 24-31, 2006. Disponível em: <[http://www.ejradiology.com/article/S0720-048X\(05\)00289-5/fulltext](http://www.ejradiology.com/article/S0720-048X(05)00289-5/fulltext)>. Acesso em: março, 2018.

MASSIMINO, L. C. **Scaffolds de biopolímeros e resina de Jatobá para utilização em engenharia tecidual**. 2020. 127f. Tese (Doutorado em Ciências) IQSC, USP, São Carlos, 2020.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. **Biomaterials**. v. 28, p. 5100-5113, 2007.

MI, F-L.; SHYU, S-S.; WU, Y-B.; LEE, S-T.; SHYONG, J-Y.; HUANG, R-N. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p. 165-173, 2001.

MOHANDAS, A.; DEEPTHI, S.; BISWAS, R.; JAYAKUMAR, R. Chitosan based metallic nanocomposite *scaffolds* as antimicrobial wound dressings. **Bioactive Materials**. v. 3, p. 267-277, 2018.

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. P.; CASTILHO, L. R. Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 50, p. 627-635, 1996.

MOSTAFALU, P.; TAMAYOL, A.; RAHIMI, R.; OCHOA, M.; KHALILPOUR, A.; KIAEE, G.; YAZDI, I.; BAGHERIFARD, S.; DOKMECI, M. R.; ZIAIE, B. SONKUSALE, S. R.; KHADEMHOSEINI, A. Smart Bandage for Monitoring and Treatment of Chronic Wounds. **Small**. v. 14, p. 1-9, 2018.

MURPHY, C. M.; O'BRIEN, F. J. Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan *scaffolds*. **Cell Adh Migr.** v. 4, l. 3, p. 377-381, 2010.

NAGAI, T.; SUZUKI, N. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. **Food Chemistry.** v. 76, n. 2, p. 149-153, 2002.

NEREM, R.; SAGE, H.; KELLEY, C. A.; MCNICOL, L. A. Symposium Summary. In: Reporative Medicine: Growing Tissues and Organs, n. 961, 2002, Bethesda, Maryland. **Anais...** Nova Iorque: Annals New York Academy Of Sciences, 2006. p. 386-391.

NIJHUIS, W. H.; EASTWOOD, D. M.; ALLGROVE, J.; HVID, I.; WEINANS, H. H.; BANK, R. A.; SAKKERS, R. J. Current concepts in osteogenesis imperfecta: bone structure, biomechanics and medical management. *Journal of Children's Orthopaedics.* v. 13, n. 1, p. 1-11, 2019.

NIU, Y.; LI, Q.; DING, Y.; DONG, L.; WANG, C. Engineered delivery strategies for enhanced control of growth factor activities in wound healing. **Adv. Drug Deliv. Rev.,** 2018. doi:10.1016/j.addr.2018.06.002

NOCERA, A. D.; COMÍN, R.; SALVATIERRA, N. A.; CID, M. P. Development of 3D printed fibrillar collagen *scaffold* for tissue engineering. **Biomedical microdevices,** v. 20, p. 26, 2018.

O'BRIEN, F. J. Biomaterials e *scaffolds* for tissue engineering. **MaterialsToday.** v. 14, p. 88-95, 2011.

OGAWA, C. A. **Compositos Hidroxiapatita:** Colágeno. Preparação, caracterização e estudos em liberação controlada de ciprofloxacina. Dissertação. Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, 2002.

PARANI, M., LOKHANDE, G., SINGH, A. & GAHARWAR, A. K. Engineered Nanomaterials for Infection Control and Healing Acute and Chronic Wounds. **ACS Appl. Mater. Interfaces.** v. 8, p. 10049–10069, 2016.

PARK, S. R.; KIM, J. W.; JUN, H. S.; ROH, J. Y.; LEE, H. Y.; HONG, I. S. Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. **Molecular Therapy.** v. 26, n. 2, 2018.

PATEL, S. C.; LALWANI, G.; GROVER, K.; QIN, Y-X.; SITHARAMAN, B. Fabrication and Cytocompatibility of In Situ Crosslinked Carbon Nanomaterial Films. **Scientific Reports.** v. 5, 2015. DOI: 10.1038/srep10261

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. **Trends Biomater. Artif. Organs.** v. 8, n. 1, p. 18-23, 2004.

PEREIRA, R. F.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L.; BARTOLO, P. J. Advanced biofabrication strategies for skin regeneration and repair. **Nanomedicine.** v. 8, n.4, p. 1–19, 2013.

POPESCU, C.; BUDRUGEAC, P.; WORTMANN, F. J.; MIL, L.; DEMCO, D. E.; BAIAS, M. Assessment of collagen-based materials which are supports of cultural and historical objects. **Polymer Degradation and Stability.** v. 93, n. 5, p. 976-982, 2008.

PONTEL, C. Z.; BOABAID, F. Regeneração tecidual guiada em recessões gengivais - o uso do enxerto gengival autógeno e das membranas de colágeno - uma revisão bibliográfica. **Braz. J. Periodontol.** v. 29, n. 2, p. 51-59, jun. 2019.

POWEL, M. H.; BOYCE, S. T. EDC cross-linking improves skin substitute strength and stability. **Biomaterials.** v. 27, n. 34, p. 5821-5827, 2006.

RAHMATI, M.; BLAKER, J. J.; LYGSTADAAS, S. P.; MANO, J.F.; HAUGEN, H.J. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances.** v. 5, i. 100051, 2020. Disponível em: <<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>>. Acesso em: junho, 2021.

RAVICHANDRAN, R.; VENUGOPAL, J. R.; SUNDARRAJAN, S.; MUKHERJEE, S.; FORSYTHE, J.; RAMAKRISHNA, S. Click chemistry approach for fabricating PVA/gelatin nanofibers for the differentiation of ADSCs to keratinocytes. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.** v. 24, p. 2863–2871, 2013.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research.** v. 49, p. 35–43, 2012.

RODRIGUES, L. R. **Scaffolds baseados em nanopartículas de fosfatos de cálcio para engenharia tecidual óssea.** 2012. 169f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica), BAE, Unicamp, Campinas, 2012.

SANANTA, P.; RAHADITYA, I. G. M. O.; IMADUDIN, M. I.; PUTERA, M. A.; ANDARINI, S.; KALSUM, U.; MUSTAMSIR, E.; DRADJAT, R. S. Collagen *scaffold* for mesenchymal stem cell from stromal vascular fraction (biocompatibility and attachment study): Experimental paper. **Annals of Medicine and Surgery.** v. 59, p. 31–34, 2020.

SANCHES, S. **Expansão de células-tronco mesenquimais em frasco spinner com microcarregadores,** 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SANTOS Jr., A. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis à base de poli-L-ácido láctico.** Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SCHOP, D. et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. **Tissue engineering,** v. 15, n. 8, p. 1877–1886, 2009.

SCHOP, D. et al. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine,** v. 4, n. 2, p. 131–40, 2010.

SEN, C. K. Human Wounds and Its Burden: An Updated Compendium of Estimates. **Advances in wound care.** v. 8, n. 2, p. 39-48, 2019.

SHOKRGOZAR, M. A.; FATTAHI, M.; BONAKDAR, S.; KASHANI, I. R.; MAJIDI, M.; HAGHIGHIPOUR, N.; BAYATI, V.; SANATI, H.; SAEEDI, S. N. Healing Potential of Mesenchymal Stem Cells Cultured on a Collagen-Based *Scaffold* for Skin Regeneration. **Iranian Biomedical Journal.** v. 16, n. 2, p. 68-76, 2012.

SIERRA-SÁNCHEZ, A.; KIM, K. H.; BLASCO-MORENTE, G.; ARIAS-SANTIAGO, S. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. **RPJ Regenerative Medicine**. v. 6, n. 35, 2021.

SILVA, I.G. **Avaliação da viabilidade de reutilização de aparas de gelatina geradas no processo produtivo de cápsula gelatinosas moles (sofjel)**. 2018. 105f. Dissertação de mestrado em Processo Industriais. IPT, São Paulo, 2018.

SINNO, H. & PRAKASH, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. **Plast. Surg. Int.** v. 2013, p. 1–7, 2013.

SMOLLE, C.; CAMBIASO-DANIEL, J.; FORBES, A. A.; WURZER, P.; HUNDESHAGEN, G.; BRANSKI, L. K., HUSS, F.; KAMOLZ, L. Recent trends in burn epidemiology worldwide: A systematic review. **Burns**. v. 43, p. 249 – 257, 2017.

SOUTO, L. R. M.; REHDER, J.; VASSALO, J.; CINTRA, M. L.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Medical Journal**, v.124, p.71-76, 2006.

SOUZA, C. M. C. O.; MESQUITA, L. A. F.; SOUZA, D.; IRIODA, A. C.; FRANCISCO, J. C.; SOUZA, C. F.; GUARITA-SOUZA, L. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; CARVALHO, K. A. T. Regeneration of Skin Tissue Promoted by Mesenchymal Stem Cells Seeded in Nanostructured Membrane. **Transplantation Proceedings**, v. 46, p. 1882-1886, 2014.

STOOP, R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. **International Journal of the Care of the Injured**. v. 39, p. 77-87, 2008.

STOPPEL, W. L.; GHEZZI, C. E.; MCNAMARA, S. L.; BLACK III, L. D.; KAPLAN, D. L. Clinical applications of naturally derived biopolymers-based *scaffolds* for regenerative medicine. **Annals of Biomedical Engineering**. v. 43, p. 657-680, 2015.

SUN, W. Q.; LEUNG, P. Calorimetric study of extracellular tissue matrix degradation and instability after gamma irradiation. **Acta Biomaterialia**. v.4, n. 4, p. 817-826, 2008.

TABATA, Yasuhiko. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of the Royal Society interface**, v. 6, n. Suppl_3, 2009, p.S311-S324. Disponível em: <<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsif.2008.0448.focus>>. Acesso em: 07 jul. 2021.

TAMADDON, M.; BURROWS, M.; FERREIRA, S. A.; DAZZI, F.; APPERLEY, J. F.; BRADSHAW, A.; BRAND, D. D.; CZERNUSZKA, J.; GENTLEMAN, E. Monomeric, porous type II collagen *scaffolds* promote chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*. **Scientific Reports**. v. 7, n.43519, 2017.

VASHISTH, P.; NIKHIL, K.; ROU, P.; PRUTHI, P. A.; SINGH, R. P.; PRUTHI, V.A novel gellan–PVA nanofibrous *scaffold* for skin tissue regeneration: Fabrication and characterization. **Carbohydrate Polymers**. v. 136, p. 851–859, 2016.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrótica. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 43, n. 3, p. 160-6, 2003.

WANG, M.; MA, Y.; SUN, Y.; HONG, S. Y.; LEE, S. K.; YOON, B.; CHEN, L.; CI, L.; NAM, J., D.; CHEN, X.; SUHR, J. Hierarchical porous chitosan sponges as robust and

recyclable adsorbents for anionic dye adsorption. **Scientific reports**. v. 7, n. 1, p. 18054, 2017.

WEBER, C.; POHL, S.; PÖRTNER, R.; WALLRAPP, C.; KASSEM, M.; GEIGLE, P.; CZERMAK, P. Expansion and Harvesting of hMSC-TERT. **The Open Biomedical Engineering Journal**. v. 1, p. 38-46, 2007.

XINGANG, W.; CHUANGANG, Y.; XINLEI, H.; YURONG, Z.; QIYIN, LI.; ZHANZENG, F.; HUAFENG, S.; CHANGYOU, G.; HAN, C. The roles of knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid *scaffold* in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. **Acta Biomaterialia**. v. 9, p. 7822–7832, 2013.

WAHID, F. Et al. Syntesis ans characterization of antibacterial carboxymethylChitosan/ZnO nanocomposite hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 88, p. 279-279, 2016.

WEI, X.; YANG, X.; HAN, Z-P.; QY, F-F.; SHAO, L.; SHI, Y-F. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 34, p. 747-754, 2013.

WITZLER, M.; BÜCHNER, D.; SHOUSHRAH, S. H.; BABCZYK, P.; BARANOVA, J.; WITZLEBEN, S.; TOBIASCH, E.; SCHULZE, M. Polysaccharide-Based Systems for Targeted Stem Cell Differentiation and Bone Regeneration. **Biomolecules**. v. 9, n. 840, 2019.

YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; SEIFALIAN, A. M. Skin regeneration *scaffolds*: a multimodal bottom-up approach. **Trends in Biotechnology**. v. 30, n. 12, p. 638-648, 2012.

ZAHEDI, S.; BOZON, C.; BRUNEL, G. Uma avaliação clínica de 2 anos de uma membrana de colágeno reticulada com difenilfosforilazida para o tratamento de recessão gengival bucal. **Journal of Periodontology**. v. 69, n.9, p. 975-98, set. 1998.

ZHANG, L; HU, J.; ATHANASIOU, K. A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. **Crit Rev Biomed Eng**. v. 37, n. 1-2, p. 1–57, 2009.