

Ministério da Saúde

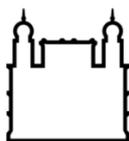
**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Mestrado em Biociências e Biotecnologia**

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS-TRONCO E CÉLULAS  
ENDOTELIAIS PROGENITORAS EM ARCABOUÇOS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)  
(PLA) PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

**GIULIANA BIAGINI**

**CURITIBA**  
**2021**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
Instituto Carlos Chagas

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Mestrado em Biociências e Biotecnologia**

GIULIANA BIAGINI

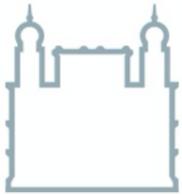
ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE CÉLULAS-TRONCO E CÉLULAS  
ENDOTELIAIS PROGENITORAS EM ARCABOUÇOS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO)  
(PLA) PARA APLICAÇÕES NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Dissertação de mestrado apresentada ao  
programa de pós-graduação do Instituto Carlos  
Chagas como pré-requisito para obtenção do  
título de mestre em Biociências e Biotecnologia

**Orientador:** Dr. Marco Augusto Stimamiglio

**Coorientadora:** Dra. Bruna Hilzendeger Marcon

**CURITIBA**  
**2021**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
**Instituto Carlos Chagas**

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Biociências e Biotecnologia.

Aos 26 dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e um, às 9:00 horas, **através de teleconferência pelo link** <https://us02web.zoom.us/j/9060451986?pwd=U0JlUHRqTXM1dEFGRU9qbFTOENYQT09>, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dra. Lia Carolina A. S. M. Kuczera, Dra. Fabiane Barchiki e Dra. Cíntia Delai da Silva Horinouchi, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Giuliana Biagini**, intitulada: **“Análise da interação de células-tronco e células endoteliais progenitoras em arcabouços de poli(ácido lático) (PLA) para aplicações na engenharia de tecidos”**, sob a orientação de **Dr. Marco Augusto Stimamiglio e Dra. Bruna Hilzendeger Marcon**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pela Presidente **Dra. Lia Carolina A. S. M. Kuczera**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

- Aprovação da dissertação por unanimidade
- Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).
- Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 26 de fevereiro de 2021

Dra. Lia Carolina A. S. M. Kuczera – ICC/Fiocruz *Lia Carolina Kuczera*

Dra. Fabiane Barchiki – PUC/PR *Fabiane Barchiki*

Dra. Cíntia Delai da Silva Horinouchi – ICC/Fiocruz *Cintia Horinouchi*

*Giuliana Biagini*

**Candidato(a): Giuliana Biagini**

Biagini, Giuliana.

Análise da interação entre células-tronco e células endoteliais progenitoras em arcabouços de poli(ácido láctico) (PLA) para aplicações na engenharia de tecidos / Giuliana Biagini. - Curitiba, 2021.  
xviii, 96 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2021.

Orientador: Marco Augusto Stimamiglio.

Co-orientadora: Bruna Hilzendeger Marcon.

Bibliografia: f. 84-90

1. engenharia de tecidos. 2. células CD133+ expandidas. 3. célula-tronco mesenquimal. 4. poli(ácido láctico). 5. PLA. I. Título.

Dedico este trabalho a minha mãe,  
sempre minha maior incentivadora, e  
à memória do meu pai.

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer primeiramente minha mãe por sempre ter apoiado minhas decisões e meus desejos e, por isso, ter me ajudado a estar aqui hoje. Obrigada por sempre estar disponível para conversar e dar conselhos ou só para ouvir minhas histórias e dar risada comigo. Obrigada pelo amor incondicional, por tudo que você já fez e por tudo que você ainda faz. Tem um pedacinho de você em tudo que eu faço.

Agradeço ao meu orientador Marco por primeiro ter me dado a oportunidade de fazer o que eu sempre quis. Uma vez me disseram que os alunos mais felizes do laboratório eram sempre os seus alunos e agora eu sei por quê. Obrigada por ter estado presente em todas as etapas e se disponibilizado para me ajudar ou para conversar sempre que eu precisei. Obrigada por ter me forçado quando necessário (principalmente quando eu não queria apresentar algo) e me parabenizado quando era merecido. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por ter sido um orientador excelente do começo até o fim.

A minha coorientadora Bruna por ter aceitado entrar nessa, por ter me ensinado a mexer nos microscópios e a tirar fotos lindas das células. Obrigada por sempre ter me acalmado quando eu ficava nervosa, por ter me ouvido e sempre ter algo positivo para dizer sobre o meu trabalho. Obrigada pela sua dedicação, suas sugestões, seus conselhos, sua compreensão e seu carinho. Mestrado não é fácil, mas você e o Marco conseguiram fazer do meu uma experiência muito prazerosa. Eu vou levar vocês no meu coração como pessoas incríveis e cientistas mais ainda. Muito obrigada!

Obrigada ao grupo de Medicina Regenerativa, Alejandro, Amanda, Anny, Bruno, Maria Julia e Rodrigo, por todas as discussões sobre o trabalho, pelas sugestões e por todos os ensinamentos nas reuniões. Um agradecimento especial à Amanda também pela grande ajuda no ensaio de angiogênese e interpretação dos resultados. Obrigada pela sua paciência e dedicação em me ensinar.

Agradeço também minhas amigas de laboratório Annanda, Hellen e Letícia por terem acompanhado tudo mais de perto, pelos cafés com bolo às 3 da tarde, pelas

conversas, pelos desabafos, pela amizade, por todo o apoio e principalmente pela companhia no laboratório em tempos de pandemia.

A Plataforma de Bioensaios em Métodos Alternativos em Citotoxicidade pelo suporte nos ensaios de citotoxicidade. Em especial, muito obrigada à Ana Paula por ter me incluído em todo o processo, discutido os resultados, se disponibilizado para ajudar e conversar sempre que necessário e por todo o carinho.

Aos colegas do LabCET: Rubens, pela amizade e companhia no laboratório na pandemia. Cíntia, Isabela e Cris pelas ótimas conversas e conselhos. Dr. Bruno Dallagiovanna por ter me recebido no laboratório. Dra Alessandra Aguiar, Dra Patrícia Shigunov pelas contribuições nos labmeetings.

Aos meus avaliadores de jornada acadêmica Dra. Lia Medeiros e Dr. Luis Gustavo Morello pela atenção, pelas sugestões e contribuições no meu trabalho.

Ao Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, em especial à Dra. Alexandra Senegaglia, pelo fornecimento das células utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Lucas Berti e Tarciso Pereira da UTFPR pela impressão dos arcabouços e realização do teste mecânico.

A minha amiga e irmã de coração, Hayfa, por ter sido por mais uma vez uma ótima base de apoio e excelente amiga, vibrando nos momentos de alegria comigo e me confortando nos outros.

Minhas amigas da faculdade Jessica, Ana Cecília, Bruna, Daniela e Victor por sempre estarem por perto mesmo quando estavam longe. Obrigada pelo apoio, incentivo e amizade. Vocês são essenciais na minha vida pessoal e profissional.

Às agências de fomento e fontes financiadores desse projeto, Inova Fiocruz, PROEP ICC/CNPq e ICC/FIOCRUZ-PR.

## RESUMO

A engenharia de tecidos é um ramo da medicina regenerativa e uma das suas abordagens se baseia no uso de biomateriais que podem ser combinados com células e outras moléculas bioativas para regenerar tecidos. Diferentes tipos celulares podem ser usados para estas aplicações, tais como células progenitoras e células-tronco. Os arcabouços de biomateriais podem ser maciços ou porosos e são utilizados para reproduzir a matriz extracelular, agindo como substrato e apoio físico para as células. Para escolher o material ideal é necessário considerar sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e a presença de propriedades semelhantes às do tecido biológico. A quantidade, o tamanho, a interconectividade dos poros e a composição e topografia da superfície dos arcabouços também podem influenciar a resposta celular. A fim de entender como biomateriais e estruturas tridimensionais podem afetar o comportamento celular em cultivo, neste trabalho foram utilizados diferentes arcabouços de poli(ácido láctico) (PLA) combinados com células-tronco mesenquimais (CTMs) e células CD133<sup>+</sup> expandidas. As CTMs foram obtidas a partir de tecido adiposo humano e representam uma fonte de células ideal para uso na engenharia de tecidos devido a sua baixa imunogenicidade, sua atividade parácrina e sua capacidade de diferenciação. As células CD133<sup>+</sup> expandidas foram derivadas do sangue de cordão umbilical humano e representam uma fonte de células endoteliais com capacidade angiogênica. Os arcabouços foram fabricados utilizando-se uma impressora 3D comercial. Foram prototipados dois modelos cúbicos com dimensões de 10 mm x 10 mm x 3 mm (LxCxA) com dois tamanhos de poros diferentes ( $1,27 \pm 0,059$  mm e  $0,700 \pm 0,023$  mm) e também um modelo circular de diâmetro de 3 cm e sem poros. A análise por microscopia óptica e eletrônica demonstrou que os dois tipos celulares aderiram aos três modelos de arcabouços mantendo suas morfologias características. Por citometria de fluxo foram avaliados o ciclo celular, a atividade proliferativa e o perfil imunofenotípico das células. Em comparação a um cultivo 2D, a porcentagem de CTMs em G2 nos arcabouços porosos aumentou, enquanto a população de células CD133<sup>+</sup> expandidas apresentou um atraso na evolução do ciclo com mais células na fase G1. Porém, no arcabouço não poroso, as CTMs não apresentaram alterações de ciclo celular e as células CD133<sup>+</sup> expandidas tiveram apenas um aumento percentual em G2, sugerindo que o biomaterial em si não foi responsável por estimular a proliferação celular. As CTMs mantiveram seu perfil imunofenotípico indiferenciado, mas as células CD133<sup>+</sup> expandidas apresentaram uma queda significativa do fator de von Willebrand (vWF). Essa variação não só afetou o potencial angiogênico dessas células, mas também a rede de vasos formada pelas células que mostrou-se menos complexa. Esses resultados indicam que a estrutura tridimensional e o biomaterial dos arcabouços afetaram de maneira distinta o comportamento dos dois tipos celulares avaliados e ressaltam a importância de se estudar como as células respondem a esses modelos de cultivo ao considerarmos o uso de células associadas a arcabouços de biomateriais para a engenharia de tecidos.

**Palavras-chave:** engenharia de tecidos; células CD133<sup>+</sup> expandidas; célula-tronco mesenquimal; poli (ácido láctico); PLA.

## ABSTRACT

Tissue engineering is a branch of regenerative medicine and one of its approaches is based on the combination of biomaterials, cells and other bioactive molecules to regenerate functional tissues. Different types of cells can be used in tissue engineering, such as progenitor and stem cells. Biomaterial scaffolds can be solid or porous and are used to reproduce the extracellular matrix acting as substrate and as physical support for cells. The ideal biomaterial is chosen based on its biocompatibility, biodegradability and properties that must be similar to the biological tissue. Other important factors that influence cells' responses are the quantity, the size and the interconnectivity of the pores. To better understand how biomaterials and 3D structures affect cell behavior in culture we combined different 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds with MSCs and expanded CD133<sup>+</sup> cells. MSCs were obtained from adipose tissue and represent an ideal source of cells for tissue engineering applications due to their low immunogenicity, paracrine activity and ability to differentiate. Expanded CD133<sup>+</sup> cells were isolated from umbilical cord blood and represent a source of endothelial cells with angiogenic potential. Cubic and disc shaped scaffolds were fabricated using a commercial 3D printer. The cubic scaffolds measured 10 mm x 10 mm x 3 mm (LxWxH) and had pore sizes of  $1,27 \pm 0,059$  mm and  $0,700 \pm 0,023$  mm. The disc scaffold had a diameter of 3 cm and did not have pores. Fluorescence microscopy and scanning electron microscopy showed that both cell types had adhered on the scaffolds and maintained their characteristic morphologies. Cell cycle and immunophenotype profile were evaluated through flow cytometry. In comparison with a 2D culture, the percentage of MSCs in G2 phase of the cell cycle on the scaffolds was higher, whereas the CD133<sup>+</sup> expanded cells population suffered a delay in the cell cycle, with a higher percentage of cells in G1. However, while the cell cycle of MSCs cultured on the PLA disc was comparable to a 2D culture, the percentage of CD133<sup>+</sup> expanded cells on the G2 phase increased, suggesting that the biomaterial itself was not responsible for the alteration on the cell cycle. MSCs were able to maintain their undifferentiated prolife when cultured on the scaffolds, but the CD133<sup>+</sup> expanded cells presented a reduction of the von Willebrand factor (vWF). This reduction not only affected the cells' angiogenic potential, but also the cells that were cultured on the 3D scaffolds formed a less complex network. These results indicate that the 3D environment and the biomaterial had different effects on different cell types. Furthermore, they reinforce the importance of studying how cells respond to 3D culture when considering the scaffold approach for tissue engineering.

**Key words:** tissue engineering; CD133<sup>+</sup> expanded cells; mesenchymal stem cells; polylactic acid - PLA

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Número de trabalhos envolvendo engenharia de tecidos que podem ser encontrados no PubMed desde 1990 até 2020 .....	19
Figura 1.2 - A rigidez de tecidos biológicos em comparação à de alguns materiais utilizados em laboratório e na engenharia de tecidos .....	20
Figura 1.3 - Avanços na engenharia de tecidos.....	21
Figura 1.4 - Esquema da classificação de células-tronco .....	25
Figura 1.5 - Linha do tempo dos marcos da terapia celular envolvendo CTs .....	26
Figura 1.6 - Esquema do desenvolvimento dos vasos sanguíneos demonstrando as diferenças morfológicas das células endoteliais e a recalibração metabólica durante o processo.....	30
Figura 1.7 - Diferença entre os cultivos 2D e 3D .....	32
Figura 1.8 - Isômeros do PLA .....	38
Figura 1.9 - Exemplo de uma impressora 3D de FDM e seus elementos principais .	41
Figura 3.1 - Imagem do arcabouço no interior da seringa para a deposição das células .....	49
Figura 3.2 Esquema de como a seringa com o arcabouço foi virada 90° para a deposição das células .....	49
Figura 4.1 - Arcabouços de PLA impressos em 3D .....	55
Figura 4.2 - Ultraestrutura dos arcabouços de PLA .....	55
Figura 4.3 - Estrutura do disco de PLA .....	56
Figura 4.4 - Comportamento elástico dos arcabouços 3D de PLA quando submetidos ao teste de compressão .....	57
Figura 4.5 - Teste de citotoxicidade por contato do arcabouço de PLA.....	58
Figura 4.6 - Citotoxicidade dos extratos do S40 no ensaio do vermelho neutro.....	59
Figura 4.7 - Marcação nuclear das células aderidas nos arcabouços 3D de PLA.....	60
Figura 4.8 - Marcação nuclear das células aderidas no disco de PLA após 48h de cultivo .....	61
Figura 4.9 - Morfologia das células CD133 <sup>+</sup> expandidas e das CTMs em cultivo 2D e 3D.....	61
Figura 4.10 - Ciclo celular das células CD133 <sup>+</sup> expandidas após 48h de cultivo em garrafas de cultivo, disco de PLA, S25 e S40 .....	62

Figura 4.11 - Ciclo celular das células CD133 <sup>+</sup> expandidas nos arcabouços 3D de PLA em 48h e 7 dias de cultivo.....	63
Figura 4.12 - Ciclo celular das CTMs após 48h de cultivo em garrafas de cultivo, disco de PLA, S25 e S40.....	64
Figura 4.13 - Ciclo celular das CTMs nos arcabouços 3D de PLA em 48h 7 dias de cultivo .....	65
Figura 4.14 - Comparação da proliferação de CTMs após 48h de cultivo 2D e 3D (S40) pelo ensaio de incorporação de EdU .....	66
Figura 4.15 - Gráficos representativos de incorporação de EdU por CTMs nos cultivos 2D e 3D .....	66
Figura 4.16 - Comparação da proliferação das células CD133 <sup>+</sup> expandidas após 48h de cultivo 2D e 3D (S40) pelo ensaio de incorporação de EdU .....	67
Figura 4.17 - Gráficos representativos de incorporação de EdU pelas células CD133 <sup>+</sup> expandidas nos cultivos 2D e 3D .....	67
Figura 4.18 - Histogramas representativos do perfil imunofenotípico de CTMs após 7 dias de cultivo em S25 e S40.....	69
Figura 4.19 - Histogramas representativos do perfil imunofenotípico das células CD133 <sup>+</sup> expandidas após 7 dias de cultivo em S25 e S40 .....	71
Figura 4.20 - Ensaio de angiogênese das células provenientes do cultivo 3D (S40) em comparação ao controle (2D).....	72
Figura 4.21 - Ensaio de angiogênese do meio condicionado do cultivo das células em S40 em comparação ao controle (2D) .....	73
Figura 4.22 - Gráficos representativos do número de estruturas semelhantes a vasos formadas no ensaio de angiogênese .....	73
Figura 4.23 - Gráfico representativo do número de nós formados após 12h do ensaio de angiogênese.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais características dos arcabouços que devem ser consideradas e seus efeitos na resposta celular e na regeneração de tecidos .....	34
Tabela 1.2 - Polímeros sintéticos e naturais mais comumente utilizados na engenharia de tecidos e suas respectivas vantagens e desvantagens .....	36
Tabela 1.3 - Vantagens e desvantagens do PLA.....	38
Tabela 1.4 - Lista de técnicas de impressão 3D .....	40
Tabela 3.1 - Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das CTMs .....	53
Tabela 3.2 - Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das células CD133 <sup>+</sup> expandidas .....	53
Tabela 3.3 - Anticorpo secundário utilizado para imunofeotipagem das células CD133 <sup>+</sup> expandidas .....	54
Tabela 4.1 - Perfil imunofenotípico das CTMs com valores percentuais de média $\pm$ desvio padrão da presença de cada marcador celular após 7 dias de cultivo nos arcabouços S25 e S40 .....	68
Tabela 4.2 - Perfil imunofenotípico das células CD133 <sup>+</sup> expandidas com valores percentuais de média $\pm$ desvio padrão da presença de cada marcador celular após 7 dias de cultivo nos arcabouços S25 e S40 .....	70

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC	- Aloficocianina
ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- Albumina de soro bovino
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	- Dióxido de carbono
CMs	- Células mononucleares
CTs	- Células-tronco
CTM	- Célula-tronco mesenquimal
DAPI	- 4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	- <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EBM-2	- <i>Endothelial cell growth basal medium</i>
EDTA	- Ácido etilenodiaminoacético
EdU	- 5'-etnil-2'-deoxiuridina
EGF	- Fator de crescimento epidermal
ESC	- Célula-tronco embrionária
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
hFGF	- Fator de crescimento de fibroblasto humano
HLA	- antígeno leucocitário humano
IGF	- Fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	- Imunoglobulina G
IMC	- Índice de massa corpórea
IMDM	- <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
iPSCs	- Células-tronco pluripotente induzidas
ISO	- Organização Internacional de Normalização
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
OECD	- Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PBS	- Solução salina tamponada por fosfato
PCL	- Policaprolactona
PE	- Ficoeritrina
PFA	- Paraformoldeído
PLA	- Poli(ácido láctico)
PLGA	- Ácido poliglicólico

PS	- Penicilina/Estreptomicina
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SFB	- Soro fetal bovino
TCR	- Taxa de crescimento relativo
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
vWF	- Fator de Von Willebrand

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	- porcentagem
°	- grau
cm <sup>2</sup>	- centímetro quadrado
E	- módulo elástico
<i>g</i>	- força centrífuga
g	- grama
GPa	- giga Pascal
h	- hora(s)
kg/m <sup>2</sup>	- quilograma por metro quadrado
kPa	- kilo Pascal
mg	- miligrama
mm	- milímetro
mm/s	- milímetro por segundo
mL	- mililitro
MPa	- Mega Pascal
N	- Newton
N/m <sup>2</sup>	- Newton por metro quadrado
Pa	- Pascal
°C	- grau Celsius
<i>p</i>	- significância
s	- segundos
µg/mL	- micrograma por mililitro
µL	- microlitro
µm	- micrômetro

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1. Engenharia de Tecidos .....	19
1.2. Células-Tronco .....	24
1.2.1. Células-Tronco Mesenquimais .....	27
1.3. Célula CD133 <sup>+</sup> Expandida.....	28
1.4. Cultivo Celular 3D.....	31
1.5. Biomateriais para a Engenharia de Tecidos .....	34
1.5.1. Poli(ácido láctico) .....	38
1.6. Impressão 3D .....	39
1.7. Justificativa .....	41
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
2.1. Objetivo Geral.....	43
2.2. Objetivos Específicos .....	43
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>44</b>
3.1. Impressão 3D dos Arcabouços de PLA .....	44
3.2. Caracterização dos Arcabouços de PLA.....	44
3.2.1. Caracterização Ultraestrutural.....	44
3.2.2. Teste Mecânico .....	44
3.3. Isolamento e Caracterização das CTMs e Células CD133 <sup>+</sup> .....	45
3.3.1. CTMs.....	45
3.3.2. Células CD133 <sup>+</sup> .....	46
3.4. Assepsia dos Arcabouços de PLA .....	46

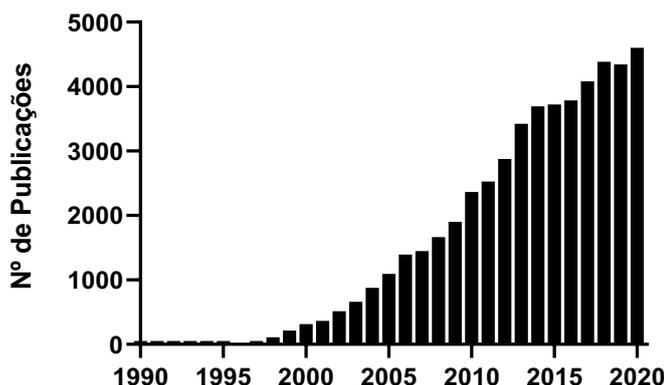
3.5.	Avaliação da Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA.....	47
3.5.1.	Teste por Contato Direto .....	47
3.5.2.	Ensaio de Captação de Vermelho Neutro.....	47
3.6.	Deposição das Células nos Arcabouços de PLA.....	48
3.6.1.	Deposição das Células pelo Método da Seringa .....	48
3.6.2.	Deposição das Células no Disco de PLA.....	50
3.7.	Acompanhamento da Adesão Celular nos Arcabouços de PLA.....	50
3.7.1.	MEV.....	50
3.7.2.	Microscopia de Fluorescência.....	51
3.8.	Dissociação das Células dos Arcabouços de PLA.....	51
3.9.	Avaliação do Ciclo Celular nos Arcabouços de PLA.....	51
3.10.	Ensaio de Proliferação por Incorporação de EdU .....	52
3.11.	Avaliação do Perfil Imunofenotípico das Células nos Arcabouços de PLA....	52
3.12.	Ensaio de Formação de Vasos <i>in vitro</i> .....	54
3.13.	Análises Estatísticas.....	54
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1.	Caracterização dos Arcabouços de PLA.....	55
4.2.	Avaliação da Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA.....	57
4.2.1.	Teste por Contato Direto .....	57
4.2.2.	Ensaio de Captação do Vermelho Neutro.....	58
4.3.	Deposição e Adesão das Células nos Arcabouços de PLA.....	59
4.4.	Ciclo Celular nos Arcabouços de PLA .....	62
4.5.	Proliferação Celular nos Arcabouços de PLA .....	65
4.5.1.	CTMs.....	65
4.5.2.	Células CD133 <sup>+</sup> Expandidas .....	67
4.6.	Perfil Imunofenotípico das Células nos Arcabouços de PLA .....	68
4.6.1.	CTMs.....	68
4.6.2.	Células CD133 <sup>+</sup> Expandidas .....	69
4.7.	Ensaio de Angiogênese .....	72
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
5.1.	Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA .....	75
5.2.	Adesão das Células nos Arcabouços de PLA.....	76

5.3.	Influência da Rigidez e da Topografia dos Arcabouços de PLA no Comportamento Celular .....	77
5.4.	Influência do Cultivo em Arcabouços no Ciclo Celular e Proliferação .....	78
5.5.	Influência do Cultivo em Arcabouços no Imunofenótipo Celular .....	80
5.6.	Considerações Finais .....	82
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
	<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>91</b>
	<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>95</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Engenharia de Tecidos

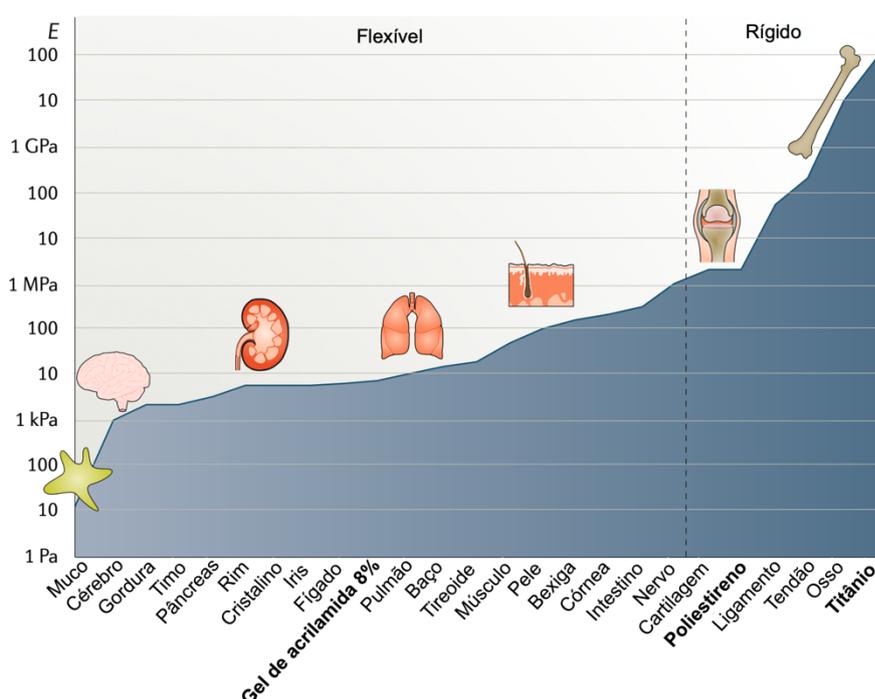
Em 1993 Langer e Vacanti definiram a engenharia de tecidos como uma área multidisciplinar que envolve técnicas e conhecimentos de engenharia, biologia e medicina para obtenção de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou aprimorar as funções de um tecido. Embora o primeiro uso do termo “engenharia de tecidos” não esteja bem claro na literatura, foi após a publicação desse trabalho de Langer e Vacanti que o número de estudos publicados dessa área começou a aumentar significativamente. Com uma pesquisa no PubMed (NCBI) utilizando o termo “engenharia de tecidos” é possível ver que o número de publicações anuais tem crescido constantemente nos últimos 30 anos (Figura 1.1).



**Figura 1.1.** Número de trabalhos envolvendo o termo engenharia de tecidos que podem ser encontrados no PubMed desde 1990 até 2020. Para o desenho do gráfico foi feita uma busca avançada nos campos de título de resumo no PubMed usando o termo “*tissue engineering*.”

Ainda de acordo com o trabalho de Langer e Vacanti, a engenharia de tecidos conta com três estratégias principais: aplicação de células isoladas, uso de fatores indutores e uso combinado de células com matrizes de materiais naturais, como o colágeno, ou de polímeros sintéticos (Langer e Vacanti, 1993). Neste último caso, as matrizes, também chamadas de arcabouços, também podem ser utilizadas sem células para serem implantadas no organismo para induzir a migração de células-tronco para o local da lesão e induzir a restauração do tecido. Essa abordagem é denominada de engenharia de tecidos *in situ* (Gahawar, Singh e Khademhosseini (2020). Outra abordagem é a engenharia de tecidos *ex vivo*, na qual os arcabouços

com as células são cultivados em laboratório para a obtenção de construtos teciduais que, então, serão implantados no organismo (Gahawar, Singh e Khademhosseini). Neste caso, os arcabouços servem como apoio para as células e direcionam o crescimento do tecido. Porém, independentemente da abordagem escolhida, o material utilizado para a produção dos arcabouços deve ser biodegradável e biocompatível (Schaap-Oziemlak, et al., 2014), assim como deve apresentar uma rigidez semelhante àquela do tecido nativo, uma vez que cada tecido apresenta uma consistência específica, como pode ser visto na Figura 1.2.

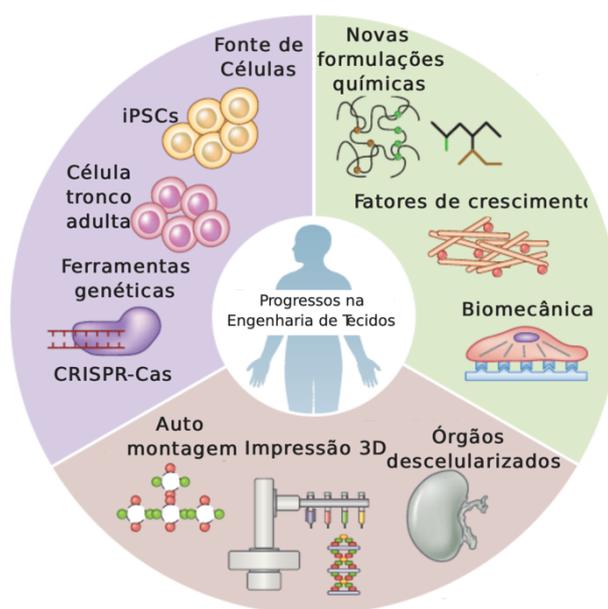


**Figura 1.2. A rigidez de tecidos biológicos em comparação à de alguns materiais utilizados em laboratório e na engenharia de tecidos.** O módulo elástico (E) é representado da unidade Pascal, que equivale a uma força de 1 N aplicada numa área de 1 m<sup>2</sup> (N/m<sup>2</sup>), na ordem de Pa até GPa. Para comparação foram incluídos alguns materiais que são utilizados na engenharia de tecidos, como gel de acrilamida, poliestireno (material das garrafas e placas de cultivo celular) e titânio. Adaptado de Guimarães, et al. (2020).

Atualmente, essas técnicas são geralmente aplicadas em conjunto para criar substitutos biológicos que mimetizem o tecido original da maneira mais confiável possível. Para isso, a combinação das matrizes com fatores de crescimento e células deve ser capaz de repor o tecido danificado e ser capaz de funcionar como o tecido original ou de estimular sua regeneração (Schaap-Oziemlak, et al., 2014).

Uma das explicações para o interesse crescente na engenharia de tecidos é a grande promessa da área de contornar os problemas da falta de órgãos e tecidos para transplantes devido à limitação do número de doadores e também da grande possibilidade de rejeição imunológica do órgão transplantado.

Desde 1993 muitos progressos ocorreram na área, principalmente no que diz respeito à obtenção e manipulação das células utilizadas, na engenharia de materiais para a obtenção de materiais mais adequados e nas técnicas de produção dessas matrizes (Figura 1.3), o que também contribuiu para o avanço da área e o crescente interesse (Khademhosseini e Langer, 2016).



**Figura 1.3. Avanços na engenharia de tecidos.** Em destaque os avanços em três áreas principais: descoberta de novas fontes de células e técnicas de edição genética; melhor entendimento de sinais químicos e físicos aos quais as células respondem; desenvolvimento de novas tecnologias de produção de scaffolds. Adaptado de Khademhosseini e Langer (2016).

A descoberta de novas fontes de células-tronco adultas e a obtenção da primeira linhagem humana de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) em 2006 permitiu que células do próprio paciente sejam utilizadas na terapia, o que abriu caminho para a medicina personalizada e futuramente poderá contornar o problema de rejeição imunológica dos transplantes tradicionais (Khademhosseini e Langer, 2016).

Outra grande inovação foi o desenvolvimento da área de biomecânica e a descoberta de que as células-tronco respondem à rigidez da matriz. O mecanismo pelo qual elas respondem a esse estímulo é chamado de mecanotransdução e ainda

não é bem compreendido. Porém, estudos têm demonstrado que este mecanismo consiste em uma combinação de moléculas mecanosensoras (como as integrinas), de propriedades do núcleo celular e da condição genética das células (Song, et al., 2020; Guimarães, et al., 2020). Em resumo, as integrinas envolvidas na adesão focal respondem à rigidez da matriz e sofrem deformações conformacionais que são, então transmitidas para o citoesqueleto. Por sua vez, o citoesqueleto, que está fisicamente associado ao núcleo, pode alterar a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, controlar a expressão gênica (Song, et al., 2020). Assim, a rigidez da matriz não é importante apenas para recriar o ambiente biológico das células, mas também porque, alterando-se essa característica, é possível controlar alguns comportamentos celulares, tais como diferenciação e migração (Guimarães, et al., 2020).

As tecnologias utilizadas para produzir as matrizes também foram aprimoradas ao longo dos anos, uma vez que elas podem ser feitas de diversos biomateriais, tais como polímeros, cerâmicas, metais e compósitos. Suas estruturas também pode ser variáveis e, atualmente, os arcabouços são divididos em: monolíticos (sólidos não porosos), microporosos, de nanopartículas, fibrosos, impressos em 3D e de hidrogéis (Gahawar, Singh e Khademhosseini, 2020).

Uma técnica de obtenção de arcabouços em desenvolvimento na engenharia de tecidos, por exemplo, é a descelularização de órgãos como uma fonte de matriz extracelular. Nessa técnica, o órgão doado é submetido a lavagens com detergentes para a retirada de todos os componentes celulares e imunogênicos. A estrutura da matriz deve ser preservada e depois pode ser recelularizada com as células do paciente recipiente (Ott, et al., 2008).

Porém, a técnica de produção de arcabouços mais utilizada e conhecida é a impressão 3D que através da deposição de camadas de filamentos poliméricos produz matrizes de diversas porosidades. As dimensões dessas matrizes podem ser facilmente montadas e controladas por um *software*. Essa técnica é considerada de baixo custo e simples (Tamay, et al., 2019).

Uma variação da impressão 3D é a bioimpressão 3D, que é a impressão direta de células em formulações variáveis (chamadas de biotintas) para a produção de órgãos e tecidos. Esta técnica teve início no começo dos anos 2000 quando o pesquisador Thomas Boland modificou uma impressora convencional e imprimiu células bovinas vivas dispersas em meio de cultivo (Mironov, et al., 2003). Em teoria, a bioimpressão 3D permite a impressão de órgãos e tecidos na sua conformação

original, mas ainda é considerada uma área em desenvolvimento. O maior desafio da técnica é a formulação de biotintas que apresentem a reologia<sup>1</sup> ideal para impressão, principalmente em termos de viscosidade, e que permitam a viabilidade celular ao mesmo tempo (Morgan, Moroni e Baker, 2020). Além disso, as bioimpressoras 3D ainda são de alto custo se comparadas às impressoras 3D convencionais.

A engenharia de tecidos tem demonstrado resultados promissores na regeneração e substituição de uma variedade de órgãos e tecidos, incluindo o preenchimento ósseo em fraturas com arcabouços de hidroxiapatita (Jakus, et al., 2016), a substituição de uma traqueia através da técnica de descelularização (Macchiarini, et al., 2008), a reconstrução de uretras com células epiteliais e musculares em arcabouços de ácido poliglicólico (PLGA) (Raya-Rivera, et al., 2011) e reconstrução uterina de coelhos com arcabouços também de PLGA (Magalhães, et al., 2020). Mais recentemente, pesquisadores de Israel bioimprimiram um coração com dimensões de um coração de coelho (Noor, et al., 2019) e um grupo do Reino Unido bioimprimiu o estroma da córnea humana (Isaacson, Swioklo e Connon, 2018).

Apesar de todo os avanços e obtenção de bons resultados *in vitro* e *in vivo*, poucas tecnologias da engenharia de tecidos passaram para a clínica. Isso é devido principalmente à dificuldade de entender e controlar os processos regenerativos (Gahawar, Singh e Khademhosseini, 2020). Além disso, há também a dificuldade de formação de uma rede de vasos sanguíneos *in vitro* para que o tecido transplantado possa integrar-se de maneira adequada ao organismo (Rouwkema e Khademhosseini, 2016). Embora existam várias estratégias para induzir vascularização *in vitro* com uso de fatores, arcabouços e biomateriais pró angiogênicos, as propriedades funcionais desses vasos sanguíneos, como a perfusabilidade e sua função de barreira, ainda precisam ser melhor estudadas (Rouwkema e Khademhosseini, 2016; Yang, et al., 2020). Dessa forma, ainda há lacunas muito importantes a serem preenchidas na área para que haja o desenvolvimento de técnicas mais robustas e mais adequadas.

---

<sup>1</sup> Ramo da física que estuda a mudança de comportamento e fluxo de um fluido.

## 1.2. Células-Tronco

As células mais exploradas para aplicações na engenharia de tecidos são as células-tronco devido ao seu potencial de diferenciação e pelo fato de poderem ser obtidas de diferentes tecidos (Leach e Whitehead, 2017; Sobacchi, et al., 2018).

O termo célula-tronco foi usado pela primeira vez em 1868 pelo biólogo alemão Ernst Haeckel para descrever um ancestral unicelular comum de todos os seres vivos multicelulares. Mais tarde, o biólogo propôs que o termo também fosse aplicado a gametas femininos (revisado por Ramalho-Santos e Willenbring, 2007). Entretanto, foi somente em 1980 que Till e McCulloch classificaram as células-tronco aquelas células capazes de, ao se dividirem, se renovarem ou darem origem a células mais diferenciadas e especializadas (Till e McCulloch, 1980). Essa definição é utilizada até hoje.

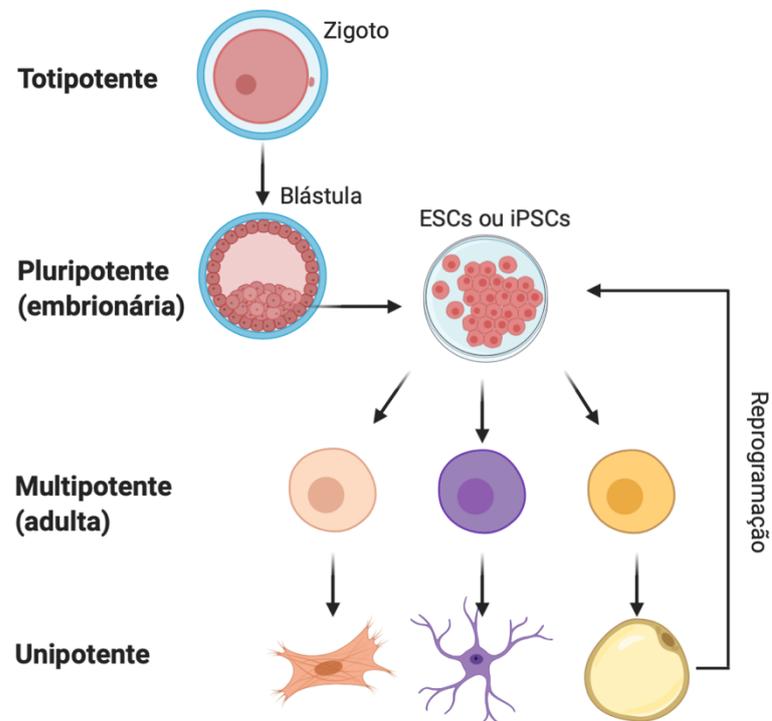
Dentre as células-tronco, há distinção entre as populações celulares de acordo com a plasticidade que possuem. Elas podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (Los, Hudecki e Wiechec, 2019). De acordo com essa classificação, as células-tronco totipotentes são aquelas capazes de dar origem a todos os tecidos de um organismo e também aos tecidos extraembrionários, como a placenta e o cordão umbilical, e a célula representante desse grupo é o zigoto (Mukul, Shakiba e Zandstra, 2018).

Conforme o zigoto se desenvolve, as células vão perdendo sua totipotência e, no estágio de blástula, as células da massa celular interna do blastocisto são capazes de formar todos os tecidos do organismo com exceção dos tecidos extraembrionários. A esse potencial de diferenciação dá-se o nome de pluripotência e essas células podem ser denominadas células-tronco embrionárias (ESCs) (Mukul, Shakiba e Zandstra, 2018).

O blastocisto se desenvolve e as células-tronco pluripotentes começam a se comprometer com um dos folhetos embrionários e, nesse estágio, portanto, são capazes de originar células de apenas um desses folhetos e recebem o nome de células-tronco multipotentes (Mukul, Shakiba e Zandstra, 2018). Enquanto as células-tronco pluripotentes estão presentes apenas no período embrionário, as multipotentes são mantidas ao longo da vida. Elas também podem ser chamadas de células-tronco adultas e estão presentes, por exemplo, na medula óssea, na polpa de dentes de leite e no tecido adiposo (Los, Hudecki e Wiechec, 2019).

As células provenientes das células-tronco multipotentes se tornam especializadas e não são mais capazes de dar origem a outros tipos celulares. Elas podem originar apenas células como elas. Assim, elas são chamadas de células unipotentes (Los, Hudecki e Wiechec, 2019).

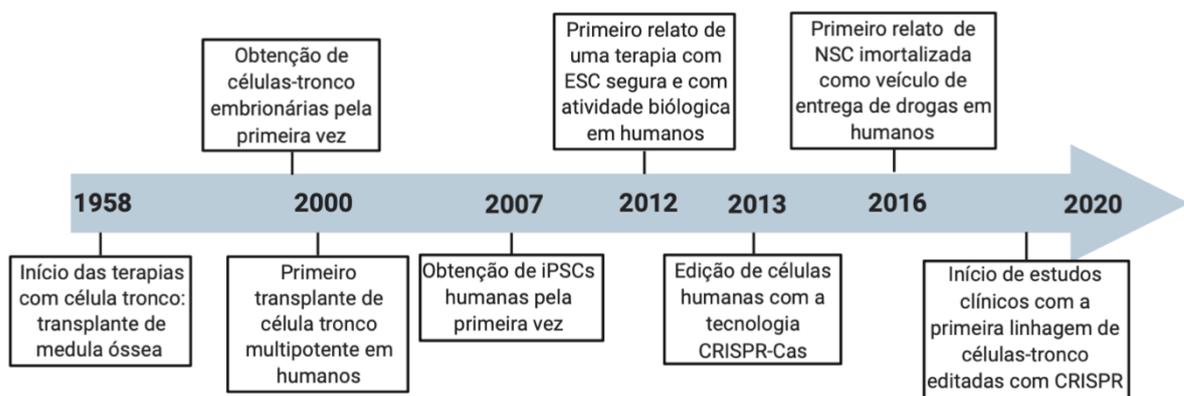
Em 2006, Takahashi e colaboradores demonstraram que, regulando um grupo de genes específico, era possível reprogramar células somáticas humanas fazendo com que elas recuperassem sua pluripotência. As células pluripotentes obtidas dessa forma recebem o nome de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Um esquema resumido da classificação das células-tronco pode ser visto na figura abaixo (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Esquema de classificação das células-tronco.** Células-tronco são definidas pela sua capacidade de originar tipos celulares especializados. O zigoto possui a capacidade de originar todos os tecidos de um organismo, incluindo tecidos extraembrionários, e por isso, é classificado como uma célula-tronco totipotente. A partir dele, são originadas as células-tronco embrionárias que, com exceção dos tecidos extra-embrionários, possuem o potencial de originar todos os tecidos do organismo, ou seja, são pluripotentes. Essas células começam a se especializar e a se comprometer com um dos folhetos embrionários, originando as células-tronco multipotentes ou adultas, a partir das quais surgem as células unipotentes que agora originam células de apenas um tecido específico. Adaptado de Mukul, Shakiba e Zandstra (2018).

Essa plasticidade das células-tronco permite o estudo de processos celulares, como a formação dos tecidos, e também faz com que elas sejam ótimas candidatas para a clínica no tratamento de doenças degenerativas e na regeneração de tecidos após traumas. O primeiro relato de aplicação clínica das células-tronco foi em 1958 com o transplante de medula óssea de uma criança para sua irmã gêmea que era portadora de leucemia (Thomas, et al., 1959; Kimbrel e Lanza, 2020). Atualmente, são realizados por ano em torno de 50.000 transplantes de medula óssea no mundo, fazendo com que as células-tronco hematopoiéticas (HSCs) sejam as mais utilizadas em terapias celulares (Kimbrel e Lanza, 2020).

No entanto, foi apenas no final dos anos 1990 e começo dos anos 2000 que a área começou a evoluir mais rapidamente. Em 1998, Thomson e colaboradores relataram o isolamento de células-tronco embrionárias humanas pela primeira vez. Desde então, os últimos 10 anos foram marcados pela combinação das células-tronco com a tecnologia de edição genética para desenvolvimento de técnicas de terapia celular mais individualizadas e eficientes (Kimbrel e Lanza, 2020). A Figura 1.5 resume brevemente os acontecimentos mais marcantes envolvendo células-tronco desde o primeiro transplante de medula óssea.



**Figura 1.5. Linha do tempo dos marcos da terapia celular envolvendo células-tronco (CTs).** NSC: célula-tronco neural; iPSCs: células-tronco pluripotentes induzidas; ESC: célula-tronco embrionária; CRISPR: sistema de edição genética por conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas. Adaptado de Kimbrel e Lanza (2020).

### 1.2.1. Células-Tronco Mesenquimais

Um dos exemplos mais conhecidos de célula-tronco adulta é a célula-tronco mesenquimal (CTM). As CTMs foram isoladas pela primeira vez a partir da medula óssea em 1976 por Alexander Friedstein e depois descritas em 1987 como fibroblastos formadores de colônia (Friedstein, Chailakhyan e Gerasimov, 1987). Foi só em 1991 que receberam o nome de células-tronco mesenquimais por serem capazes de originar algumas células e tecidos de fenótipo mesodermal (Caplan, 1991), podendo realizar as diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica (Dominici, et al., 2006).

Essas células podem ser isoladas não só da medula óssea, mas também do tecido adiposo (Fraser, et al. 2006), da polpa de dente (Gronthos, et al., 2002), do sangue de cordão umbilical (Erices, Conget e Minguell, 2000), do sangue periférico (Cao, Dong E Dong, 2005) do sangue menstrual (Meng, et al., 2007) e também de vários outros tecidos.

No entanto, células isoladas de diferentes fontes podem apresentar diferentes níveis de proliferação e também de capacidade de diferenciação. Então, para garantir a comparabilidade dos estudos, em 2006 o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular e Gênica determinou atributos para que as células isoladas desses tecidos fossem classificadas como CTMs. Para tanto, elas deveriam preencher alguns pré-requisitos, como a capacidade de aderir ao plástico e de realizar as diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*. Além disso, essas células devem expressar na sua membrana CD90, CD105, CD73 e CD140b e não devem apresentar marcadores de células hematopoiéticas, como CD34, CD45, CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 $\alpha$  e HLA-DR (Dominici, et al., 2006; Bühring, et al., 2007).

Essas células têm sido muito exploradas na medicina regenerativa e no tratamento de doenças devido a: sua capacidade de diferenciação em três linhagens diferentes; variedade de fontes das quais podem ser isoladas; sua baixa imunogenicidade (não expressam HLA-DR ou moléculas coestimulatórias); e por possuírem um grande poder imunomodulatório (Li, Hu e Zhong, 2019). Até janeiro de 2021, por exemplo, cerca de 10 mil estudos clínicos estavam cadastrados no site *clinicaltrials.gov* envolvendo o uso de CTMs para aplicações diversas, que vão desde regeneração óssea após uma fratura, cicatrização de feridas diabéticas, tratamento

de doenças degenerativas do sistema nervoso, até mais recentemente para o tratamento de COVID-19.

Embora o efeito regenerativo das células-tronco mesenquimais tenha sido atribuído por muito tempo a sua capacidade de diferenciação, estudos mais recentes têm demonstrado que esses efeitos terapêuticos também estão associados a fatores bioativos secretados por essas células (Phelps, et al., 2018). O secretoma das CTMs é composto principalmente por moléculas de sinalização, fatores de crescimento e citocinas imunomodulatórias, mas também apresentam vesículas extracelulares que carregam citocinas e fatores de crescimento (Phelps, et al., 2018).

Outros estudos, no entanto, focam em obter as vesículas extracelulares do meio condicionado e aplicá-las isoladamente do meio e das células. Essa técnica já demonstrou oferecer proteção cardíaca *in vitro* e *in vivo* (Wendt, et al., 2018) e, assim como o meio condicionado, também já promoveu a cicatrização de feridas estimulando a migração e proliferação de fibroblastos e produção de colágeno (Hu, et al., 2016).

Mesmo assim, o uso de CTMs ou de seu secretoma na clínica ainda não é bem estabelecido, pois, apesar dos resultados positivos *in vitro* e *in vivo*, poucos se repetem nos testes clínicos (Kimbrel e Lanza, 2020; Levy et al., 2020). Atualmente, há tratamentos baseados em terapias com CTMs aprovados no Canadá, mas não nos Estados Unidos (Kimbrel e Lanza, 2020). No Brasil, essas terapias ainda são classificadas como tratamentos experimentais (ABTCEL, 2020).

Considerando que as respostas celulares podem diferir de acordo com os diversos modelos de cultivo utilizados (2D, 3D, biomateriais, topografias), torna-se pertinente estudar como essas variáveis de fato afetam o potencial secretório e regenerativo das CTMs. Além disso, diante do exposto, fica clara também a importância de se estudar e descrever com mais detalhes os mecanismos pelos quais as CTMs são capazes de regenerar tecidos, de forma a entendermos melhor seu funcionamento e a aprimorar resultados de ensaios clínicos.

### **1.3. Célula CD133<sup>+</sup> Expandidas**

Além das CTMs, outras células muito exploradas na medicina regenerativa e, portanto, também na engenharia de tecidos são as células endoteliais devido ao seu potencial angiogênico (Qiu e Hirschi, 2019).

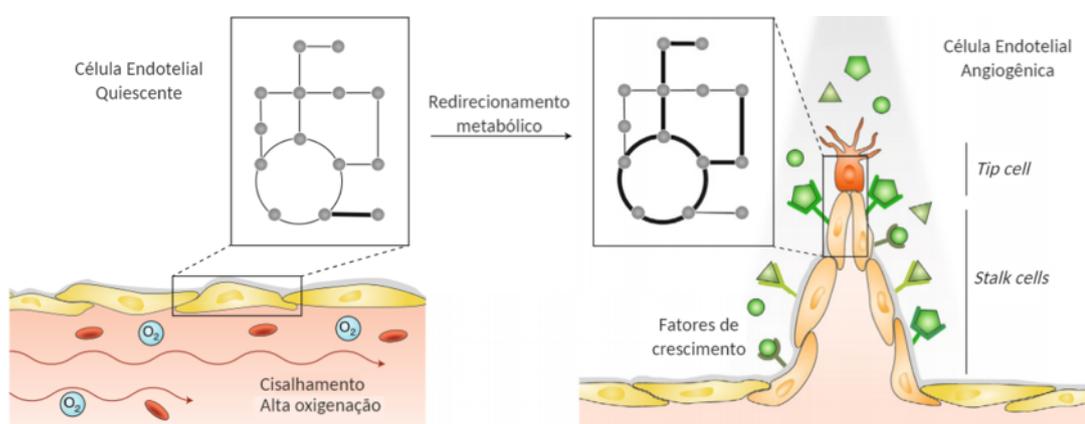
Em 1997, Ashara e colaboradores relataram o isolamento de células circulantes que expressavam marcadores endoteliais e possuíam a capacidade de formar vasos sanguíneos. As células, então, receberam o nome de progenitores endoteliais, ou CPEs. Porém, ao longo dos anos surgiram evidências de que as CPEs eram um grupo de células heterogêneo e que nem todas elas se diferenciavam em progenitores endoteliais com potencial angiogênico (Medina, et al., 2017). Hoje sabe-se que algumas dessas células são de origem hematopoiética e seu potencial angiogênico se dá por mecanismos parácrinos, sendo que elas não são capazes de gerar células endoteliais maduras (Medina, et al., 2017).

Por isso, o termo CPE não é mais bem visto na literatura e em 2017 Medina e colaboradores sugeriram denominar essa população de células endoteliais formadoras de colônias (CEFC), enquanto as células de origem hematopoiética receberiam o nome de células mieloides angiogênicas (CMA).

As CEFCs podem ser isoladas principalmente de sangue de cordão umbilical e do sangue periférico, mas também podem ser encontradas na placenta (Medina, et al., 2017). No entanto, independentemente da fonte, sabe-se que as células endoteliais imaturas apresentam o marcador CD133 e, conforme amadurecem, perdem essa expressão e passam a apresentar marcadores de células endoteliais maduras, como CD31, CD146, CD309 (VEGFR-2) e vWF (fator de Von Willebrand) (Ingram, et al., 2004; Bongiovanni, et al., 2014). Ao mesmo tempo, há redução na expressão de marcadores de células hematopoiéticas, como CD34 e CD45 (Bongiovanni, et al., 2014). Dessa forma, as células CD133<sup>+</sup> representam inicialmente as células endoteliais imaturas que foram isoladas a partir desse marcador (Bongiovanni, et al., 2014). Conforme elas amadurecem, ou são expandidas *in vitro*, perdem a expressão de CD133 e adquirem características endoteliais, como o potencial angiogênico e, por isso, podem ser denominadas de células CD133<sup>+</sup> expandidas (Senegaglia, et al., 2010; Correa, et al., 2018).

Quanto à presença e ação das células endoteliais no organismo, por muito tempo também houve dúvida se o processo de vasculogênese ocorreria apenas no período intrauterino ou se ele se estenderia à vida adulta. Hoje sabe-se que essas células estão quiescentes no organismo adulto e podem ser ativadas caso haja necessidade de vascularização de um tecido danificado (Falkenberg, et al., 2019). Quando ativadas, as células endoteliais sofrem uma mudança fenotípica e se diferenciam na sua forma proliferativa (*stalk cells*) que se alongam formando um broto

até a *tip cell*, que é a célula que guia o brotamento do novo vaso sanguíneo. Essa mudança fenotípica é iniciada por uma recalibração metabólica. As células endoteliais preferencialmente realizam a via glicolítica para produção de ATP e quando são expostas a níveis crescentes de oxigênio passam a realizar a fosforilação oxidativa. Então, fatores de crescimento, tais como FGF e VEGF, se ligam aos receptores das células e induzem a proliferação das *stalk cells* e a migração das *tip cells*, dando origem a células endoteliais maduras (angiogênicas) (Falkenberg, et al., 2019). Um esquema do processo de formação de vaso sanguíneo pode ser visto na figura abaixo (Figura 1.6).



**Figura 1.6. Esquema do desenvolvimento dos vasos sanguíneos demonstrando as diferenças morfológicas das células endoteliais e a recalibração metabólica durante o processo.** Os esquemas de pontos e traços dentro das caixas representam as vias metabólicas utilizadas em uma célula quiescente (à esquerda) e em uma célula endotelial angiogênica (à direita). Adaptado de Falkenberg (2019).

O uso dessas células na engenharia de tecidos se torna essencial uma vez que um dos motivos que limita o avanço da tecnologia é a vascularização insuficiente dos tecidos formados *in vitro* e consequente falta de integração ao tecido biológico. Um grande número de métodos tem sido desenvolvido para aprimorar a vascularização na engenharia de tecidos e alguns foram bem sucedidos. Essas abordagens incluem, em sua grande maioria, entrega de fatores de crescimento e citocinas ao cultivo e cultura de células endoteliais em conjunto com outros tipos celulares (cocultura) (Yang, et al., 2020).

Um dos tipos celulares usualmente cultivado com células endoteliais é a CTM, usada para formar principalmente tecido ósseo vascularizado (Böhrensen e Schliephake, 2016; Liu, et al, 2017). Além de serem capazes de induzir a angiogênese,

as CTMs podem estabilizar os novos vasos (Adams e Alitalo, 2007) e, assim, permitir uma melhor vascularização do novo tecido.

No entanto, a literatura é reduzida tratando-se de estudos sobre a célula endotelial em arcabouços 3D para aplicações na engenharia de tecidos. A maioria desses estudos se concentra em avaliar a formação da rede de vasos e a quantidade de ramificações geradas. Porém, Rouwkema e Khademhosseini (2016) lembram que é mais importante avaliar funcionalidade e qualidade dos vasos do que apenas a quantidade de vasos formados e, para isso, é necessário ainda estudar como essas células se comportam em ambientes tridimensionais. Além disso, até o momento de redação deste trabalho não foram encontrados trabalhos associando a célula CD133<sup>+</sup> expandida a arcabouços 3D.

#### **1.4. Cultivo Celular 3D**

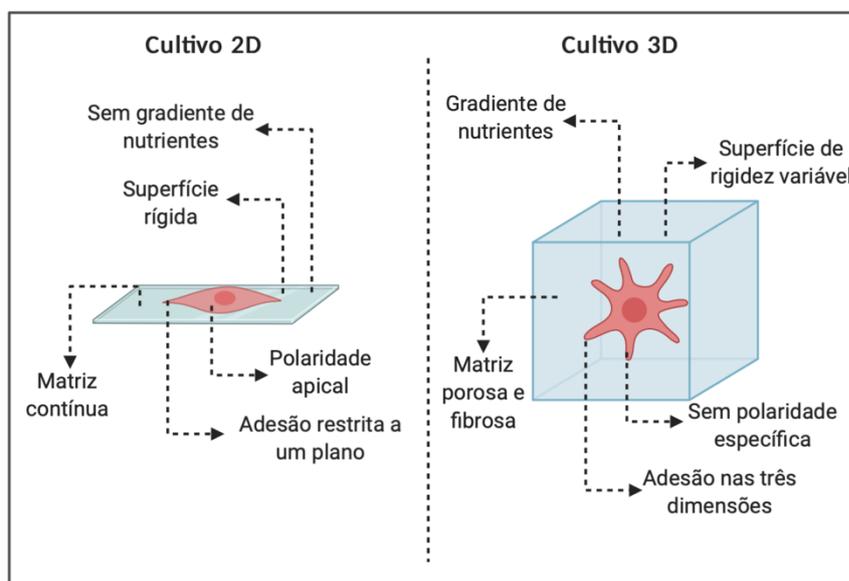
O cultivo celular é uma das técnicas utilizadas na biologia celular e molecular para o estudo do comportamento de células (como interação célula-célula, replicação, transcrição, ciclo celular, metabolismo, entre outros) e é também um modelo para estudar ação de drogas farmacêuticas, para produção de compostos de interesse biotecnológico e, mais recentemente, para o desenvolvimento de órgãos e tecidos para a medicina regenerativa.

A técnica de cultivo de células originou-se ainda no século XIX quando o fisiologista Sydney Ringer desenvolveu uma solução composta de sais de potássio, cálcio e magnésio capaz de manter os batimentos cardíacos do coração de um sapo fora do corpo do animal (revisado por Yao e Asayama, 2017). Porém, o marco inicial do cultivo celular animal foi apenas em 1907 quando o biólogo Ross G. Harrison, inspirado pelos trabalhos de Ringer, isolou fragmentos da medula espinhal de sapos e observou *in vitro* o crescimento das fibras nervosas cultivadas em fluido linfático (revisado por Yao e Asayama, 2017).

Nos anos que se seguiram, a área viveu grandes marcos como, por exemplo, quando Margaret Reed Lewis (1908) cultivou medula óssea de porco (Yao e Asayama, 2017) e quando Alexis Carrel (1910) cultivou fragmentos de embrião de galinha em diversos meios de cultivo, primeiro por vários dias e depois por até 2 anos (Simian e Bissell, 2017). Até que em 1951 o médico George O. Gey isolou com sucesso a

primeira linhagem de células humanas denominadas células HeLa em referência à paciente da qual as células foram isoladas, Henrietta Lacks (Lucey, et al., 2009).

No entanto, o que todos esses cultivos têm em comum é que todos foram realizados em placas ou garrafas de cultivo planas, ou seja, em apenas duas dimensões. Embora o cultivo 2D seja utilizado até hoje, ele não representa fielmente a situação das células no organismo, onde elas estão organizadas num ambiente 3D (Baker e Chen, 2012). As principais diferenças entre os cultivos 2D e 3D estão resumidas na figura abaixo (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Diferenças entre os cultivos 2D e 3D.** Os sinais físicos e químicos aos quais as células estão expostas em cultivos 2D e 3D são distintos e geram respostas celulares diferentes. O ambiente 3D permite, além da adesão em três dimensões, a difusão gradual de nutrientes, resultando em células diferencialmente polarizadas. Os *scaffolds* 3D também podem ter sua rigidez e composição alteradas para se assemelharem mais aos tecidos biológicos. Por outro lado, no cultivo 2D, as células estão submetidas a matrizes de alta rigidez e são normalmente homogêneas, o que resulta num ambiente sem gradientes químicos e físicos e, portanto, em células igualmente polarizadas. Adaptado de Baker e Chen (2012).

A primeira grande diferença entre os cultivos 2D e 3D é o fato de que num ambiente 3D as células podem aderir nas três dimensões e, assim, explorar mais o espaço e aumentar não só a interação com a matriz extracelular, mas também com as outras células ao seu redor (Baker e Chen, 2012).

Além disso, a grande maioria dos cultivos 2D é realizada em superfícies de plástico que possuem uma rigidez muito alta (como está representado na Figura 1.2) e inadequada para a maioria das células. Já em matrizes tridimensionais, dependendo

do material utilizado para sua construção, a rigidez pode ser manipulada para atender às necessidades de cada tipo celular (Baker e Chen, 2012). Essa característica do cultivo 3D é importante porque, embora os mecanismos ainda não estejam bem descritos, sabe-se que a rigidez da matriz extracelular influencia algumas atividades celulares, tais como adesão, diferenciação e migração (Guimarães, et al., 2020).

Além da rigidez, outro fator da estrutura das matrizes 3D que pode ser controlado é a porosidade e interconectividade dos poros. Essa característica influencia a diferenciação celular e também cria microambientes com concentrações variáveis de metabólitos e nutrientes. Já no cultivo 2D, os metabólitos e os nutrientes do meio de cultivo facilmente se difundem e se distribuem de maneira praticamente homogênea por todo o cultivo (Baker e Chen, 2012).

Todos esses fatores influenciam a polarização das células. As forças de tensão em uma só direção, a falta de gradiente de nutrientes e a alta rigidez da matriz do cultivo 2D fazem com que as células apresentem a mesma polarização. Enquanto no cultivo 3D, a variação desses fatores contribui para que as células se polarizem de maneira diferente e por conta própria e, assim, criem um ambiente de células diferentemente polarizadas, recriando mais fielmente a situação *in vivo* (Baker e Chen, 2012).

De acordo com Simian e Bissell (2017) a técnica do cultivo 3D pode ser datada dos anos de 1970 com o cultivo de células em géis de colágeno flutuantes. Porém, o uso do termo “cultivo tridimensional” começou a ser utilizado apenas no final dos anos de 1980 e começo dos anos de 1990.

Nos últimos 10 anos, o número de estudos publicados envolvendo cultivo 3D cresceu significativamente e a técnica se tornou um modelo robusto e confiável. Atualmente, os cultivos 3D podem ser divididos em dependentes e não dependentes de arcabouços (Jensen e Teng, 2020).

As técnicas não dependentes de arcabouços são compostas principalmente por formação de organoides e esferoides (Jensen e Teng, 2020). Organoides são estruturas 3D derivadas de células-tronco pluripotentes que se organizam de maneira espontânea num cultivo e apresentam pelo menos uma função fisiológica do órgão que ele representa (Pal, 2019). Por outro lado, os esferoides são derivados do cultivo de um único tipo celular e, assim, representam apenas parte de um tecido. Sua formação não é espontânea e as células precisam ser depositadas em poços com

fundos arredondados para sedimentarem ao longo do tempo e o esferoide formado no final é difícil de ser mantido em cultivo (Pal, 2019).

Já os métodos dependentes de arcabouço consistem em depositar as células nesses arcabouços e colocá-los em cultivo convencional (numa placa de cultura, por exemplo) ou cultivadas em biorreatores. Esses arcabouços podem ser produzidos por diversos métodos, como impressão 3D, *eletrospinning*, síntese química, etc. Esses métodos são discutidos a seguir.

Apesar das diversas técnicas, o modelo de cultivo 3D ainda está nas suas etapas iniciais de estudo e os mecanismos pelos quais as células se organizam tridimensionalmente ainda precisam ser elucidados.

### 1.5. Biomateriais para a Engenharia de Tecidos

Um biomaterial é definido como uma substância ou um conjunto de substâncias (naturais ou sintéticas) que interagem com um organismo no sentido de reparar ou substituir um tecido ou órgão. O aspecto principal de um biomaterial na engenharia de tecidos é a sua biocompatibilidade, ou seja, sua capacidade de executar a resposta apropriada no organismo sem causar efeitos nocivos (Ratner, 2019).

Tecidos biológicos possuem uma estrutura altamente organizada e uma composição única que promovem suporte mecânico e transporte de fatores para regular funções celulares. Dessa forma, a escolha do biomaterial para produção de arcabouços também deve levar em conta cada tecido, sua estrutura e sua função de forma a imitar as condições biológicas de maneira confiável e permitir a integração do arcabouço ao organismo (Deb, et al., 2018).

A Tabela 1.1 resume outras principais características que podem ser alteradas num arcabouço de modo a se controlar a resposta celular e a regeneração do tecido.

**Tabela 1.1. Principais características dos arcabouços que devem ser consideradas e seus efeitos na resposta celular e na regeneração dos tecidos.**

Adaptado de Atala e Hunsberger (2016).

Característica	Efeito
Porosidade	<ul style="list-style-type: none"><li>Variabilidade da área disponível para adesão celular</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltração celular e de nutrientes</li> <li>• Alteração das características mecânicas</li> </ul>
Biodegradabilidade	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradação gradual permite que o tecido novo ocupe o espaço deixado pelo arcabouço</li> <li>• Oferece suporte para as células proliferarem e secretarem matriz</li> </ul>
Bioatividade	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento na proliferação e/ou diferenciação</li> <li>• Promove a entrada de células para alterar a taxa de regeneração</li> </ul>

Biomateriais podem ser utilizados para substituir um tecido ou órgão de maneira permanente, como implantes de titânio, ou apenas auxiliar no reparo de um tecido temporariamente (Deb et al., 2018). Neste caso, o biomaterial serve como um suporte para as células proliferarem e produzirem a matriz extracelular (Atala e Hunsberger, 2016). Portanto, é essencial que eles sejam também biodegradáveis e que os subprodutos da degradação não sejam tóxicos e sejam facilmente eliminados pelo organismo sem interferir em outros tecidos (Atala e Hunsberger, 2016). Além disso, é importante que a taxa de degradação do material seja semelhante à do tecido biológico para que haja espaço suficiente para o novo tecido ser formado sem que haja desestruturação por falta de apoio do arcabouço degradado antes do tempo (Deb, et al., 2018).

A resposta do organismo ao biomaterial também pode ser controlada dependendo da sua composição e também da estrutura do arcabouço. Por exemplo, alguns são bioativos, ou seja, ativamente auxiliam na adesão, proliferação e diferenciação celular (Atala e Hunsberger, 2016). Geralmente, biomateriais com composições químicas semelhantes ao tecido biológico possuem uma alta bioatividade e podem promover respostas celulares específicas. Para esse fim, é possível modificar a superfície do arcabouço acrescentando-se fatores de crescimento ou macromoléculas de matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e laminina, para produzir um ambiente biomimético equivalente ao tecido nativo e modular o comportamento celular (Atala e Hunsberger, 2016).

A estrutura tridimensional do arcabouço também influencia a resposta celular. A porosidade, o tamanho e a interconectividade dos poros alteram a difusão de

nutrientes e de oxigênio e pode influenciar o processo de diferenciação celular. (Atala e Hunsberger, 2016; Deb, et al., 2018). Por exemplo, apesar de haver variações, normalmente poros de tamanhos maiores, entre 300 até 800  $\mu\text{m}$  são mais adequados para diferenciação condrogênica e osteogênica (Loh e Choong, 2013; Abassi, et al., 2020). Já poros de tamanhos entre 100 e 300  $\mu\text{m}$  estão associados à angiogênese (Loh e Choong, 2013). Além disso, as características mecânicas e químicas dos arcabouços também podem influenciar a diferenciação, migração, adesão e proliferação celular (Deb et al., 2018).

No entanto, o uso de biomateriais para cicatrizar feridas, manter ou restaurar funções corporais não é uma estratégia nova. Na antiguidade, egípcios e romanos já usavam fibras vegetais para tratar lesões de pele e já eram capazes de moldar uma série de próteses. Mais tarde, a revolução industrial permitiu o desenvolvimento de uma série de biomateriais sintéticos (primeiro os metálicos e depois os poliméricos) com características cada vez mais apropriadas para o desenvolvimento de dispositivos médicos (Simionescu e Ivanov, 2015). Atualmente, existe uma grande variedade de biomateriais que podem ser divididos em polímeros (naturais e sintéticos), cerâmicos (como os sais de fosfato e cálcio) e metálicos (Simionescu e Ivanov, 2015). Devido a essa grande variedade, este trabalho será focado na discussão dos polímeros. Alguns dos polímeros mais utilizados na engenharia de tecidos estão detalhados na Tabela 1.2.

**Tabela 1.2 Polímeros sintéticos e naturais mais comumente usados na engenharia de tecidos e suas vantagens e desvantagens.** Adaptado de Tamay (2019).

Biomaterial	Vantagens	Desvantagens
Polímeros sintéticos		
ABS (acrilonitrila butadieno estireno)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processamento simples</li> <li>• Baixa temperatura de fusão</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é biodegradável</li> </ul>
PLA (ácido polilático)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flexibilidade</li> <li>• Propriedades mecânicas manipuláveis</li> <li>• Biodegradável</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta temperatura de fusão</li> </ul>

PCL (policaprolactona)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa temperatura de fusão</li> <li>• Propriedades reológicas e viscoelásticas ótimas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradação lenta</li> </ul>
PLGA (ácido poliglicólico)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propriedades mecânicas manipuláveis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura de processamento alta</li> </ul>
PEEK poli(éter-éter-cetona)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propriedades elásticas ótimas</li> <li>• Bioinerte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta temperatura de fusão</li> </ul>
PU (poliuretano)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradável</li> <li>• Propriedades mecânicas ótimas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processo de síntese complexo</li> </ul>
PMMA (polimetilmetacrilato)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta biocompatibilidade</li> <li>• Bioinerte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é biodegradável</li> </ul>
Polímeros Naturais		
Gelatina/ Colágeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradável</li> <li>• Facilita adesão celular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocolos extensos de purificação para evitar contaminações</li> </ul>
Quitosana	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biodegradável</li> <li>• Atividade antibacteriana e antifúngica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propriedades mecânicas baixas</li> </ul>
Alginato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não é imunogênico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dificuldade de controlar o processo de degradação</li> </ul>

Devido a essa grande variação de propriedades dos materiais, cada um tem sido estudado para a regeneração de diferentes tecidos. Por exemplo, aqueles mais rígidos geralmente são explorados para aplicações ósseas e os menos rígidos para regeneração de tecidos moles, como cartilagem. Mesmo assim, devido às diversas técnicas de produção de arcabouços, eles podem ser utilizados em conjunto para obtenção de características químicas, físicas e mecânicas variáveis e inéditas (Tamay, 2019).

### 1.5.1. Poli(ácido lático)

Um dos polímeros muito explorados na engenharia de tecidos é o poli(ácido lático) (PLA). Ele existe em duas formas (isômeros): PLLA e PDLA (Figura 1.8). A mistura racêmica é conhecida como PDLLA (Casalini, et al., 2019), mas apenas o PLLA e o PDLLA apresentam aplicações biomédicas (Simionescu e Ivanov, 2015).

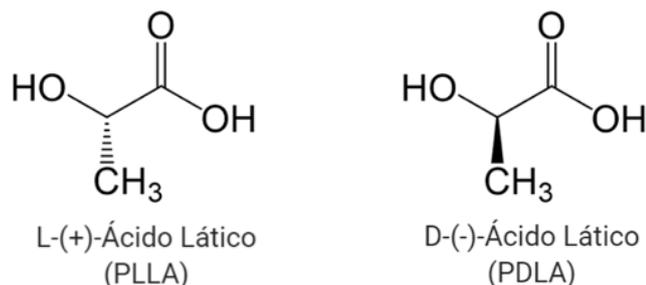


Figura 1.8. Isômeros do PLA. Adaptado de Casalini, et al (2019).

Para aplicações na engenharia de tecidos, no entanto, apenas o isômero PLLA é utilizado, uma vez que ele pode fazer parte do metabolismo celular, sendo incorporado ao ciclo da fosforilação oxidativa ou convertido em glicogênio no fígado, sendo depois facilmente eliminado na forma de água e dióxido de carbono (Casalini, et al., 2019). Além disso, enquanto o PLLA é um polímero semicristalino, o PDLA é um polímero amorfo, o que lhe confere baixa resistência mecânica e uma taxa de degradação muito alta (Simionescu e Ivanov, 2015; Casalini, et al., 2019).

Uma das vantagens do PLA é a sua produção que pode se dar através de fermentação bacteriana de milho, arroz ou trigo que oferece altos rendimentos e, dependendo da bactéria utilizada, é possível obter apenas um dos isômeros da mistura racêmica. Dessa forma, a produção do PLA pode ser considerada sustentável (Casalini, et al., 2019). Outras vantagens desse biomaterial, assim como algumas desvantagens, estão descritas na Tabela 1.3.

Tabela 1.3. Vantagens de desvantagens do PLA. Adaptado de Casalini, et al (2019)

VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>Sustentabilidade:</b> produzido a partir de fontes renováveis, biodegradável, reciclável e sua produção exige menos	<b>Características mecânicas:</b> PLA pode ser frágil, o que pode ser um limitante

energia do que polímeros derivados do petróleo e consome gás carbônico.	para aplicações que exigem um material mais elástico.
<b>Versatilidade:</b> suas propriedades mecânicas podem ser facilmente modificadas com a mistura do PLA com outros polímeros e formação de estereocomplexos.	<b>Baixa taxa de degradação:</b> implantes precisam de mais tempo para serem degradados e substituídos pelo novo tecido, o que para algumas aplicações pode não ser adequado.
<b>Biocompatibilidade:</b> o produto principal de degradação é o ácido lático que pode ser facilmente metabolizado pelo organismo.	<b>Hidrofobicidade:</b> pode resultar em baixa adesão celular.
<b>Fácil processamento:</b> em comparação a outros polímeros, as técnicas de processamento do PLA são bem estabelecidas.	<b>Inércia química:</b> PLA é quimicamente inerte o que pode dificultar processos de funcionalização.

Arcabouços tridimensionais de PLA têm sido usados em combinação com diferentes tipos celulares para regenerar principalmente tecido ósseo (Shahrezaee, et al., 2018; Ashwvin, et al., 2020; Söhling, et al., 2020) e cartilagem (Rosenzweig, et al., 2015; Haaparanta, et al., 2014). Mesmo quando não é usado diretamente para produzir arcabouços, o PLA também tem sido usado em biotintas para bioimpressão de tecidos (Antich, et al., 2020), como veículo em forma de nanopartículas para entregar drogas (Elmowafy, Tiboni e Soliman, 2019) e como dispositivos médicos em forma de parafusos para auxiliar em tratamentos ósseos (Alsaheb, et al., 2015).

## 1.6. Impressão 3D

Existem diversas maneiras de produzir arcabouços de biomateriais e uma das mais comuns é a impressão 3D. A primeira patente envolvendo impressão 3D é datada de 1986 e foi depositada por Charles Hull, que denominou a tecnologia de estereolitografia. A técnica de Hull envolvia a cura de materiais de resina camada por camada com uma lâmpada UV (Hull, 1986). Atualmente, a impressão 3D é conhecida

como manufatura aditiva ou prototipagem rápida e a estereolitografia é uma das técnicas de impressão (Tamay, et al., 2019).

Em termos gerais, a impressão 3D consiste em modelar um protótipo 3D em programas de engenharia, como CAD, a partir do qual a impressora, seguindo o plano cartesiano (coordenadas X, Y e Z) é capaz de imprimir o objeto (Ligon, et al., 2017). Algumas das técnicas de impressão 3D estão resumidas na Tabela 1.4.

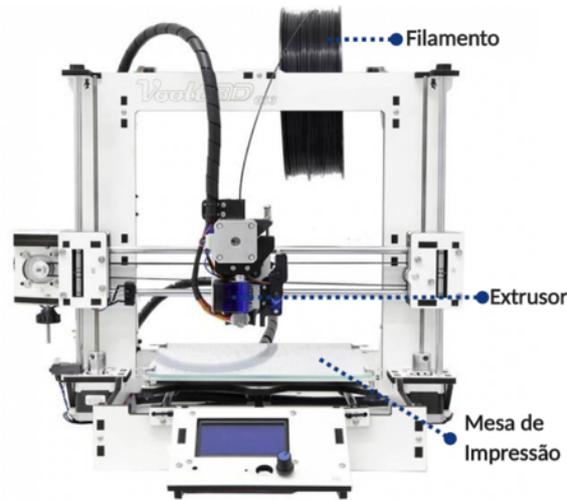
**Tabela 1.4 Lista de técnicas de impressão 3D.** Adaptado de Ligon, et al (2017).

<b>TÉCNICA</b>	<b>VANTAGENS</b>	<b>DESVANTAGENS</b>
<b>PRODUÇÃO CONTÍNUA DE INTERFACE DE LÍQUIDOS (CLIP)</b>	Impressão rápida	Exige materiais de baixa viscosidade
<b>LITOGRAFIA MULTIFOTÔNICA</b>	Alta resolução	Construção lenta; opção de materiais limitada
<b>POLYJET</b>	Impressão rápida; ampla opção de materiais	Exige materiais de baixa viscosidade
<b>AEROSOL JET</b>	Alta resolução; baixa temperatura de processo	Exige materiais de baixa viscosidade
<b>JET BINDER</b>	Impressão rápida; baixa temperatura de processo	Produz objetos com superfícies rugosas
<b>FABRICAÇÃO DE OBJETOS LAMINADOS</b>	Impressora compacta	Baixa resolução
<b>3D DISPENSING</b>	Ampla opção de materiais	Produz objetos com superfícies rugosas

Essas técnicas, no entanto, não são tão usadas por serem muito trabalhosas, muito caras ou, em alguns casos, patenteadas.

A técnica mais utilizada é a modelagem por deposição fundida (FDM – *fused deposition modeling*). A impressora FDM (Figura 1.9) utiliza uma variedade de filamentos plásticos chamados termoplásticos que são aquecidos até suas

temperaturas de fusão e solidificam novamente quando são depositados na mesa de impressão por um extrusor (Ligon et al., 2017; Tamay, et al., 2019).



**Figura 1.9. Exemplo de uma impressora 3D de FDM e seus componentes principais.**

As principais vantagens da FDM são a simplicidade, o baixo custo e a possibilidade de se utilizar mais de um extrusor para a impressão de mais de um tipo de polímero por vez. Além disso, não há necessidade do uso de solventes químicos em nenhuma etapa do processo (Tamay, 2019). Porém, alguns polímeros podem produzir vapores tóxicos durante a fusão, como o ABS (Zhang, et al., 2019).

Independentemente da técnica, a possibilidade de se controlar a arquitetura do material impresso facilmente tornou a impressão 3D muito interessante para aplicações biomédicas na produção de próteses e também na engenharia de tecidos para produção de arcabouços.

### **1.7. Justificativa**

De acordo com dados do Ministério da Saúde, até agosto de 2020 no Brasil havia uma lista de espera por transplante de quase 47 mil órgãos (rim, fígado, córnea, coração, pulmão, pâncreas...). Até a redação deste trabalho, a lista de doadores efetivos não foi atualizada para 2020, mas em 2019 o Brasil contava com menos de 4 mil doadores cadastrados. Diante da grande disparidade desses números, nota-se a importância de se encontrar soluções alternativas para a falta de órgãos. Uma dessas opções é a engenharia de tecidos, uma área que tem evoluído muito nos últimos 30 anos nas questões de identificação de novas fontes de células, bem como de técnicas

para a manipulação dessas células e no desenvolvimento de novas metodologias de produção de arcabouços que auxiliem na regeneração de um órgão ou tecido.

As células mais comumente exploradas para aplicações na engenharia de tecidos são as CTMs devido ao seu potencial de diferenciação, sua atividade parácrina imunomodulatória e sua presença em diversos tecidos, o que facilita seu isolamento. Em conjunto com as CTMs, as células endoteliais, como as células CD133<sup>+</sup> expandidas, também apresentam grande importância para a área devido ao seu potencial angiogênico.

Um dos biomateriais de grande interesse para a produção de arcabouços é o PLA, um polímero biocompatível, biodegradável, barato e versátil. Suas características físicas permitem que ele seja impresso em 3D para fabricação de arcabouços de diversos tamanhos e estruturas.

Enquanto há estudos sobre a combinação de CTMs com arcabouços de PLA, não foram encontrados trabalhos associando as células CD133<sup>+</sup> expandidas a esses arcabouços. Ainda, enquanto boa parte dos estudos se concentra em desenvolver novas combinações de biomateriais e células para aplicações clínicas, pouco se sabe sobre as respostas celulares específicas a esses arcabouços.

Este trabalho, então, usou arcabouços de PLA de diferentes porosidades para avaliar a resposta celular de CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas com o intuito de gerar mais informações para um melhor entendimento do comportamento celular no cultivo 3D em arcabouços.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Analisar os efeitos de dois arcabouços de PLA com tamanhos de poros diferentes no comportamento de CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar a estrutura e as propriedades físicas de arcabouços de PLA com poros de tamanhos diferentes;
- Verificar a adesão de CTMs e de células CD133<sup>+</sup> expandidas nos arcabouços de PLA;
- Avaliar a citotoxicidade dos arcabouços de PLA;
- Avaliar o ciclo celular e quantificar a proliferação de CTMs e de células CD133<sup>+</sup> expandidas em cultivo nos arcabouços de PLA;
- Analisar o perfil imunofenotípico de CTMs e de células CD133<sup>+</sup> expandidas após o cultivo nos arcabouços de PLA;
- Avaliar o potencial angiogênico de células CD133<sup>+</sup> expandidas após o cultivo em arcabouços de PLA e do meio condicionado produzido nestas condições.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Impressão 3D dos Arcabouços de PLA**

A impressão dos arcabouços foi realizada em colaboração com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) utilizando-se uma impressora 3D de FDM (ANET A8) e filamento de PLA (1,75 mm; ESUN). Foram impressos arcabouços cúbicos de dimensões 10 mm x 10 mm x 3 mm (LxCxA) e discos chatos de 3 cm de diâmetro. Os arcabouços cúbicos apresentaram preenchimento de 25% e 40% (S25 e S40). O disco apresentou preenchimento de 100% de acordo com os parâmetros do *software* fatiador utilizado (Fatiador Cura). Para todas as impressões, a velocidade de impressão foi de 30 mm/s e as temperaturas de extrusão e da mesa foram determinadas em 200°C e 55°C, respectivamente.

#### **3.2. Caracterização dos Arcabouços de PLA**

##### **3.2.1. Caracterização Ultraestrutural**

A estrutura e o tamanho dos poros dos arcabouços foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso os arcabouços foram submetidos à secagem por ponto crítico utilizando o equipamento Leica EM CPD300 Manual e depois recobertos com ouro utilizando o equipamento Leica EM ACE200. A análise foi realizada utilizando o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6010 PLUS-LA.

Para determinação dos tamanhos médios dos poros foram medidas a largura e o comprimento de 20 poros de um S25 e de um S40.

##### **3.2.2. Teste Mecânico**

Para a caracterização mecânica foram realizados testes de compressão utilizando três corpos de prova para cada categoria de arcabouço. Os ensaios foram realizados numa máquina de ensaio universal (EMIC, DL10000) montada com o dispositivo para teste de compressão com uma célula de carga de 500 N (50 fg) com velocidade de deslocamento de 1,3 mm/min. As medidas de compressão e tensão

obtidas foram usadas para a determinação das curvas de resistência elástica e o cálculo do módulo de Young.

### **3.3. Isolamento e Caracterização das CTMs e das Células CD133<sup>+</sup>**

As células humanas utilizadas neste trabalho foram obtidas de tecido adiposo humano e de sangue de cordão umbilical e foram isoladas após o consentimento esclarecido dos doadores. Esse estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e da Fundação Oswaldo Cruz sob o parecer de número 1366 e 419/07, respectivamente.

#### **3.3.1. CTMs**

As CTMs foram isoladas de tecido adiposo de uma paciente feminina de 46 anos (IMC = 27,03 kg/m<sup>2</sup>) que foi submetida a um procedimento de lipoaspiração. O isolamento foi realizado pelo Núcleo de Tecnologia Celular da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) seguindo protocolo previamente descrito (Marcon, et al., 2020). O tecido foi inicialmente lavado com uma solução salina tamponada por fosfato (PBS) estéril e depois digerido com colagenase tipo I por 30 minutos, 5% CO<sub>2</sub> e sob agitação constante. A fase lipídica foi separada e a fase inferior foi filtrada em um filtro de 100 µm e depois centrifugada a 950 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas e tratadas por 10 minutos com tampão hemolítico (0,83% cloreto de amônio; 0,1% bicarbonato de sódio e 0,04% EDTA). Em seguida, as células foram centrifugadas a 150 x g por 10 minutos, ressuspensas em PBS e filtradas em um filtro de 40 µm e plaqueadas em garrafas de cultivo numa densidade de 2x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup> em DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% SFB, 1% (PS) e 1% L-glutamina.

Quando as células atingiram 80-90% de confluência, elas foram tripsinizadas e replaqueadas em DMEM suplementado com 10% SFB, 1% PS e 1% L-glutamina para expansão e congelamento.

Para confirmação da identidade das CTMs, realizou-se a caracterização proposta por Dominici e colaboradores (2006) composta pela avaliação das diferenciações adipogênica e osteogênica *in vitro* e pela confirmação do perfil imunofenotípico celular por citometria de fluxo.

Para todos os experimentos, as CTMs foram utilizadas entre as passagens 5 e 7.

### **3.3.2. Células CD133<sup>+</sup>**

As células CD133<sup>+</sup> utilizadas nesse trabalho foram isoladas a partir de sangue de cordão umbilical e congeladas a -80°C. O isolamento foi realizado pelo Núcleo de Tecnologia Celular da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná a partir do protocolo previamente descrito (Senegaglia, et al., 2010). Células mononucleares (CMs) foram primeiramente obtidas de sangue de cordão umbilical coletado de placentas frescas seguindo o protocolo de Böyum (1968) modificado. CMs foram diluídas na proporção 1:2 (v/v) em *Iscove's Modified Dulbecco Media* (IMDM) e centrifugadas a 400 x g por 30 minutos usando gradiente de Ficoll. Então, elas foram lavadas três vezes com PBS e as células CD133<sup>+</sup> foram selecionadas usando CD133 microbeads (Miltenyi Biotec) seguindo o protocolo do fabricante. As células purificadas foram plaqueadas em garrafas de cultivo numa densidade de 1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> contendo *Endothelial Cell Basal Medium* (EBM-2) suplementado com EGM®-2MV *Microvascular Endothelial Cell Single Quots*® kit (Lonza) de acordo com as instruções do fabricante.

Após o descongelamento, as células foram cultivadas até atingirem confluência de 70-80%, tendo o meio de cultivo trocado a cada 3-4 dias. Os cultivos confluentes eram então dissociados com uma solução de 0,25% de tripsina-EDTA e as células replaqueadas numa densidade de 1,3x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Para os experimentos foram utilizadas células entre as passagens 6 e 8, ponto no qual são consideradas células CD133<sup>+</sup> expandidas.

### **3.4. Assepsia dos Arcabouços de PLA**

Previamente ao cultivo, os arcabouços foram desinfectados por imersão em etanol 70% por 45 minutos sob agitação em um agitador tridimensional. Foram realizadas duas lavagens com etanol 70% e, em seguida, foram feitas mais duas lavagens de 45 minutos cada com uma solução estéril de PBS para retirar o excesso de etanol do interior dos poros dos arcabouços.

### **3.5. Avaliação da Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA**

#### **3.5.1. Teste por Contato Direto**

A avaliação da citotoxicidade dos arcabouços de PLA foi primeiro realizada a partir do teste por contato direto seguindo as diretrizes da ISO 10993-5 (ISO, 2009). CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas foram plaqueadas em densidades de  $2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> e  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, respectivamente, em placas de 24 poços e cultivadas por 24 horas em meio de cultivo suplementado. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado e foram selecionados 2 poços para o controle positivo, 2 poços para o controle negativo e 3 para a realização do teste por contato. Para o controle positivo foi acrescentada uma solução de 100 µg/mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) em meio de cultivo suplementado. Para o controle negativo, apenas meio de cultivo suplementado foi utilizado. Para os testes foi cortado um pedaço do arcabouço de PLA e depositado em cima da monocamada de células, que, então, também foi cultivada com meio de cultivo suplementado.

Após 48 horas de incubação (37°C e 5% CO<sub>2</sub>), para a análise da morfologia celular foram obtidas 10 imagens de cada poço com o auxílio de um microscópio invertido Nikon Eclipse TE300 utilizando sempre a mesma magnificação (ocular 10x e objetiva 10x).

#### **3.5.2. Ensaio de Captação de Vermelho Neutro**

Para avaliar se o PLA poderia gerar produtos de degradação tóxicos para as células, foi realizado um ensaio de coloração com vermelho neutro. A obtenção do extrato (meio de cultivo com fragmentos de PLA) foi realizada seguindo as diretrizes da ISO 10993/12 (ISO, 2016). De acordo com o documento deve haver uma relação ideal entre as áreas das superfícies ou massa dos sólidos e o volume dos líquidos de extração. Dessa forma, os arcabouços foram considerados produtos porosos de forma irregular e os S40 foram cortados de maneira a obtermos 0,1 g de PLA por 1 mL de meio de cultivo. Para obtenção do extrato, estes fragmentos de PLA foram mantidos sem células com meio DMEM suplementado com 2% PS e 2% L-glutamina sob agitação suave e a 37°C por 24, 48, 72 e 96 horas. Após a incubação, os fragmentos de PLA foram descartados e apenas o extrato foi utilizado para os testes.

O ensaio de captação de vermelho neutro foi realizado em duplicata pela Plataforma de Bioensaios em Métodos Alternativos em Citotoxicidade do Instituto Carlos Chagas seguindo as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) *guideline* 129 (OECD 2010). Para os testes, células da linhagem BalB/c3T3 foram cultivadas por 48 horas com os extratos e, para o controle, as células foram cultivadas com meio DMEM suplementado com 2% PS e 2% L-glutamina. Após as 48 horas, as amostras foram coradas com solução de vermelho neutro e as absorbâncias foram avaliadas e convertidas em viabilidade.

Então, para determinar o efeito citotóxico, foi calculada a Taxa de Crescimento Relativo (TCR) que é determinada pela relação entre a viabilidade do grupo testado e a viabilidade do controle. Se o valor de TCR for menor do que 70% a amostra deve ser considerada citotóxica.

### **3.6. Deposição das Células nos Arcabouços de PLA**

Para avaliação da adesão celular, foram testados diversos métodos para semear as células, assim como também foi testado o número ideal de células que deveriam ser semeadas por arcabouço. Esses testes estão descritos em mais detalhes no Apêndice A.

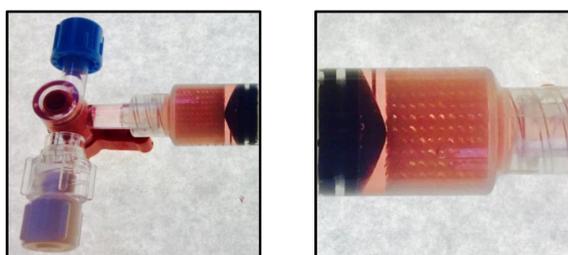
Ainda, considerando que o PLA é um biomaterial hidrofóbico, foi importante avaliar se havia diferenças na adesão celular quando o arcabouço estava seco e quando ele estava molhado. Então, testou-se semear as células depositando-as em arcabouços secos e molhados. As células foram plaqueadas por cima dos arcabouços nas seguintes condições: 1) arcabouços totalmente secos; 2) arcabouços úmidos, seco brevemente por 5 minutos dentro do fluxo laminar após a lavagem em PBS; 3) arcabouços molhados, nos quais as células foram semeadas logo após a lavagem com PBS.

#### **3.6.1. Deposição das Células pelo Método da Seringa**

Após a realização dos testes de deposição das células (descritos no Apêndice A), foi padronizado o processo de semeadura pelo método da seringa. Para isso, as células foram primeiro cultivadas em garrafas de cultura até atingirem uma confluência de aproximadamente 70-80% quando, então, foram dissociadas com uma solução de

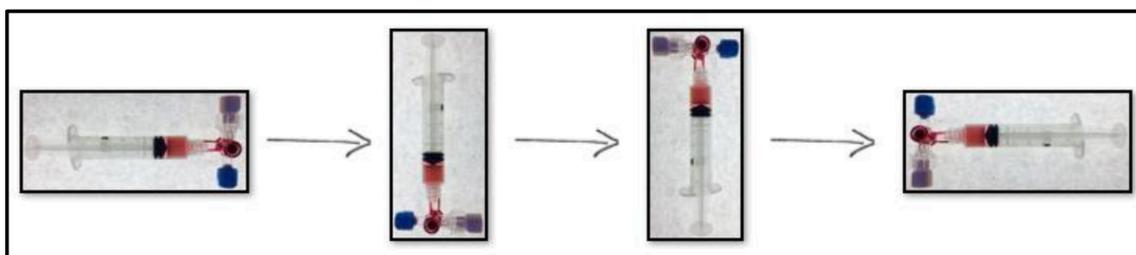
0,05% de tripsina-EDTA. Para as CTMs foi preparada uma solução contendo  $6 \times 10^4$  células em 5 mL de DMEM suplementado e para as células CD133<sup>+</sup> expandidas foi preparada uma solução com  $5 \times 10^5$  células em 5 mL de meio EBM-2 suplementado.

Então, as células foram semeadas nos arcabouços usando a técnica da seringa descrita por Fairag e colaboradores (2019), que consistiu em depositar o arcabouço dentro de uma seringa conectada a uma válvula de 4 vias. O meio de cultivo contendo as células foi acrescentado na seringa até que o arcabouço ficasse totalmente submerso e, então, o êmbolo foi inserido e a seringa foi virada cuidadosamente. Assim que o arcabouço estivesse no fundo da seringa, o êmbolo foi empurrado cuidadosamente para cima até que o arcabouço estivesse preso no topo da seringa, como mostra a Figura 3.1, permitindo que as células entrassem em contato com toda a superfície do arcabouço, inclusive o interior dos poros.



**Figura 3.1. Imagem do arcabouço no interior da seringa para deposição das células.** O arcabouço foi inserido na seringa contendo uma válvula de 4 vias e, em seguida, foi acrescentado meio de cultivo com as células. O êmbolo foi inserido e empurrado até o fim para que o meio contendo as células entrasse em contato com todas as superfícies do arcabouço.

Em seguida, a seringa foi incubada a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e virada 90° no sentido horário a cada 30 minutos por 2 horas, como esquematizado na Figura 3.2.



**Figura 3.2. Esquema de como a seringa com o arcabouço foi virada 90° a cada 30 minutos para deposição das células.**

Após permitir que as células aderissem ao arcabouço, o meio de cultivo foi descartado e os arcabouços foram depositados em placas de 24 poços contendo 600

$\mu\text{L}$  de meio de cultivo suplementado. A placa com os arcabouços foi incubada na estufa e o meio de cultivo foi trocado a cada 2 dias.

### **3.6.2. Deposição das Células nos Discos de PLA**

Para a semeadura das células nos discos de PLA, eles foram depositados em placas de 6 poços e foi acrescentado primeiro meio de cultivo suplementado. Em seguida,  $2 \times 10^4$  células em 200  $\mu\text{L}$  de meio (DMEM ou EBM-2 suplementado) foram depositadas por cima dos discos. A placa foi deixada para descansar por 5 minutos para permitir que as células decantassem e se depositassem sobre o disco antes de serem colocadas na estufa.

### **3.7. Acompanhamento da Adesão Celular nos Arcabouços de PLA**

Para avaliar se os arcabouços de PLA permitiam a adesão das células, eles foram analisados 48 horas e 7 dias após a semeadura das células por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de fluorescência.

#### **3.7.1. MEV**

A MEV foi utilizada para confirmar a adesão celular e avaliar a morfologia das células. Os arcabouços foram primeiramente lavados com PBS para retirar células que não haviam aderido completamente e depois incubados com fixador de Karnovsky (2,5% glutaraldeído; 4% paraformaldeído - PFA; 0,1 M tampão cacodilato de sódio) por 1 hora em temperatura ambiente. Os arcabouços 3D foram, em seguida, lavados com tampão cacodilato de sódio (0,1M) e cortados verticalmente em 4 partes. O processo de pós fixação foi realizado por 50 minutos com uma solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. As amostras foram lavadas e desidratadas com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) com incubações de 10 minutos em cada etapa. Por fim, elas foram submetidas à secagem por ponto crítico utilizando o equipamento Leica EM CPD300 Manual e recobertas com ouro utilizando o equipamento Leica EM ACE200. A análise foi realizada com o microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM6010 PLUS-LA.

### **3.7.2. Microscopia de Fluorescência**

Após a lavagem com PBS para retirar células que não estavam totalmente aderidas, os arcabouços foram fixados com uma solução de PFA 4% por 20 minutos. Após a fixação, os arcabouços foram cortados verticalmente em 4 partes e submergidos numa solução de DAPI (1 µg/mL) por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Depois eles foram lavados duas vezes com PBS por 10 minutos e analisados em um microscópio invertido LEICA DMI6000B. As imagens foram adquiridas utilizando o *software* LAS AF (Leica).

### **3.8. Dissociação das Células dos Arcabouços de PLA**

Para alguns dos experimentos realizados era necessário retirar as células dos arcabouços. Para isso, eles foram lavados com uma solução salina livre de cálcio e magnésio (BSS-CMF) por 10 minutos sob agitação suave. Depois eles foram incubados a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> com uma solução de 0,25% de tripsina-EDTA por 4 minutos. A tripsina foi inativada com um volume igual de meio de cultivo contendo 10% SFB e os arcabouços foram coletados e centrifugados em tubos de centrífuga de polipropileno de fundo cônico de 15 mL a 700 x g por 30 segundos para remover a tripsina e as células que ficavam presas dentro dos poros. Então, juntou-se a solução inicial de tripsina inativada e a solução coletada após a centrifugação dos arcabouços e elas foram centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas e contadas numa câmara de Neubauer. Este método foi previamente padronizado conforme descrito no Apêndice B.

### **3.9. Avaliação do Ciclo Celular nos Arcabouços de PLA**

O ciclo celular foi avaliado em dois momentos: após 48 horas e 7 dias de cultivo nos arcabouços. Para isso, as células foram primeiro dissociadas dos arcabouços utilizando-se o protocolo descrito anteriormente (item 3.8) e ressuspensas numa solução gelada de etanol 70% em PBS e incubadas por 1 hora e 30 minutos a 4°C. Após essa etapa de fixação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em PBS e, em seguida, acrescentou-se volume igual da solução de coloração 2X (3,4

mM Tris HCl pH 7,4; 0,1% Nonidet P40; 700 U/L RNase DNase-free; 10 mM NaCl; 300 µg/mL iodeto de propídeo). As células foram incubadas com essa solução por 10 minutos em temperatura ambiente e no escuro e depois centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS para análise por citometria de fluxo. Aproximadamente 10 mil eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II e a análise dos dados foi realizada usando o *software* FlowJo versão 10.6.2.

Paralelamente ao cultivo nos arcabouços de 48 horas foi realizado também o cultivo em garrafas de cultura, que foram utilizadas como o controle para comparação dos resultados, e nos discos de PLA. A preparação dessas amostras, aquisição e análise de dados seguiu o mesmo protocolo.

### **3.10. Ensaio de Proliferação por Incorporação de EdU**

Para análise de proliferação, as células foram cultivadas nos arcabouços e em garrafas de cultura por 48 horas e, então, incubadas com 10 µM de EdU diluído em meio de cultivo por 5 horas. As células foram tripsinizadas, fixadas e marcadas com Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 *Flow Cytometry Assay Kit* seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 10 mil eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCanto II e a análise dos dados foi realizada usando o *software* FlowJo versão 10.6.2.

### **3.11. Avaliação do Perfil Imunofenotípico das Células nos Arcabouços de PLA**

As células foram dissociadas dos arcabouços e ressuspensas em 3 mL de uma solução de 1% de albumina de soro bovino (BSA) diluída em PBS e deixadas no gelo por 1 hora para bloquear ligações inespecíficas. Em seguida, elas foram centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensado mecanicamente e foram acrescentados os anticorpos diluídos em PBS/BSA 1% como descrito nas Tabelas 3.1 e 3.2.

**Tabela 3.1. Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das CTMs**

Antígeno	Hospedeiro	Fluoróforo	Fabricante	Diluição
CD90	Camundongo	FITC	eBioscience™	1:5
CD73	Camundongo	APC	eBioscience™	1:50
CD105	Camundongo	PE	eBioscience™	1:50
CD140b	Camundongo	PE	BD Pharmingen™	3:10
HLA-DR	Camundongo	APC	Life technologies	1:50
CD34	Camundongo	FITC	eBioscience™	1:50

**Tabela 3.2. Anticorpos utilizados para a imunofenotipagem das células CD133<sup>+</sup> expandidas.**

Antígeno	Hospedeiro	Fluoróforo	Fabricante	Diluição
CD34	Camundongo	FITC	eBioscience™	1:50
CD133	Camundongo	PE	eBioscience™	1:10
CD45	Camundongo	APC	eBioscience™	1:5
CD31	Camundongo	FITC	eBioscience™	1:50
CD105	Camundongo	PE	eBioscience™	1:50
CD309	Camundongo	Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	1:5
CD146	Camundongo	PE	BD Biosciences	1:50
vWF	Coelho	-	ThermoFisher	1:50

A incubação com os anticorpos se deu por 1 hora a 4°C no escuro. Então, foram acrescentados 500 µL de PBS e as amostras foram centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 200 µL de PFA 4% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas a 700 x g por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 300 µL de PBS.

Para a marcação com vWF, após a incubação com PBS/BSA 1%, as células foram fixadas por 10 minutos em temperatura ambiente com PFA 4% e, em seguida, permeabilizadas com uma solução de PBS/Triton X-100 0,5% por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram incubadas com o anticorpo primário e secundário diluídos em PBS/BSA 1% como descrito nas Tabelas 3.2 e 3.3. Cada incubação se deu por 1 hora a 4°C no escuro.

**Tabela 3.3. Anticorpo secundário utilizando na imunofenotipagem das células CD133<sup>+</sup> expandidas**

Antígeno	Hospedeiro	Fluoróforo	Fabricante	Diluição
IgG de coelho	Cabra	Alexa Fluor® 488	Invitrogen	1:800

Após as incubações com os anticorpos, as amostras foram centrifugadas a 700 x g por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS. Aproximadamente 10 mil eventos foram adquiridos com o citômetro de fluxo FACSCanto II e os dados foram analisados com o *software* FlowJo versão 10.6.2.

### **3.12. Ensaio de Formação de Vasos *in vitro***

Para avaliar o potencial angiogênico das células CD133<sup>+</sup> expandidas e do seu meio condicionado após o cultivo nos arcabouços, foi realizado um ensaio de formação de vasos com Matrigel®. Para isso, placas de 96 poços foram recobertas com 150 µL de Matrigel® *Matrix Basement Membrane* (Corning) e incubadas a 37°C por 24 horas. As células foram cultivadas em S40 por 7 dias, o meio de cultivo foi coletado e as células foram tripsinizadas e plaqueadas na concentração de 3x10<sup>4</sup> células/poço. Tanto para o controle quanto para a avaliação do potencial indutor de angiogênese do meio condicionado foram usadas células provenientes de uma cultura em garrafa. As células controle no ensaio foram mantidas em meio EBM-2 suplementado e as células do ensaio do meio condicionado foram cultivadas com meio condicionado do cultivo do S40. Os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos por 24 horas com fotos sendo tiradas a cada 6 horas. Foi obtida uma imagem do centro de cada poço utilizando um microscópio invertido ZEISS Primo Vert (ocular 10x e objetiva 10x).

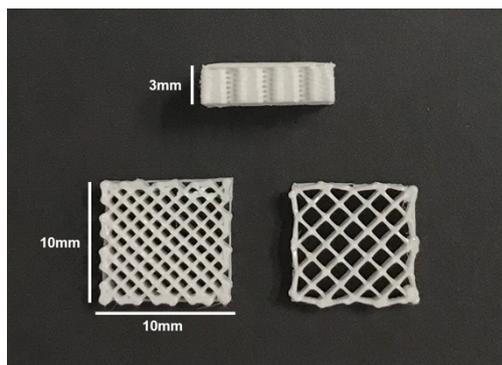
### **3.13. Análises Estatísticas**

Em experimentos que comparavam mais de dois grupos foi utilizado *One-Way* ANOVA com pós-teste de Tukey, e quando havia apenas dois grupos para serem analisados foi utilizado teste t não pareado. Valores de p≤0,05 foram considerados significativos. As análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism (versão 8.0)

## 4. RESULTADOS

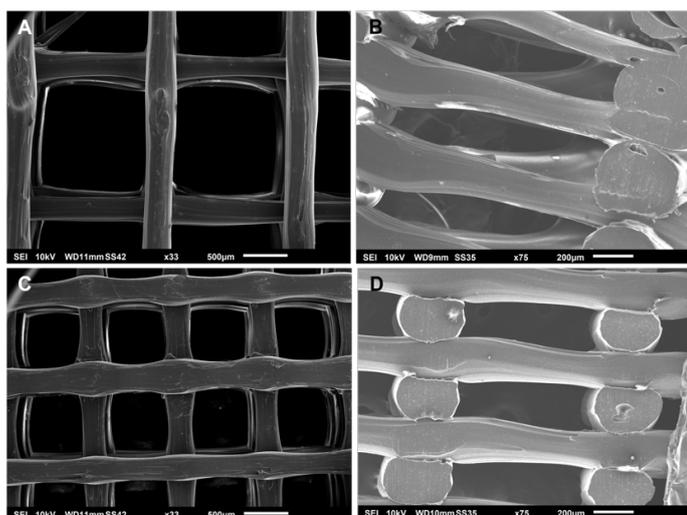
### 4.1. Caracterização dos Arcabouços de PLA

Pela técnica de impressão 3D foram produzidos dois modelos de arcabouços cúbicos de dimensões 10 mm x 10 mm x 3 mm (LxCxA) com preenchimentos de 40% (S40) e de 25% (S25), como pode ser visto na Figura 4.1.



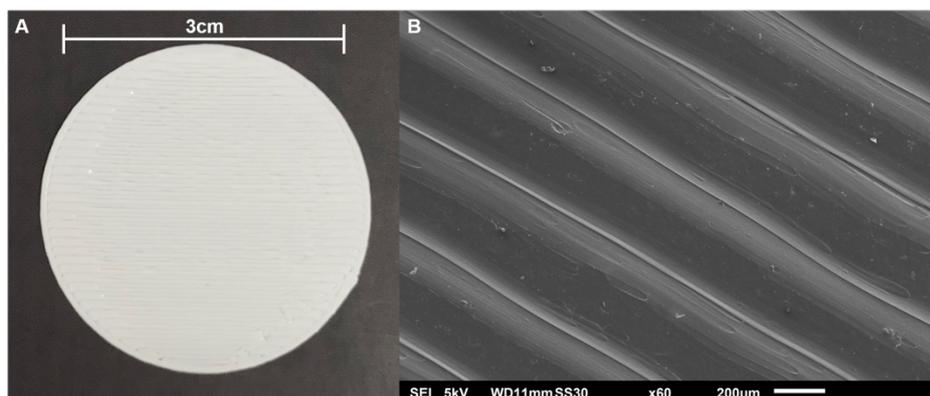
**Figura 4.1. Arcabouços de PLA impressos em 3D.** Vista lateral do S40 (superior); e vistas superiores dos arcabouços S40 (esquerda) e S25 (direita).

O tamanho dos poros e as estruturas dos arcabouços foram avaliados por MEV (Figura 4.2). S25 e S40 apresentaram tamanhos médios de poros de  $1,27 \pm 0,059$  mm e  $0,700 \pm 0,023$  mm, respectivamente (Figura 4.2A e C). Foi observado que a superfície dos dois arcabouços não era totalmente lisa, apresentando regiões rugosas, e que a estrutura interna dos dois arcabouços era semelhante (Figura 4.2B e D).



**Figura 4.2. Ultraestrutura dos arcabouços de PLA.** Imagens ilustrativas de S25 e S40 obtidas por MEV: (A) superfície do S25. (B) Interior do S25. (C) Superfície do S40. (D) Interior do S40. As imagens do interior dos arcabouços foram feitas após secção transversal de forma manual com uma lâmina metálica, o que pode refletir nas diferenças do plano de inclinação das superfícies analisadas.

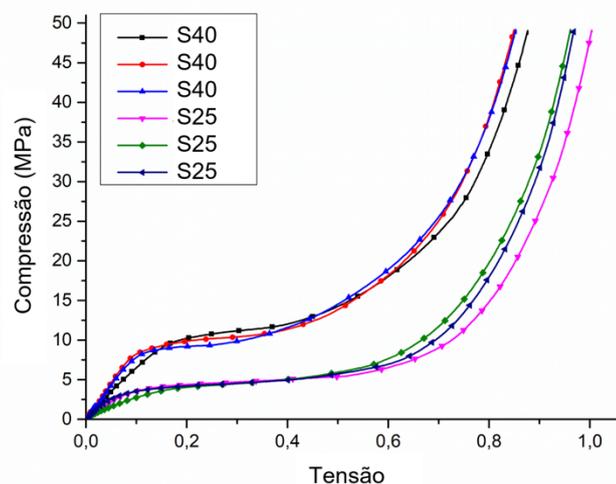
Foi impresso também um disco de apenas uma camada de PLA para avaliar um possível efeito do material nas respostas celulares. O disco possuía um diâmetro de 3 cm e não apresentava poros (Figura 4.3A). Sua superfície era rugosa como a dos outros arcabouços e ainda possuía ondulações, como pode ser visto na Figura 4.3B. Isso pode ser atribuído ao próprio processo de impressão 3D do filamento que é depositado fileira por fileira.



**Figura 4.3. Estrutura do disco de PLA.** (A) Estrutura macroscópica do disco. (B) MEV da superfície do disco.

Além da caracterização ultraestrutural, foi realizado também um teste de compressão para uma caracterização mecânica em relação ao módulo elástico de cada arcabouço. A elasticidade é a capacidade de um material de recuperar sua forma original após ser submetido a uma carga. Ela é descrita pelo módulo de Young, que avalia a resistência do material à deformação. Assim, quanto maior o módulo de Young, maior é a resistência do material à deformação e, portanto, menor sua elasticidade. O comportamento do material obtido pelo teste de compressão é caracterizado inicialmente por uma reta que representa a elasticidade do material. Com o aumento da carga e, portanto, da tensão, o material começa a deformar, comportamento representado pela curva após a reta. A partir desse ponto o material já perdeu sua elasticidade e não é mais possível recuperar sua forma original. O módulo de Young é calculado, portanto, a partir da tangente da reta inicial.

Para os arcabouços, o comportamento elástico obtido pelo teste de compressão está representado no gráfico da Figura 4.4. Calculando-se o módulo de Young pela tangente da reta, S25 apresentou uma maior flexibilidade com um módulo de Young de aproximadamente 5 MPa, enquanto o S40 mostrou-se mais rígido com um módulo de aproximadamente 10 MPa.



**Figura 4.4. Comportamento elástico dos arcabouços 3D de PLA quando submetidos ao teste de compressão.** Curvas de resistência elástica obtidas em teste de compressão com célula de carga de 500 N (50fg) e velocidade de deslocamento constante de 1,3 mm/min. As curvas foram obtidas pela mensuração de três corpos de prova de cada arcabouço (S40 e S25).

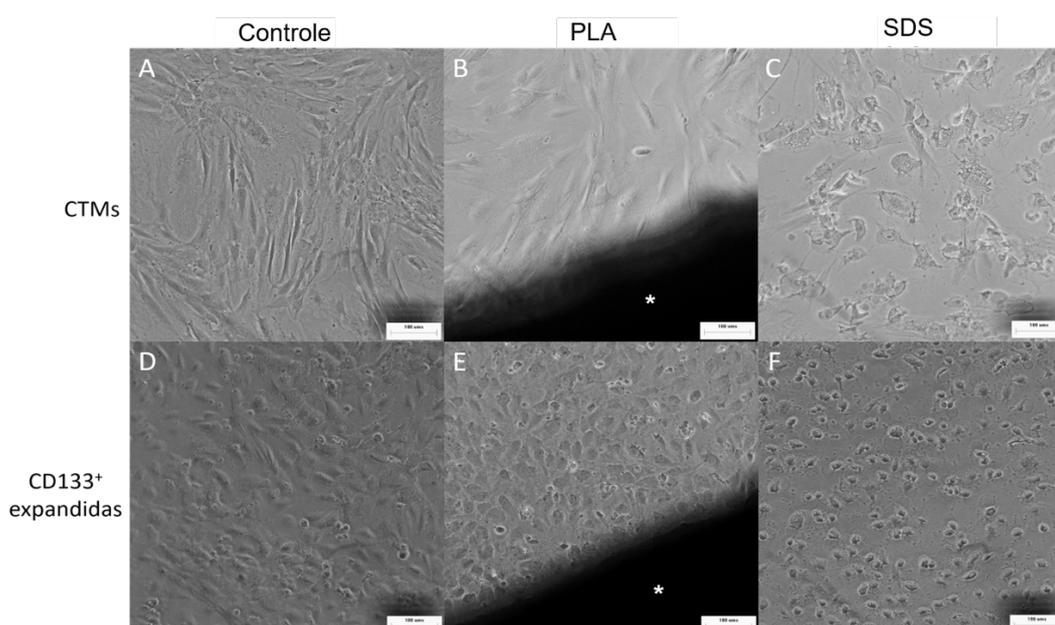
## 4.2. Avaliação da Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA

### 4.2.1. Teste por Contato Direto

Para avaliar a ação direta e uma possível toxicidade dos arcabouços sobre as células, foi realizado um teste de contato direto. A avaliação da toxicidade se dá pela análise da morfologia celular e da presença ou ausência de uma zona de reatividade próxima ao arcabouço, caracterizada pela ausência de células ou presença de *debris* celulares ou células com morfologia alterada.

Após as 48 horas de incubação, pelas imagens de microscopia óptica (Figura 4.5), foi possível notar que tanto as CTMs quanto as células CD133<sup>+</sup> expandidas quando em contato com o PLA (Figura 4.5 B e E) apresentaram morfologias semelhantes aos seus respectivos controles negativos (Figura 4.5 A e D). Já nos controles positivos com SDS (Figura 4.5 C e F) observou-se lise celular e consequente perda da morfologia característica nos dois tipos celulares.

Assim, a manutenção da morfologia celular e, portanto, a ausência de morte celular nos testes com o PLA, indica que nos parâmetros avaliados o material não é tóxico para as CTMs nem para as células CD133<sup>+</sup> expandidas.

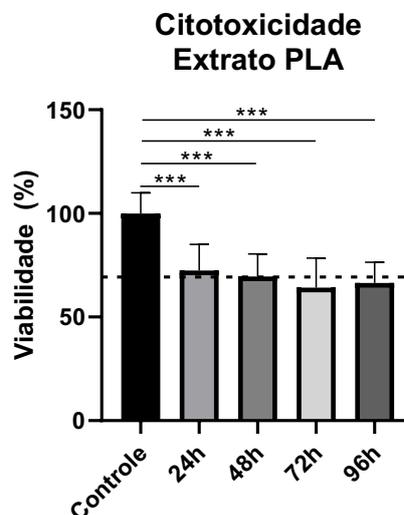


**Figura 4.5. Teste de citotoxicidade por contato do arcabouço de PLA.** (A) Morfologia das CTMs no controle negativo. (B) Morfologia das CTMs na presença do arcabouço de PLA. (C) Morfologia das CTMs em processo de morte celular na presença de 100 µg/mL de SDS. (D) Morfologia das células CD133<sup>+</sup> expandidas no controle negativo. (E) Morfologia das células CD133<sup>+</sup> expandidas na presença do arcabouço de PLA. (F) Morfologia das células CD133<sup>+</sup> expandidas em processo de morte celular na presença de 100 µg/mL de SDS. (\*) arcabouço de PLA. Barra de escala = 100µm.

#### 4.2.2. Ensaio de Captação de Vermelho Neutro

Com o objetivo de avaliar se os arcabouços poderiam gerar produtos citotóxicos de degradação, a viabilidade de células BalB/c3T3 cultivadas em extratos de PLA (meio mantido com fragmentos de arcabouços de PLA) foi determinada. Como durante os experimentos com as CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas o meio de cultivo precisava ser trocado a cada 48 horas, foram realizados cultivos para avaliação da viabilidade das células BalB/c3T3 com os extratos de PLA obtidos após 24 e 48 horas de incubação (conforme item 3.5.2 da metodologia). Isso foi feito para avaliar se em algum momento que antecede a troca de meio, normalmente realizada nos experimentos, poderia haver concentração de subprodutos tóxicos de PLA. Além disso, considerando as possíveis aplicações dos arcabouços na engenharia de tecidos e, portanto, a possibilidade de as células precisarem estar expostas ao PLA por mais tempo, os extratos de 72 e 96 horas também foram usados para avaliação da citotoxicidade em cultivo.

Conforme a Figura 4.6 mostra, foi possível notar uma redução significativa de viabilidade entre o controle e os grupos de teste, embora não tenha sido observada diferença entre os extratos obtidos com diferentes tempos de incubação.



**Figura 4.6 Citotoxicidade dos meios condicionados do S40 no ensaio de vermelho neutro.** Células BalB/c3T3 foram cultivadas com meios coletados em 24, 48, 72 e 96 horas (extratos de PLA). A citotoxicidade é representada pela viabilidade celular em cada um dos grupos. A linha tracejada representa 70% de viabilidade celular (n=2). Análise por *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey. \*\*\*p<0,001.

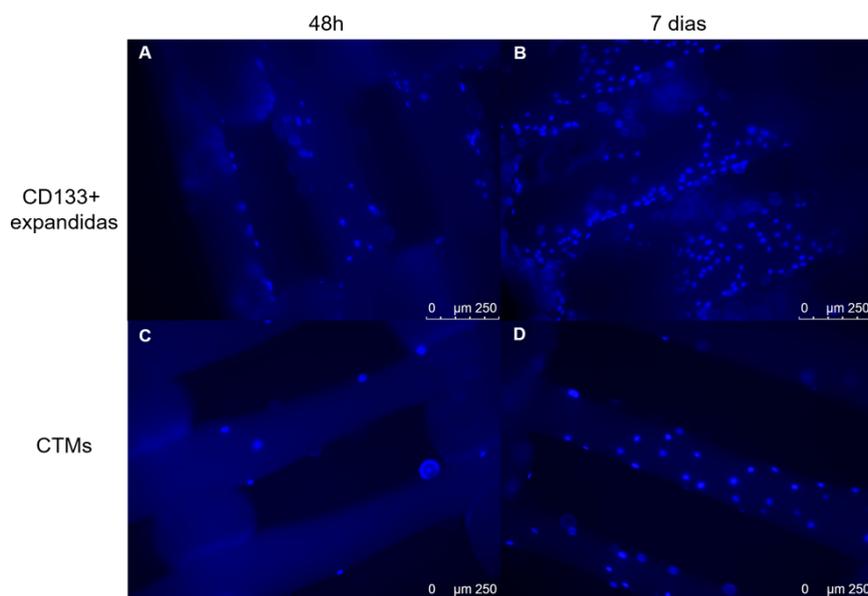
Calculando-se a TCR observamos que, para o extrato de 24 horas, a viabilidade relativa fica em 72%, indicando baixa toxicidade do extrato. Já em 48 horas, no entanto, esse valor cai para 69,5% e em 72 e 96 horas a TCR cai para 66% e 64%, respectivamente. Esses valores sugerem que, segundo as diretrizes da ISO 10993/12, os extratos coletados nesses momentos são citotóxicos.

### 4.3. Deposição e Adesão das Células nos Arcabouços de PLA

A deposição das células e sua distribuição pelo arcabouço é a primeira etapa de estabelecimento de uma cultura 3D. Para isso, é importante determinar os melhores métodos de deposição celular, que incluem determinar em quais condições isso será feito e como as células serão semeadas nos arcabouços. Assim, após o processo de desinfecção, foram analisados 3 diferentes graus de umidade dos arcabouços: molhados com PBS, úmidos (após terem sido deixados para secar por 5 minutos no fluxo laminar) e totalmente secos. Esses testes de padronização mostraram que não houve adesão celular quando as células eram semeadas nos

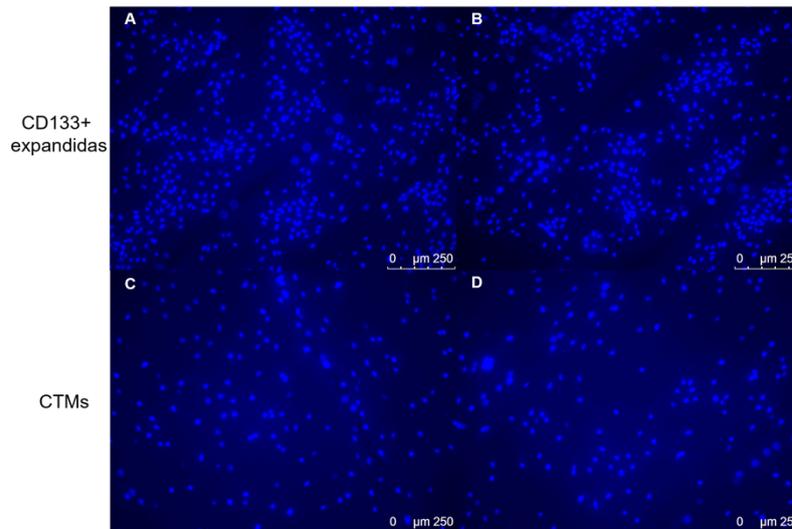
arcabouços secos e houve pouca ou nenhuma adesão nos arcabouços molhados. Dessa forma, para deposição das células em todos os experimentos, os arcabouços foram previamente mantidos por 5 minutos dentro da capela de fluxo laminar após lavagem com PBS, condição esta que demonstrou ser ideal para a adesão celular.

As imagens de microscopia de fluorescência mostraram que as CTMs e as células CD133<sup>+</sup> expandidas aderiram à superfície dos arcabouços 3D e se distribuíram de maneira aparentemente homogênea por toda a estrutura (Figura 4.7). Após 7 dias de cultivo, o número de células nos arcabouços pareceu ter aumentado, o que indica que as células proliferaram ao longo do cultivo e também evidencia que o ambiente fornecido pelos arcabouços é adequado para a adesão e sobrevivência celular (Figura 4.7 B, D).



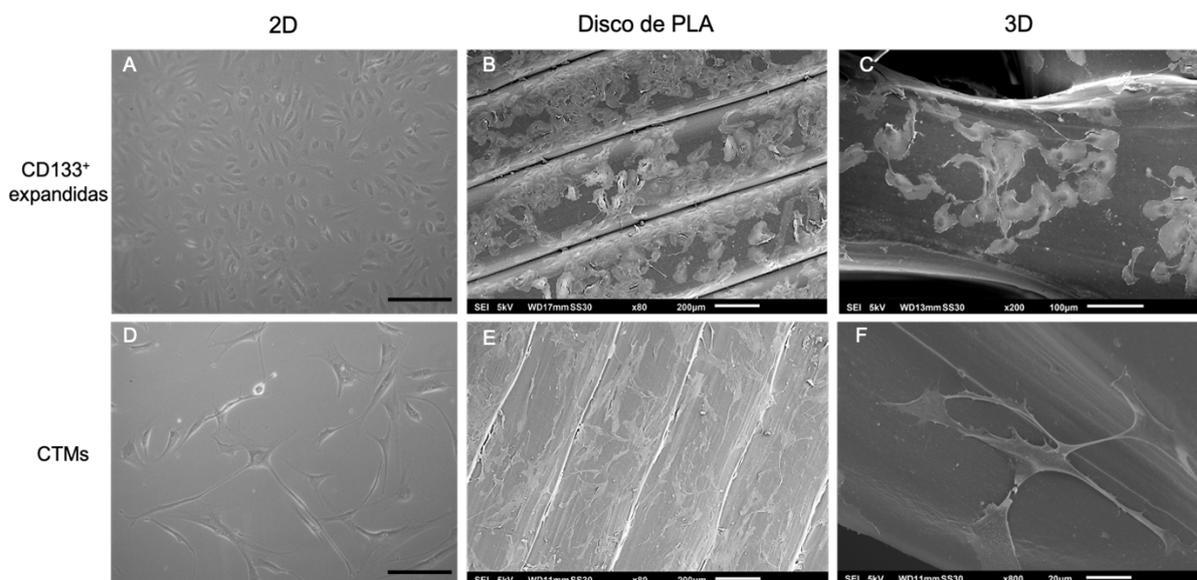
**Figura 4.7. Marcação nuclear das células aderidas nos arcabouços 3D de PLA.** (A) Células CD133<sup>+</sup> expandidas aderidas ao arcabouço após 48h de cultivo (B) Células CD133<sup>+</sup> expandidas aderidas ao arcabouço após 7 dias de cultivo. (C) CTMs aderidas ao arcabouço após 48h de cultivo. (D) CTMs aderidas ao arcabouço após 7 dias de cultivo. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.

As células também aderiram ao disco de PLA e se distribuíram de maneira relativamente homogênea pela sua superfície como mostra a Figura 4.8. Além das células terem aderido, observou-se que, enquanto as CTMs se distribuíram pelo disco de maneira aleatória, as células CD133<sup>+</sup> expandidas pareceram seguir a direção dos filamentos de PLA e se organizaram no formato do relevo do disco.



**Figura 4.8. Marcação nuclear das células nos discos de PLA após 48h de cultivo.** (A-B) Células CD133<sup>+</sup> expandidas (C-D) CTMs. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.

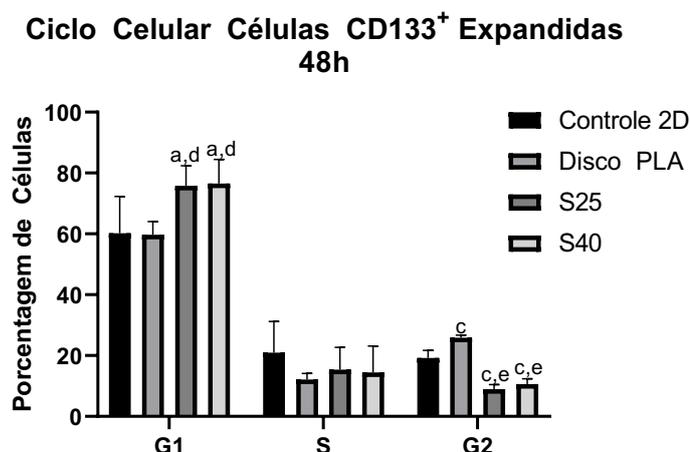
Uma vez confirmada a adesão das células por microscopia de fluorescência, suas morfologias foram analisadas por MEV. Assim, observou-se que as células CD133<sup>+</sup> expandidas mantiveram a morfologia mais arredondada e tendendo a formar colônias (Figura 4.9 A, B, C). Da mesma forma, as CTMs aderidas aos arcabouços 3D, ao disco de PLA e nos cultivos 2D apresentaram sua morfologia fibroblastóide característica (Figura 4.9 D, E, F).



**Figura 4.9. Morfologia das células CD133<sup>+</sup> expandidas e CTMs em cultivo 2D e 3D.** Microscopia óptica (contraste de fase) de CD133<sup>+</sup> expandidas (A) e CTMs (D) em cultivo 2D (Barra de escala = 200 μm). MEV de CD133<sup>+</sup> expandidas (B) e CTMs (E) no disco de PLA. MEV de CD133<sup>+</sup> expandidas (C) e CTMs (F) nos arcabouços 3D de PLA.

#### 4.4. Ciclo Celular nos Arcabouços de PLA

O efeito dos arcabouços 3D de PLA (S25 e S40) na progressão do ciclo celular foi avaliado comparando-se os ciclos celulares das CTMs e das células CD133<sup>+</sup> expandidas cultivadas nos discos de PLA e em garrafas de cultivo (controle 2D). Após 48 horas de cultivo, a maior parte das células CD133<sup>+</sup> expandidas encontrava-se na fase G1 em todas as condições de cultivo (Figura 4.10). Não foi observada diferença estatística entre as porcentagens de células na fase G1 do ciclo celular no controle 2D e no disco de PLA, mas houve um aumento significativo de células em G1 em S25 e S40 (controle 2D: 60,2% ± 12,14; Disco PLA: 59,7% ± 4,37; S25 75,8% ± 6,51; S40: 76,5% ± 7,91). Em comparação ao controle 2D, a porcentagem de células na fase G2 do ciclo celular diminuiu significativamente, em torno de 55%, em S25 e S40, e um aumentou significativamente (aproximadamente 35%) no disco de PLA (controle 2D: 19,2% ± 2,53; Disco PLA: 25,9% ± 0,86; S25: 8,6% ± 1,28; S40: 10,6% ± 1,77) (Figura 4.10).

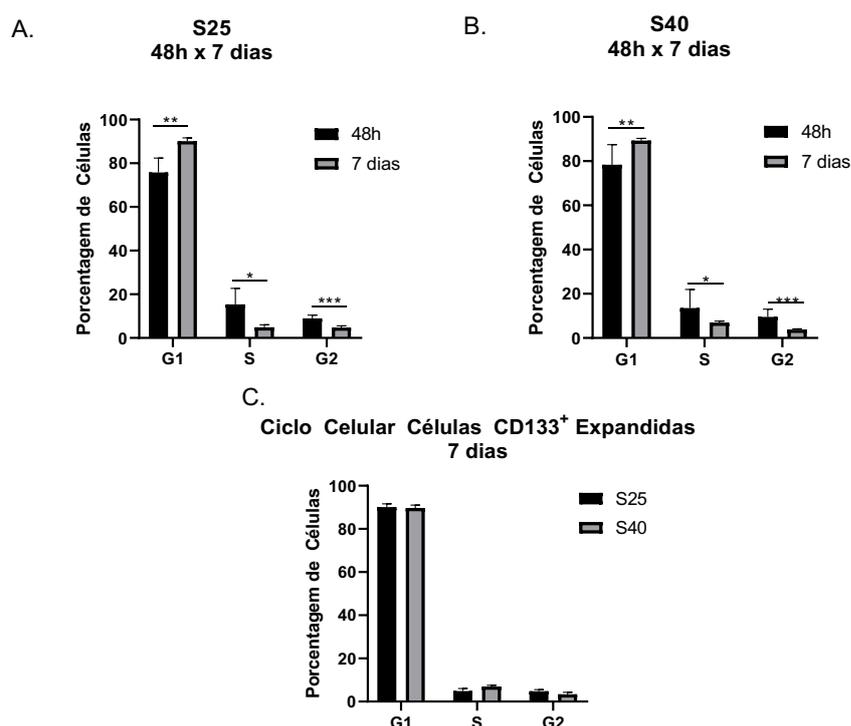


**Figura 4.10. Ciclo celular das células CD133<sup>+</sup> expandidas após 48h de cultivo em garrafas de cultivo, disco PLA, S25 e S40.** Gráfico com o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2) representado pela média ± desvio padrão. (2D n=6; Disco PLA n=3; S25 n=8; S40 n=8). Para os arcabouços, 'n' representa o número de arcabouços analisados. Análise por *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey: <sup>a</sup>p≤0,05 em comparação ao controle 2D, <sup>c</sup>p≤0,001 em comparação ao controle 2D, <sup>d</sup>p≤0,05 em comparação ao disco de PLA, <sup>e</sup>p≤0,01 em comparação ao disco de PLA.

Além disso, pela Figura 10 também é possível ver que não há diferença estatística na porcentagem de células nas fases do ciclo celular entre S25 e S40, o que significa que o tamanho do poro não afetou o ciclo celular em 48 horas de cultivo. Então, para avaliar se o tamanho do poro poderia ter alguma influência no

comportamento das células em cultivos mais longos, o ciclo celular também foi analisado após 7 dias de cultivo nos arcabouços 3D.

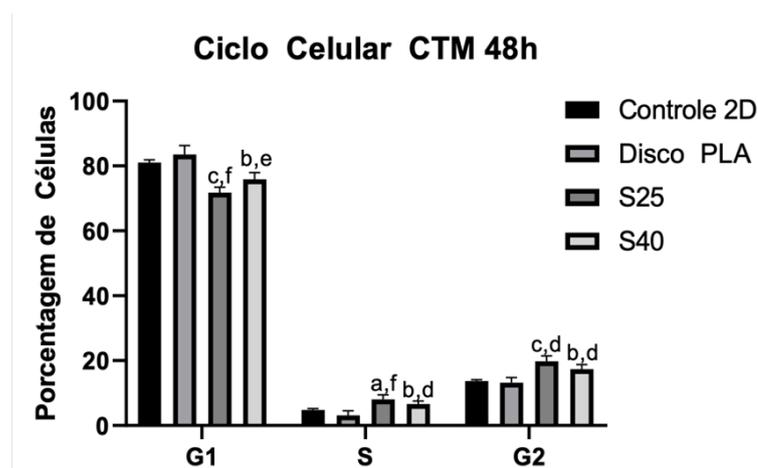
Após 7 dias em cultivo a porcentagem de células na fase G1 aumentou (S25: 90,1% ± 1,48; S40: 89,7% ± 1,29) em comparação ao cultivo de 48 horas, enquanto a porcentagem de células em S e G2 diminuiu (S25: 4,8% ± 0,76; S40: 3,38% ± 0,93) (Figura 4.11 A, B). No entanto, também não foi observada diferença significativa em nenhuma fase do ciclo celular entre S25 e S40 (Figura 4.11 C).



**Figura 4.11. Ciclo celular das células CD133<sup>+</sup> expandidas nos arcabouços 3D de PLA em 48 h e 7 dias.** Gráfico com o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2) representado pela média ± desvio padrão (S25 n=5; S40 n=4). Para os arcabouços ‘n’ representa o número de arcabouços analisados. (A) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em S25 após 48h e 7 dias de cultivo. (B) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em S40 após 48h e 7 dias de cultivo. (C) Comparação da porcentagem de células em cada fase do ciclo celular entre S25 e S40 após 7 dias de cultivo. Análise por teste T de Student não pareado: \*p≤0,05; \*\*p≤0,01; \*\*\*p≤0,001.

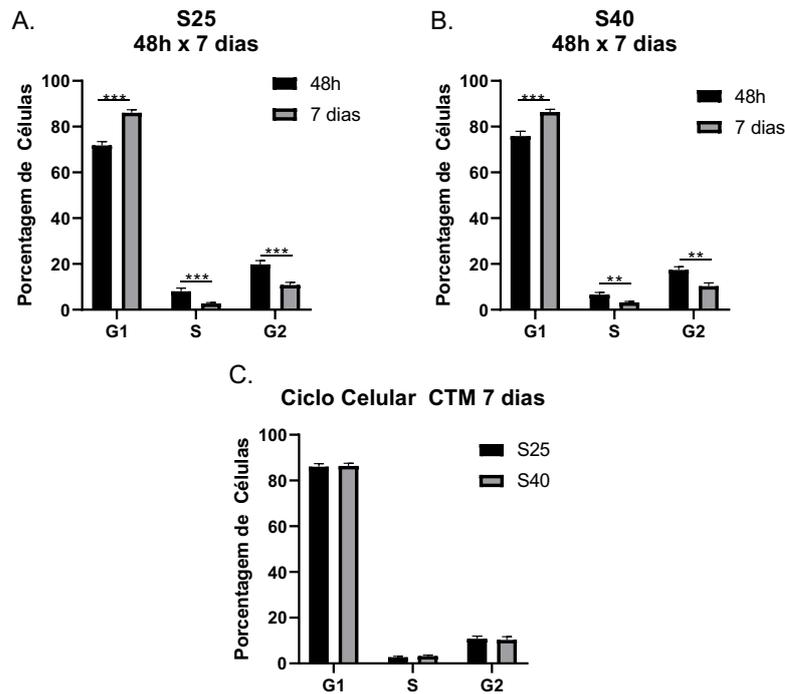
Em seguida, foi avaliada a influência do PLA na progressão do ciclo celular das CTMs. Como observado com as células CD133<sup>+</sup> expandidas, após 48 horas de cultivo as CTMs estavam mais concentradas na fase G1 do ciclo celular em todas as condições de cultivo (Controle 2D: 82,48% ± 2,36; Disco PLA: 83,50% ± 2,75; S25: 71,83% ± 1,62; S40: 75,90% ± 2,06) (Figura 4.12). No entanto, diferentemente do que

aconteceu com as células CD133<sup>+</sup> expandidas, as CTMs cultivadas no controle 2D e no disco de PLA apresentaram um perfil de ciclo celular muito semelhante sem diferenças estatísticas. Além disso, houve um aumento de, aproximadamente, 58% na porcentagem de células na fase G2 quando as CTMs foram cultivadas nos arcabouços 3D (Controle 2D: 12,53% ± 1,84; Disco PLA: 13,23% ± 1,59; S25: 19,78% ± 1,64; S40: 17,35% ± 1,45). Não houve diferença significativa entre a porcentagem de células nas fases do ciclo celular entre S25 e S40 após as 48 horas de cultivo (Figura 4.12).



**Figura 4.12. Ciclo celular de CTMs após 48h de cultivo em garrafas de cultivo, disco PLA, S25 e S40.** Gráfico com o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2) representado pela média ± desvio padrão. (2D n=4; Disco PLA n=3; S25 n=4; S40 n=4). Para os arcabouços 'n' representa o número de grupos de 3 arcabouços que foram analisados. Análise por *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey: <sup>a</sup>p≤0,05 em comparação ao controle 2D, <sup>b</sup>p≤0,01 em comparação ao controle 2D, <sup>c</sup>p≤0,001 em comparação ao controle 2D, <sup>d</sup>p≤0,05 em comparação ao disco de PLA, <sup>e</sup>p≤0,01 em comparação ao disco de PLA, <sup>f</sup>p≤0,001 em comparação ao disco de PLA.

Para avaliar se o tamanho do poro poderia influenciar o ciclo celular das CTMs em um período de cultivo mais longo, também foi realizada análise após 7 dias em cultivo. Assim como as células CD133<sup>+</sup> expandidas, após 7 dias de cultivo houve um decréscimo na porcentagem de CTMs nas fases S e G2 (S25: 11,0% ± 1,31, S40: 10,3% ± 1,48) (Figura 4.13 A, B) e também não foi observada diferença nos ciclos celulares entre S25 e S40 (Figura 4.13 C).



**Figura 4.13. Ciclo celular das CTMs nos arcabouços 3D de PLA em 48h e 7 dias.** Gráfico com o percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2) representado pela média  $\pm$  desvio padrão (S25 n=4; S40 n=3). Para os arcabouços, 'n' representa o número de grupos de 3 arcabouços que foram analisados. (A) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em S25 após 48h e 7 dias de cultivo. (B) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular em S40 após 48h e 7 dias de cultivo. (C) Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular nos arcabouços 3D de PLA após 7 dias de cultivo. Análise por teste T de Student não pareado. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ .

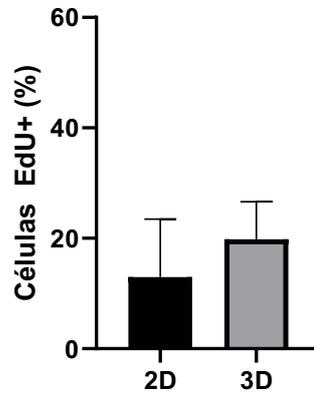
## 4.5. Proliferação Celular nos Arcabouços de PLA

### 4.5.1. CTMs

Como não foram observadas variações no ciclo celular quando as CTMs foram cultivadas nos discos de PLA e nem entre os arcabouços 3D, foi selecionado apenas um deles – S40 – para avaliação da proliferação celular pelo ensaio de EdU.

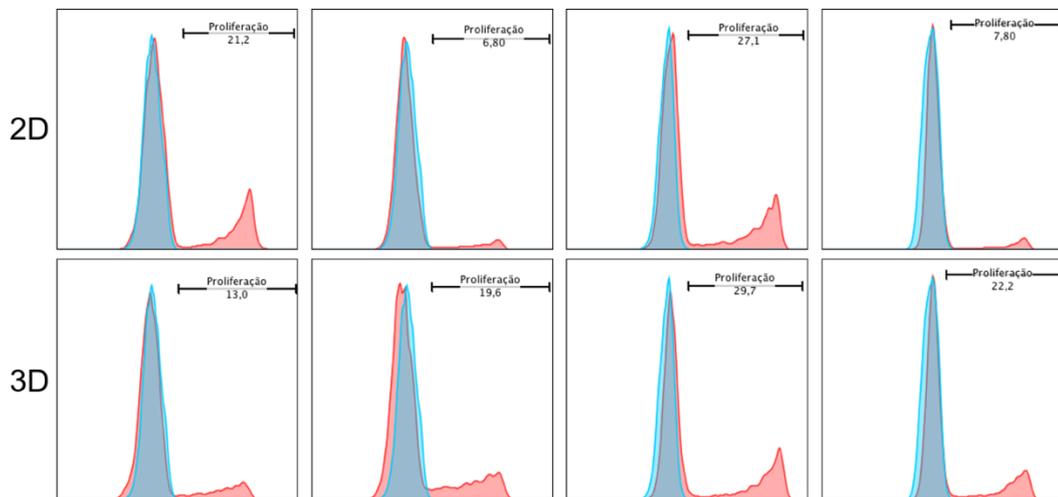
Em relação ao cultivo 2D, as CTMs não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, apesar de haver uma tendência de aumento de proliferação quando cultivadas no arcabouço 3D, como pode ser visto na Figura 4.14.

### Proliferação CTM 48h



**Figura 4.14.** Comparação da proliferação de CTMs após 48h de cultivo 2D e 3D (S40) pelo ensaio de incorporação de EdU. (2D n=4; 3D n =4). Média  $\pm$  desvio padrão. Análise por teste T de Student não pareado.

No entanto, é possível observar na Figura 4.15 que os perfis de proliferação celular apresentaram variações de incorporação de EdU ao longo das replicatas experimentais, o que poderia mascarar possíveis diferenças de proliferação celular nas duas condições de cultivo.



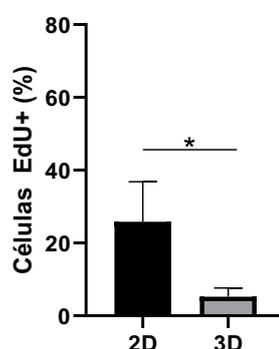
**Figura 4.15.** Gráficos representativos de incorporação de EdU por CTMs nos cultivos 2D e 3D. Em azul: controle negativo de marcação (sinal inespecífico do anticorpo em células não incubadas com EdU). Em vermelho: células incubadas com EdU (o marcador define o percentual de células que incorporaram o EdU).

#### 4.5.2. Células CD133<sup>+</sup> Expandida

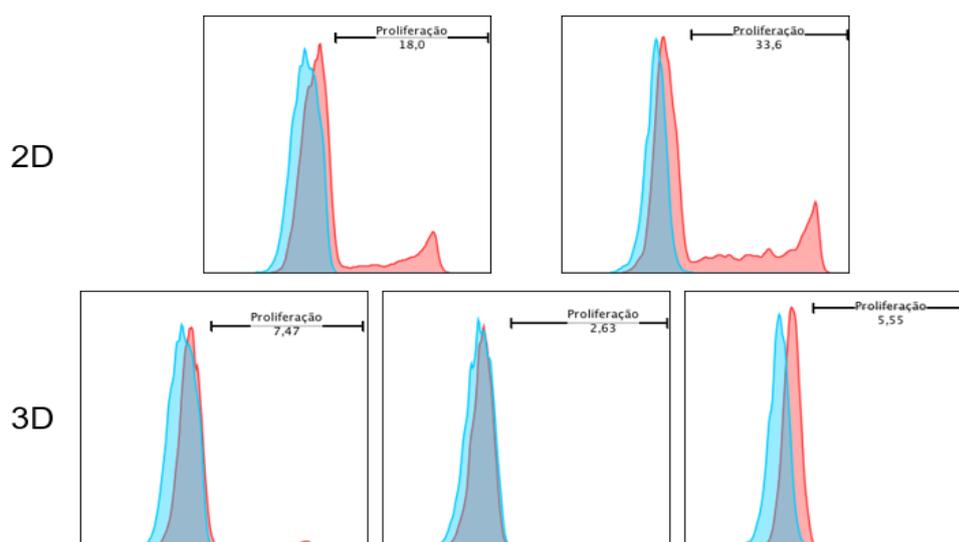
Assim como com as CTMs, não foram observadas diferenças no ciclo celular das CD133<sup>+</sup> expandidas nos dois arcabouços 3D, então foi selecionado apenas o S40 para o ensaio de incorporação de EdU.

Em comparação ao cultivo 2D, as células CD133<sup>+</sup> expandidas apresentaram uma redução significativa de proliferação quando cultivadas no arcabouço 3D, como pode ser visto nas Figuras 4.16 e 4.17.

**Proliferação Células CD133<sup>+</sup> Expandidas 48h**



**Figura 4.16. Comparação da proliferação de células CD133<sup>+</sup> expandidas após 48h de cultivo 2D e 3D (S40) pelo ensaio de incorporação de EdU. (2D n=2; 3D n=3). Média ± desvio padrão. Análise por teste T de Student não pareado: \*p<0,05.**



**Figura 4.17. Gráficos representativos de incorporação de EdU por células CD133<sup>+</sup> expandidas. Em azul: controle negativo de marcação (sinal inespecífico do anticorpo em células não incubadas com EdU). Em vermelho: células incubadas com EdU (o marcador define o percentual de células que incorporaram o EdU).**

#### 4.6. Perfil Imunofenotípico das Células nos Arcabouços de PLA

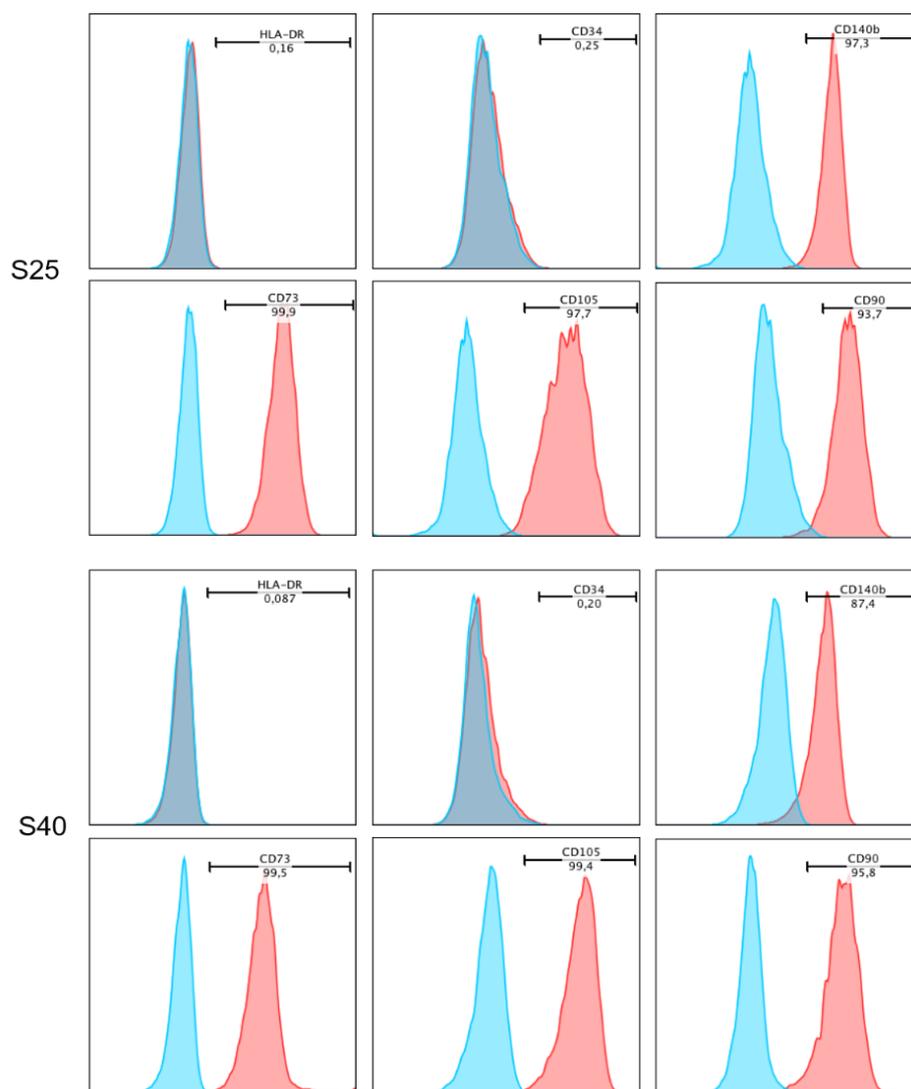
Para avaliar se os arcabouços poderiam induzir alguma alteração imunofenotípica durante o cultivo, foi realizada uma análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo após 7 dias de cultivo em S25 e S40 para os dois tipos celulares.

##### 4.6.1. CTMs

As análises das CTMs após 7 dias de cultivo nos arcabouços 3D demonstraram não haver mudanças significativas no perfil imunofenotípico característico destas células em condições padrão de cultivo. Portanto, as CTMs apresentaram alta expressão de CD90, CD105, CD73 e CD140b, enquanto a presença de CD34 e HLA-DR foi baixa ou nula. Não houve diferença significativa nos perfis imunofenotípicos das células cultivadas em S25 e S40 (Tabela 4.1 e Figura 4.18).

**Tabela 4.1. Perfil imunofenotípico das CTMs com os valores percentuais de média  $\pm$  desvio padrão da presença de cada marcador celular após 7 dias de cultivo nos arcabouços S25 e S40.** Controle 2D n = 1; S25 n=3; S40 n=3. Para os arcabouços 'n' representa o número de grupos de 3 arcabouços que foram analisados.

	Controle 2D	S25	S40
Anticorpo	%	%	%
HLA-DR	0,13	0,11 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,04
CD34	0,58	0,26 $\pm$ 0,06	0,28 $\pm$ 0,08
CD140b	97,80	97,50 $\pm$ 1,14	92,87 $\pm$ 5,50
CD73	98,00	99,99 $\pm$ 0,00	99,77 $\pm$ 0,24
CD105	98,60	97,23 $\pm$ 2,43	99,47 $\pm$ 0,31
CD90	93,90	92,57 $\pm$ 5,20	96,73 $\pm$ 0,21



**Figura 4.18. Histogramas representativos do perfil imunofenotípico de CTMs após 7 dias de cultivo em S25 e S40.** Os histogramas mostram os valores percentuais para cada marcador baseado na comparação entre as intensidades de fluorescência obtidas nas situações controle (área azul = marcação com anticorpo isotópico não específico) e experimental (área vermelha = marcação com anticorpo específico). Os seis histogramas superiores representam os cultivos nos arcabouços S25 e os seis inferiores nos S40.

#### 4.6.2. Células CD133<sup>+</sup> Expandidas

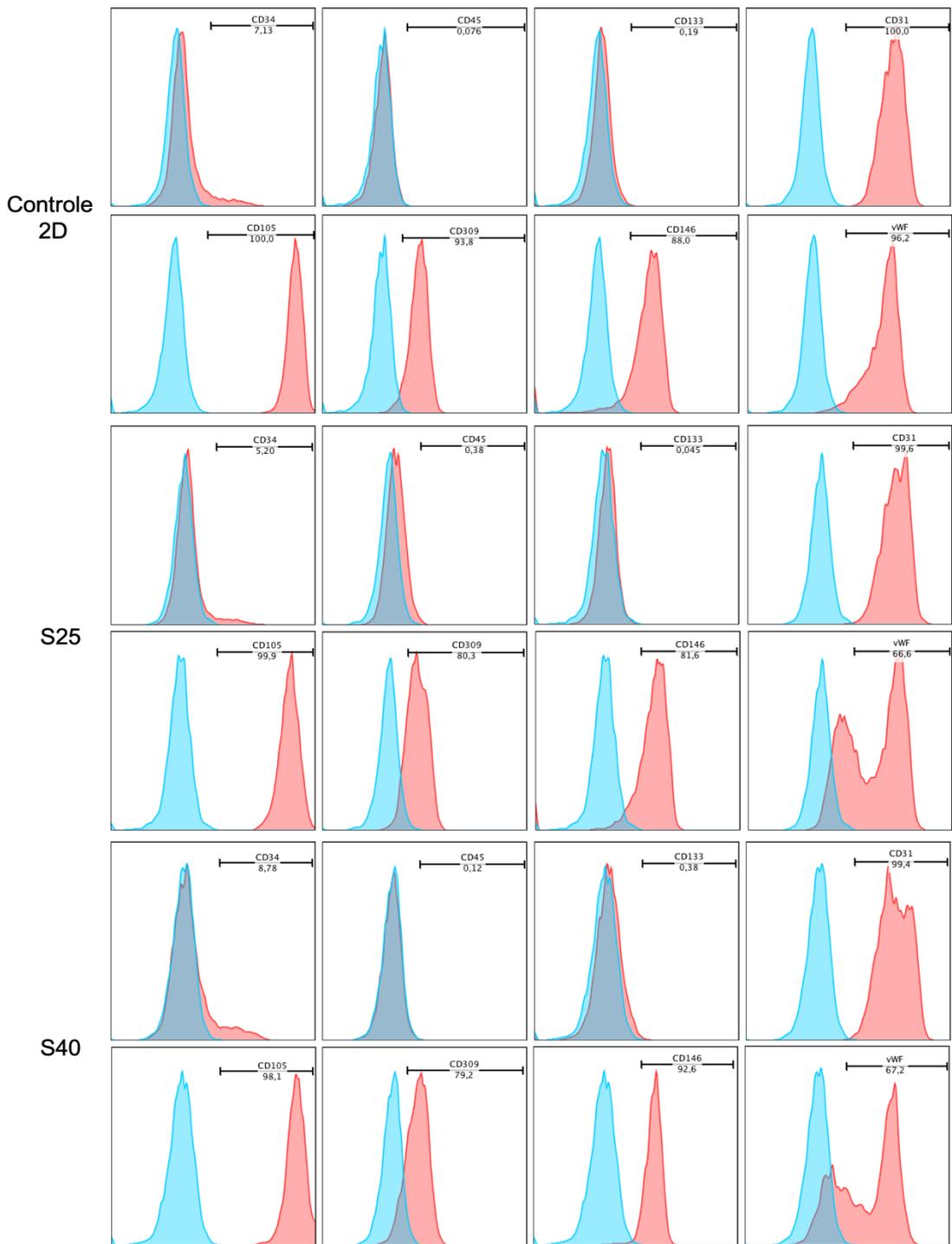
As células CD133<sup>+</sup> expandidas apresentaram perfis imunofenotípicos semelhantes à cultura 2D quando cultivadas em S25 e S40, apresentando baixa expressão de marcadores hematopoiéticos, como CD34 e CD45, e alta expressão de marcadores endoteliais, como CD31. Em todos os casos a expressão de CD133 se mostrou sempre reduzida. No entanto, em comparação ao controle 2D, houve uma

redução significativa de, aproximadamente, 30% na marcação de vWF nas células cultivadas nos arcabouços (Tabela 4.2).

**Tabela 4.2. Perfil imunofenotípico das células CD133<sup>+</sup> expandidas com os valores percentuais de média  $\pm$  desvio padrão da presença de cada marcador celular após 7 dias de cultivo nos arcabouços S25 e S40.** Controle 2D n=2; S25 n=3; S40 n=3. Para os arcabouços 'n' representa o número de arcabouços analisados.

	<b>Controle 2D</b>	<b>S25</b>	<b>S40</b>
Anticorpo	%	%	%
CD34	7,27 $\pm$ 0,20	5,16 $\pm$ 0,14	8,45 $\pm$ 3,13
CD133	0,22 $\pm$ 0,04	0,34 $\pm$ 0,40	0,28 $\pm$ 0,22
CD45	0,10 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,22	0,11 $\pm$ 0,33
CD31	100,00 $\pm$ 0,00	98,93 $\pm$ 1,16	98,77 $\pm$ 0,85
CD105	100,00 $\pm$ 0,00	99,80 $\pm$ 0,26	99,13 $\pm$ 0,92
CD309	86,35 $\pm$ 10,54	80,77 $\pm$ 3,62	78,67 $\pm$ 0,75
CD146	89,85 $\pm$ 2,61	86,43 $\pm$ 4,32	87,80 $\pm$ 7,30
vWF	90,60 $\pm$ 7,92	69,23 $\pm$ 6,56	62,27 $\pm$ 3,66

Ainda, para o vWF foi observado também uma variação do seu perfil de marcação nos cultivos em S25 e S40 em comparação ao cultivo 2D. Como pode ser visto na Figura 4.19, enquanto no controle 2D foi possível evidenciar apenas uma população de células com alta intensidade de fluorescência de vWF, nos arcabouços 3D observaram-se duas populações (alta e baixa intensidades de fluorescência). É possível evidenciar ainda que, nos arcabouços 3D, a população com baixa intensidade de fluorescência foi menor que aquela com alta intensidade.

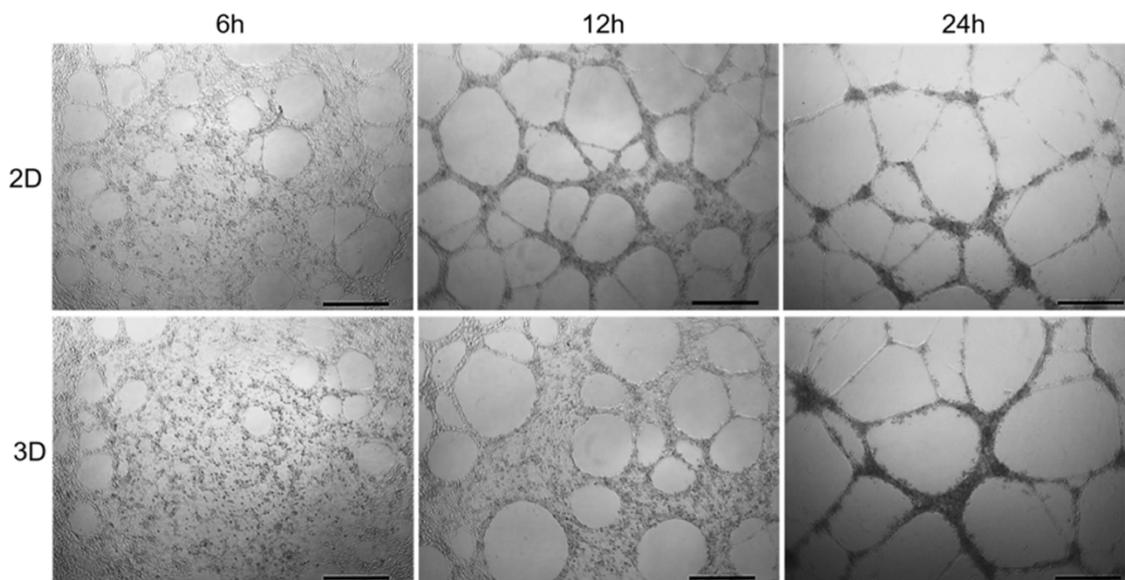


**Figura 4.19.** Histogramas representativos do perfil imunofenotípico de células CD133<sup>+</sup> expandidas após 7 dias de cultivo em 2D, S25 e S40. Os histogramas mostram os valores percentuais para cada marcador baseado na comparação entre as intensidades de fluorescência obtidas nas situações controle (área azul = marcação com anticorpo isotópico não específico) e experimental (área vermelha = marcação com anticorpo específico). Os oito histogramas superiores representam os cultivos 2D (controle), os oito seguintes nos arcabouços S25 e os oito inferiores nos S40.

#### 4.7. Ensaio de Angiogênese

Sabe-se que o vWF nas células endoteliais está relacionado à angiogênese, tendo um papel importante no controle da formação de novos vasos sanguíneos. Dessa forma, considerando a diferença observada nos cultivos celulares em relação à marcação desse fator, foi realizado um ensaio funcional para avaliar se essa alteração afetava o potencial angiogênico das células CD133<sup>+</sup> expandidas que foram cultivadas nos arcabouços de PLA. Como não foi observada diferença entre o perfil e a intensidade de marcação de vWF entre S25 e S40 foi selecionado apenas o S40 para a realização do ensaio.

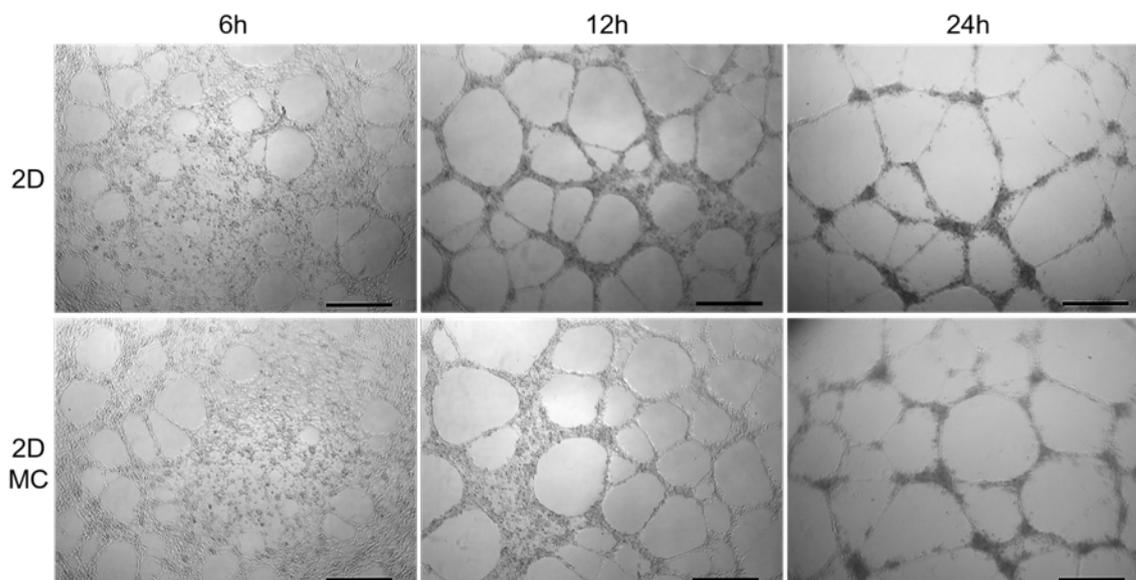
Entre o controle e as células provenientes do S40 (3D) foi observada uma redução do número de vasos formados, porém, esta não foi uma diferença significativa (Figuras 4.20 e 4.22).



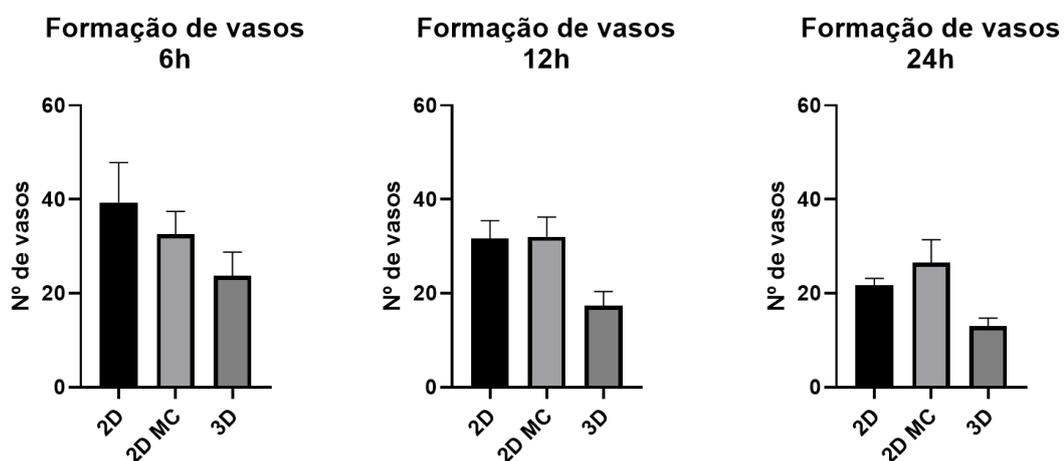
**Figura 4.20. Ensaio de angiogênese das células provenientes do cultivo 3D (S40) em comparação ao controle (2D).** Formação de estruturas semelhantes a capilares observadas em 6h, 12h e 24h de ensaio nas células do controle e provenientes da cultura 3D. (2D n = 3; 3D n = 3). Barra de escala = 500  $\mu$ m.

Considerando ainda que o vWF possivelmente secretado pelas células CD133<sup>+</sup> expandidas poderia modular a formação de vasos, ensaiamos esta possível atividade utilizando o meio condicionado pelas células CD133<sup>+</sup> expandidas em ambiente 3D. Em questão de formação de vasos foi observado que as células provenientes de uma cultura 2D cultivadas com meio fresco (controle) ou com o meio

condicionado obtido dos cultivos em arcabouço 3D (2D MC) se comportaram de maneira muito semelhante, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as condições (Figura 4.21 e 4.22).



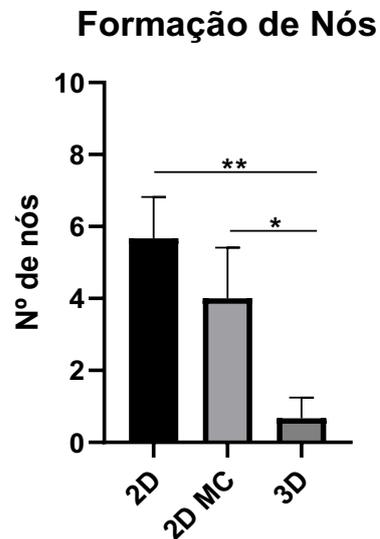
**Figura 4.21. Ensaio de angiogênese do meio condicionado do cultivo das células em S40 em comparação ao controle (2D).** Formação de estruturas semelhantes a capilares observadas em 6h, 12h e 24h de ensaio nas células de cultura 2D com meio fresco e com meio condicionado pelas células cultivadas no arcabouço 3D. (2D n = 3; 2D MC n = 2). Barra de escala = 500µm.



**Figura 4.22. Gráficos representativos do número de estruturas semelhantes a vasos formadas no ensaio de angiogênese.** Média com desvio padrão. Análise por *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey.

Outra análise que foi feita nesse ensaio foi a contagem do número de nós formados após 12 horas de ensaio. Os nós são os pontos de interseção entre 3 ramos e a análise foi realizada apenas em 12 horas uma vez que em 6 horas ainda não era

possível identificá-los e em 24 horas o início da desestruturação dos vasos impossibilita visualizá-los. Pela Figura 4.22 vemos que as células provenientes do cultivo 3D formaram menos nós do que no controle 2D e no 2D MC.



**Figura 4.23.** Gráfico representativo do número de nós formados após 12 horas do ensaio de angiogênese. (2D n=3; 2D MC n = 2; 3D n = 3). Média com desvio padrão. Análise por *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey: \*p≤0,05; \*\*p≤0,01.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Citotoxicidade dos Arcabouços de PLA

A aplicação de arcabouços associados a células-tronco é uma das abordagens clássicas da engenharia de tecidos e tem sido extensivamente estudada e explorada. Um dos motivos que contribui para isso é a alta biocompatibilidade dos biomateriais e a necessidade de se encontrar alternativas para regenerar e tratar órgãos e tecidos lesionados.

Cada biomaterial tem suas vantagens e desvantagens e suas estruturas e superfícies podem ser modificadas para atenderem às necessidades específicas de cada tecido. O PLA é um biomaterial muito explorado para essa aplicação por ser versátil, barato e de fácil manipulação. Além disso, sua biocompatibilidade é amplamente conhecida e reportada na literatura. Ainda assim, variações nos processos de produção dos arcabouços de PLA, dos tipos celulares estudados e das metodologias de cultivo empregadas podem favorecer ou prejudicar seu uso na engenharia de tecidos (Grémare, et al., 2017).

Dessa forma, os arcabouços de PLA impressos em 3D para este trabalho foram avaliados quanto a sua citotoxicidade de duas formas: por um teste de contato e por um ensaio de captação de vermelho neutro. No teste de contato direto não foi observada citotoxicidade para as CTMs e nem para as células CD133<sup>+</sup> expandidas.

Já o ensaio do vermelho neutro, que avaliou a toxicidade de possíveis produtos de degradação do PLA, não detectou citotoxicidade em 24 horas de cultivo (TCR ficou acima de 70%), mas em 48 horas a TCR reduziu para 69,5%. Nas outras condições, considerando cultivos de 72 e 96 horas sem troca de meio esse valor caiu ainda mais. Considerando que neste trabalho o meio de cultura era trocado a cada 48 horas, é possível que o PLA possa ter apresentado baixa toxicidade nesse período de cultivo. No entanto, as condições de obtenção do extrato do PLA não eram as mesmas nas quais os arcabouços foram cultivados com as células, mas foi escolhido seguir as normas propostas pelos órgãos reguladores para permitir a comparação com outros estudos e a posterior publicação do trabalho.

Embora o teste de contato reproduza condições mais próximas das que são utilizadas no cultivo, o ensaio de captação de vermelho neutro é capaz de detectar perda de viabilidade celular de forma mais precoce, antes mesmo das células

apresentarem modificações morfológicas visíveis. Porém, é importante destacar que as células testadas no ensaio - BalB/c3T3 - embora possam ser utilizadas neste ensaio como representantes generalizadas de células de mamíferos, são células menos resistentes do que as CTMs (Abud, et al., 2015). Dessa forma, seria pertinente realizar testes complementares para determinar a real toxicidade do PLA nessas células.

## **5.2. Adesão das Células nos Arcabouços de PLA**

A adesão de CTMs em arcabouços de PLA já é bastante conhecida e explorada na literatura para aplicações na engenharia de tecidos (Oshima, et al., 2009; Velioglu, et al., 2018; Liang, et al., 2019). No entanto, por ser um biomaterial hidrofóbico, o PLA por si só não permite a adesão celular (Persson, et al. 2019). Por isso, muitos estudos focam em funcionalizar a superfície do arcabouço com proteínas, como o colágeno, ou biomateriais hidrofílicos, como a hidroxiapatita, para permitir a interação entre o PLA e as células (Teixeira, et al., 2018; Wang, et al., 2018, Jaidev & Chatterjee, 2019). No caso deste trabalho, não foi observada adesão celular quando as células foram semeadas em arcabouços secos, fato que pode ser atribuído à hidrofobicidade do PLA. Então, testou-se semear as células quando os arcabouços estavam molhados e úmidos. Assim como os arcabouços secos, os molhados não permitiram adesão celular, uma vez que nesse caso a superfície do biomaterial já estava saturada e impediu que as células interagissem com o PLA. Então, concluiu-se que a melhor condição para permitir adesão celular era deixando os arcabouços secarem parcialmente no fluxo laminar para que ficassem apenas úmidos e a água restante tornasse a superfície hidrofílica o suficiente para que as células pudessem aderir. Theodoridis e colaboradores (2019) relataram resultados semelhantes ao testarem métodos para semear células em arcabouços de PCL. A técnica mais eficiente consistiu em previamente umidificar os arcabouços com meio de cultivo para que as células pudessem aderir ao biomaterial.

Tanto as CTMs quanto as células CD133<sup>+</sup> expandidas foram capazes de aderir ao PLA dessa maneira, mantiveram suas morfologias características e foram capazes de sobreviver e proliferar, indicando que o ambiente oferecido pelos arcabouços foi satisfatório para os dois tipos celulares.

### **5.3. Influência da Rigidez e Topografia dos Arcabouços de PLA no Comportamento Celular**

Apesar de ser hidrofóbico, uma característica importante do PLA é a sua rigidez, que pode ser variável de acordo com o método de produção dos arcabouços e com a sua estrutura (Song, et al., 2017). Por exemplo, Rosenzweig e colaboradores (2015) utilizaram impressão 3D para produzir arcabouços de PLA com uma rigidez de aproximadamente 1 MPa. Por outro lado, Voliglu e colaboradores (2018) demonstraram o efeito do tamanho dos poros na rigidez do PLA e obtiveram arcabouços com módulos elásticos de até 640 MPa. Já os arcabouços deste trabalho apresentaram elasticidade de 5 MPa e 10 MPa. Comparando-se com dados da literatura (Figura 1.2) essa característica permitiria que esses arcabouços fossem utilizados para aplicações de regeneração de tecido cartilaginoso.

Ainda, arcabouços produzidos pela técnica de impressão 3D podem apresentar módulos de elasticidade distintos dependendo da forma como ela é analisada. Song e colaboradores (2017) demonstraram que, quando os arcabouços são comprimidos na mesma direção na qual os filamentos foram impressos, a rigidez tende a ser maior do que se ele for comprimido em outra direção. Dessa forma, para uma futura aplicação dos arcabouços S25 e S40, seria interessante repetir o teste de forma que a compressão fosse aplicada em outra direção para se obter uma caracterização mais completa da sua rigidez.

Além das características mecânicas, outro fator que influencia a resposta celular é a topografia dos arcabouços. Tanto S25 quanto S40 apresentaram superfícies ligeiramente rugosas, assim como o disco de PLA, que, além de ser rugoso também apresentou ondulações, o que poderia alterar o comportamento das células. Por exemplo, para as células CD133<sup>+</sup> expandidas, a superfície ondulada parece ter influenciado a forma como as células se organizaram no disco, fazendo com que elas seguissem a direção das ondulações. Neste contexto, Heath, Lannutti & Cooper (2009) avaliaram como células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVECs) respondiam a arcabouços fibrosos quando eles apresentavam fibras difusas ou organizadas. Os autores observaram que nos arcabouços com fibras organizadas as células aderiram e se organizaram de maneira a seguir a orientação das fibras, além de terem apresentado uma morfologia mais alongada. Eles discutem que esse comportamento celular é compreensível uma vez que no tecido biológico as células

estruturalmente se organizam dessa maneira para formar os vasos sanguíneos e, devido à taxa de cisalhamento, suas morfologias se tornam mais alongadas. Como neste trabalho as células foram mantidas em cultivo estático, as suas morfologias não se alteraram em relação ao cultivo controle, mas, pelas imagens de microscopia, foi possível notar a preferência das células em se organizarem ao longo das ondulações do disco. Isso pode sugerir que a característica topográfica do PLA recriou, nesse sentido, um ambiente próximo ao biológico para as células CD133<sup>+</sup> expandidas.

No caso das CTMs, no entanto, não foram observadas diferenças na distribuição celular nos discos de PLA em comparação ao cultivo 2D. Também não foram observadas diferenças nos outros parâmetros analisados. Porém, alguns estudos apontam a influência da topografia dos arcabouços na atividade parácrina de CTMs. Su e colaboradores (2017) mostraram que, quando cultivadas em arcabouços fibrosos as CTMs produziam mais citocinas anti-inflamatórias e pró-angiogênicas em comparação a cultivos 2D. Além disso, entre os arcabouços que possuíam diferentes orientações das fibras para mudar a topografia, também havia diferença na quantidade e tipos de citocinas produzidas. Dessa forma, embora as CTMs tenham mantido seu comportamento nos discos de PLA, poderia ser pertinente avaliar seus secretomas para analisar de maneira mais completa a possível influência da topografia ondulada nessas células.

#### **5.4. Influência do Cultivo em Arcabouços Porosos no Ciclo Celular e Proliferação**

Embora as CTMs e as células CD133<sup>+</sup> expandidas tenham respondido de maneira diferente ao disco de PLA, o que foi comum para elas foi a alteração do ciclo celular no cultivo nos arcabouços 3D. Para as células CD133<sup>+</sup> expandidas, após 48 horas de cultivo, foi observado um aumento da porcentagem de células em G1 quando elas foram cultivadas em S25 e S40. Esses dados sugerem que houve uma parada do ciclo celular na fase G1 e, conseqüentemente, houve uma diminuição na porcentagem de células que entrou na fase G2. Por outro lado, quando elas foram cultivadas nos discos de PLA, houve um aumento de células em G2. Esses resultados são um indicativo de que o biomaterial não foi o responsável pela parada do ciclo celular e a conseqüente queda de células em G2, mas sim o microambiente gerado pelos arcabouços 3D. Em coerência com esses resultados, os dados do ensaio de

proliferação mostraram uma queda do número de células proliferativas quando elas eram cultivadas nos arcabouços 3D em comparação ao cultivo 2D. Porém, a alteração do ciclo na fase G2 nos discos de PLA sugerem que suas ondulações, ou o conjunto do biomaterial somado à topografia, também podem ter efeitos sobre as células CD133<sup>+</sup> expandidas.

Além disso, estudos têm demonstrado que arcabouços com poros de até 400 µm aproximadamente, oferecem um ambiente de condições de hipóxia capaz de induzir a proliferação de células endoteliais (Abbasi, et al., 2020), uma vez que essas células demonstram preferência por um metabolismo anaeróbico (Falkenberg, et al. 2019). Dessa forma, os poros dos S40 e S25 selecionados foram muito grandes para permitir esse ambiente anaeróbico, o que pode justificar parcialmente a redução na proliferação das células CD133<sup>+</sup> expandidas. Para confirmar essa influência do ambiente 3D sobre o potencial proliferativo celular seria pertinente avaliar a proliferação das células CD133<sup>+</sup> expandidas nos discos de PLA.

Já para as CTMs, foi observado um aumento de células na fase G2 quando elas foram cultivadas por 48 horas nos arcabouços 3D. Os dados de proliferação também sugerem uma tendência de aumento de proliferação nesse caso. As variações encontradas nesses ensaios foram evidências de que a proliferação celular era intimamente dependente da confluência celular, uma característica do cultivo que muitas vezes é imprevisível por estar relacionada à capacidade proliferativa de cada população celular. Esses aspectos do cultivo podem ter resultado nas grandes variações de proliferação observadas principalmente na condição 2D. Já no caso do cultivo 3D as variações podem estar ligadas ao fato de que, por serem opacos, não era possível determinar inicialmente quantas células haviam efetivamente aderido nos arcabouços. Também não era possível acompanhar o desenvolvimento da cultura celular durante o cultivo para determinar se ela estava se comportando da maneira ideal. No entanto, alguns estudos demonstram que de fato os arcabouços de PLA têm o potencial de estimular a proliferação celular (Korpela, et al., 2012; Teixeira, et al., 2018), mas devido às variações encontradas neste trabalho seria necessário aumentar o grupo amostral para fazer essa afirmação com mais segurança. Porém, ficou claro que o microambiente 3D dos arcabouços nos quesitos ciclo celular e proliferação foi vantajoso para as CTMs, mas desestimulante para as células CD133<sup>+</sup> expandidas.

O tamanho dos poros dos arcabouços também tem sido relatado na literatura como um fator determinante na resposta celular (Xing, et al., 2019). Poros muito pequenos não permitem a migração adequada das células e limitam a difusão de nutrientes e produtos de excreção. Por outro lado, poros muito grandes diminuem a área disponível para adesão celular. Assim, os cultivos em S25 e S40 foram levados adiante até 7 dias para analisar se o tamanho desses poros poderia influenciar as células em períodos de cultivo mais longos. Porém, tratando-se de ciclo celular não foram observadas diferenças entre os resultados obtidos para as CTMs e para as células CD133<sup>+</sup> expandidas cultivadas em arcabouços com poros de tamanhos diferentes. Em ambos os casos, entre 48 horas e 7 dias de cultivo houve uma diminuição no número de células na fase G2 para os dois tipos celulares. No entanto, como mencionado anteriormente, um dos fatores que influenciam a proliferação é a confluência celular. A partir das imagens de microscopia foi possível notar que em 7 dias de cultivo os arcabouços já apresentavam uma grande quantidade de células e pouco espaço disponível para permitir que as células continuassem proliferando. Dessa forma, as diferenças observadas entre 48 horas e 7 dias não seriam atribuídas aos arcabouços de PLA nem ao tamanho dos poros. Ainda, os resultados sugerem que a diferença no tamanho dos poros utilizados não foi o suficiente para gerar respostas celulares distintas em relação aos parâmetros estudados.

### **5.5. Influência do Cultivo em Arcabouços Porosos no Imunofenótipo Celular**

Para completar a avaliação dos ambientes gerados pelos arcabouços 3D foi analisado se as células mantinham seus perfis imunofenotípicos característicos. Em caracterização prévia realizada em nosso laboratório, foi visto que as CTMs utilizadas neste trabalho apresentavam expressões de marcadores tipicamente mesenquimais (CD90, CD105, CD73 e CD140b) sem expressão significativa de CD34 e HLA-DR, apresentando o perfil imunofenotípico de CTM determinado por Dominici e colaboradores (2006). Após os 7 dias de cultivo nos arcabouços, este perfil foi mantido, indicando que elas foram capazes de manter seu estado indiferenciado. Esses resultados estão em coerência com dados da literatura que demonstram que as CTMs somente se diferenciam em arcabouços de PLA se forem cultivadas com meios indutores (Fairag, et al., 2019) ou se o PLA for recoberto com algum biomaterial capaz de induzir diferenciação (Persson, et al., 2018; Teixeira, et al., 2018).

Já as células CD133<sup>+</sup> expandidas mantiveram uma expressão reduzida de CD133 em todos os cultivos, o que indica um alto grau de maturidade endotelial, como foi descrito por Senegaglia e colaboradores (2010). Em coerência com esse resultado, foi observada também alta expressão de CD309, CD105, CD146 e CD31 e baixa expressão dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, reforçando a manutenção do caráter endotelial dessas células em todas as condições de cultivo avaliadas (Ingram, et al., 2004; Senegaglia, et al., 2010; Correa, et al., 2018).

No entanto, foi observada uma redução significativa na marcação de vWF nos cultivos 3D. Como este é um fator relacionado ao controle de formação de vasos sanguíneos (Starke, et al., 2011), foi realizado um ensaio de formação de vasos com as células que foram cultivadas nos arcabouços para avaliar se essa redução de marcação era o suficiente para afetar o potencial angiogênico das células. Ainda, como o vWF é um fator intracelular, foi testada a hipótese de que a redução na marcação foi resultado do aumento de secreção do fator e não de uma redução direta de expressão. Então, o ensaio de formação de vasos foi também realizado com o meio condicionado obtido do cultivo 3D e aplicado em células provenientes de uma cultura 2D.

O ensaio foi conduzido por 24 horas e observou-se uma redução não significativa no número de vasos formados pelas células que haviam sido cultivadas em 3D em comparação tanto ao controle quanto àquelas mantidas com meio condicionado. Embora na questão de número de vasos as células tenham se comportado de maneira semelhante nas três situações, o número de nós formados pelas células provenientes do cultivo 3D foi significativamente menor do que nos outros casos. Isso sugere que, embora as células não tenham perdido seu potencial angiogênico, elas formaram uma rede de vasos menos complexa. Vale ressaltar, no entanto, que o meio condicionado testado foi obtido apenas das últimas 48 horas de cultivo, uma vez que a mudança na marcação de vWF foi observada após 7 dias de cultivo nos arcabouços. Porém, como os produtos de secreção das células podem variar ao longo do cultivo de acordo com as condições de confluência e disponibilidade de nutrientes, é possível que se fossem testados meios condicionados de outros tempos pudéssemos ver essas diferenças com mais clareza. Assim, seria interessante fazer essa avaliação mais ampla de modo a verificar a funcionalidade destes

secretomas e para confirmar o efeito do cultivo 3D sobre a expressão ou secreção de vWF.

## **5.6. Considerações Finais**

Por fim, foi observado também que, apesar dos arcabouços serem 3D, a grande maioria das células aderiu em apenas duas dimensões. Isso pode ter ocorrido porque os diâmetros dos filamentos de PLA eram muito grandes em comparação às células. Apesar disso, tendo em vista todas as diferenças no comportamento celular, a rugosidade dos filamentos de PLA e a diferença de rigidez dos arcabouços, consideramos ter criado um ambiente tridimensional bastante diferente do cultivo 2D tradicional.

Os dados adquiridos neste trabalho abrem espaço para análises mais aprofundadas e detalhadas do comportamento celular em cultivos 3D. Além disso, eles também demonstram a importância de se avaliar comportamentos celulares básicos ao considerarmos o uso de células associadas a arcabouços de biomateriais ou os subprodutos obtidos deste tipo de cultivo para a engenharia de tecidos.

## 6. CONCLUSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar como CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas interagem com arcabouços de PLA de duas porosidades diferentes em relação à adesão, ciclo celular, proliferação e perfil imunofenotípico.

- Foram impressos 2 arcabouços cúbicos de PLA com poros de tamanhos  $1,27 \pm 0,059$  mm (S25) e  $0,700 \pm 0,023$  mm (S40) e um arcabouço em formato de disco de diâmetro de 3 cm;

- Os arcabouços possuíam superfícies rugosas e, no caso do disco, ele também possuía ondulações;

- O S25 apresentou um módulo elástico de 5 MPa e o S40 de 10 MPa. Essa característica os torna viáveis para possíveis usos na engenharia de tecidos de cartilagem;

- Os arcabouços de PLA podem ser considerados de baixa citotoxicidade e permitem adequada adesão celular, proliferação e manutenção das morfologias das CTMs e células CD133<sup>+</sup> expandidas;

- Em 48 horas de cultivo nos arcabouços houve diminuição da porcentagem de células CD133<sup>+</sup> expandidas na fase G2 do ciclo celular e a queda na proliferação foi possivelmente causada pelo ambiente 3D e não pelo biomaterial;

- Em 48 horas de cultivo nos arcabouços houve um aumento de CTMs na fase G2 do ciclo celular e uma tendência de aumento de proliferação;

- As CTMs foram capazes de manter seu perfil indiferenciado durante o cultivo nos arcabouços;

- Houve redução na marcação de vWF nas células CD133<sup>+</sup> expandidas após o cultivo nos arcabouços, mas isso não afetou o potencial angiogênico das células;

- A diferença no tamanho dos poros não afetou o comportamento das células.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABTCEL, *Nota da Associação Brasileira de Terapia Celular e Gênica*. Disponível em: <<http://www.abtcel.org.br/recomendacedilotildees-e-notiacutecias-abtcel-gen.html>> Acesso em: 9 jan. 2021.
- ABBASI, N. et al. Porous scaffolds for bone regeneration. **J. Sci. Adv. Mat. Dev.** v. 5, n.1, p. 1-9, 2020.
- ABUD, A.P.R. et al. The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** v. 73, n. 3, p. 992-998, 2015.
- ADAMS, R.H., ALITALO, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 8, n. 6, p. 464-478, 2007.
- ALSAHEB, R.A.A. et al. Recent applications of polylactic acid in pharmaceutical and medical industries. **J Chem Pharm.** v. 7, n. 12, p. 51-63, 2015.
- ANTICH, C. et al. Bio-inspired hydrogel composed of hyaluronic acid and alginate as a potential bioink for 3D bioprinting of articular cartilage engineering constructs. **Acta Biomater.**, v. 106, p. 114-123, 2020.
- ATALA, A., HUNSBERGER, J.G. Engineering biomaterials for enhanced tissue regeneration. **Curr Stem Cell Rep.**, v. 2, n. 2, p. 140-146, 2016.
- ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-967, 1997.
- ASHWIN, B. et al. 3D-poly (lactic-acid) scaffold coated with gelatin and mucic acid for bone tissue engineering. **Int J Biol Macromol.**, v.162, p. 523-532, 2020.
- BAKER, B.M., CHEN, C.S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **J Cell Sci.**, v. 125, p. 3015-3024, 2012.
- BÖHRNSEN, F., SCHLIEPHAKE, H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. **Int J Oral Sci.**, v. 8, n. 4, p. 223-230, 2016.
- BONGIOVANNI, D. et al. The CD133<sup>+</sup> cell as advanced medicinal product for myocardial and limb ischemia. **Stem Cells Dev.**, v. 23, n. 20, 2014.
- BÜHRING, H.J. et al. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. **Ann N Y Acad Sci.**, p. 262-271, 2007.
- CAO, C., DONG, Y., DONG, Y. Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cell. **Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery**, v. 19, n. 8, p.642-647, 2005.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells. **J Orthop Res**, v.5, p.641-650, 1991.

CASALINI, T. et al. A perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications. **Front Bioeng Biotechnol.**, v. 7, n. 259. 2019.

CIZKOVA, D. et al. Localized intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells conditioned medium improves functional recovery in a rat model of spinal cord injury. **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 3, 2018.

CORREA, A. et al. Expanded CD133<sup>+</sup> cells from human umbilical cord blood improved heart function in rats after severe myocardial infarction. **Stem Cells Int.** v. 2018, 11 abril 2018.

DEB, P. et al. Scaffold development using biomaterials: a review. **Mater Today**, v. 5, n. 5, p. 12909-12919, 2018.

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.

ELMOWAFY, E.M., TIBONI, M., SOLIMAN, M.E. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. **J Pharm Invest** v. 49, p. 347-380. 16 abril 2019.

ERICES, A., CONGET, P., MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br. J. Haematol.**, v. 109, n. 1, p.235-242, 2000.

FALKENBERG, K.D. et al. The metabolic engine of endothelial cells. **Nat Metabolism**. v. 1, p. 937-946, 2019.

FAIRAG, R. et al. Three-dimensional printed polylactic acid scaffolds promote bone-like matrix deposition in vitro. **ACS Appl Mater Interfaces**, v. 11, n. 17, p. 15306-15315, 2019.

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

FRIEDSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell Tissue Kinet.**, v. 20, n. 3, p. 263-272, 1987.

GAHARWAR, A.K., SINGH, I., KHADEMHOSEINI, A. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. **Nat Rev Mater**. v. 5, p. 686-705, 6 jul 2020.

GRÉMARE, A., et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res**. v. 106, n. 4, p. 887-894. 6 nov 2017.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J Dent Res.**, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

GUIMARÃES, C.F. et al. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. **Nat Rev Mat.** v. 5, p. 351-370, 2020.

HAAPARANTA, A.M. et al. Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med.** v. 25, n. 4, p. 1129-1136, 2014.

HEATH, D.E., LANNUTTI, J.L., COOPER, S.L. Electrospun scaffold topography affects endothelial cell proliferation, metabolic activity, and morphology. **J Biomed Mater Res A**, v. 94, n. 4, p. 1195- 11204, 2010.

HU, L. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Sci Rep.**, v. 6, 2016.

HULL, Charles W. Hull. **Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography.** Depositante: 3D Systems Inc. Depósito: 8 de agosto de 1984. Concessão: 19 de dezembro de 1989.

INGRAM, D. et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood.** v. 104, n. 9, p. 2752-2760, 29 jun 2004.

ISAACSON, A., SWIOKLO, S., CONNON, C.J. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent. **Exp Eye Res.** v. 173, p. 188-193, 2018.

ISO, Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Disponível em: < <https://www.iso.org/standard/36406.html>>. Acesso em 5 jul. 2020.

ISO, Biological evaluation of medical devices - part 12: sample preparation and reference materials. Disponível em: < <https://www.iso.org/standard/75769.html> >. Acesso em 14 dez. 2020.

JAKUS, A.E. et al. Hyperelastic “bone”: A highly versatile, growth factor-free, osteoregenerative, scalable, and surgically friendly biomaterial. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 358, 2016.

JAIDEV, L.R., CAHTTERJEE, K. Surface functionalization of 3D printed polymer scaffolds to augment stem cell response, **Mater Des.** v. 161, p. 44-54, 2019.

JENSEN, C., TENG, Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? **Front Mol Biosci.** v. 7, 2020

JOSEPH, A. et al. Mesenchymal stem cell-conditioned media:a novel alternative of stem cell therapy for quality wound healing. **J Cell Physiol.** v. 235, p. 5555-5569, 2020.

KHADEMHOSEINI, A.; LANGER, R. A decade of progress in tissue engineering. **Nat Protoc.** v.11, n. 10, p. 1775-1781, 2016.

KIMBREL, E.A., LANZA, R. Next-generation stem cells – ushering in a new era of cell-based therapies. **Nat Rev**, v. 19, p. 463-479, 2020.

KORPELA, J. et al. Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. v. 101, n. 4, p. 610-619, 2013.

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

LEACH, J.K., WHITEHEAD, J.R. Materials-directed differentiation of mesenchymal stem cells for tissue engineering and regeneration. **ACS Biomater Sci Eng**. v. 4, n. 4, p. 1115-1127, 16 mar 2017.

LEVY, O. et al. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. **Sci. Adv.** v. 6. n. 30. 22 jul 2020.

LI, Z., HU, X., ZHONG, J.F. Mesenchymal stem cells: characteristics, function and applications. **Stem Cells Int**. v. 5, 2019.

LIANG, X. et al. Structural mechanics of 3D-printed poly(lactic acid) scaffolds with tetragonal, hexagonal and wheel-like designs. **Biofabrication**. v. 11, n. 3, 2019.

LIGON, S.C. et al. Polymers for 3D printing and customized additive manufacturing. **Chem Rev**. v. 117, n. 15, p.10212-10290, 2017.

LIU, X. et al. Co-seeding human endothelial cells with human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffold enhances osteogenesis and vascularization in rats. **Tissue Eng Part A**. v. 23, p. 546-555, 2017.

LOH, Q.L., CHOONG, C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. **Tissue Eng Part B Rev**. v. 19, n. 6, p. 485-502, 2013.

LOS, M.J., HUDECKI, A, WIECHEC, E. Stem cells. **Stem cells and biomaterials for regenerative medicine**. Academic Press, 249p, 2019.

LUCEY, B.P. et al. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. **Arch Pathol Lab Med**. v. 133, n. 9, p. 1463-1467, 2009.

MACCHIARINI, P. et al. Clinical transplantation of a tissue engineered airway. **The Lancet**, v.372, n. 9655, p. 2023-2030, 2008.

MAGALHÃES, R.S. et al. A tissue-engineered uterus supports live births in rabbits. **Nat Biotechnol**. v. 38, n. 11, p. 1280-1287, 29 jun 2020.

MARCON, B.H. et al. DDX6 helicase behavior and protein partners in human adipose tissue-derived stem cells during early adipogenesis and osteogenesis. **Int J Mol Sci**. v. 21, n. 7, 2020.

MEDINA, R.J. et al. Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. **Stem Cells Transl Med.** v. 6, n. 5, p. 1316-1320, 2017.

MENG, X. et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. **J Transl Med.** v. 5, 2007.

Ministério da Saúde. *Doação de órgãos: transplantes, lista de espera e como ser doador.* Disponível em <<https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos>>. Acesso em 14 jan 2021.

MIRONOV, V. et al. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. **Trends Biotechnol.** v. 21, n. 4, p.157-161, 2003.

MORGAN, F.L., MORONI, L., BAKER, M.B. Dynamic bioinks to advance bioprinting. **Adv Healthc Mater.** v. 9. n. 15. 2020.

MUKUL, T., SHAKIBA, N., ZANDSTRA, P.W. Stem cell bioengineering: building from stem cell biology. **Nat Rev Genet.**, v. 19, n. 10, p. 595-614, 2018.

NOOR, N. et al. 3D printing of personalized thick and perfusable cardiac patches and hearts. **Adv Sci.** v. 6, n. 11, 2019.

OECD, *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests.* Disponível em <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oeecd/oeecd-gd129.pdf>>. Acesso em 5 jan. 2021.

OTT, H.C. et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. **Nat Med.** v. 14, p. 213-221, 2008.

OSHIMA, Y., et al. Variation of mesenchymal stem cells in polylactic acid scaffold in an osteochondral repair model. **Tissue Eng Part C Methods.** v. 15, n. 4, p. 595-604, 2009.

PAL, R. *How are organoids different from spheroids?* Disponível em: <<https://blog.crownbio.com/organoids-or-spheroids>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

PERSSON, M. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in a 3D woven scaffold. **Sci Rep.** v. 8, 2018.

PHELPS, J. et al. Bioprocessing of mesenchymal stem cells and their derivatives: toward cell-free therapeutics. **Stem Cells Int.** v. 2018, 2018.

QIU, J., HIRSCHI, K.K. Endothelial cell development and its application to regenerative medicine. **Circ Res.** v. 2019. n. 125. p. 489-501. 2019.

RAMALHO-SANTOS, M., WILLENBRING, H. On the origin of the term "stem cell". **Cell Stem Cell.** v. 1, n. 1, p. 35-38, 2007.

RATNER, B. Biomaterials: been there, done that, and evolving into the future. **Annu Rev Biomed Eng.**, v. 21, n. 171, p. 171-191, 2019.

RAYA-RIVERA, A. et al. Tissue engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. **The Lancet**. v. 37, n. 9772, p. 1175-1182, 2011.

ROSENZWEIG, D.H. et al. 3D-Printed ABS and PLA scaffolds for cartilage and nucleus pulposus tissue regeneration. **Int J Mol Sci**. v. 16, p. 15118-15135, 2015.

ROUWKEMA, J., KHADEMHOSEINI, A. Vascularization and angiogenesis in tissue engineering: beyond creating static networks. **Trends Biotechnol**. v. 34, n. 9, p. 733-745, 2016.

SCHAAP-OZIEMLAK, A.M.; KÜHN, P.T.; van Kooten. T.G.; van RIJN. P. Biomaterial-stem cell interactions and their impact on stem cell response. **RSC Advances**. v. 4, p. 53307-53320, 2014.

SENEGAGLIA, A.C. et al. Are purified or expanded cord blood-derived CD133<sup>+</sup> cells better at improving cardiac function? **Exp Biol Med**. v. 235, n. 1, p. 119-129, 2010.

SHAHREZAEI, M. et al. In vitro and in vivo investigation of PLA/PCL scaffold coated with metformin-loaded gelatin nanocarriers in regeneration of critical-sized bone defects. **Nanomedicine**, v. 14, n. 7, p. 2061-2073, 2018.

SIMIONESCU, B.C., IVANOV, D. Natural and synthetic polymers for designing composite materials. **Handbook of Bioceramics and Biocomposites**. Switzerland: Springer International, 2015.

SIMIAN, M., BISSEL, M.J. Organoids: a historical perspective of thinking in three dimensions. **J Cell Biol**. v. 216, n. 1, p. 31-40, 2017.

SOBACCHI, C., et al. 3D Bone mimetic scaffolds for basic and translation studies with mesenchymal stem cells. **Int J Mol Sci**. v. 19, n. 10, 13 out 2018.

SÖHLING, N. et al. 3D-printing of hierarchically designed and osteoconductive bone tissue engineering scaffolds. **Materials (Basel)**. v.8, 2020.

SONG, Y. et al. Cell engineering: biophysical regulation of the nucleus. **Biomaterials**. v. 234, 2020.

SONG, Y. et al. Measurements of the mechanical response in unidirectional 3D-Printed PLA, **Materials Design**. v. 123, p. 154-164, 2017.

STARKE, R. et al. Endothelial von willebrand factor regulates angiogenesis. **Blood**. v. 117, n. 3, p. 1071- 1080, 20 jan. 2011.

SU, N., et al. Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction. **Biomaterials**, v. 141, p. 74-85, 2017.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 861-872, 2007.

TAMAY, D.G. *et al.* 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications. **Front Bioeng Biotechnol.** v. 7, 2019.

TEIXEIRA, B.N. et al. Evaluation of bone marrow stem cell response to PLA scaffolds manufacture by 3D printing and coated with polydopamine and type I collagen, **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 107, n. 1, p. 37-49, 2018.

THEODORIDIS, K., et al. An effective device and method for enhanced cell growth in 3D scaffolds: investigation of cell seeding and proliferation under static and dynamic conditions. **Mat Sci Eng C.** v. 114, 5 maio 2020.

THOMAS, E.D. et al. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplant in man. **J Clin Invest.** v. 38, p. 1709-1716, 1959.

TILL, J.E., McCULLOCH, E.A. Hemopoietic stem cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 605, p. 431-459, 1980.

VELIOGLU, Z.B. et al. 3D-printed poly(lactic acid) scaffolds for trabecular bone repair and regeneration: scaffold and native bone characterization, **Connect Tissue Res.**, v. 60, n. 3, p. 274-282, 2018.

WANG, J. et al. Surface entrapment of chitosan on 3D printed polylactic acid scaffold and it biomimetic growth of hydroxiapatite, **Composite Interfaces**, v. 26, p. 1-14, 2018.

WENDT, S. et al. Evaluation of the cardioprotective potential of extracellular vesicles – a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep**, v. 8, 2018.

XU, J. et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. **Stem Cell Res Ther.** v. 7, n. 1, 2016.

YANG, G., et al. Vascularization in tissue engineering: fundamentals and state-of-art. **Prog Biomed Eng.** v. 2, 2020.

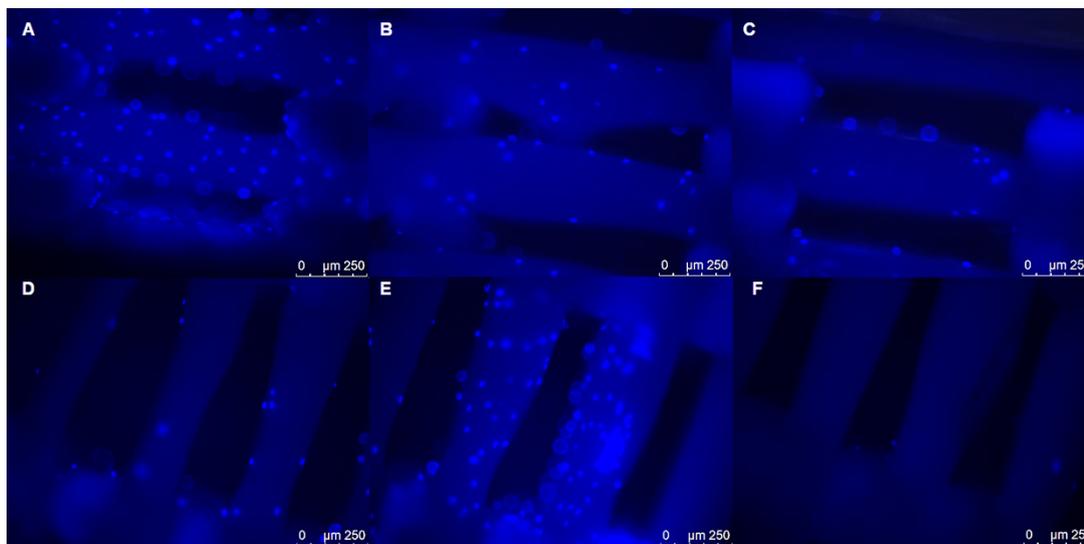
YAO, T., ASAYAMA, Y. Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues. **Reprod Med Bio.** v. 16, p. 99-117, 2017.

ZHANG, Q. et al. Chemical composition and toxicity of particles emitted from a consumer-level 3D printer using various materials. **Environ Sci Technol.** v. 53, n. 20, p. 12054-12061, 2019.

## APÊNDICE A – Padronização do Método de Deposição das Células

Para avaliação e padronização da semeadura das células em sistema 3D, foram testadas diferentes concentrações celulares e também métodos para a deposição das células nos arcabouços. Testou-se semear as células pela superfície do arcabouço e deixar que elas decantassem e entrassem pelos poros e também foi testado colocá-las poro por poro. Neste último caso, as células foram inseridas com uma pipeta nos poros dos arcabouços num volume de 10  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo. Os arcabouços foram então incubados numa placa de Petri na estufa por 1 hora e 30 minutos e, só então, a placa foi completada com meio de cultivo para que os arcabouços ficassem submersos. Após 24 horas, os arcabouços foram transferidos para uma placa de cultivo de 24 poços contendo 700 $\mu\text{L}$  de meio de cultivo em cada poço.

Verificou-se que a semeadura das células poro por poro demonstrou ser mais efetiva que a deposição na superfície dos arcabouços, a qual causava extravasamentos e maiores dificuldades de padronização. Quando semeadas poro por poro, as células se distribuíam de maneira mais homogênea pelos arcabouços (Figura A.1 A, B, C). Porém, foi observada uma grande variabilidade a cada semeadura realizada em termos de número de células aderidas e distribuição e o método se mostrou bastante trabalhoso, demandando um longo tempo de semeadura e inviabilizando a execução de experimentos com várias réplicas.



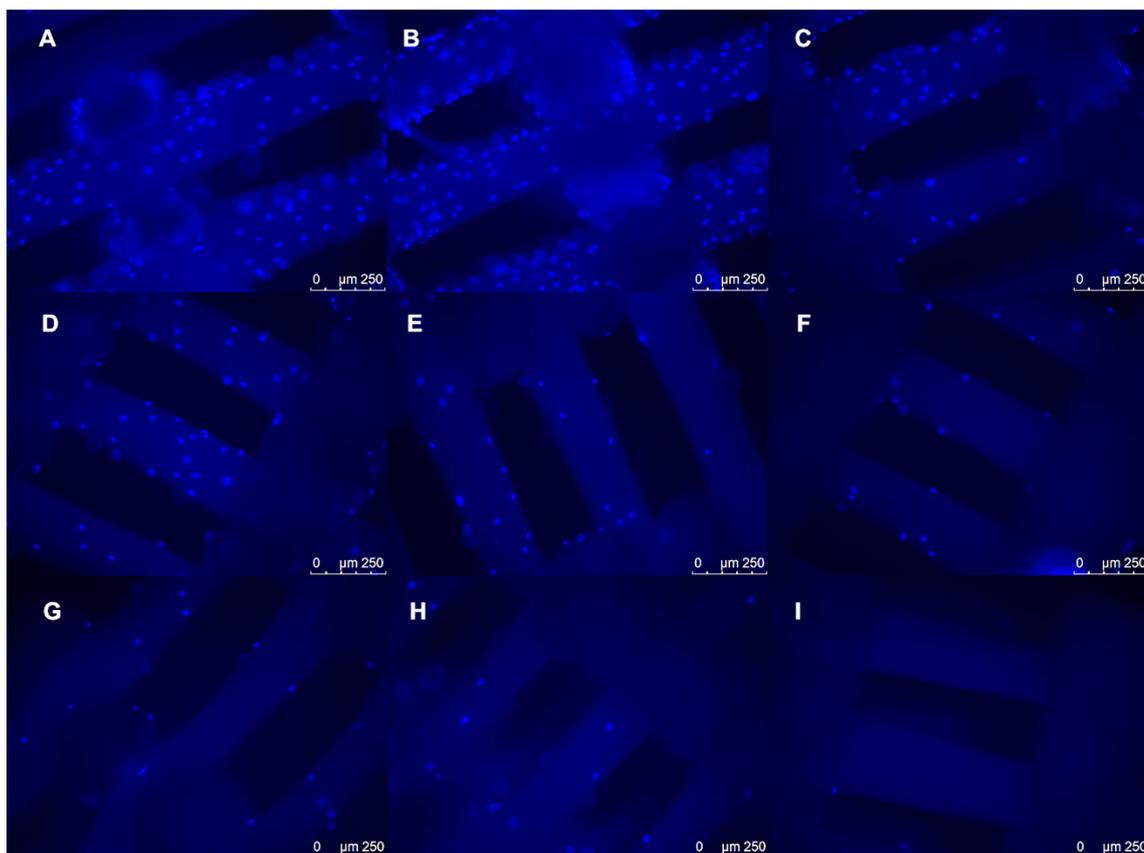
**Figura A.1. Marcação nuclear dos arcabouços com CTMs semeadas poro por poro (A-C) e pela superfície (D-F).** (A e D) camadas do fundo do arcabouço. (B e E) camadas do meio do arcabouço. (C e F) camadas superiores do arcabouço. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.

Também foram testadas concentrações diferentes de células que seriam depositadas para determinar qual seria a melhor concentração para obtenção de uma distribuição mais homogênea. Para as CTMs foram testadas as concentrações  $1 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  células por arcabouço. Após a deposição das células poro por poro, os arcabouços foram postos de pé na vertical e virados 90 graus a cada 5 minutos por 20 minutos de modo que as células pudessem se espalhar por todos os lados do

arcabouços, evitando que elas decantassem e se concentrassem no fundo. Após 24 horas de cultivo, as células foram fixadas e coradas com DAPI para visualização no microscópio de fluorescência. A Figura A.2 mostra que as células se distribuíram homogêneas e não foram observadas regiões com grandes amontoados de células. No entanto, com a concentração menor de células (Figura A.2 G, H,I) havia várias regiões do arcabouço vazias.

Já com a concentração maior de células, não foram observadas regiões vazias e elas estavam ocupando boa parte do arcabouço. Porém, isso também demonstrou que para análises em cultivos longos, por mais de 24 horas, a semeadura de  $1 \times 10^5$  células pareceu ser um número muito alto de células que rapidamente ocupariam todo o arcabouço, o deixando sem espaço para a proliferação celular.

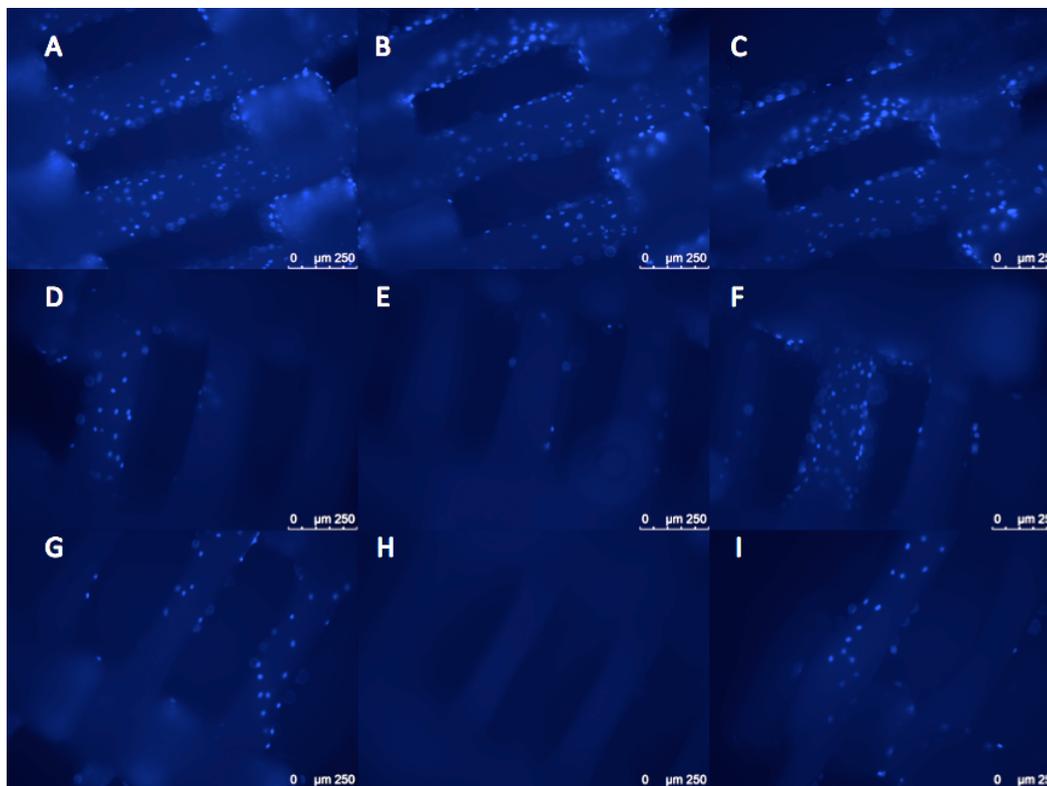
Dessa forma, concluiu-se que a concentração ideal de células para os testes era de  $6 \times 10^4$  células/ arcabouço, visto que nesse caso as células se distribuíram bem, que a distância entre elas ainda poderia permitir reconhecimento e comunicação e que haveria espaço suficiente para elas continuarem proliferando e aderindo por mais tempo.



**Figura A.2. Marcação nuclear dos arcabouços nos testes de adesão de CTMs com diferentes concentrações celulares.** (A-C):  $1 \times 10^5$  células. (D-F):  $6 \times 10^4$  células. (G-I):  $5 \times 10^3$  células. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.

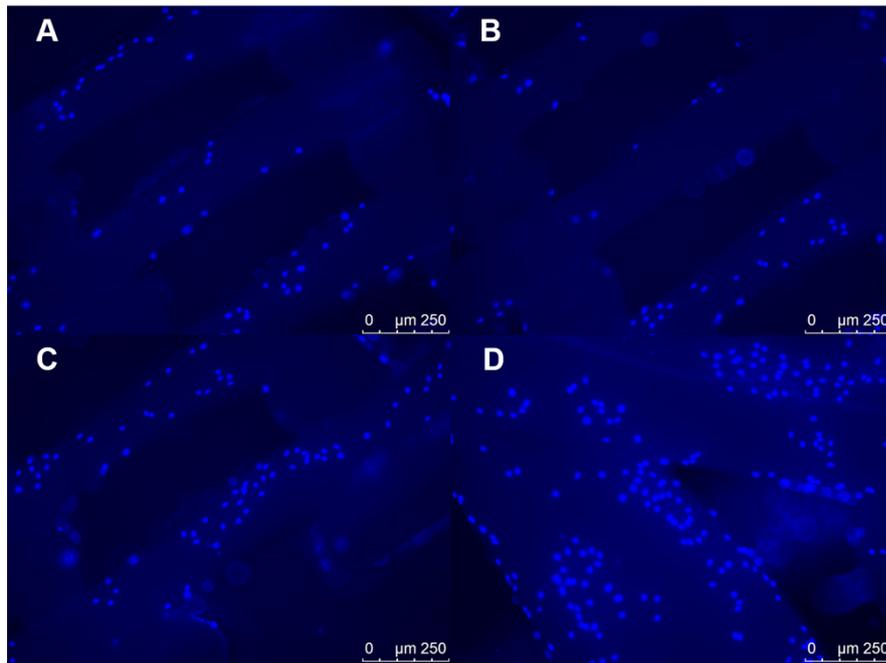
Para as células  $CD133^+$  expandidas foram testadas concentrações de  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  e  $5 \times 10^4$  células/ arcabouço depositadas poro por poro. O protocolo seguiu os mesmos passos do protocolo das CTMs.

Observou-se que, com a maior concentração, as células se distribuíram de maneira mais homogênea (Figura A.3 A-C). Porém, nas outras duas concentrações mais baixas as células se concentraram nas camadas superiores (Figura A.3 D, G) e inferiores (Figura A.3 F, I) do arcabouço e poucas foram encontradas nas camadas do meio (Figura A.3 E, H).



**Figura A.3. Marcação nuclear dos arcabouços dos testes de adesão das células CD133<sup>+</sup> expandidas com diferentes concentrações celulares. (A-C) 1x10<sup>6</sup> células. (D-F): 1x10<sup>5</sup> células. (G-I): 5x10<sup>4</sup> células. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.**

Com estes testes também foi possível observar a presença de regiões sem células nos arcabouços. Isso poderia ser um indício de que o tempo de 5 minutos para permitir a adesão dessas células não era o suficiente e/ou que a concentração celular ainda não era a ideal. Dessa forma, foi testada a concentração celular de 5x10<sup>5</sup> células por arcabouço e um novo método de semeadura de células, o método da seringa (descrito na metodologia). Pela figura A.4 observou-se que, com o método da seringa, as células tinham se distribuído de maneira homogênea pelo arcabouço e não havia espaços vazios como nos casos anteriores. Além disso, também foi possível encontrar células aderidas na parte externa do arcabouço, o que não ocorria nos outros métodos. Então, ficou determinado que a concentração de células CD133<sup>+</sup> expandidas utilizada seria de 5x10<sup>5</sup> células/ arcabouço e o método utilizado para semear as células seria o método da seringa.

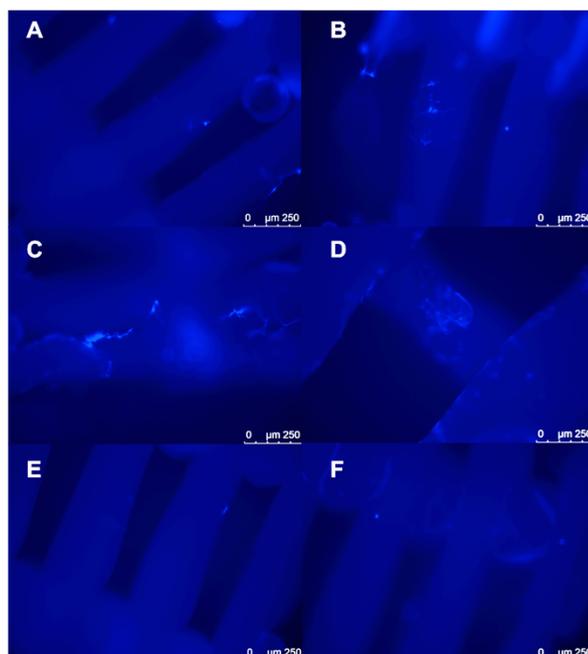


**Figura A.4. Marcação nuclear dos arcabouços do teste de adesão de células CD133<sup>+</sup> expandidas com  $5 \times 10^5$  células utilizando o método da seringa. (A) camadas superiores do arcabouço. (B) camadas do meio do arcabouço. (C) camadas inferiores do arcabouço. (D) superfície externa do topo do arcabouço. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.**

## APÊNDICE B – Padronização do Processo de Remoção e Coleta das Células Aderidas aos Arcabouços de PLA

Para a realização de avaliações nas células individualizadas após os cultivos no sistema 3D, a remoção das células dos arcabouços e sua coleta foram analisadas e padronizadas. Inicialmente foram testadas três variações do mesmo protocolo para retirar as células dos arcabouços. Este protocolo consiste em 3 etapas: 1) realização de uma lavagem inicial com solução salina livre de cálcio e magnésio (BSS-CMF) por 10 minutos sob agitação suave para remoção do meio de cultivo; 2) incubação com solução de 0,25% de tripsina-EDTA por 4 minutos a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>; 3) inativação da tripsina com igual volume de meio de cultivo contendo 10% SFB. No primeiro teste (método 1) o arcabouço foi centrifugado três vezes após a tripsinização para retirar toda a tripsina de dentro dos poros; no segundo (método 2) foi realizada uma centrifugação após lavagem com BSS-CMF além da centrifugação após tripsinização; e no último (método 3) foi realizada apenas uma centrifugação após tripsinização.

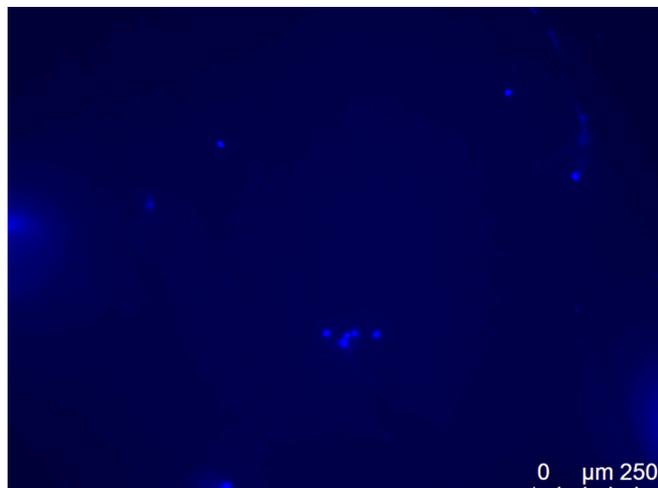
Para avaliar a eficiência dos protocolos, foi feita a contagem de células e também a coloração com DAPI para verificar a presença de células que possivelmente ficaram aderidas ao arcabouço após a tripsinização. Pela Figura B.1 observou-se que ficaram poucas células nos arcabouços, indicando que o protocolo para recuperação das células era adequado. Era possível ver também núcleos celulares difusos (Figura B.1 B, C, D, F). Como DAPI é um corante intercalante de DNA, o perfil de marcação observado indica que o DNA dessas células havia se desenovelado e isso se deu provavelmente ao estresse das centrifugações e/ou ação da tripsina. De qualquer modo, o arcabouço que passou pelo protocolo com apenas uma centrifugação no final apresentou menos desses núcleos difusos (Figura B.1 E, F). Este, portanto, foi o método escolhido para realização dos experimentos.



**Figura B.1. Marcação nuclear dos arcabouços mostrando as células que continuaram aderidas no interior dos arcabouços após os protocolos de tripsinização. (A,B): método 1. (C, D): método**

2. (E, F): método 3. Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.

Para retirar as células do disco de PLA, o método 3 foi utilizado sem a centrifugação no final, o que permitiu uma boa recuperação de células (Figura B.2).



**Figura B.2. Marcação nuclear do disco de PLA após o processo de tripsinização.** Os núcleos que aparecem em azul foram corados com DAPI e visualizados por microscopia de fluorescência.