

Rafaela Grecco Machado

**POTENCIAL DE REPARO CUTÂNEO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERMIS ASSOCIADAS À
NANOMATRIZES DE CELULOSE BACTERIANA**

Dissertação submetida ao programa de Pós Graduação em Biologia celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento. Orientadora: Prof. Dr. Andréa Gonçalves Trentin. Coorientadora: Dr. Talita da Silva Jeremias

Florianópolis, 2016.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Machado, Rafaela
POTENCIAL DE REPARO CUTÂNEO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERMIS ASSOCIADAS À NANOMATRIZES DE CELULOSE
BACTERIANA / Rafaela Machado ; orientadora, Andréa
Gonçalves Trentin ; coorientadora, Talita da Silva
Jeremias. - Florianópolis, SC, 2016.
139 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células
tronco. 3. Lesões Cutâneas. 4. Biomateriais. 5. Celulose
Bacteriana. I. Gonçalves Trentin, Andréa . II. da Silva
Jeremias, Talita. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

“Potencial de reparo cutâneo de células-tronco mesenquimais dermais associadas à nanomatriz de celulose bacteriana”

Por

Rafaela Grecco Machado

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (05/PPGBCD/2016) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.

Prof(a). Dr(a). Yara Maria Rauh Müller
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)

Dr(a) Carlos Renato Rambo (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr(a) Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro (Universidade Federal de Santa Catarina)

Dr(a) Ricardo Castillo Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 31 de março de 2016.

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me apoiam e me motivam a seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Andréa Gonçalves Trentin, por ter me acolhido no laboratório, me dando a oportunidade de estudar na prática a Biologia Celular que tanto amo. Agradeço também por toda a confiança em meu trabalho, por sua paciência para me acalmar nos meus momentos de desespero, e por servir como um exemplo de dedicação.

À minha coorientadora, grande amiga e mentora Talita da Silva Jeremias, por me mostrar que a ciência é muito mais do que meus resultados mostram, por me motivar a seguir a carreira científica e por não desistir de mim em nenhum momento. Não há palavras para agradecer todos seus ensinamentos para minha carreira científica e para minha vida pessoal.

Ao Professor Ricardo Castilho Garcez que, com sua paixão pela ciência, me mostra a cada aula/seminário/conversa, que eu não poderia estar fazendo algo melhor com minha vida do que pesquisar e estudar.

Ao Professor Giordano Vosgrau Calloni, por todos os ensinamentos no laboratório e por todas as conversas que me fizeram refletir sobre a vida e a ciência.

À Professora Derce de Oliveira Souza Recouvreux que me auxiliou com as produções de celulose bacteriana, respondendo minhas questões em tempo recorde. Muito obrigada por todo o seu tempo dedicado, por todas as conversas e auxílios prestados e pela confiança em meu trabalho.

Ao Professor Jamil Assreuy por permitir a utilização de suas instalações para a realização de experimentos.

Aos técnicos do LAMEB I , LAMEB II e do LCME que me auxiliaram em grande parte dos meus experimentos, tornando este trabalho possível de ser realizado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde me formei também na graduação, por me dar a oportunidade de cursar uma graduação e uma pós-graduação gratuitas e de qualidade.

Ao HU, aos médicos e aos pacientes que possibilitaram a obtenção das células utilizadas nos experimentos.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq, FAPESC, Ministério da Saúde e Ministério da Ciência e Tecnologia que apoiaram o trabalho financeiramente, permitindo sua realização.

A todos os colegas do LACERT que tornam nosso ambiente de trabalho mais agradável, nossas pesquisas mais interessantes e nossas festas invejáveis.

À Diana Heck linda, parceira de "bancada" e de projetos futuros, muito obrigada por me escutar, me aconselhar e me ajudar com os experimentos.

À Michele Rode, pelo auxílio nas cirurgias e nas estatísticas, pelas discussões científicas e pelas cervejas artesanais.

Ao Diego Amarante, por tornar dias que seriam péssimos em gargalhadas e por me motivar a manter minha alma sempre jovem para que eu possa ser como ele.

À Priscilla Delben que me mostrou que arriscar, seguir instintos e colocar ideias em prática são a alma da ciência.

À Alice, companheira de cafés, bares e comilanças, que nunca me deixa festejar sozinha e que sempre esteve disposta a tomar minhas dores e me auxiliar em meus momentos difíceis.

Às alunas de iniciação científica Camila Acordi e Maiara Marques que me auxiliaram nos experimentos e me ensinaram a ensinar.

Aos "velhos" Lacertianos: Clari, Felipe, Pati e Jéssica que mesmo distantes me auxiliaram com suas palavras motivadoras ou com seu desespero, mostrando que eu não estava sozinha.

Às minhas companheiras de graduação, minhas "xuxus", Leili, May, Mille, Gabi, Chê, Laís e Amanda que cresceram e amadureceram junto comigo. Vocês enchem meu coração de alegria! Muito obrigada por todos os conselhos, gordices, filmes de terror, piadinhas infames e por manterem esse grupo unido mesmo com tantas diferenças e obrigações da vida adulta.

Ao meu noivo, José Alvim, o engenheiro mais biólogo que eu conheço, por todo o companheirismo durante essa caminhada que estamos trilhando juntos. Obrigada pelas discussões científicas, pelas aulas de história e principalmente, obrigada por confiar em mim e se orgulhar até das minhas menores conquistas.

Aos meus pais Roseli e Celso por considerarem minha educação uma prioridade nas suas vidas e por confiarem cegamente em minhas decisões, me dando a possibilidade de errar e me auxiliando a cada queda.

"... Deixe-me pensar: eu era a mesma quando me levantei esta manhã? Tenho uma ligeira lembrança de que me senti um bocadinho diferente. Mas, se não sou a mesma, a próxima pergunta é: 'Afinal de contas quem sou eu? 'Ah, este é o grande enigma!'"

(Lewis Carrol, 1865)

RESUMO

Lesões de espessura total na pele, como queimaduras extensas e úlceras crônicas, resultam em numerosos problemas fisiológicos, funcionais e psicológicos para os pacientes. Apesar de existirem diversos tratamentos para essas lesões, nenhum deles resulta em uma pele totalmente íntegra e funcional. Por isso, buscou-se com este trabalho um melhor método de reparo cutâneo, associando células-tronco mesenquimais dermais (dCTMs) com matrizes de celulose bacteriana (MCBs). Trabalhos têm mostrado que CTMs melhoram o reparo de tecidos lesados, por meio de sua diferenciação nos fenótipos afetados ou da liberação de fatores parácrinos. As MCBs, por sua vez, são polímeros naturais produzidos por bactérias. Essas membranas são atrativas para o reparo tecidual, por apresentarem características como biocompatibilidade, alta capacidade de retenção de água, e boa permeabilidade. Neste trabalho as MCBs produzidas foram caracterizadas fisicamente em seu estado úmido e liofilizado. As MCBs hidratadas apresentaram uma alta capacidade de retenção de água, fibras nanométricas e porosidade superficial de cerca de 30%. Quando submetidas ao processo de liofilização as MCBs não mantiveram sua conformação tridimensional, apresentando porosidade quase nula, fibras achatadas e baixa taxa de reabsorção de água, não sendo capazes de retornar ao seu estado original. Desse modo, a associação de dCTMs foi analisada apenas com as MCBs hidratadas. As dCTMs foram obtidas a partir de fragmentos de pele, de pacientes saudáveis, que se submeteram a cirurgias de *lifting* facial, e foram cultivadas sobre as MCBs em condições de cultivo padrão. Os experimentos demonstraram que as dCTMs permaneceram viáveis por 21 dias sobre as MCBs, análises com microscopia de varredura e confocal indicaram que as dCTMs se aderem progressivamente sobre as MCBs, são capazes de se proliferar, não migram para o interior das membranas e mantém sua morfologia típica. Nessas condições as dCTMs também mantiveram suas características imunofenotípicas de CTMs como visto por citometria de fluxo. Esses resultados mostram que as MCBs são biocompatíveis às dCTMs. Considerando estas análises, o potencial terapêutico dessa associação foi avaliado *in vivo* em lesões cutâneas de camundongos. Foram avaliados os seguintes parâmetros: taxa de fechamento das lesões, infiltrado inflamatório, angiogênese, espessura e homogeneidade da epiderme e comprimento das cicatrizes. Os resultados revelaram que, quando comparado com o grupo controle, o grupo tratado com dCTM+MCB apresentou um aumento significativo na angiogênese e no infiltrado de neutrófilos. Além disso, o tratamento

influenciou a espessura do tecido de granulação, levou a formação de uma epiderme mais fina e homogênea, e aparentemente diminuiu as cicatrizes. Em conjunto, os resultados sugerem que a associação esteja acelerando a maturação das lesões cutâneas, e favorecendo o processo de reparo cutâneo.

Palavras-chave: Células-tronco mesênquimais. Matrizes de celulose bacteriana. Reparo cutâneo.

ABSTRACT

Full-thickness skin injuries, such as extensive burns and chronic ulcers result in numerous physiological functional and psychological problems for the patients. Even though there are various current treatments for these lesions, none of them lead to a fully reconstituted and functional skin. For this reason, this work search for a better method to improve skin repair, associating dermal mesenchymal stem cells (dMSCs) with bacterial cellulose membranes (BCMs). Studies have shown that MSCs improve tissue repair through differentiation in affected phenotypes or by releasing paracrine factors. The BCMs, in turn, are natural polymers produced by bacteria. These membranes are attractive for tissue repair by presenting biocompatibility, high capacity of water retention, and good permeability. In the present work, the produced BCMs were physically characterized in their wet and freeze-dried states. The wet BCMs showed a high capacity for water retention, nanometric fibers and a surface porosity of about 30%. When subjected to the freeze drying process, BCMs did not keep their three-dimensional conformation, presented almost no porosity, flattened fibers and low water absorption rate, not being able to return to its original state. Thus, dMSCs association was analyzed only with wet BCMs. The dMSCs were obtained from fragments of skin of healthy patients who had undergone facelift surgery. The cells were then cultured on BCMs in standard culture conditions. The experiments showed that dMSCs remained viable for 21 days on BCMs. Scanning electron and confocal microscope analyses revealed that dMSCs progressively adhered on BCMs, were able to proliferate, do not migrate to the interior of the matrices and maintained their typical morphology. In this condition, cells maintained the MSCs immunophenotypic characteristics as assessed by flow cytometry. These results show that the MCBs are biocompatible with the dMSCs. Therefore, the therapeutic potential of the dMSCs associated with BCMs was evaluated *in vivo*, in mice cutaneous lesions. The following parameters were evaluated: closing rate of lesions, inflammatory infiltration, neovascularization, thickness and homogeneity of the epidermis and length of scars. The results revealed that, when compared to the control group, the treated group (MSC+BCM) showed a significant increase in neovascularization and neutrophil infiltration. Besides, the treatment also influenced the thickness of granulation tissue, and allowed the formation of a thin and uniform epidermis. The lenght of scras int he treated gruoup were relatively smaller. Together, the results suggest that the MSC+BCM

treatment is accelerating the maturation of skin lesions, and promoting the skin repair process.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Bacterial cellulose membrane. Skin repair

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação Esquemática da Estrutura da Pele	28
Figura 2 - Fechamento de Lesões Cutâneas.....	32
Figura 3 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana que constitui a CB.....	36
Figura 4 - Nichos das CTs na pele.....	42
Figura 5 - Participação das CTMs nas Fases do Reparo Cutâneo.....	44
Figura 6 - Esquema da produção das MCBs.....	52
Figura 7- Produção das MCBs Utilizadas para Caracterização Nanoestrutural	55
Figura 8 - Procedimento Cirúrgico Realizado em Camundongos da Linhagem C57BL/6	62
Figura 9 - Parâmetros Macroscópicos e Microscópicos Avaliados Através de Histologia	64
Figura 10 - Medições da Espessura do Tecido de Granulação.....	65
Figura 11- Contagem de Vasos Sanguíneos e Comprimento da Cicatriz	66
Figura 12- Caracterização Física das MCBs.....	71
Figura 13 - Nanoestrutura das MCBs Vistas em MEV	73
Figura 14 - Viabilidade das dCTMs Cultivadas sobre as MCBs	75
Figura 15 - Distribuição das dCTMs sobre as MCBs	76
Figura 16 - Adesão e Morfologia das dCTMs associadas às MCBs	77
Figura 17 - Manutenção do Perfil Imunofenotípico das dCTMs	78
Figura 18 - Fechamento macroscópico das lesões de pele dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos.	80
Figura 19 - Porcentagem de fechamento das lesões de pele ao longo do tempo	82
Figura 21- Formação do Tecido de Granulação, nos dia 3, 7 e 14 de	84
Figura 20 – Espessura do Tecido de Granulação	84
Figura 22 - Infiltração de macrófagos e neutrófilos	87
Figura 23 - Vascularização nas lesões cutâneas, no 7º dia pós-operatório.....	89
Figura 24 - Espessura e Homogeneidade da Epiderme	91
Figura 25 - Comprimento das cicatrizes 14 dias pós lesão	93
Figura 26 - Visão geral do potencial da ação da associação (dCTM+MCB) para o tratamento de lesões de pele.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo de algumas aplicações da Celulose Bacteriana.	37
Tabela 2 - Marcadores Utilizados na Citometria de Fluxo	59
Tabela 3 - Poros nas MCBs hidratadas	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcento
 μ l - Microlitros
 μ m - Micromêtros
Ang-1 - Angiopoietina-1
ANOVA - *Analysis of Variance*
bFGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico
CB - Celulose Bacteriana
 cm^2 - Centímetros quadrados
 CO_2 - Gás carbônico
CRA - Capacidade de Retenção de água
CTL - Controle
CTMs - Células Tronco Mesenquimais
CTs- Células-Tronco
dCTMs- Células Tronco Mesenquimais derivadas da derme
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
g - força centrífuga relativa
GL - *Gay Lussac*
HE - Hematoxilina e Eosina
HU - Hospital Universitário
L - Litros
LACERT - Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual
LAMEB - Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MCBs - Membranas de Celulose Bacteriana
MEC- Matriz Extra Celular
MEV - Microscópio eletrônico de Varredura
min - Minutos
ml - mililitros
 $M_{\text{lió}}$ - Massa da MCB liofilizada
MMPs - Metaloproteinases de Matriz Extracelular
MRDs - Matrizes de Regeneração dérmica
 $M_{\text{reabsorvida}}$ - Massa da MCB após reabsorção
MTS - [*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) 2Htetrazolium*]
 $M_{\text{úmida}}$ - Massa da MCB úmida
nm - nanômetros
 $^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

pH - Potencial Hidrogeniônico

SBF- Soro Bovino Fetal

SEM - Erro Padrão da Média

TR - Taxa de Reabsorção

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	ESTRUTURA DA PELE.....	26
1.2	LESÕES CUTÂNEAS.....	28
1.2.1	Reparo e Regeneração	29
1.2.2	Fases do Reparo Tecidual.....	30
1.3	ESTRATÉGIAS de REPARO CUTÂNEO	33
1.3.1	Curativos como Tratamentos para Lesões de Pele.....	33
1.4	POLÍMEROS DE CELULOSE BACTERIANA	35
1.4.1	Conceitos e estrutura química	35
1.4.2	Aplicações dos polímeros de CB	36
1.5	CÉLULAS-TRONCO.....	40
1.5.1	Características das CTMs e seu potencial terapêutico	42
1.6	JUSTIFICATIVA	47
2	OBJETIVOS	49
2.1	OBJETIVO GERAL	49
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	ANÁLISES IN VITRO.....	51
3.1.1	Produção de Membranas de Celulose Bacteriana (MCBs)	51
3.1.2	Medida do Peso e Espessura das MCBs	52
3.1.3	Capacidade de Retenção de Água e Taxa de Reabsorção.....	53
3.1.4	Caracterização nanoestrutural das MCBs.....	53
3.1.5	Obtenção dos fragmentos de pele	55
3.1.6	Cultura Primária e Isolamento de dCTMs	56
3.1.7	Cultura das dCTMs nas MCBs	56
3.1.7	Ensaio de viabilidade celular por MTS	57
3.1.8	Microscopia Confocal e de Varredura	58
3.1.9	Citometria de Fluxo	58
3.2.1	Animais	59
3.2.2	Procedimento Cirúrgico	60

3.2.3	Análise Macroscópica do reparo tecidual.....	63
3.2.4	Processamento das amostras para estudo histológico.....	63
3.2.4.1	Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	63
3.2.5	Análises histológicas.....	65
3.2.5.1	Determinação da Espessura do Tecido de Granulação.....	65
3.2.5.2	Avaliação da Angiogênese.....	65
3.2.5.3	Avaliação do infiltrado inflamatório.....	66
3.2.5.4	Espessura e Homogeneidade da epiderme.....	67
3.2.5.5	Determinação do Comprimento da Cicatriz.....	67
3.2.6	Análise Estatística.....	67
4	RESULTADOS.....	69
4.1	Caracterização física das MCBs.....	69
4.1.1	Peso e Espessura.....	69
4.1.2	Capacidade de Retenção de água e Taxa de Reidratação.....	69
4.1.3	Caracterização Nanoestrutural das MCBs.....	72
4.2	Biocompatibilidade e Interação entre dCTMs e MCBs.....	74
4.2.1	Viabilidade das dCTMs associadas às MCBs.....	74
4.2.2	Capacidade de Migração das dCTMs através das MCBs.....	75
4.2.3	Adesão e Morfologia das dCTMs associadas às MCBs.....	76
4.2.4	Perfil Imunofenotípico das dCTMs Associadas às MCBs.....	77
4.3	Ensaio pré-clínico: Potencial de Reparo Cutâneo.....	79
4.3.1	Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas.....	79
4.3.2	Fechamento das lesões.....	81
4.3.3	Formação do Tecido de Granulação.....	83
4.3.4	Infiltração de Neutrófilos e Macrófagos.....	86
4.3.5	Angiogênese.....	88
4.3.6	Espessura e Homogeneidade da epiderme.....	90
4.3.7	Comprimento da Cicatriz.....	92
5	DISCUSSÃO.....	95
5.1	Caracterização física das MCBs.....	96
5.2	Interação e Biocompatibilidade entre dCTMs e MCBs.....	100
5.3	As MCBs como curativos ou arcabouços.....	102

5.4	Potencial de Reparo Cutâneo da associação de dCTMs com MCBs	103
5.4.1	Avaliação dos Curativos	104
5.4.2	Fechamento das lesões cutâneas	105
5.4.3	Formação do tecido de granulação, inflamação e neovascularização	106
5.4.4	Reepitelização e cicatrização	109
6	CONCLUSÕES.....	113
7	PERSPECTIVAS.....	115
	REFERÊNCIAS	117
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	127
	APÊNDICE B - Infiltração de Células Inflamatórias	129
	APÊNDICE C - Angiogênese das lesões de pele	131
	APÊNDICE D- Características da epiderme e da cicatriz	133
	APÊNDICE E- Comprimento das cicatrizes após 14 dias	135
	ANEXO A - Aprovação Plataforma Brasil	137
	ANEXO B - Parecer CEUA (Protocolo PP00810)	139

1. INTRODUÇÃO

O estudo do processo de cicatrização de feridas parece ser tão antigo quanto a história da humanidade, assim como as tentativas de tratar as mesmas. O primeiro registro sobre tratamentos para feridas de pele data de 2100 aC, onde são descritos os procedimentos de lavar, aplicar emplastos e enfaixar feridas. Atualmente, esses procedimentos ainda constituem os princípios básicos do tratamento de feridas. Outro conceito bastante antigo, ainda utilizado hoje é a descrição dos sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor, dor, e perda de função, datada entre 42 aC - 37 dC (SHAH, 2011).

Os eventos das guerras durante a Renascença trouxeram avanços neste campo. No século XVI, as feridas dos soldados causadas por projéteis eram tratadas de modos variados, incluindo o uso de óleo fervente, utilização de ovos e óleo de rosa. Porém, foi a descoberta dos métodos antissépticos e antibióticos que levou a um grande salto no tratamento de lesões cutâneas (SHAI; MAIBACH, 2005).

Em 1862, Joseph Lister, baseando-se nas descobertas de Pasteur sobre ação microbiana, sugeriu a utilização de curativos que destruíssem a vida das "partículas flutuantes" que poderiam infeccionar as lesões. Entretanto, apenas na década de 1890 o uso de antissépticos se tornou universal, incluindo assepsia das mãos e superfícies para realização de procedimentos cirúrgicos. Mesmo assim, a mortalidade dos pacientes após estes procedimentos era elevada. Um avanço considerável nesta área foi o descobrimento dos antibióticos, no século XX, que tem importância primordial no tratamento de feridas agudas e crônicas (SHAI; MAIBACH, 2005).

Ainda no século XIX começaram os estudos histopatológicos, aumentando o conhecimento sobre como os processos complexos do reparo cutâneo ocorrem. Desse modo novos tratamentos, como a utilização de curativos úmidos (WINTER, 1962), o transplante de queratinócitos expandidos em cultura celular (RHEINWALD; GREEN, 1975) e o uso de fatores de crescimento (VAN BRUNT; KLAUSNER, 1988) foram desenvolvidos, visando acelerar e melhorar o reparo cutâneo.

Mesmo com a grande expansão nas pesquisas, problemas no reparo tecidual após traumas, cirurgias, doenças agudas ou doenças crônicas, são comuns e afetam milhões de pessoas em todo o mundo e todos os anos. Isso ocorre devido à enorme complexidade do processo de reparo tecidual e ao pouco conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Sendo assim, a busca por um tratamento eficiente e de baixo custo para auxiliar o reparo de lesões de pele é um dos principais objetivos na medicina regenerativa.

1.1 ESTRUTURA DA PELE

A pele, ou tecido cutâneo, é o maior órgão do corpo humano, sendo responsável por cerca de 16% do peso corporal dos indivíduos. Este órgão multifuncional recobre toda a superfície do corpo, protegendo-o contra a perda de água e agentes externos como micro organismos, raios solares, ações mecânicas e químicas (ALONSO; FUCHS, 2003). Outras funções ainda atribuídas à pele são: receber informações do ambiente e repassá-las ao sistema nervoso e participar da termorregulação do corpo por meio dos vasos sanguíneos, tecido adiposo e glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Estruturalmente, a pele é composta por duas porções principais, a epiderme e a derme (Figura 1). A epiderme é a camada mais externa da pele de mamíferos, formada por um epitélio multiestratificado. Essa camada, de origem ectodérmica, é composta principalmente por queratinócitos (90-95% das células), melanócitos (células pigmentares), células de Langerhans (envolvidas com o sistema imune) e de Merkel (mecanorreceptores). Os queratinócitos são organizados nas camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea, que correspondem aos seus respectivos estágios de diferenciação. O estrato córneo corresponde à camada mais externa da pele e é a maior barreira para evitar perdas de água e permeação de substâncias do ambiente, esta camada tem espessura altamente variável, indo de 15 a centenas de células, dependendo da região corporal. A espessura do estrato córneo também varia com o sexo, idade e condições patológicas. A arquitetura e o desenvolvimento da epiderme, incluindo a formação de seus apêndices são direcionados por interações celulares e parácrinas com a região da derme (HAAKE; SCOTT; HOLBROOK, 2001).

A derme, unida à epiderme por meio de fibrilas de colágeno, consiste em uma camada de espessura variável de tecido conjuntivo de origem mesodérmica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Ela proporciona flexibilidade, elasticidade e resistência à tração, protegendo o corpo de injúrias mecânicas. A derme possui uma menor quantidade de células comparada à epiderme, sendo composta principalmente de matriz extracelular (MEC) amorfa, rica em colágeno (75% de seu peso seco), glicosaminoglicanos e elastina. Nesta mesma região ainda estão

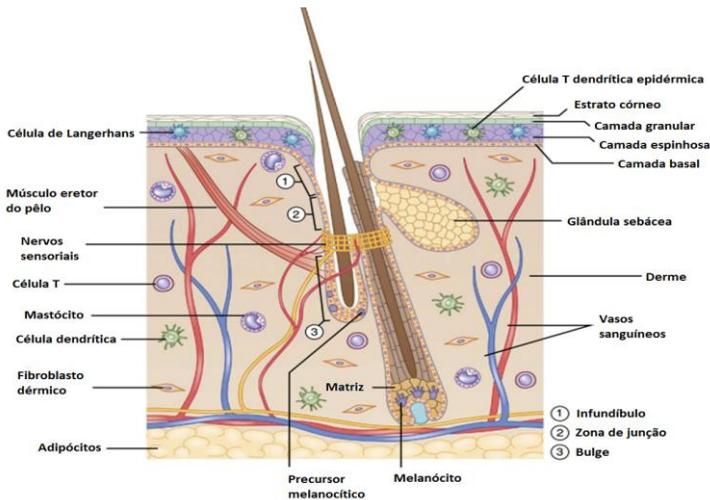
presentes vasos linfáticos, terminações nervosas e estruturas derivadas da epiderme, como folículos pilosos e glândulas sebáceas e sudoríparas (FREINKEL; WOODLEY, 2001). O componente celular mais abundante na derme são os fibroblastos, que migram através do tecido e são responsáveis pela síntese e degradação de diversas proteínas da MEC. Além dos fibroblastos, células imunes (monócitos, macrófagos e dendrócitos) e do endotélio vascular também estão presentes na derme. Esse tecido é ricamente suprido por sangue, por meio de uma densa rede de capilares, chamada de plexo dérmico (RAMOS, 2004).

A interação entre a derme e a epiderme esta envolvida no desenvolvimento dessas camadas e em processos de reparo e regeneração de lesões de pele após a ocorrência de injúrias (HAAKE; SCOTT; HOLBROOK, 2001).

Subjacente à derme, há uma camada de células adiposas, denominada tela subcutânea. Este tecido conjuntivo frouxo é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apoia, proporciona isolamento térmico e serve como reserva energética (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Tendo em vista as diferentes funções e a complexidade do tecido cutâneo, traumas que desestabilizam sua integridade, como queimaduras, úlceras e feridas crônicas, podem ocasionar desequilíbrios osmóticos, cicatrizações hipertróficas, infecções e, dependendo de sua gravidade, até mesmo a morte.

Figura 1 - Representação Esquemática da Estrutura da Pele



Fonte: Adaptado de HSU; LI; FUCHS, 2014.

1.2 LESÕES CUTÂNEAS

As lesões cutâneas podem ocorrer por doenças genéticas, traumas agudos, feridas crônicas ou mesmo por intervenções cirúrgicas (SHEVCHENKO; S. JAMES; E. JAMES, 2010). Após a ocorrência de uma lesão, uma complexa série de eventos é desencadeada, visando reestabelecer a homeostase tecidual (GROEBER *et al.*, 2011). Problemas nesses eventos afetam milhões de pessoas em todo o mundo e são geralmente relacionados a uma condição clínica subjacente, tal como doenças vasculares, diabetes e envelhecimento, as quais interferem no fechamento dessas lesões (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

As lesões de pele podem ser divididas de acordo com sua profundidade em: epidermais, dermais superficiais, dermais profundas e as que são de espessura total, atingindo todas as camadas da pele. Nos primeiros três casos, a pele tem a capacidade de fechar as lesões; já nas feridas de espessura total ou em casos de lesões crônicas, outros

tratamentos são essenciais para que ocorra o fechamento ou um melhor prognóstico dos pacientes afetados (GROEBER *et al.*, 2011).

Devido às múltiplas causas que levam a lesões de pele, não há uma estatística global bem definida que considere o número de pessoas afetadas e os custos necessários para os tratamentos (CLARK; GHOSH; TONNESEN, 2007; SEN *et al.*, 2009). Alguns números demonstram a ocorrência de cerca de 100 milhões de casos de lesões de pele com cicatrizes todos os anos, considerando apenas os países desenvolvidos (BAYAT; MCGROUTHER; FERGUSON, 2003).

Além de afetar diretamente a saúde do paciente, as lesões de pele são refletidas em grandes gastos econômicos. Como exemplo, podemos citar os EUA, onde cerca de 6,5 milhões de pessoas sofrem com feridas crônicas, o que leva a um gasto anual de 25 bilhões de dólares para o devido tratamento. Segundo Sen *et al.* (2009), a previsão de gastos com medicamentos para o tratamento de cicatrizes em 2010 foi de aproximadamente 15,3 bilhões de dólares (SEN *et al.*, 2009). No Brasil as estatísticas são escassas, porém é estimado que, apenas as queimaduras, sejam responsáveis por mais de 1 milhão de acidentes por ano (ODELL, *et al.*, 2012). Destes, 200 mil são atendidos em serviços de emergência e 40 mil demandam hospitalização (TAVARES *et al.*, 2011).

1.2.1 Reparo e Regeneração

O processo de fechamento de uma lesão pode se dar por duas vias: a regeneração ou o reparo. A regeneração consiste em uma resposta na qual o tecido neoformado recapitula totalmente a arquitetura tecidual após a ocorrência de uma lesão, com a manutenção das propriedades mecânicas e funcionais. Esse processo ainda é pouco compreendido, porém ocorre em alguns organismos eucariontes, como salamandras, insetos, poríferos e equinodermos (GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012). Nos mamíferos há relatos escassos de processos de regeneração, porém, no ano de 2012 foi demonstrada pela primeira vez a capacidade de autotomia de pele em mamíferos (murinos *Acomys*) e a posterior regeneração total deste tecido (SEIFERT *et al.*, 2012).

Em humanos, um dos poucos processos regenerativos conhecidos ocorre nas falanges dos dedos após amputação, sendo esse processo mais frequente em crianças (SHIEH; CHENG, 2015). Curiosamente, o processo de regeneração de pele é descrito nos humanos apenas em fetos de até 24 semanas. Após esse período ocorre somente o processo de

reparo tecidual (LARSON; LONGAKER; LORENZ, 2010; LO *et al.*, 2012; YATES; HEBDA; WELLS, 2012).

O processo de reparo consiste em fechar as lesões por meio da formação de cicatrizes. Cicatrizes consistem em um aglomerado de matriz extracelular (MEC) desorganizada e, apesar de fecharem a lesão, não reconstituem características essenciais dos tecidos. No caso da pele, por exemplo, cicatrizes frequentemente apresentam ausência de elasticidade, folículos pilosos, glândulas, terminações nervosas e pigmentação (REINKE; SORG, 2012). Especula-se que a formação de um tecido cicatricial, em detrimento a um processo de regeneração, tenha surgido evolutivamente conferindo uma vantagem ao prevenir infecções por microrganismos nas feridas e evitar maiores deformações mecânicas ao tecido lesado (GURTNER *et al.*, 2008).

1.2.2 Fases do Reparo Tecidual

O reparo de lesões cutâneas consiste em uma série gradual de eventos altamente complexos, que envolvem interações entre moléculas de MEC, mediadores solúveis, células residentes do tecido e do sistema imune, entre outros (SCHULTZ *et al.*, 2011). O processo de reparo é dividido didaticamente em três fases que se sobrepõem no tempo e no espaço: inflamação, proliferação e remodelamento, as quais serão descritas a seguir.

Fase Inflamatória

A inflamação inicia imediatamente após a lesão. Nesta fase, componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e o sistema imune, previnem infecções, perda de sangue e fluidos, além de removerem células mortas. As plaquetas, atraídas para a lesão, inibem a perda de fluídos, se agregam formando um coágulo e liberam compostos que atraem células do sistema imune (neutrófilos, macrófagos e mastócitos) (**Figura 2 - A**). A degranulação das plaquetas estimula a formação de um trombo de fibrina, o qual impede a hemorragia e acumula fatores secretados pelas plaquetas e células do sistema imune. Além disso, serve como um arcabouço para a migração de células inflamatórias e epiteliais (GURTNER *et al.*, 2008; REINKE; SORG, 2012)

Fase Proliferativa

A fase proliferativa tem início dois dias após a lesão, persistindo por até dez dias, e consiste na formação de um novo tecido. Nessa fase

ocorre a reepitelização da ferida, a formação do tecido de granulação e a angiogênese (Figura 2 - B). Primeiramente, os queratinócitos das bordas das feridas migram sobre o tampão de fibrina e, juntamente com as células-tronco dos folículos e glândulas sebáceas próximas, auxiliam no processo de reepitelização (GURTNER et al., 2008).

Nesta fase ainda, ocorre a formação do tecido de granulação, com alta densidade de fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares e feixes de colágeno desorganizado, substituindo o tampão de fibrina. Os fibroblastos desse tecido produzem colágeno e outras substâncias da MEC (fibronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e ácido hialurônico). A MEC serve como um arcabouço para adesão celular, além de regular crescimento, movimento e diferenciação celular na área lesada (SCHULTZ et al., 2011).

A angiogênese ocorre através da produção de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), bFGF (fator de crescimento de fibroblastos básico) que estimulam a degradação da MEC, permitindo a proliferação e migração de células endoteliais para a vascularização da ferida.

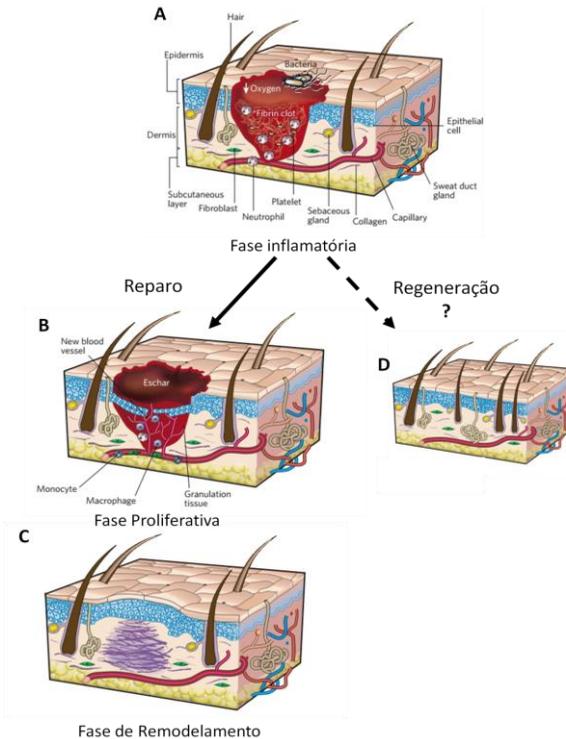
Em etapas mais tardias da fase proliferativa, os fibroblastos presentes nas bordas da lesão se diferenciam em miofibroblastos (células contráteis que tendem a fechar a ferida), que são responsáveis pelo processo de retração. Os fibroblastos ainda interagem com miofibroblastos e produzem MEC, em sua maioria formada por colágeno, que constitui a maior parte da cicatriz madura (OPALENIK; DAVIDSON, 2005).

Fase de remodelamento

O terceiro estágio – remodelamento - tem início 2 ou 3 semanas após a lesão e pode durar mais de um ano. Nesta fase, a maioria das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos presentes na ferida entram em apoptose, deixando uma massa de MEC com poucas células e muito colágeno do tipo III. Finalmente, ao longo de seis a doze meses essa MEC é remodelada com o auxílio de metaloproteinases de matriz (MMP) secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e o colágeno III é substituído por colágeno I (Figura 2 - C).

Figura 2 - Fechamento de Lesões Cutâneas.

O fechamento de lesões cutâneas em humanos ocorre através do processo de reparo, que é dividido em três fases (A), (B) e (C). A: Fase inflamatória - Inicia logo após a lesão e dura cerca de 48 h. A ferida é caracterizada por um ambiente isquêmico, os principais componentes nesse estágio são as plaquetas e o coágulo de fibrina que controlam a hemostase e iniciam o processo inflamatório. B: Fase Proliferativa - Inicia após 2 dias da lesão. As células epiteliais (em azul), migram sobre o tampão de fibrina, novos vasos sanguíneos preenchem a lesão, fibroblastos e células do sistema imune migram, formando o tecido de granulação. C: Fase de Remodelamento - Inicia 2 ou 3 semanas após a lesão e pode durar mais de um ano. Os fibroblastos que migraram para a ferida produzem uma matriz desorganizada de colágeno e ocorre contração da ferida próximo a superfície. A ferida é reepitelizada porém não há presença de anexos. D: Processo de regeneração, com presença de todos os anexos. Estudos tem buscado modos de tornar o processo de reparo semelhante a uma regeneração



1.3 ESTRATÉGIAS de REPARO CUTÂNEO

O processo de reparo, apesar de comum e eficiente para fechar feridas, normalmente resulta em cicatrizes. Estas tendem a ser mais problemáticas quando ocorrem em crianças, pois podem prejudicar o desenvolvimento das regiões afetadas, e também quando atingem articulações e locais muito visíveis, como a face, prejudicando assim a mobilidade e flexibilidade e levando a consequências psicológicas severas. O processo de cicatrização ainda pode formar cicatrizes patológicas, que podem ser proeminentes, esteticamente desagradáveis, e associadas com sintomas de dor e coceira (LO *et al.*, 2012).

A pele perde sua capacidade de reparo quando as lesões são muito extensas (mais de 4 cm de diâmetro), ou profundas, sendo necessários enxertos para tratar a área lesada. Os enxertos são normalmente realizados de forma autóloga, a partir de uma região de pele saudável dos pacientes, ou heteróloga, de outros doadores. As maiores limitações desta técnica são a dor, a formação de cicatrizes no sítio doador, feridas que não se curam, pele saudável insuficiente para cobrir grandes defeitos e até mesmo rejeição autoimune, em casos de aloenxertos (MOHD HILMI; HALIM, 2015). Além disso, após o procedimento cirúrgico, os enxertos podem não se integrar, sendo necessárias outras cirurgias. A realização de enxertos também não é possível em todos os casos, como em pacientes com queimaduras extensas ou doenças genéticas que afetam a cicatrização (GROEBER *et al.*, 2011; MACNEIL, 2007).

Devido à falta de um tratamento efetivo, estudos têm buscado aprimorar o processo de reparo cutâneo tornando-o mais semelhante ao de regeneração. Para isso são empregadas estratégias como a utilização de biomateriais, modificação do ambiente mecânico ou elétrico da ferida, administração de moléculas bioativas e células-tronco, terapia gênica, entre outras. Muitos desses tratamentos têm mostrado resultados positivos *in vitro* e *in vivo*, e a combinação deles parece ser algo promissor para o tratamento de lesões de pele (GURTNER *et al.*, 2008).

1.3.1 Curativos como Tratamentos para Lesões de Pele

As estratégias terapêuticas têm considerado o ambiente local da ferida como alvo de modificações para melhorar o reparo. Desse modo, a utilização de curativos baseados em biomateriais proporcionam um ambiente mais favorável para uma boa cicatrização pois, além de proteger a ferida de novos traumas, mantêm o local úmido e absorvem o

excesso de exsudato das lesões (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

A utilização de curativos, também denominados de emplastos, para fechar e tratar lesões de pele é relatada há séculos (SHAH, 2011; SHAI; MAIBACH, 2005). Esses curativos tinham como função principal proteger a ferida do ambiente externo, mantê-las secas e impedir traumas secundários. Essa visão do curativo como algo passivo vem mudando nas últimas décadas. Atualmente, espera-se que os curativos sejam componentes ativos do reparo tecidual, desenvolvidos para proporcionar um ambiente propício ao reparo (SULAEVA *et al.*, 2015).

O curativo ideal deve absorver o exsudato das lesões, prover isolamento térmico, manter um ambiente úmido, permitir a troca de gases, servir de barreira contra bactérias, ser facilmente aplicável e não causar injúrias secundárias ao ser retirado (JU *et al.*, 2016; SULAEVA *et al.*, 2015). Nenhum dos materiais existentes hoje é capaz de fornecer todas estas características (LAGANA; ANDERSON, 2010). Entretanto, polímeros naturais como colágeno, elastina, alginato, quitosana e hidrogéis têm despertado um grande interesse como materiais biomédicos para a confecção de curativos e na regeneração de tecidos e têm se mostrado versáteis em aplicações na engenharia de tecidos (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Entre os materiais existentes, os hidrogéis estão atualmente em destaque para o tratamento de queimaduras e feridas crônicas (KWAK *et al.*, 2015).

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais, hidrofílicas, com alta capacidade de absorção de água ou outros fluidos. Dependendo de sua composição química, podem ser estáveis quimicamente, ou se degradar e dissolver ao longo do tempo (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; FU; ZHANG; YANG, 2013a). Esses materiais apresentam características que favorecem seu uso na engenharia de tecidos e medicina regenerativa como: suporte à sobrevivência, proliferação e migração celular; controle da liberação de fatores de crescimento; difusão de nutrientes para suportar o crescimento celular; boa integração ao tecido circundante. Além disso, simulam os tecidos vivos de maneira mais eficiente do que outros biomateriais, devido ao seu alto teor de retenção de água, porosidade e consistência. Dentre os diferentes hidrogéis que vêm sendo desenvolvidos e estudados para o reparo cutâneo, estão os de celulose bacteriana (SULAEVA *et al.*, 2015).

1.4 POLÍMEROS DE CELULOSE BACTERIANA

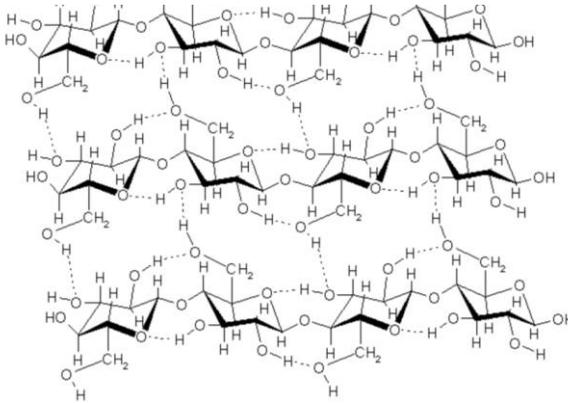
1.4.1 Conceitos e estrutura química

A celulose é o componente orgânico mais abundante na natureza, produzida principalmente por plantas mas também por outros organismos como bactérias, algas e fungos (LIN *et al.*, 2013c). A celulose bacteriana (CB) consiste em um polímero extracelular produzido por bactérias de diferentes gêneros, incluindo *Acetobacter* (renomeado como *Gluconacetobacter*), *Acanthamoeba*, *Achromobacter*, *Zoogloea*, sendo a espécie mais amplamente estudada a *Gluconacetobacter hansenii*, que consiste em uma bactéria gram negativa, estritamente aeróbica (PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

Assim como a celulose presente nas plantas, a CB é um polissacarídeo formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de β -D-glicose, unidas por ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. Essas cadeias estão orientadas paralelamente e são unidas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, como demonstrado na Figura 3. Apesar das similaridades químicas, a CB difere da celulose produzida por plantas. As fibras da CB, em comparação às fibras da celulose vegetal, são ultrafinas; além disso, as CBs são polímeros altamente puros, não apresentando em sua composição substâncias como lignina, pectina ou hemicelulose presentes na celulose derivada das plantas (LIN *et al.*, 2013c).

As bactérias *Gluconacetobacter hansenii* possuem capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono para a biossíntese de celulose. Quando cultivadas em meio de cultura adequado, de forma estática, essas bactérias produzem uma membrana de celulose bacteriana (MCB), também denominada de matriz, na superfície do meio de cultivo que está em contato com o oxigênio. O formato e o tamanho das membranas são originados de acordo com o recipiente no qual as mesmas estão sendo produzidas, já sua espessura varia com a quantidade de meio de cultura e o tempo de produção. Após tempo determinado as MCBs são submetidas a processos de lavagem e esterilização, e processadas para as aplicações desejadas (RECOUVREUX, 2008).

Figura 3 - Estrutura química da cadeia $\beta(1\rightarrow4)$ -glicana que constitui a CB.



Fonte: RECOUVREUX, 2008. Adaptado de www.sameerrahatekar.org/Cellulose_Silk_IL.html

As MCBs são classificadas como hidrogéis, pois sua estrutura interligada por pontes de hidrogênio permite a retenção de água em seu espaço intersticial formando assim, uma membrana constituída de 99% do volume total de água e apenas 1% de celulose pura (HELENIUS et al., 2006a; HUTCHENS et al., 2006). Estas vêm sendo extensivamente estudadas devido à sua natureza tridimensional, biocompatibilidade e versatilidade no processamento (ZHANG; KOHN, 2012).

1.4.2 Aplicações dos polímeros de CB

A CB possui propriedades físico-químicas adequadas a diferentes necessidades de produção e apresentam alta abundância e um baixo custo produtivo. Por essa razão, as MCBs são utilizadas em diversas áreas, como demonstrado na tabela adaptada de Lin e colaboradores, 2013 (Tabela 1). Algumas aplicações incluem: indústria alimentícia e de cosméticos, fabricação de aparelhos eletroacústicos, produção de aditivos para a fabricação de papel, criação de papel eletrônico, membranas para filtração e recuperação de óleo mineral, entre outras (RECOUVREUX, 2008; LIN, S. et al., 2013).

Tabela 1 – Resumo de algumas aplicações da Celulose Bacteriana. Aplicações relacionadas à área biomédica estão destacadas com asterisco.

Tipo	Descrição	Referências
Diafragma de alto-falante	Aplicada para processar filmes acústicos	Yamanaka and Watanabe (1994), Iguchi <i>et al.</i> (2000).
Papel composto	Aumenta a força de materiais para manufaturamento de papel	Stoica-Guzun <i>et al.</i> (2012), Grande <i>et al.</i> (2009), Winter <i>et al.</i> (2010), Cheng <i>et al.</i> (2011), Quero <i>et al.</i> (2010), Huang <i>et al.</i> (2010), Yamanaka and Watanabe (1994), Iguchi <i>et al.</i> (2000), Wu and Liu (2012), Mohammadi <i>et al.</i> (2009).
Material de Filtração	Utilizada para filtrar impurezas utilizando sua estrutura ultra-reticular	Takai (1994), Chen <i>et al.</i> (2009a, b)
Indústria Alimentícia	Fabricação de alimentos pouco calóricos, nata de coco, sorvetes e espessantes	Okiyama <i>et al.</i> (1992, 1993), Khan <i>et al.</i> (2007), Brown Jr., 1998.
Papel eletrônico	Boa condutividade elétrica quando incorporada com nanopartículas de ouro e carbono	Hu <i>et al.</i> (2011), Gutierrez <i>et al.</i> (2012), Choi <i>et al.</i> (2012), Ifuku <i>et al.</i> (2009), Sun <i>et al.</i> (2010), Kang <i>et al.</i> (2012), Shah and Brown (2005), Zhang <i>et al.</i> (2011), Nogi and Yano (2008), Legnani <i>et al.</i> (2008), Ummartyotin <i>et al.</i> (2012).
Curativo*	Aplicada como curativo devido à capacidade de retenção de água, biocompatibilidade e propriedades mecânicas	Barud <i>et al.</i> (2011), Ifuku <i>et al.</i> (2009), Winter (1962), Alvarez <i>et al.</i> (2004), Legeza <i>et al.</i> (2004), Czaja <i>et al.</i> (2006, 2007), Meftahi <i>et al.</i> (2010), Szczygielski <i>et al.</i> (2010), Maneerung <i>et al.</i> (2008), Portal <i>et al.</i> (2009), Hu <i>et al.</i> (2009), Solway <i>et al.</i> (2011), Wei <i>et al.</i> (2011), Muangman <i>et al.</i> (2011), Yang <i>et al.</i> (2012).
Veículo para transporte de drogas *	Bom carreador de drogas devido à grande retenção de água e estrutura porosa	Trovatti <i>et al.</i> (2012), Songsurang <i>et al.</i> (2011), Amin <i>et al.</i> (2012a, b), Goelzer <i>et al.</i> (2009).

<p>Vasos sanguíneos artificiais *</p>	<p>Através de alguns peptídeos de revestimento ou de tratamento químico, CB pode ser utilizada na formação de vasos sanguíneos artificiais, em engenharia de tecidos</p>	<p>Andrade <i>et al.</i> (2010), Fink <i>et al.</i> (2010, 2011), Zahedmanesh <i>et al.</i> (2011), Wippermann <i>et al.</i> (2009), Esguerra <i>et al.</i> (2010), Mohammadi <i>et al.</i> (2009), Finkenstadt and Millane (1998), Backdahl <i>et al.</i> (2006), Schumann <i>et al.</i> (2009), Backdahl <i>et al.</i> (2011), Malm <i>et al.</i> (2012).</p>
<p>Regeneração óssea *</p>	<p>Arcabouço promovendo proliferação e adesão celular através de sua estrutura porosa</p>	<p>Saska <i>et al.</i> (2011), Brackmann <i>et al.</i> (2012), Zaborowska <i>et al.</i> (2010), Fang <i>et al.</i> (2009); Shi <i>et al.</i> (2012); Saska <i>et al.</i> (2012); Cai e Kim (2010); Extremina <i>et al.</i> (2010); Zaborowska <i>et al.</i> (2010); Zimmermann <i>et al.</i> (2011).</p>
<p>Próteses para o septo nasal *</p>	<p>CB possui boa compatibilidade e pode ser implantada em organismos vivos alternada com tecidos moles como o septo nasal</p>	<p>Martinez Neto e Dolci (2010).</p>
<p>Arcabouço para imobilização celular *</p>	<p>CB pode, através de modificações químicas ou incorporações de elementos, proporcionar uma boa adesão celular</p>	<p>Andrade <i>et al.</i> (2010b), Andersson <i>et al.</i> (2010), Bodin <i>et al.</i> (2010), Pertile <i>et al.</i> (2012), Martinez <i>et al.</i> (2012), Wang <i>et al.</i> (2012), Sanchavanakit <i>et al.</i> (2006), Svensson <i>et al.</i> (2005), Watanabe <i>et al.</i> (1993), Backdahl <i>et al.</i> (2006), Kohno <i>et al.</i> (1998), Extremina <i>et al.</i> (2010), Rezaee <i>et al.</i> (2008); Ton and Le (2011b), Ton and Le (2011), Nguyen <i>et al.</i> (2009), Yao <i>et al.</i> (2011).</p>

Fonte: Traduzido e Adaptado de LIN *et al.* 2013

As MCB apresentam propriedades físico-químicas únicas, como: alta cristalinidade, resistência à tração e capacidade de absorção de água; resistência à degradação; boa permeabilidade e biocompatibilidade. Considerando essas propriedades, a CB passou a ser aplicada também na área biomédica, sendo utilizadas como curativos

para queimaduras de segundo, terceiro grau e úlceras, para a criação de micro vasos artificiais e produção de arcabouços para tecidos como cartilagens e pele (HELENIUS *et al.*, 2006a).

A utilização de MCBs para o reparo cutâneo tem sido investigada por diversos trabalhos, e apresenta resultados promissores *in vivo* e *in vitro* (FU *et al.*, 2012; KWAK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2013c). A estrutura porosa das MCBs permite que sejam transferidos antibióticos, ou outros produtos (como soluções aquosas de glicose, sacarose, etanol, NaCl, KCl, etc.) para a ferida, ao mesmo tempo em que serve como uma barreira física para fatores externos que poderiam causar infecções. Além disso, as MCBs têm a capacidade de absorver o exsudato das feridas durante sua utilização como um curativo, e são facilmente retiradas das superfícies das feridas, não causando novos traumas aos locais das lesões (FU; ZHANG; YANG, 2013b).

Dentre as características das MCB, a que se mostra mais importante para sua aplicação como um biomaterial para o reparo é sua biocompatibilidade. Estudos têm relatado que o implante de CB subcutânea em ratos Wistar, não resulta em inflamação ou rejeição ao redor dos implantes. Além disso, foi observada angiogênese em torno das CB e infiltração de fibroblastos nas mesmas (HELENIUS *et al.*, 2005).

Estudos pré-clínicos, relatados por Czaja e colaboradores (2006), concluíram que as MCB são totalmente biocompatíveis e eficientes para proteger regiões com queimaduras de excessiva perda de fluídos, além de acelerar o processo de cura nessas áreas, em modelo animal (CZAJA *et al.*, 2006a).

Estudos clínicos, com a utilização das MCBs como curativo para lesões de pele em pacientes vítimas de queimaduras ou com feridas crônicas, também têm sido relatados (FU *et al.*, 2012). Em 2009, Portal e colaboradores demonstraram que para úlceras crônicas, o tempo requerido para o fechamento de 75% da lesão, diminuiu de 315 para 81 dias com o uso de curativo de MCB. Além disso, outros estudos relataram o restabelecimento de feridas profundas na superfície facial em um paciente com queimaduras de segundo grau, com o uso MCB, sem necessidade de enxerto, ou ocorrência de cicatrizes hipertróficas (CZAJA *et al.*, 2007a).

Czaja e colaboradores (2007) demonstraram ainda, em outro teste clínico, o tratamento de pacientes de queimaduras de segundo grau, superficiais e profundas. Dentre os pacientes que receberam cobertura de MCB, nenhum apresentou hipersensibilidade aos curativos, que aderiram bem às feridas, evitando a entrada de micro-organismos. Foi

observada também a diminuição do tecido necrótico, do tempo de reepitelização e do inchaço, sem retração das feridas (CZAJA *et al.*, 2007b).

A associação de células com biomateriais vem sendo estudada como uma tentativa de auxiliar no reparo de lesões cutâneas (JEREMIAS, 2013). Nesse contexto, trabalhos *in vitro* mostram que a estrutura tridimensional da CB estimula a adesão e a proliferação celular (FU; ZHANG; YANG, 2013b). Além disso, células cultivadas sobre matrizes de CB demonstraram cerca de 95% de viabilidade, além de manter morfologias típicas (FU *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2009).

Trabalhos recentes têm associado células-tronco (CT) à MCB para o reparo de tecidos (BODIN *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA, 2012; OLYVEIRA *et al.*, 2013). Experimentos considerando a associação de um tipo específico de CT à MCB para o tratamento lesões de pele são o foco do presente trabalho.

1.5 CÉLULAS-TRONCO

As CT são caracterizadas pela capacidade de auto-renovação e pela habilidade de produzir células filhas que possam se diferenciar em tipos celulares especializados, conhecidas como progenitores. Essas células podem ser encontradas em tecidos embrionários, fetais ou adultos (SANDERS *et al.*, 2006) e, dependendo de sua origem, apresentam um distinto potencial de diferenciação celular. As CTs totipotentes, presentes até o estágio da mórula, possuem capacidade de diferenciação em todos os tecidos e anexos embrionários. As CTs pluripotentes, encontradas na massa celular interna do blastocisto, apresentam potencialidade para diferenciação em tecidos provenientes dos 3 folhetos embrionários. Já as CTs multipotentes, encontradas em tecidos adultos, apresentam potencial de diferenciação mais restrito, contribuindo para a produção de apenas algumas linhagens celulares (ALISON; ISLAM, 2009).

Os processos de auto-renovação e formação de progenitores podem ocorrer nas CTs por meio de divisões celulares simétricas, ou assimétricas, simultâneas ou não. Nas divisões simétricas, as CTs produzem células filhas que continuam a desempenhar um papel de CT (auto-renovação) ou progenitores comprometidos com uma mesma linhagem diferenciada. O processo de divisão assimétrica gera, a partir de uma CT, uma CT filha e um progenitor. O balanço entre esses dois modos de divisão é controlado por sinais durante o desenvolvimento ou fatores ambientais, e é responsável pela manutenção da população de

CTs nos tecidos, além de gerar progenitores que substituem células senescentes ou auxiliam no reparo de eventuais lesões (MORRISON; KIMBLE, 2006).

Atualmente acredita-se que todos os tecidos adultos possuem compartimentos com CTs residentes, suportadas por microambientes especializados denominados nichos. Essas CTs seriam responsáveis pela manutenção da homeostase dos tecidos ao longo da vida e auxiliariam no reparo de lesões (LI; XIE, 2005; SCADDEN, 2006). Apesar de ser clara a influência do nicho sobre as CTs, a localização anatômica destes não está clara para todos os tecidos (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008).

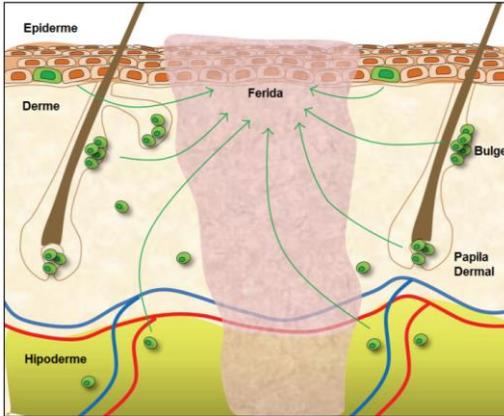
Considerando que as CTMs podem ser obtidas de diversos tecidos, a utilização da pele como uma possível fonte se mostra atraente, uma vez que este órgão possui alta taxa de proliferação celular e capacidade de se regenerar a cada duas semanas, substituindo células mortas e reparando pequenas lesões (ADOLPHE; WAINWRIGHT, 2005). Além disso, a obtenção dessas CTs seria possível a partir de pequenas biópsias, ou até mesmo de fragmentos descartados após cirurgias plásticas, permitindo um isolamento pouco invasivo e sem muitas restrições éticas (JEREMIAS, 2013; CRIGLER *et al.*, 2007)

O tecido cutâneo abriga diferentes nichos e populações de CTs, sendo o nicho epidérmico o mais amplamente descrito (HSU, 2014), porém também existem nichos na região da derme e na tela subcutânea. O nicho das CTs na epiderme encontra-se em três locais diferentes: bulge do folículo piloso, na glândula sebácea e na camada basal da epiderme. Os nichos da região dérmica ainda não são completamente compreendidos, porém estudos recentes sugerem sua localização na papila dérmica dos folículos pilosos, em regiões perivasculares e na MEC, como demonstrado na Figura 4 (WONG *et al.*, 2012).

As CTs derivadas da derme, quando isoladas em cultura celular, possuem as seguintes características: aderência ao plástico; capacidade de diferenciação *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos e marcadores de superfície mesodermiais. Estas são características também presentes em células-tronco mesenquimais (CTMs) (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012), por isso, no presente trabalho, as CTs provenientes da derme são denominadas de células-tronco mesenquimais derivadas da derme (dCTMs).

Figura 4 - Nichos das CTs na pele.

Populações de CTs (indicadas em verde) têm sido identificadas em vários nichos por toda a pele. CTs dermais podem existir na papila dérmica, na matriz extracelular ou em integração com vasos.



Fonte: Adaptado de WONG *et al.* 2012

1.5.1 Características das CTMs e seu potencial terapêutico

A existência de CT mesenquimais (CTMs), também denominadas células estromais mesenquimais, foi sugerida há 130 anos pelo patologista alemão Cohnheim, que acreditava que a medula era uma fonte de fibroblastos que contribuía para o reparo de feridas em tecidos periféricos (PROCKOP, 1997). Entretanto, o primeiro trabalho que demonstrou a existência de CTMs foi realizado em 1968 por Friedenstein e colaboradores. Neste, foram isoladas células da medula óssea de camundongos, que apresentavam capacidade de formar colônias aderentes ao plástico, morfologia fibroblastóide e capacidade de formar ossos e ambientes hematopoiéticos quando implantadas de maneira subcutânea. Seguindo protocolos semelhantes, outros grupos de pesquisa expandiram as descobertas relativas a essas células, demonstrando que elas podem sobreviver por várias passagens e se diferenciar em fenótipos mesênquimais como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (SCHIPANI; KRONENBERG, 2009).

Em adição à medula óssea, tem sido descrito o isolamento de CTMs a partir de diversos órgãos e tecidos como: gordura (ZUK; ZHU;

MIZUNO, 2001), sangue do cordão umbilical (ZHANG *et al.*, 2011), líquido amniótico (IN 'T ANKER *et al.*, 2004), placenta (MARTINI *et al.*, 2013), ligamento periodontal (COURA *et al.*, 2008), tendões e músculo esquelético (WILLIAMS IV *et al.*, 1999), sendo que a presença destas células é sugerida em todos os tecidos e órgãos (DA SILVA MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

O conhecimento atual sobre as CTMs é fundamentado principalmente na caracterização dessas células em cultura e pouco se sabe sobre suas características fenotípicas *in vivo*. Sua origem embrionária, contribuição para a organogênese, participação na homeostase dos tecidos e sua localização anatômica ainda são pouco compreendidos (SCHIPANI; KRONENBERG, 2009). Baseando-se no comportamento *in vitro* das CTMs, a *International Society for Cellular Therapy*, definiu critérios mínimos para a identificação destas células, como: proliferação; aderência ao plástico; expressão dos marcadores de membrana CD105, CD73 e CD90 e ausência da expressão de CD45, CD34 e CD14; e capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006).

Com menos de 50 anos desde sua descoberta, as CTMs, são hoje o tipo celular mais bem estudado no campo da terapia com células-tronco (TRAN; DAMASER, 2015). Isso se dá, em parte, porque as CTMs se mostram candidatas ideais para a medicina regenerativa. Elas podem ser obtidas de tecidos amplamente utilizados em procedimentos clínicos, como lipoaspirações, cirurgias de *lifting* facial, sangue do cordão umbilical, entre outros. Essas células também podem ser expandidas em cultura para fornecer quantidade suficiente para as terapias, e, além disso, possuem baixa imunogenicidade e risco de formação de tumores, (ELISSEEFF *et al.*, 2005; LAVOIE; ROSU-MYLES, 2013).

O potencial terapêutico das CTMs tem sido atribuído a três mecanismos principais de ação: restauração de lesões teciduais por meio de diferenciação multipotente; migração das células para áreas lesionadas, onde ocorre secreção de moléculas que auxiliam no reparo tecidual; e secreção de fatores com efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios. Trabalhos recentes têm demonstrado que as CTMs não tem grande sobrevida no local das lesões, mesmo apresentando resultados positivos no reparo das mesmas (EGGENHOFER *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012). De acordo com estas observações, tem se discutido que o efeito de reparo das CTMs ocorre majoritariamente devido ao seu efeito parácrino (LAVOIE; ROSU-MYLES, 2013; TRAN; DAMASER, 2015).

Em relação ao processo de reparo cutâneo, tem sido relatado que as CTMs estão envolvidas em todas as suas fases (Figura 5). Mesmo com o mecanismo de ação não muito claro, tem sido relatada uma melhora no reparo de feridas utilizando-se CTMs, através do aumento da angiogênese, reepitelização e formação do tecido de granulação. (ISAKSON *et al.*, 2015). Além disso, um dos efeitos mais reconhecidos das CTMs no reparo consiste na modulação de fatores inflamatórios, com uma diminuição da produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e $IFN\gamma$, e aumento das citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-4 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Isso demonstra um efeito parácrino importante das CTMs, que pode regular a sobrevivência, proliferação, migração e expressão gênica de células presentes nas lesões (HOCKING *et al.*, 2010). Considerando sua potencialidade e atuação, as dCTMs parecem boas candidatas para o tratamento de lesões cutâneas.

Figura 5 - Participação das CTMs nas Fases do Reparo Cutâneo



Fonte: Adaptado e traduzido de MAXSON *et al.*, 2012.

Tendo em vista a complexidade do processo de reparo cutâneo, não existem tratamentos que sejam capazes de restituir completamente o tecido lesado. Visando melhorar o processo de reparo, abordagens que associam células-tronco e biomateriais, com subsequente enxertia em tecidos lesionados, vêm sendo estudadas. Diante destas perspectivas, o presente trabalho buscou estabelecer um novo tratamento para lesões cutâneas, baseado na associação das CTMs derivadas da pele com MCBs. A escolha dessa associação se baseou nas características

promissoras nas CTMs e das MCBs, descritas na literatura, e na possibilidade de que a união desses dois componentes potencialize seus benefícios no reparo tecidual. De modo geral, a utilização deste tratamento tem o intuito de buscar um reparo mais rápido, com melhor qualidade e com menores custos de tratamento para feridas cutâneas.

1.6 JUSTIFICATIVA

Lesões de pele resultantes de doenças, acidentes ou cirurgias são consideradas um importante problema de saúde pública, porém, devido a dificuldade de estimar sua ocorrência, elas são muitas vezes subestimadas quanto a sua gravidade e epidemiologia. O fechamento dessas lesões, quando possível, ocorre através do processo de reparo, levando à formação de cicatrizes que, por sua vez podem ter consequências funcionais, estéticas e psicológicas de longa duração para os pacientes. O tratamento de cicatrizes é complexo, podendo envolver até mesmo cirurgias reparadoras, além de ser bastante oneroso.

Nos últimos 20 anos, avanços no entendimento clínico sobre lesões e sua fisiopatologia levaram a grandes inovações biomédicas para seu tratamento, incluindo a utilização de substitutos cutâneos, biomembranas e arcabouços. Estes podem ser associados a células-tronco, buscando-se melhores resultados. Apesar de vários trabalhos investigarem um método de estimular a regeneração da pele, melhorando sua qualidade e diminuindo a formação de cicatrizes, não existe ainda um tratamento que possibilite a formação de uma pele totalmente íntegra e funcional. Por isso, buscamos com este trabalho um melhor método de reparo cutâneo, associando CTMs a um biomaterial, sendo este as nanomatrizes de celulose bacteriana.

A CB é normalmente utilizada como um curativo, porém sua participação no reparo de lesões profundas não é claro. A validação de MCBs como curativos para lesões superficiais e profundas é uma alternativa, quando comparada aos altos custos financeiros provenientes de outros tratamentos de lesões de pele. Materiais de reparo já existentes no mercado apresentam preços elevados, o que inviabiliza o tratamento de todos os pacientes em necessidade. A CB, por sua vez, apresenta baixos custos de produção e poderia representar uma significativa economia para o SUS, por exemplo.

Diversos estudos que utilizaram CTMs no tratamento de lesões teciduais descrevem uma restauração estrutural e funcional dos tecidos. Esta pode se dar pela diferenciação dessas células nos fenótipos afetados ou através de sua ação parácrina. Entre as CTMs, aquelas derivadas da derme (dCTMs) parecem ser as mais adequadas para o tratamento de lesões cutâneas, já que derivam do mesmo tecido a ser tratado.

A associação de dCTMs com MCBs não foi encontrada na literatura durante a realização do presente trabalho, desse modo, ao associar essa membrana com dCTMs, visa-se diminuir o tempo de fechamento das lesões, e melhorar os resultados estéticos das cicatrizes.

O que levaria a uma melhora na qualidade de vida dos pacientes acometidos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação das CTM dermais (dCTMs) com MCBs *in vitro* e o efeito dessa associação no reparo de lesões cutâneas em ensaios pré-clínicos em modelo de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar MCBs quanto a suas características físicas (peso, espessura, capacidade de absorção de líquido, tamanho das fibras e porosidade);
- Analisar *in vitro* a biocompatibilidade e interação das dCTMs com as MCBs, avaliando a sobrevivência, adesão, morfologia e migração celular;
- Avaliar o perfil fenotípico das dCTMs associadas às MCBs, através da expressão de marcadores de superfície característicos de CTMs;
- Analisar o reparo tecidual das lesões cutâneas de espessura total em modelo pré-clínico de camundongos quanto ao fechamento, formação do tecido de granulação, recrutamento de células inflamatórias, angiogênese, espessura e homogeneidade da epiderme e tamanho da cicatriz.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANÁLISES IN VITRO

3.1.1 Produção de Membranas de Celulose Bacteriana (MCBs)

As MCBs foram desenvolvidas em parceria com o Laboratório de Polímeros e Compósitos do Centro de Engenharias da Mobilidade (Campus Joinville, UFSC), seguindo os protocolos estabelecidos por Recouvreux (2008). Para a produção destas matrizes, foi utilizada a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da Coleção da Cultura Tropical (CCT - Fundação André Tosello), Campinas – SP.

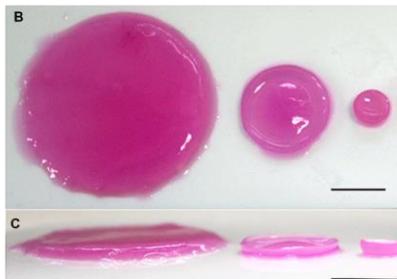
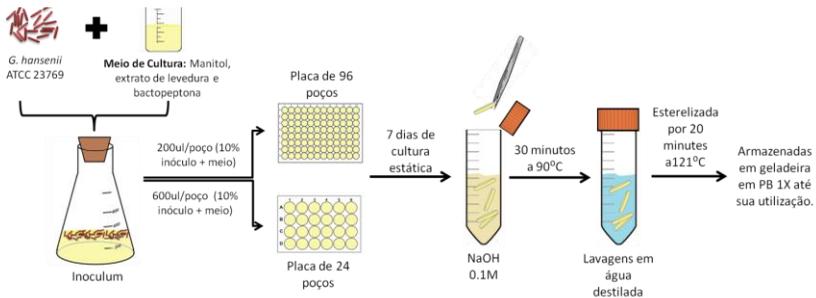
Um inóculo de bactérias foi preparado em frascos Erlenmeyer contendo 25 ml de meio de cultura composto por: 25 g de manitol (Vetec Química - Sigma-Aldrich, Brasil), 5 g de extracto de levedura (Merck, Brasil) e 3 g de bactopectona (Merck, Brasil), diluídos em 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi autoclavado a 121 °C durante 20 min. O meio foi inoculado com 10% (v/v) do estoque de bactérias e cultivado em condições estáticas, a temperatura ambiente (Figura 6).

As MCBs foram produzidas em placas de cultura de poliestireno transparente (Corning), de 24 e de 96 poços, contendo 600 e 200 uL de meio inoculado, respectivamente. Após sete dias, as MCBs sintetizadas na superfície do meio foram isoladas e tratadas com solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 M) durante 30 min a 90 °C, para remover as impurezas bacterianas e eventuais debris celulares. Em seguida, as MCBs foram lavadas com água destilada até atingir pH neutro, autoclavadas durante 20 min a 121 °C e armazenadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), a 4 °C (Figura 6). As MCBs produzidas segundo esta metodologia foram designadas neste estudo de MCBs hidratadas, e apenas a face superior destas matrizes foi utilizada para as análises propostas.

Para a realização das análises físicas e estruturais, as MCBs hidratadas foram liofilizadas durante 24h a uma pressão de vácuo e uma temperatura de condensação de -55 °C (Liofilizador L101, LioTop, Liobras, Brasil), sendo então designadas de MCBs liofilizadas.

Figura 6 - Esquema da produção das MCBs

A - Representação gráfica do processo de produção das MCBs. B e C - Imagens representativas de diferentes produções de MCBs embebidas em meio de cultivo padrão, responsável pela coloração rosa das MCBs. Da esquerda para a direita, MCBs produzidas em placas de 6, 24 e 96 poços, respectivamente. B - visão superior; C - visão lateral. Escala: 1cm.



Fonte: A Autora (2016)

3.1.2 Medida do Peso e Espessura das MCBs

A análise do peso e espessura foi realizada de forma comparativa entre as MCBs liofilizadas e hidratadas, obtidas a partir de três produções independentes (placas de 96 poços). Para determinação do peso, as MCBs foram pesadas em balança de precisão (Sartorius - Cubis), e para a análise da espessura, as mesmas foram fotografadas (Canon EOS Rebel T3i), as medições de espessura foram realizadas através do *software Image J*.

3.1.3 Capacidade de Retenção de Água e Taxa de Reabsorção

Para determinar a capacidade de retenção de água (CRA) das MCBs hidratadas (três produções independentes), estas foram retiradas de seu meio líquido, o excesso de água foi retirado e foram então pesadas imediatamente (Sartorius - Cubis), obtendo-se assim a $M_{úmida}$. As MCBs da mesma produção foram liofilizadas e pesadas obtendo-se assim a M_{lio} . A CRA das amostras foi calculada através da Equação 1 (SHEZAD *et al.*, 2010).

$$CRA = \frac{M_{úmida} - M_{lio}}{M_{lio}} \quad (1)$$

A fim de determinar a taxa de reabsorção (TR) das MCBs liofilizadas (três produções independentes), o peso seco (M_{lio}) destas foi medido e registrado. Após, essas membranas foram embebidas em 5 ml de água destilada, e seu peso foi medido novamente ($M_{reabsorvida}$) em diferentes períodos de tempo, até sua estabilização. A TR foi calculada através da Equação 2 (HUANG *et al.*, 2011).

$$TR (\%) = \frac{M_{reabsorvida} - M_{lio}}{M_{úmida} - M_{lio}} \times 100 \quad (2)$$

3.1.4 Caracterização nanoestrutural das MCBs

A fim de caracterizar a nanoestrutura das MCBs, as membranas hidratadas e liofilizadas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol JSM-6390LV). Para isso, as MCBs hidratadas foram fixadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M), contendo glutaraldeído (2,5%) (pH 7,2) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, o material foi lavado com tampão cacodilato de sódio (0,1M) (3 lavagens de 30 minutos), e desidratado em sequência de alcoóis (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). As amostras foram incubadas em cada série durante 20 minutos, sendo que a última etapa (álcool 100%) foi repetida três vezes por períodos de 30 minutos. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD 030).

As MCBs hidratadas (submetidas ao ponto crítico) e as liofilizadas foram metalizadas com cobertura de 30nm de ouro (Metalizador Sputter Leica EM SCD 500), e analisadas no MEV por captura de elétrons secundários em 10kV. Os procedimentos de ponto

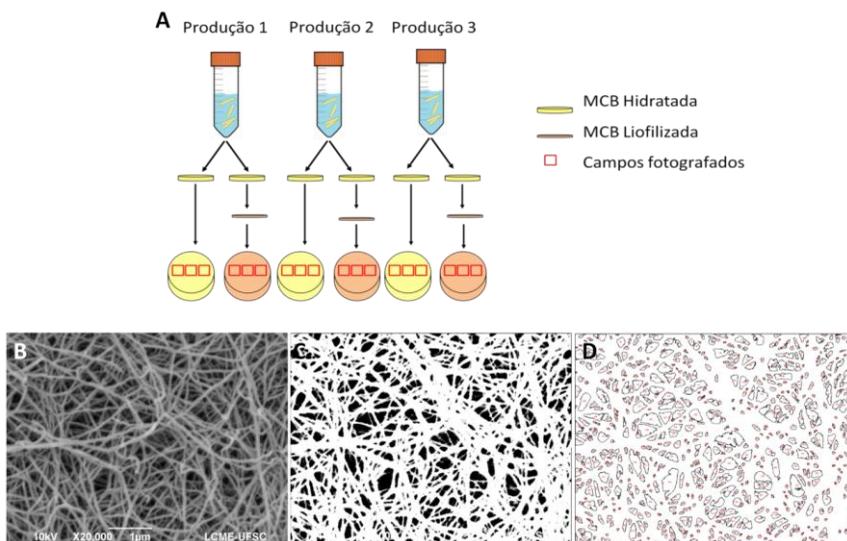
crítico, metalização e as análises no MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Três campos distintos, no aumento de 20.000x, foram fotografados em cada MCB (3 produções independentes), totalizando 9 campos analisados em MCBs liofilizadas e 9 em MCBs hidratadas (Figura 7 - A). A partir das imagens obtidas foi realizada análise da espessura das fibras. Foram realizadas 100 medições, perpendiculares ao comprimento das fibras, em cada campo utilizando o *software Image J*, totalizando 900 medidas.

As mesmas imagens foram utilizadas para análise dos poros das MCBs (Figura 7 - B). O número de poros por campo foi contabilizado como as áreas pretas das imagens após ajuste do *threshold* (Figura 7 - C), também foi calculada a área superficial ocupada pelos poros e a área média dos mesmos (Figura 7 - D). Os poros foram aproximados por círculos e seus diâmetros médios foram calculados com base em sua área média. Além disso, a porosidade das MCBs foi calculada como a porcentagem da área superficial ocupada por poros. Essas análises foram realizadas através do *software ImageJ*.

Figura 7- Produção das MCBs Utilizadas para Caracterização Nanoestrutural

A - Esquema das 3 produções independentes utilizadas para a caracterização nanoestrutural, onde parte das MCBs foi submetida a liofilização. B - Foto representativa de um dos campos fotografados das MCBs. C - Imagem modificada no *software ImageJ* mostrando em preto as áreas consideradas como poros e em branco as fibras. D - Contornos dos poros gerados automaticamente por meio do *software ImageJ*.



Fonte: A Autora (2016)

3.1.5 Obtenção dos fragmentos de pele

Os fragmentos de pele humana foram obtidos da região do couro cabeludo de pacientes submetidos a cirurgias plásticas (*lifting* facial), através de colaboração com o Hospital Universitário (HU) e com o Hospital e Maternidade Ilha. Foram utilizados os fragmentos de pele dos pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico que aceitaram doar após a apresentação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE - A).

O presente protocolo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) tendo recebido certificado de aprovação (CAAE: 37167014.9.0000.5355) do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) (ANEXO - A).

3.1.6 Cultura Primária e Isolamento de dCTMs

Os fragmentos de pele foram incubados com 12.5 U/ml de dispase (BD) durante 17 horas, a 4°C e, após este período, a epiderme e a tela subcutânea foram retiradas, assim como os pelos. O tecido dérmico foi cortado com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica em fragmentos com o menor tamanho possível (cerca de 3 milímetros), os quais foram mantidos em solução de tripsina/EDTA (BD) durante 45 minutos a 37°C. Após esse período, os fragmentos foram colocados em meio de cultura padrão composto por DMEM, 10% de Soro Bovino Fetal (SBF), estreptomicina (10µg/ml) e penicilina (200U/ml), para inibir a ação enzimática.

A suspensão foi filtrada utilizando-se um *cell strainer* (poros de 70 µm) e centrifugada por 7 minutos a 504 g. As células obtidas foram suspensas e mantidas em meio padrão, em garrafas de cultura de 25 cm², a 37°C, 5% CO₂. Após aproximadamente 5 dias, o meio de cultivo foi trocado, selecionando assim apenas as células aderentes ao plástico.

Ao atingir confluência de aproximadamente 80%, as células aderentes ao plástico foram retiradas das garrafas de cultura com a utilização de tripsina 0,25% durante 3 minutos a 37°C, após este período a ação enzimática foi inibida com meio padrão e as células centrifugadas (504 g) durante 7 minutos. As células foram então replaqueadas em novas garrafas de cultura e mantidas em meio padrão a 37°C, 5% CO₂. Esse processo foi repetido diversas vezes, sendo que cada uma delas foi contabilizada como uma passagem celular. As células do presente trabalho foram utilizadas entre as passagens 3 e 8, pois nesse intervalo as culturas são mais homogêneas e apresentam potencial proliferativo mais elevado do que passagens mais altas.

3.1.7 Cultura das dCTMs nas MCBs

Todos os experimentos de associação entre as dCTMs e as MCBs foram realizados apenas com as membranas hidratadas. Após o processo de esterilização (Figura 6), as MCBs produzidas em placas de 24 e 96 poços, foram embebidas em meio padrão por pelo menos 1 hora

antes do plaqueamento das células. Para realizar o cultivo das dCTMs, as MCBs foram posicionadas nas placas de cultivo com a face superior para cima. Nas placas de 96 e 24 poços foram plaqueadas cerca de 1×10^4 dCTMs em 20 μ l de meio padrão, e 1×10^5 dCTMs em 35 μ l de meio padrão, respectivamente. Após 1 hora, as placas de 96 poços foram completadas com mais 180 μ l de meio padrão e as placas de 24 poços com mais 250 μ l de meio padrão.

3.1.7 Ensaio de viabilidade celular por MTS

A viabilidade das dCTMs cultivadas sobre as matrizes de CB foi avaliada por meio do ensaio de MTS (Promega) [(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolium)]. O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução deste composto em um produto cromogênico de cor púrpura, solúvel em meio de cultura (formazan). A biorredução do MTS é realizada por enzimas mitocondriais: quanto maior a atividade mitocondrial, maior a produção de cristais de formazan. A mudança de coloração do meio é diretamente proporcional à atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Desta forma, a leitura da absorbância desta solução, mensurada por espectrofotometria, será proporcional à atividade mitocondrial.

Para isso, foram plaqueadas 1×10^4 dCTMs nas MCBs produzidas em placas de 96 poços e a absorbância, a 490 nm, foi mensurada nos dias 1, 4, 7, 14 e 21, após o plaqueamento. Em cada um desses dias, as dCTMs cultivadas nas MCBs foram incubadas com MTS dissolvido em DMEM suplementado com 10% de SBF, por 3 horas, em estufa a 37°, 5% CO₂. Para evitar interferências das células que tenham aderido ao plástico, as MCBs foram transferidas para novos poços antes da incubação com MTS. Após esse período, a solução de MTS foi homogeneizada e 80 μ l do sobrenadante transferido para novos poços, nos quais foi realizada a leitura de absorbância (490 nm) em multileitora de placas (Tecan Infinite M200). Foi utilizado como controle (branco) do experimento, MCBs sem células plaqueadas sobre as mesmas. Esses procedimentos foram realizados em três experimentos independentes em triplicata e a leitura realizada no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia I (LAMEB I).

3.1.8 Microscopia Confocal e de Varredura

A análise de migração das dCTMs cultivadas através das MCBs foi realizada através de microscopia confocal. As dCTMs foram cultivadas durante 3 dias sobre as MCBs e então submetidas ao ensaio de imunofluorescência para visualização de seu citoesqueleto. Para isso, as dCTMs foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas em PBS 1 X e permeabilizadas para a análise de marcadores intracelulares (30 min, 0,25% de Triton X-100; Sigma). As células foram então incubadas com uma solução de bloqueio (PBS 1X com 5% de SBF), durante 45 min em temperatura ambiente, seguido de incubação (*overnight* a 4 °C), com o anticorpo primário anti- β -tubulina III (Promega). A marcação com β -tubulina III foi anteriormente descrita como positiva para a maioria das dCTMs (JEREMIAS *et al.*, 2014). Após 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1X, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (Alexa Fluor 488 anti-camundongo - Invitrogen), por 1 hora em temperatura ambiente. Os núcleos das células foram coradas com 4', 6-diamino-2-fenilindole (DAPI; Sigma-Aldrich). As células cultivadas sobre as MCBs foram então visualizadas por microscopia confocal (Leica DMI6000).

A fim de verificar a adesão e morfologia das dCTMs associadas às MCBs, foi empregada a técnica de MEV. Para isso as dCTMs foram cultivadas sobre as MCBs por 1, 4, 7, 14 e 21 dias e, após esse período, essas amostras passaram pelo processo de fixação, desidratação, ponto crítico e metalização como previamente descritos no item 3.1.3.

3.1.9 Citometria de Fluxo

Através da citometria de fluxo, foram analisados alguns dos antígenos de superfície tipicamente positivos nas dCTMs (CD 105, CD 90, CD 73) e marcadores hematopoiéticos, tipicamente negativos para estas células (CD34 e CD45) na população de dCTMs associadas às MCBs. Para esta caracterização, foram utilizados os anticorpos conjugados a fluorocromos (BD Biosciences) descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Marcadores Utilizados na Citometria de Fluxo

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Isotipos
Anti-CD34	PE (Ficoeritrina)	IgG1 de camundongo
Anti-CD45	FITC (Isotiocinato de fluoresceína)	IgG1 de camundongo
Anti-CD73	PE	IgG1 de camundongo
Anti-CD90	FITC	IgG1 de camundongo
Anti-CD105	PerCP (Complexo proteico clorofila peredinina)	IgG1 de camundongo
Isotipo 1	PE	IgG1 de camundongo
Isotipo 2	FITC	IgG1 de camundongo
Isotipo 3	PerCP	IgG1 de camundongo

Para a realização do ensaio, as dCTMs cultivadas no plástico (placa de cultivo) e nas MCBs foram tripsinizadas, contadas e suspensas em PBS suplementado com 10% de SBF. Em seguida, aproximadamente 2.5×10^5 células foram incubadas com os anticorpos descritos na Tabela 2, durante 1h a 4°C protegidas de luz.

Após o período de incubação das amostras, as células foram lavadas com PBS suplementado com 10% de SBF, centrifugadas a 300 G durante 5 minutos e suspensas em 200µL de PBS suplementado com 10% de SBF. Essas células foram analisadas no citômetro de fluxo FACS Calibur (BD) no LAMEB I (UFSC). Os dados foram gerados pelo software FACSDiva 6.0 e analisados pelo *Flowing Software*

3.2 ESTUDO PRÉ-CLÍNICO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REPARO TECIDUAL DA ASSOCIAÇÃO DE DCTMS COM MCBs

3.2.1 Animais

Para avaliar o potencial de reparo da associação das dCTMs com as MCBs, foram realizados estudos *in vivo* com 92 camundongos da linhagem isogênica C57BL/6 (*Mus musculus*), machos e fêmeas, com idade entre 4-6 meses e peso variando entre 22-30 gramas. Os camundongos foram obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do Laboratório de Células Tronco e Regeneração

Tecidual (LACERT) - UFSC. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob número de protocolo PP00810 (ANEXO B).

Os animais foram acondicionados em caixas individuais de plástico com maravalha, em ambiente com temperatura e umidade controladas, ciclo claro/escuro de 12 horas, ração sólida e água “ad libitum”. A utilização dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2.2 Procedimento Cirúrgico

Para a realização das cirurgias, todos os animais receberam anestesia geral (60ul/animal) com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) por via intramuscular. O animal foi considerado anestesiado quando houve perda de reflexo palpebral e de qualquer reação motora após prensão do coxim adiposo da pata dianteira. Posteriormente, foi realizada a tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear e assepsia com solução de Iodopovidona 10% e álcool 70°GL. Nesta região foi realizada uma lesão de pele de espessura total, deixando exposta a fáscia muscular. Os procedimentos cirúrgicos foram baseados no modelo experimental não contrátil descrito por Wang e colaboradores em 2013, e estão apresentados na Figura 8 (WANG *et al.*, 2013)

Um *punch* cirúrgico de 8,0 mm de diâmetro e tesoura cirúrgica foram utilizados para excisão dos fragmentos da pele. Em seguida, os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais (Figura 8 - F):

- Grupo Controle (CTL): feridas cobertas apenas com o filme transparente Tegaderm™ (3M);
- Grupo dCTM: tratamento com as dCTMs em solução salina. As dCTMs foram retiradas das garrafas de cultura, lavadas uma vez com PBS 1X, e aplicadas nas lesões com PBS1X como veículo (aproximadamente 5×10^5 células em 35 μ l de PBS1X, em cada animal);
- Grupo MCB: tratamento com as MCBs. As membranas utilizadas foram produzidas, de acordo com o item 3.1.1, em placas de 24 poços, tendo aproximadamente 1,55 cm de diâmetro;
- Grupo dCTM+MCB: tratamento com as dCTMs associadas com MCBs. Foram utilizadas MCBs

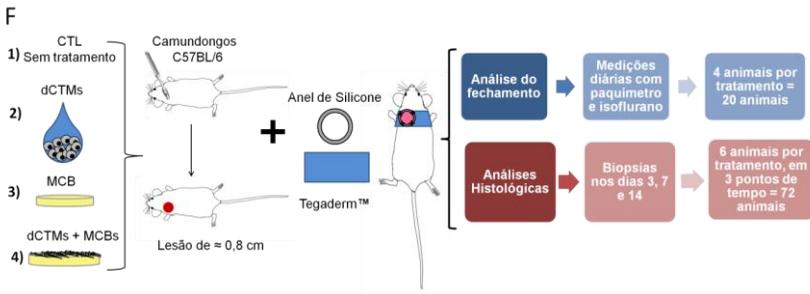
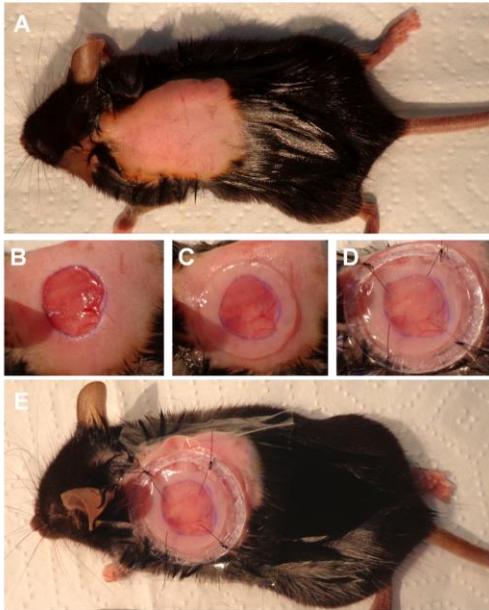
produzidas em placas de 24 poços, com dCTMs (aproximadamente 3×10^5 células) plaqueadas nas mesmas, de acordo com o item 3.1.7, por 48 horas.

Após os tratamentos, todas as lesões foram cobertas com o filme transparente Tegaderm™. Esse material consiste em um filme transparente comercial, não estéril, e impermeável a líquidos, que funciona como uma barreira à prova de água e de microorganismos com mais de 27 nm. Seu uso é indicado para fixação de equipamentos médicos, como drenos; fixação de curativos primários como gazes e esponjas; e para proteger áreas sensíveis da pele de fricções e líquidos (*Website 3M*).

Sobre os filmes de Tegaderm™ foi suturado um anel de silicone (1.7 cm de diâmetro) (Figura 8 - D), a fim de manter o curativo por mais tempo e diminuir as variações decorrentes da contração da ferida, visto que os resultados podem ser afetados pela movimentação e postura do animal.

Figura 8 - Procedimento Cirúrgico Realizado em Camundongos da Linhagem C57BL/6

(A) Procedimento de tricotomia na região dorsal; (B) Lesão dorsal de aproximadamente 0.9 mm de diâmetro; (C) Aplicação tópica das MCBs no local da lesão; (D e E) Recobrimento da lesão com o adesivo Tegaderm e sutura de um anel de silicone com 4 pontos cirúrgicos. (F) Esquema metodológico dos experimentos *in vivo*, após receberem os tratamentos os camundongos foram analisados macroscópica e histologicamente.



Fonte: A Autora (2016)

3.2.3 Análise Macroscópica do reparo tecidual

As lesões foram avaliadas macroscopicamente quanto a presença de exsudato purulento. Além disso, foram realizadas medidas da taxa de fechamento das lesões ao longo do tempo. Essas foram determinadas pela medição diária de 20 animais (5 de cada grupo, descrito no item 3.2). Os camundongos foram anestesiados por inalação de isoflurano e dois diâmetros perpendiculares foram medidos utilizando um paquímetro universal (Starrett 125 6/150). A área da lesão foi determinada a partir da seguinte fórmula: $Wa = \frac{\pi d^2}{4}$, sendo o "d" calculado a partir da média dos dois diâmetros perpendiculares. A taxa de fechamento da lesão em cada tempo foi calculada através da Equação 3.

$$\text{Fechamento da Lesão (\%)} = \frac{\text{Inicial } Wa - \text{Final } Wa}{\text{Inicial } Wa} \times 100 \quad (3)$$

3.2.4 Processamento das amostras para estudo histológico

Para análise dos parâmetros histológicos e morfométricos, os animais foram eutanasiados por inalação de CO₂ (70% em ar atmosférico com administração lenta) e foi realizada a biópsia do local da lesão, 3, 7 e 14 dias após o procedimento cirúrgico.

As biópsias foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 48 h a 4°C. Em seguida, as amostras fixadas foram desidratadas pela passagem em séries de etanol crescente (70, 90 e 100° GL), diafanizadas em xilol, incluídas em parafina e submetidas à microtomia (cortes de 5 µm) para a confecção de lâminas histológicas.

3.2.4.1 Coloração com Hematoxilina e Eosina

As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), para isso as mesmas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em série decrescente de álcool (100, 80 e 70° GL) e lavadas em água destilada. Logo após, coradas com Hematoxilina durante 3 min, lavadas com água destilada e coradas com Eosina durante 10 min. As amostras foram então desidratadas em série crescente de álcool (70, 80 e 100° GL), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan (Merk)

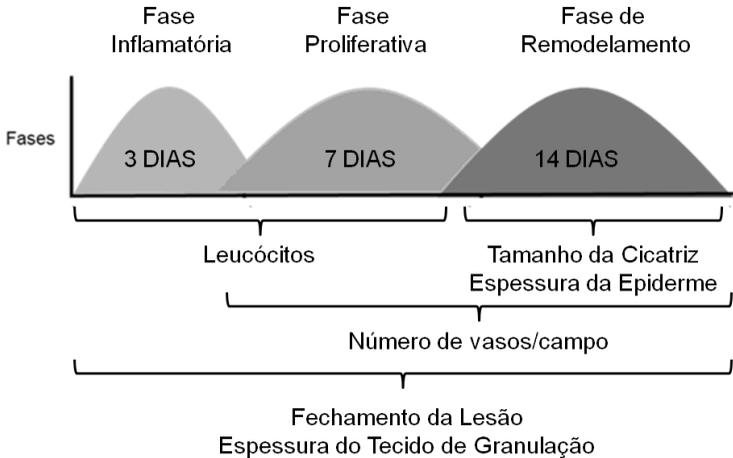
Após a coloração de HE, todas as lâminas foram escaneadas, em um aumento de 400X, utilizando um digitalizador de lâminas (Axio

Scan Z1). A partir destas imagens, foram analisados os seguintes parâmetros:

- Espessura do tecido de granulação;
- Avaliação do Infiltrado Inflamatório (densidade de leucócitos).
- Angiogênese;
- Espessura e homogeneidade da epiderme;
- Comprimento das cicatrizes;

As análises foram realizadas conforme apresentado na Figura 9: o fechamento da lesão e a espessura do tecido de granulação foram avaliados durante todo o período experimental; o número de vasos foi avaliado nos dias 7 e 14; a densidade de leucócitos foi avaliada nos dias 3 e 7; o tamanho da cicatriz e espessura da epiderme foram avaliados no dia 14.

Figura 9 - Parâmetros Macroscópicos e Microscópicos Avaliados Através de Histologia



Fonte: A Autora (2016)

As medidas relativas a todos esses parâmetros, exceto a densidade de leucócitos, foi feita com o auxílio do software ZEN 2 -

Blue edition. Todos os gráficos e análises estatísticas foram feitos utilizando-se o *software GraphPad Prism 5.*

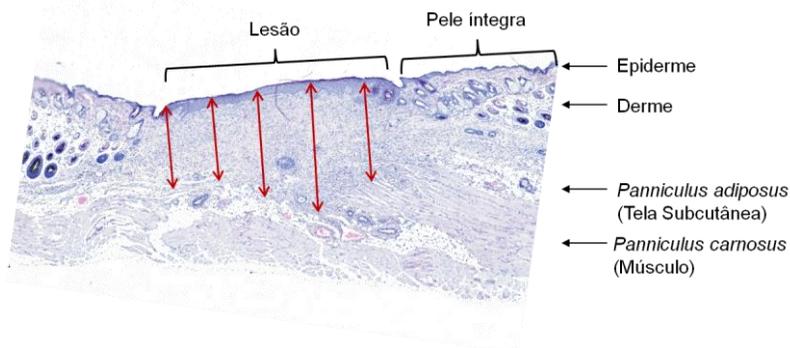
3.2.5 Análises histológicas

3.2.5.1 Determinação da Espessura do Tecido de Granulação

Para a determinação da espessura do tecido de granulação, foram medidos, em cada amostra, 5 pontos distintos ao longo de toda a lesão. Foi considerada como espessura do tecido de granulação a distância entre a epiderme e a tela subcutânea ou músculo (Figura 10). A medida do tecido de granulação de cada animal foi calculada como uma média desses 5 valores.

Figura 10 - Medições da Espessura do Tecido de Granulação

Corte histológico da lesão corado com HE, onde podem ser observadas a epiderme, derme, a tela subcutânea e o músculo. Também estão diferenciadas as áreas da lesão e pele íntegra. As setas vermelhas indicam as 5 medições lineares da espessura do tecido de granulação.



Fonte: A Autora (2016)

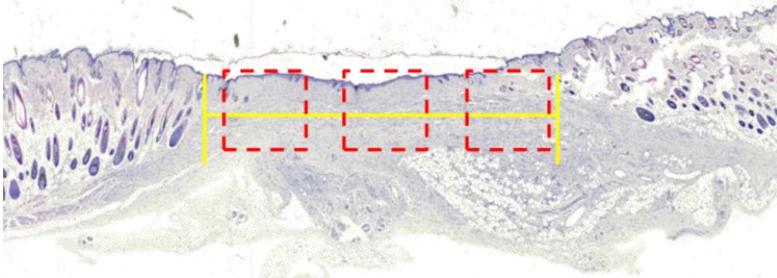
3.2.5.2 Avaliação da Angiogênese

A análise da angiogênese foi realizada a partir da contagem dos vasos presentes na região da lesão. Foram definidos e analisados de 2 a 5 campos, medindo 1100 X 700 μm (Figura 11), sendo que o número de campos variou de acordo com o tamanho da lesão. Foram contados os

vasos entre a epiderme e a tela subcutânea ou o músculo. As imagens foram analisadas no aumento de 400x e o número de vasos em cada lâmina foi calculado como uma média dos campos analisados.

Figura 11- Contagem de Vasos Sanguíneos e Comprimento da Cicatriz

Corte histológico de uma lesão de pele, após 14 dias, corado com HE. Na imagem estão destacados por quadrados vermelhos com linhas tracejadas os campos utilizados para a contagem dos vasos. A linha amarela contínua representa o comprimento da cicatriz.



Fonte: A Autora (2016)

3.2.5.3 Avaliação do infiltrado inflamatório

A infiltração de neutrófilos e macrófagos nas lesões foi classificada independentemente, em categorias de 0 a 5, sendo o 0 atribuído a lesões onde não havia células inflamatórias e 5 onde havia influxo maciço dessas células. A atribuição dos escores foi feita de forma cega em relação aos tratamentos, e considerou as características microscópicas das células em questão, como formato e disposição do núcleo, além da coloração e tamanho do citoplasma. As lâminas, dos dias 3 e 7, foram analisadas nos aumentos de 40 e 100X. Primeiramente as lâminas do dia 3 foram classificadas de 0-5 e depois as lâminas do dia 7 passaram por um novo processo de classificação. Desse modo, o número de neutrófilos e macrófagos do dia 3 não pode ser comparado com o do dia 7. Por exemplo, um score de 4 no dia sete pode representar uma infiltração maior de macrófagos do que um score 5 do dia três, pois o score foi realizado para cada dia de análise separadamente.

3.2.5.4 Espessura e Homogeneidade da epiderme

Para a determinação da espessura da epiderme, foram medidos, em cada lâmina do 14º dia, 10 pontos distintos ao longo de toda a lesão, sendo que a média foi calculada a partir destes 10 valores. Já a homogeneidade da epiderme foi definida a partir da comparação entre os desvios padrões das lâminas em relação à média inicial, sendo que as lâminas com menor desvio foram consideradas as mais homogêneas.

3.2.5.5 Determinação do Comprimento da Cicatriz

O tamanho da cicatriz foi medido no 14º dia e, para essa medida, foram consideradas as bordas da lesão como o limite do tecido cicatricial e foi traçada e mensurada uma reta (Figura 11).

3.2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram, em sua maioria, avaliados por meio de Teste T não pareado, uma vez que os grupos tratados foram comparados apenas com o grupo CTL e são independentes. Para a análise do infiltrado inflamatório, foi realizado Teste de Mann Whitney, devido a sua classificação por sistema de escores.

Algumas outras análises foram realizadas, como ANOVA de 1 via, seguido por teste de Bonferroni para o teste de MTS e análise de Kaplan-Meier para as curvas de fechamento das lesões em cada grupo

Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software estatístico *GraphPad Prism*®.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização física das MCBs

No estado hidratado, as MCBs produzidas no LACERT, de acordo com o item 3.1.1, se apresentaram como um gel translúcido possível de ser armazenado de maneira dobrada e com capacidade de voltar à conformação original. Essas membranas eram semitransparentes, bastante resistentes a trações mecânicas, e macroscopicamente homogêneas em sua face superior.

Após a liofilização das MCBs (realizada no Laboratório de Polímeros e Compósitos UFSC - Joinville), as MCBs secas possuíam coloração esbranquiçada, e se assemelhavam a uma folha de papel, porém com uma superfície com rugosidades

4.1.1 Peso e Espessura

A estrutura física das MCBs hidratadas e liofilizadas, foi caracterizada, primeiramente, pela análise do pesos e espessura das mesmas, em três produções independentes. As MCBs hidratadas, tiveram um peso médio de 54,5200 mg ($\pm 9,951$), já para as MCBs liofilizadas o peso médio foi de 0,3453 mg ($\pm 0,032$), assim, pode-se dizer que as MCBs hidratadas, pesam em média, 157.89 vezes mais do que as MCBs liofilizadas (

Figura 12 - A, B e D). Quanto às espessuras, as MCBs hidratadas apresentaram espessura média de 0,8293 mm ($\pm 0.,140$), enquanto as liofilizadas 0,154 mm ($\pm 0,012$) sendo as hidratadas 5.38X mais espessas (Figura 12 - E).

4.1.2 Capacidade de Retenção de água e Taxa de Reidratação

A CRA das MCBs hidratadas, e a TR das MCBs liofilizadas, foram medidas de acordo com a Equação 1 e 2, respectivamente descritas no item 3.1.3. A CRA das MCBs hidratadas foi de aproximadamente 157 vezes sua massa seca, ou seja, as MCBs hidratadas, carregam 156.88 vezes seu peso seco em água.

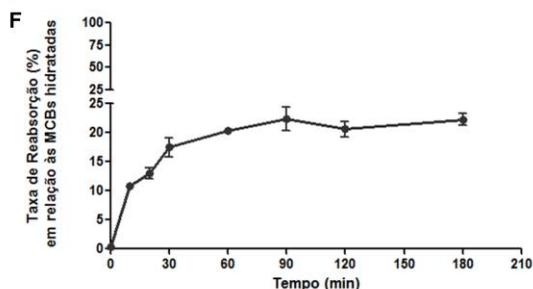
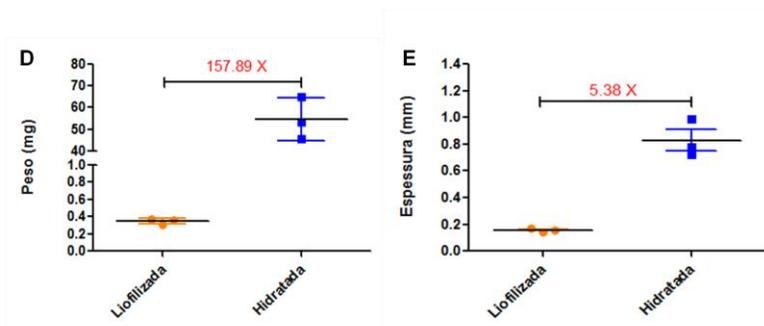
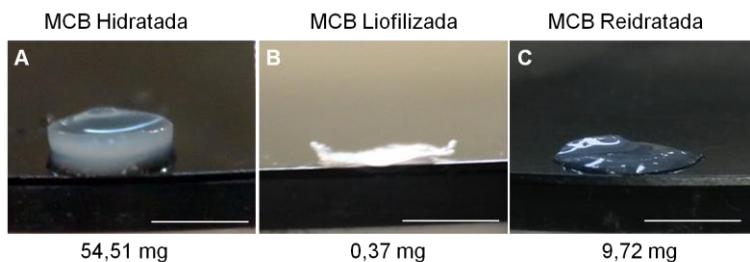
A TR das celulosas liofilizadas foi determinada em diferentes pontos de tempo até as amostras atingirem massa constante (Figura 12 - F). Os resultados obtidos mostram que, em 90 minutos, ocorreu uma grande reabsorção de água, e que após este período ocorreram pequenas

modificações na massa das MCBs reidratadas, demonstrando que a absorção máxima ocorreu neste período. Às MCBs liofilizadas apresentaram uma TR de 22,37% em relação às MCBs hidratadas, o que representou um aumento de 25 vezes em sua massa. Após atingirem sua máxima reidratação, a CRA das MCBs liofilizadas também foi calculada, resultando em 34,40 vezes seu peso seco.

Estes resultados demonstram que as MCBs hidratadas possuem alta capacidade de reter água, em relação à sua massa seca, e que as MCBs liofilizadas, mesmo tendo a capacidade de reabsorver água, não são capazes de atingirem a massa inicial das MCBs hidratadas.

Figura 12- Caracterização Física das MCBs

Imagens representativas de MCBs (A) hidratadas, (B) liofilizadas e (C) reidratadas em água destilada, com suas respectivas massas em mg. (D) Gráfico demonstrando o peso (mg) das MCBs liofilizadas e hidratadas, o peso das MCBs hidratadas foi 157,89x maior do que das liofilizadas. (E) Representação gráfica das espessuras nas MCBs liofilizadas e hidratadas. A espessura das membranas hidratadas foi 5,38x maior do que a das liofilizadas. (F) Gráfico da taxa de reabsorção das MCBs liofilizadas ao longo do tempo, a partir de 90 min não ocorreram mudanças significativas na massa das MCBs.



4.1.3 Caracterização Nanoestrutural das MCBs

A caracterização nanoestrutural das MCBs liofilizadas e hidratadas foi realizada através de MEV, pela análise das fibras e da porosidade. As MCBs hidratadas são formadas por uma grande densidade de nanofibras sobrepostas, as quais ao se entrelaçarem formam uma estrutura porosa, com poros de tamanhos variados (Figura 13 - B e D).

Já nas MCBs liofilizadas, as fibras estruturais agregaram-se e, conseqüentemente, sua porosidade foi quase nula. Estes resultados demonstram que as MCBs liofilizadas não mantiveram sua estrutura tridimensional bem conservada (Figura 13- C). Desse modo, só foi possível realizar as medidas de diâmetro das fibras e a porosidade nas MCBs hidratadas.

A espessura das fibras foi analisada a partir da medida de 900 diâmetros observados a partir das fotos de MEV, de acordo com o item 3.1.4. Os dados obtidos mostram que esta foi homogênea entre as 3 produções, apresentando uma média em torno de 61 nm ($\pm 15,77$) (Figura 13 - E). A análise da distribuição da espessura das fibras mostrou que estas variam de 21 a 118 nm de espessura, sendo que a maioria delas apresentou diâmetros entre 50 e 70 nm. Estes resultados indicam que todas as fibras se encaixaram na escala nanométrica, desse modo, as MCBs produzidas neste estudo, podem ser classificadas como nanomatrizes (Figura 13 - F).

Os poros das MCBs foram medidos a partir das mesmas imagens utilizadas para a medição das fibras, de acordo com a Figura 7. Os resultados, obtidos de acordo com o item 3.1.4, estão apresentados na Tabela 3. As produções se mostraram variáveis quanto a este parâmetro, tanto no tamanho dos poros quanto na quantidade dos mesmos em cada campo fotografado. Em média, foram contabilizados 498 poros por campo, os quais apresentaram uma área média de $0,020 \mu\text{m}^2$, e ocupavam, em conjunto, uma área de $9,115 \mu\text{m}^2$ por campo. Dessa maneira a porosidade das MCBs hidratadas foi de aproximadamente 29%.

Figura 13 - Nanoestrutura das MCBs Vistas em MEV

Imagens de MEV de MCBs liofilizadas e hidratadas. (A) Corte transversal de MCB hidratada em aumento de 25X. (B) Região central da MCB hidratada em aumento de 20.000X. (C) Face superior da MCB liofilizada, mostrando fibras agregadas e poros quase inexistentes, aumento de 20.000X (D) Face superior de MCB hidratada, onde é possível observar a estrutura tridimensional, fibras mais afastadas e poros de tamanhos variados, aumento de 20.000X. Escala: (A) 1mm; (B) (C) e (D) 1 μ m. E e F - Gráficos relativos a análise dos diâmetros das fibras das MCBs hidratadas. (E) As três produções de MCBs foram homogêneas quanto ao diâmetro das fibras, colunas representam a média dos diâmetros \pm desvio padrão. (F) O diâmetro das fibras variou entre 0.21 e 118nm, sendo a maioria delas entre 50 e 70 nm

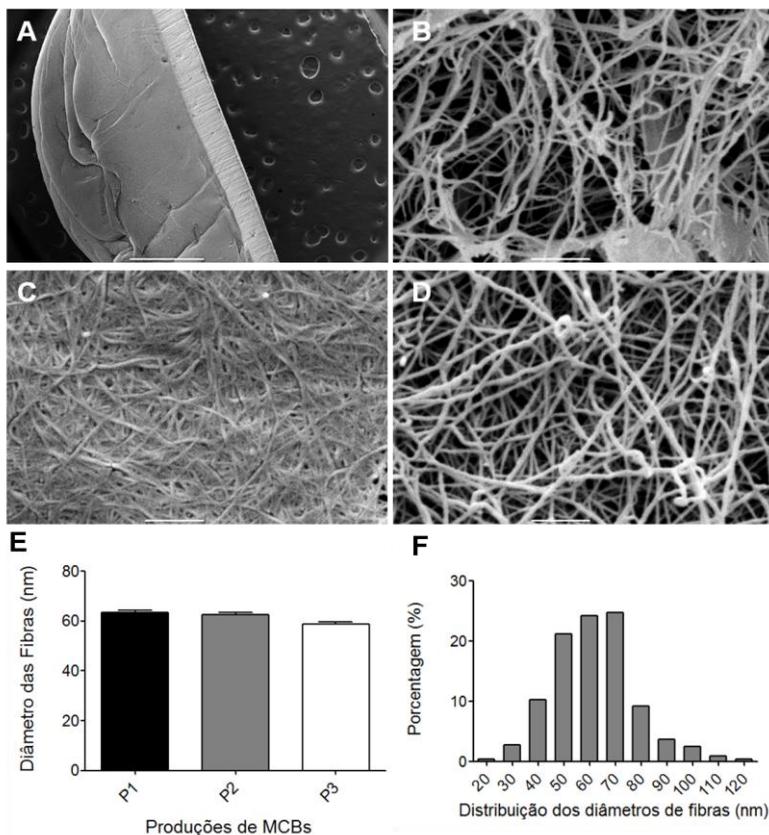


Tabela 3 - Poros nas MCBs hidratadas

	P1	P2	P3
Nº de poros/campo	589	462	444
Área total dos poros por campo (μm^2)	5,889	9,560	11,897
Área Média dos poros (μm^2)	0,010	0,021	0,028
Diâmetro médio dos poros (μm)	0,11	0,16	0,19
Porosidade (%)	18,636	30,778	37,531

4.2 Biocompatibilidade e Interação entre dCTMs e MCBs

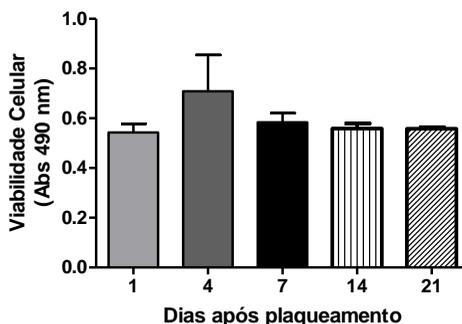
Com o intuito de estabelecer e avaliar a associação das dCTMs com MCBs foram realizadas diferentes análises *in vitro*, com o intuito de demonstrar a biocompatibilidade das MCBs. Para isso, foram conduzidos testes de viabilidade, integração, adesão e morfologia celular. As dCTMs utilizadas foram isoladas, cultivadas e caracterizadas de acordo com protocolos previamente estabelecidos no LACERT (JEREMIAS, 2013), descritos nos itens 3.1.5 e 3.1.6. Para estas análises, foram utilizadas apenas MCBs hidratadas, pois estas foram consideradas mais adequadas para os posteriores ensaios pré-clínicos devido a sua CRA e tridimensionalidade (vide discussão).

4.2.1 Viabilidade das dCTMs associadas às MCBs

Para analisar se as dCTMs permanecem viáveis após a associação com as MCBs, foi realizado o teste de MTS nos períodos de 1, 4, 7, 14 e 21 dias. Os dados obtidos mostram que não houve diferença significativa na viabilidade celular, medida pela absorbância ($P > 0.05$), nos dias analisados (Figura 14), indicando, assim, que as células mantiveram a mesma viabilidade ao longo dos 21 dias de cultivo.

Figura 14 - Viabilidade das dCTMs Cultivadas sobre as MCBs

Representação gráfica da viabilidade celular medida por MTS nos dias 1, 4, 7, 14 e 21 após plaqueamento das dCTMs nas MCBs. Valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. Nenhuma diferença significativa entre os dias de cultivo foi encontrada. Para os cálculos foram utilizados ANOVA de uma via e pós teste de Bonferroni ($P < 0.05$)

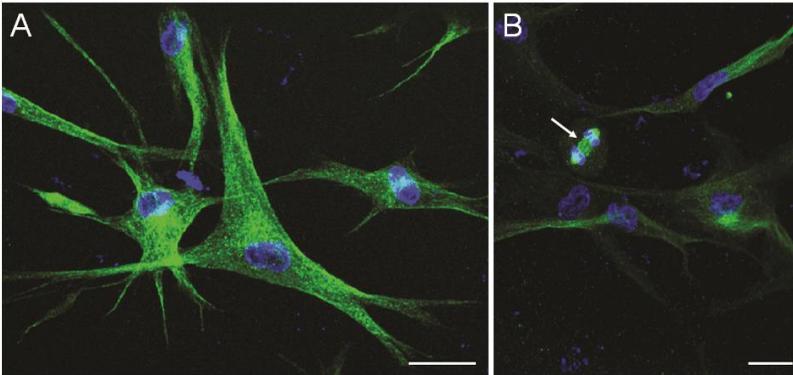


4.2.2 Capacidade de Migração das dCTMs através das MCBs

A migração das dCTMs para o interior das MCBs foi avaliada por meio de microscopia confocal após 1, 7 e 14 dias de cultivo. As imagens obtidas mostraram que, em todos os dias analisados, as dCTMs estão distribuídas apenas na superfície das MCBs, indicando que apesar de interagirem com as matrizes, não são capazes de migrar através das fibras. Os resultados demonstraram ainda que as dCTMs possuem capacidade proliferativa durante o cultivo nas MCBs, confirmada através da visualização de divisões celulares (mitose) (Figura 15).

Figura 15 - Distribuição das dCTMs sobre as MCBs

Imagens representativas de microscopia confocal das dCTMs cultivadas nas MCBs, após 4 dias de cultivo. Em azul, os núcleos corados com DAPI e em verde, o citoesqueleto corado com β -Tubulina III. (A) As células com citoplasma estrelado indicam que existe adesão com as MCBs. (B) seta indicando célula em processo de divisão celular. Escala: 25 μ m



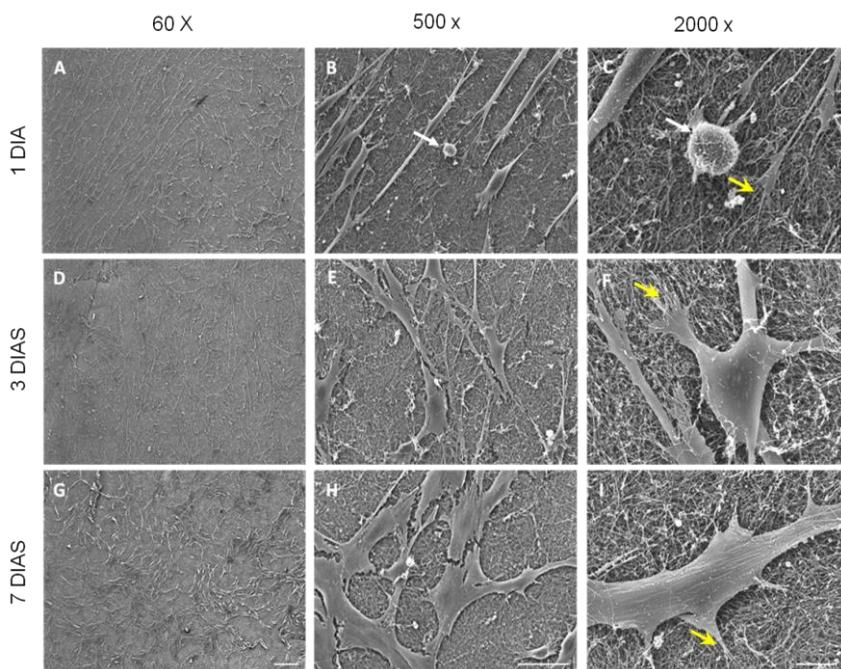
4.2.3 Adesão e Morfologia das dCTMs associadas às MCBs

Os resultados obtidos através da análise em microscópio confocal mostraram que as dCTMs são capazes de interagir com as MCBs. Assim, para avaliar com maiores detalhes esta interação, foram analisadas a adesão e a morfologia das dCTMs, através de microscopia eletrônica de varredura, após 1, 4, 7, 14 e 21 dias de cultura. As imagens obtidas mostraram que as células se distribuem de maneira uniforme na superfície das MCBs e que após 24 horas de cultivo, a maioria delas apresenta uma morfologia alongada e delgada (Figura 16 - A e B), sendo que algumas células possuem uma morfologia arredondada (Figura 16 B e C - setas brancas). Estes resultados indicam que, após 24 horas, não há adesão completa de todas as células.

Progressivamente, até o dia 7, as dCTMs apresentaram uma maior adesão às MCBs, adquiriram formato semelhante a fibroblastos e passaram a ocupar uma área maior na superfície das matrizes (Figura 16). Nos tempos de 14 e 21 dias não foram observadas mudanças na distribuição ou conformação celular em relação ao dia 7 (Imagens não demonstradas). Foi possível observar também projeções citoplasmáticas e pontos de adesão focal das células com as fibras das MCBs.

Figura 16 - Adesão e Morfologia das dCTMs associadas às MCBs

Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), em três aumentos distintos (60, 500 e 2000x). A, B e C – fotos de dCTMs após um dia de cultivo; dCTMs finas, alongadas e espaçadas; algumas células arredondadas não completamente aderidas (seta branca). D, E e F – dCTMs após 4 dias de cultivo; células com citoplasma volumoso e diversos pontos de adesão. G, H e I – dCTMs após 7 dias de cultivo; células com formato fibroblastóide, totalmente aderidas. Pontos de adesão marcados com setas amarelas. Escalas: A, D e G: 200 μ m; B, E e H: 50 μ m; C, F e I: 10 μ m



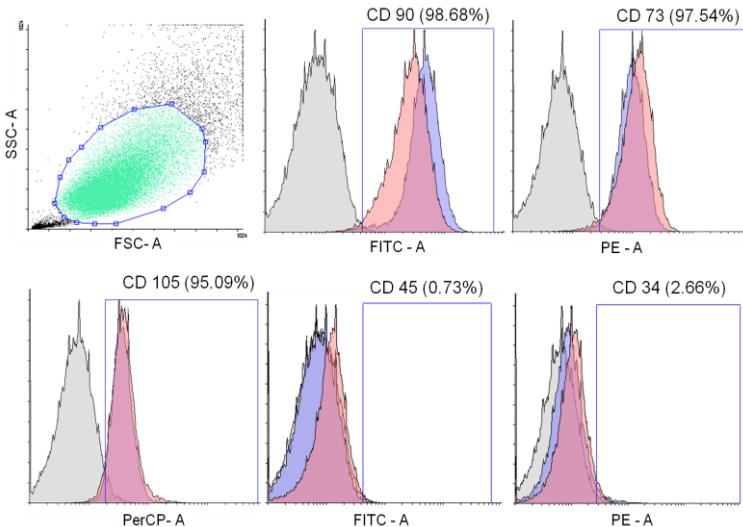
4.2.4 Perfil Imunofenotípico das dCTMs Associadas às MCBs

Com o intuito de avaliar se a interação com as MCBs altera a expressão de marcadores imunofenotípicos característicos das dCTMs, foi realizada análise por citometria de fluxo das dCTMs cultivadas sobre as MCBs e sobre plástico (cultivo padrão). Como resultado foi possível

observar que a maioria das células após a associação com as MCBs são positivas para CD 90 (98.68%), CD 73 (97.54%) e CD 105 (95.09%) e negativas para CD 45 (menos que 0.73%) e CD 34 (menos que 2.66%). Este perfil fenotípico foi semelhante ao das dCTMs cultivadas sobre o plástico, que também expressam CD 90 (98.90%), CD 73 (98.48%), CD105 (96.33%) e não expressam CD 45 (menos que 0.17%) e CD 34 (menos que 2.77 %). Ou seja, a expressão dos marcadores de superfície típicos de CTMs se manteve após o cultivo das dCTMs sobre as MCBs (Figura 17).

Figura 17 - Manutenção do Perfil Imunofenotípico das dCTMs

Representação em histogramas do perfil imunofenotípico das dCTMs submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD90-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP, CD45-FITC, CD34-PE, após 4 dias de cultivo. O pico cinza representa os controles, o pico azul representa as dCTMs em condição de cultivo padrão (plástico) e o Pico vermelho representa as dCTMs após 4 dias de cultivo nas MCBs. Porcentagens relativas às dCTMs cultivadas sobre as MCBs.



4.3 Ensaio pré-clínico: Potencial de Reparo Cutâneo.

Os resultados obtidos até o momento demonstram que as MCBs hidratadas são matrizes nanométricas e porosas, com grande quantidade de água em sua composição. As dCTMs foram associadas com sucesso a este material, que permitiu a adesão, proliferação, viabilidade e manutenção do imunofenótipo das mesmas. Considerando que a associação destes elementos pode ocasionar um melhor reparo ou a regeneração do tecido lesionado, foi investigado então o efeito terapêutico do tratamento de dCTMs associadas às MCBs em lesões cutâneas de camundongos. Para isso, foram realizadas análises macroscópicas e histológicas nos diferentes grupos experimentais: controle (CTL), apenas a MCB (MCB), apenas célula (dCTM) e a associação das dCTMs com a MCB (dCTM + MCB).

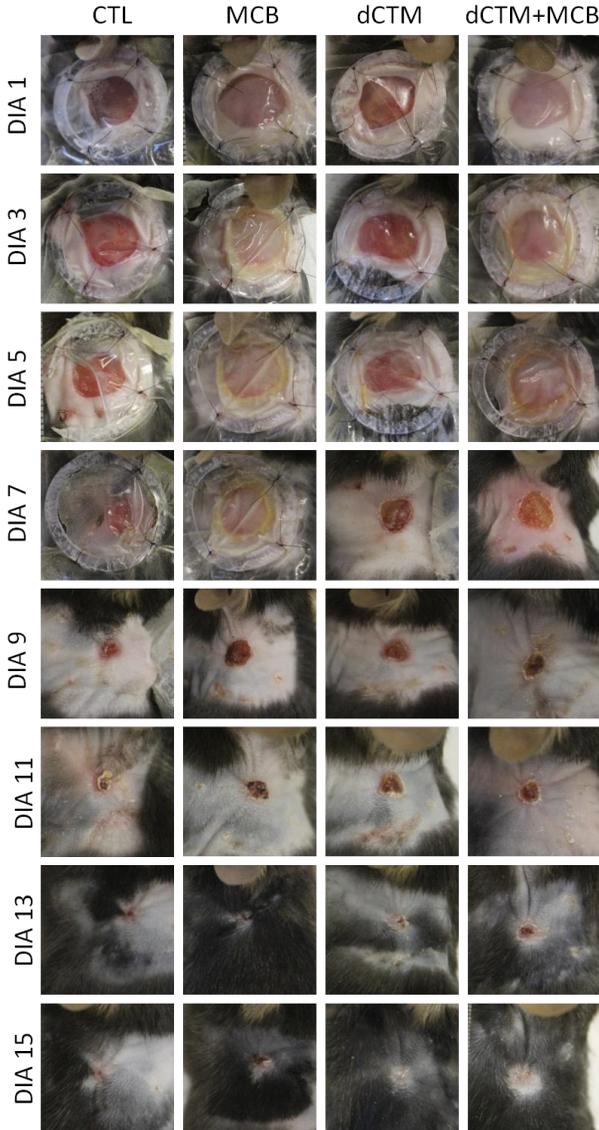
4.3.1 Aspectos macroscópicos das lesões cutâneas

Durante a análise macroscópica das lesões dos animais, desde o procedimento cirúrgico até o completo fechamento, foi observada ausência de infiltrado purulento nas lesões de todos os grupos. Nos curativos com a presença de MCBs foi observada a absorção do exsudato das feridas, o que tornou a coloração das matrizes mais opaca ao longo do tempo.

Durante o acompanhamento dos animais, os curativos caíram em períodos diferentes de tempo, entre o 5º e o 8º dia. Foi possível observar que a partir do momento em que o curativo não estava mais íntegro, ou seja, permitindo a entrada de ar, as feridas diminuam mais seus diâmetros. Em relação à cicatrização, não foi observada cicatrização hipertrófica em nenhum dos grupos analisados (Figura 18).

Figura 18 - Fechamento macroscópico das lesões de pele dos camundongos submetidos a diferentes tratamentos.

Fotos das lesões dos animais representativos em cada condição de tratamento (CTL, dCTMs, MCB, MCB+dCTMs) ao longo do tempo. Escala: 1 cm



4.3.2 Fechamento das lesões

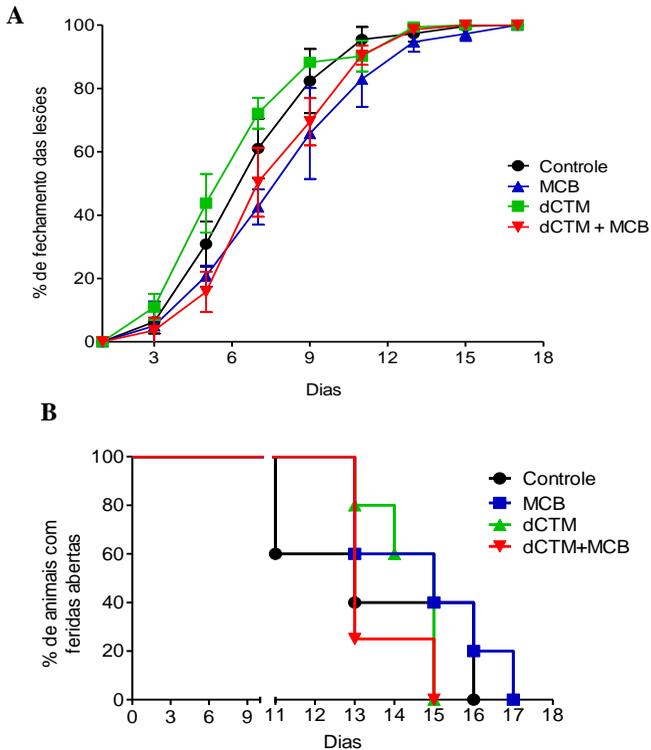
O processo de fechamento das lesões foi analisado a partir de medições das mesmas nos camundongos, em dias alternados, até seu completo fechamento. A partir das medidas geradas, foi observado que as lesões de todos os grupos apresentaram um padrão de curva de fechamento semelhante, sendo este mais acentuado a partir do 3º dia e com resolução completa entre o 11º e o 17º dia pós lesão (Figura 19 - A). As maiores diferenças no processo de fechamento foram observadas entre o 5º e o 9º dia após a lesão.

De forma geral, o fechamento mais acelerado ao longo do tempo, se deu no grupo tratado apenas com dCTMs. No dia 5, os animais do grupo CTL, MCB, dCTM e dCTM+MCB apresentaram uma média de fechamento de 30,88%, 20,75%, 43,47% e 15,76%, respectivamente. No dia 7, a média de fechamento nos grupos CTL, MCB, dCTM e dCTM+MCB foi de 61,04%, 42,57%, 72,19% e 50,36%, e no dia 9, média de fechamento nos grupos CTL, MCB, dCTM e dCTM+MCB foi de 82,34%, 65,79%, 88,25% e 69,49%, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados e o CTL (Figura 19 - A)

Em relação ao fechamento completo das lesões, os resultados obtidos mostraram que todos os animais dos grupos dCTM e dCTM+MCB estavam fechados no dia 15 pós operatório, enquanto os animais do controle levaram 16 dias e os animais tratados apenas com MCBs demoraram 17 dias para alcançarem a mesma condição (Figura 19 - B). Esta diferença pode ser observada nas imagens macroscópicas da Figura 18 (última linha), onde no dia 15, as lesões dos animais representativos do grupo CTL e MCB ainda não estão completamente fechadas. Apesar da diferença entre os grupos não ser estatisticamente significativa, os grupos tratados com dCTMs e dCTMs+MCB apresentaram um fechamento anterior aos outros grupos, sugerindo que as dCTMs possuem algum efeito durante o reparo.

Figura 19 - Porcentagem de fechamento das lesões de pele ao longo do tempo

Representação gráfica da porcentagem de fechamento das lesões de pele em quatro grupos experimentais de camundongos ao longo do tempo. (A) Linhas representando cada grupo experimental, grupo controle representado com linha preta e círculos, grupo MCB em linha azul e triângulos, grupo dCTM em linha verde e quadrados e grupo MCB+dCTM em vermelho e triângulos invertidos. Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao CTL (ANOVA de duas vias seguido por pós-teste de Bonferroni). (B) Representação gráfica do número de animais com feridas abertas ao longo do tempo, após procedimento cirúrgico, em camundongos controle (círculos, n=5), tratados com MCB (quadrados, n=5), tratados com dCTMs (triângulo, n=5), e tratados com dCTM+MCB (triângulos invertidos n=4). Não houve diferença significativa entre os grupos ($P < 0.05$, análise de Kaplan-Meier seguida por teste de log rank).



4.3.3 Formação do Tecido de Granulação

A formação do tecido de granulação durante o processo de reparo tecidual foi avaliada histologicamente, nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório. As médias da espessura desse tecido, em cada grupo experimental (n=6), são apresentadas na Figura 20 - A. Os dados mostraram que não houve diferenças significativas na espessura do tecido de granulação entre os diferentes grupos, nos dias 3, 7 e 14.

Contudo foi possível observar que, em todos os grupos, a espessura do tecido de granulação aumentou no dia 7 em relação ao dia 3, e diminuiu no dia 14 em relação ao dia 7 (Figura 20 - B). Os resultados mostram um aumento significativo de 1,91 vezes, 2,48 e 1,85 na espessura do tecido de granulação no dia 7, em relação ao dia 3, nos grupos MCB, dCTM e dCTM+MCB, respectivamente. Já no dia 14, o grupo dCTM+MCB mostrou uma diminuição significativa de 1,64 vezes em relação ao dia 7, e o grupo dCTM apresentou aumento significativo de 2,36 vezes em relação ao dia 3 (Figura 21). O grupo CTL não apresentou variações significativas na espessura do tecido de granulação ao longo do tempo.

Figura 20 – Espessura do Tecido de Granulação

(A) Tabela apresentando a espessura do tecido de granulação (em μm), dos diferentes grupos tratados nos dias 3, 7 e 14. (B) Representação gráfica da comparação da espessura do tecido de granulação. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, por ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Bonferroni.

A

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CTL	410.429	720.8762	621.8854
MCB	428.107	819.7447	673.7934
dCTM	313.604	779.0179	739.9481
dCTM+MCB	507.568	943.557	574.5265

B

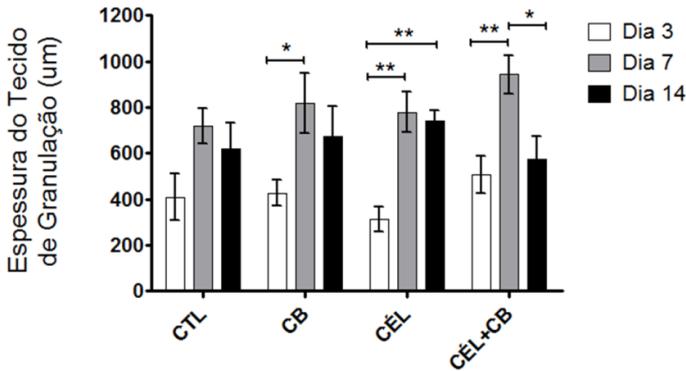
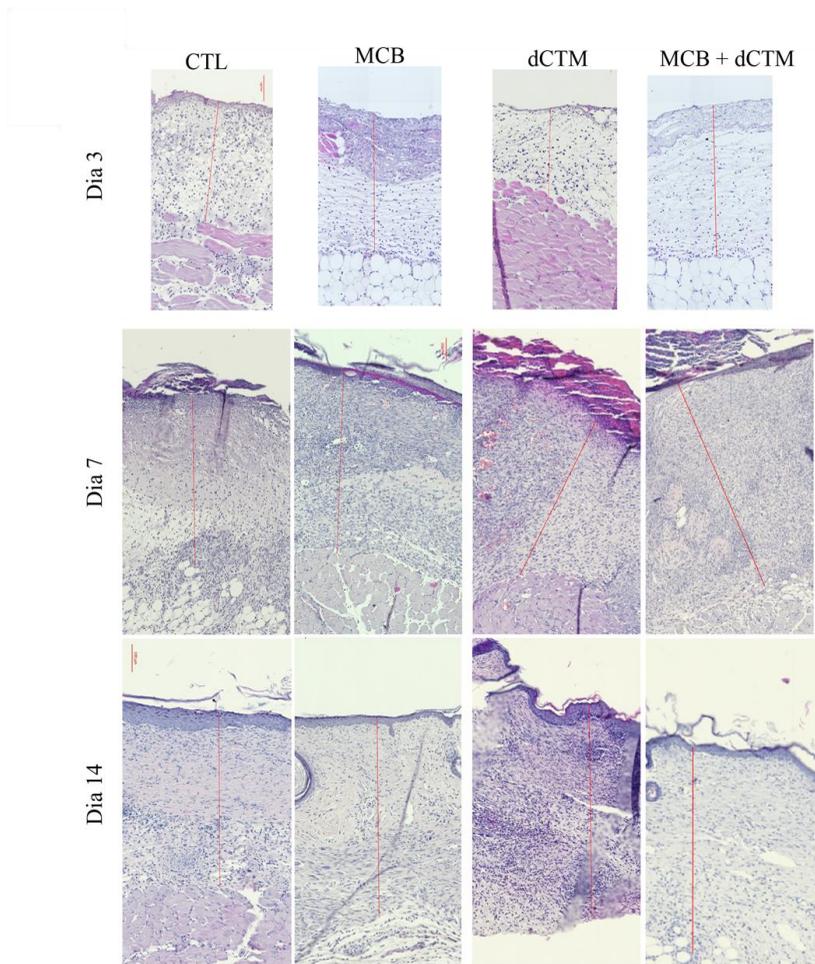


Figura 21- Formação do Tecido de Granulação, nos dia 3, 7 e 14 de Pós-operatório.

Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. Foi analisado o tecido de granulação de todos os grupos, nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório. Linha vermelha representa a espessura do tecido nos diferentes animais. Escala: 100 μ m



4.3.4 Infiltração de Neutrófilos e Macrófagos

A migração de células inflamatórias é parte essencial do processo de reparo, desse modo, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos foi avaliado nos dias 3 e 7 pós-operatório, através da análise histológica das amostras coradas com HE. Os resultados obtidos quanto à infiltração de neutrófilos, no dia 3, mostraram em todos os grupos um escore acima de 1,5, indicando a presença de um processo inflamatório (Figura 22).

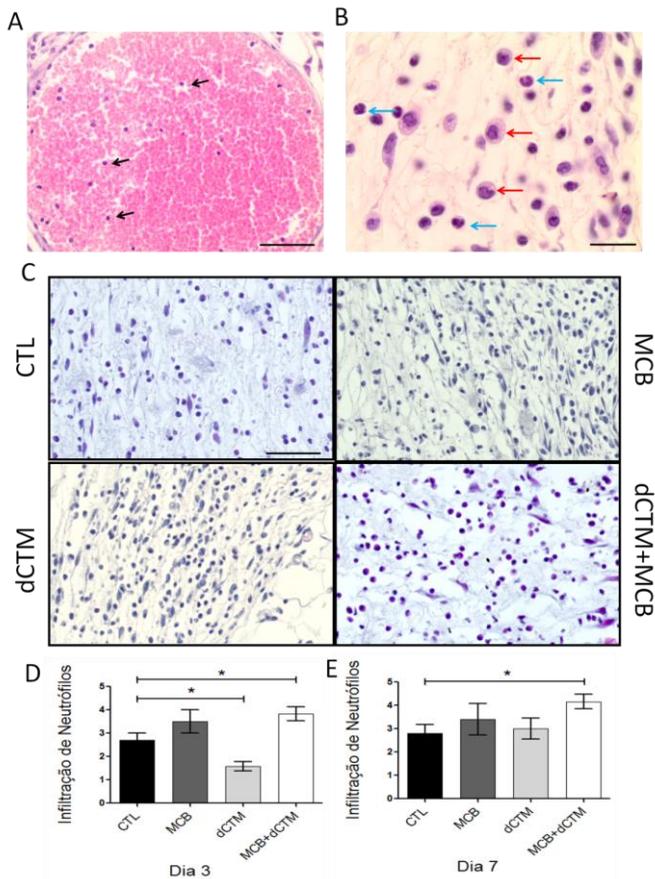
No dia 3 pós-operatório, as análises comparativas mostraram uma diminuição significativa de 1,41 vezes na infiltração de neutrófilos no grupo dCTM ($1,57 \pm 0,53$), e um aumento de 1,37 vezes no grupo dCTM+MCB ($3,83 \pm 0,75$), ambos em relação ao grupo CTL ($2,71 \pm 0,75$). Não houve diferença significativa do grupo MCB ($3,50 \pm 1,22$) em relação ao CTL. No dia 7 pós-operatório, o grupo dCTM+MCB ($4,17 \pm 0,75$) apresentou um aumento significativo de 1.49 vezes no infiltrado de neutrófilos em comparação ao grupo CTL ($2,80 \pm 0,84$). Os grupos dCTM ($3,00 \pm 1,10$) e MCB ($3,40 \pm 1,51$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao CTL.

Em relação à infiltração de macrófagos, foi observada a presença destas células em todos os grupos, no 3º e 7º dia pós-operatório, porém em nenhum dos dias houve diferenças estatísticas entre os tratamentos e o grupo CTL. No 3º dia o grupo dCTMS ($4,66 \pm 0,21$) apresentou os maiores números de macrófagos, seguido pelo grupo CTL ($4,00 \pm 1,09$), dCTM+MCB ($3,17 \pm 0,41$) e MCB ($2,83 \pm 0,54$). No dia 7, os valores entre os grupos foram mais semelhantes: CTL ($2,60 \pm 1,52$), MCB ($2,40 \pm 1,67$), dCTM ($3,00 \pm 1,26$), MCB+dCTM ($2,83 \pm 1,60$).

Esses resultados indicam que as dCTMs e as MCBs podem estar modificando o processo inflamatório por meio de modulações no recrutamento de neutrófilos. Os gráficos comparando cada grupo individualmente ao CTL podem ser consultados no apêndice B.

Figura 22 - Infiltração de macrófagos e neutrófilos

(A) Células inflamatórias chegando ao local das lesões através dos vasos sanguíneos (setas pretas), escala: 50 μm (B) Detalhe das células inflamatórias contabilizadas como macrófagos (setas vermelhas) e neutrófilos (setas azuis). Escala: 20 μm . (C) Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE. dos quatro grupos tratados, no dia 7 pós-operatório. Escala: 50 μm . (D e E) Representação gráfica da infiltração de neutrófilos nas lesões 3 e 7 dias pós lesão (n=6). Gráficos montados a partir do apêndice B * $p < 0.05$, calculado por Teste de Mann Whitney. A quantificação das células inflamatórias foi realizada por sistema escore (0-5) comparativo entre as lâminas, sendo 0 nenhum leucócito, e 5 o máximo de leucócitos encontrados. O escore das células inflamatórias não é comparável entre os dias.



4.3.5 Angiogênese

A formação de novos vasos durante o processo de reparo foi avaliada por meio de análise histológica com HE, nos dias 7 e 14 pós-operatório (Figura 23 - A).

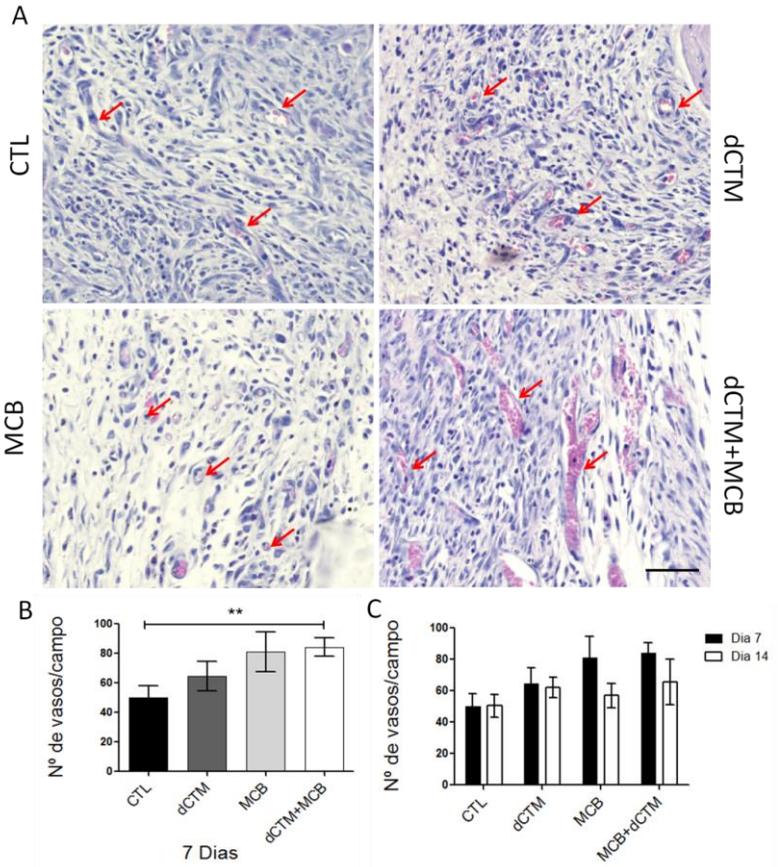
A análise dos dados obtidos mostrou que o grupo dCTM+MCB ($84.20 \pm 15,48$) apresentou um aumento significativo de 1,68 vezes no número de novos vasos, em relação ao grupo CTL ($50,17 \pm 18,85$) (Figura 23 - B). Os grupos dCTM ($64.61 \pm 24,96$) e MCB ($81.16 \pm 32,75$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao CTL. Apesar de não serem constatadas diferenças significativa no grupo MCB, o número de vasos neste grupo foi bem próximo ao grupo dCTM+MCB, sugerindo um possível efeito das MCBs no aumento do número de vasos durante o processo de reparo.

No 14º dia, as médias do número de vasos por campo foram mais semelhantes entre os grupos CTL ($50,44 \pm 16,68$), MCB ($56,86 \pm 18,91$), dCTM ($62,03 \pm 16,10$) e dCTM + MCB ($65,69 \pm 35,62$). Foi possível observar, graficamente, que em todos os grupos houve uma diminuição do número de vasos no 14º dia em relação ao 7º dia, sendo esta diminuição mais acentuada nos grupos MCB e dCTM + MCB, apesar de não ser estatisticamente significativa (Figura 23 - C).

Os gráficos comparando cada grupo individualmente ao CTL podem ser consultados no Apêndice C.

Figura 23 - Vascularização nas lesões cutâneas, no 7º dia pós-operatório.

(A) Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE nos diferentes grupos de tratamento após 7 dias da cirurgia. Setas vermelhas indicam alguns dos vasos contabilizados em cada campo (1100x700µm) Escala: 50µm (B e C) Representação gráfica, construída a partir dos gráficos do apêndice C, do número de vasos nos diferentes tratamentos após 7 e 14 dias pós-operatório. Os valores representam as médias \pm S.E.M de 6 animais por grupo. ** $p < 0.01$ calculado por Teste T não pareado.



4.3.6 Espessura e Homogeneidade da epiderme

A nova epiderme formada durante o processo de fechamento das lesões foi avaliada quanto à sua espessura (Figura 24 - A) e homogeneidade (Figura 24 - B), através da coloração com HE, após 14 dias de pós-operatório.

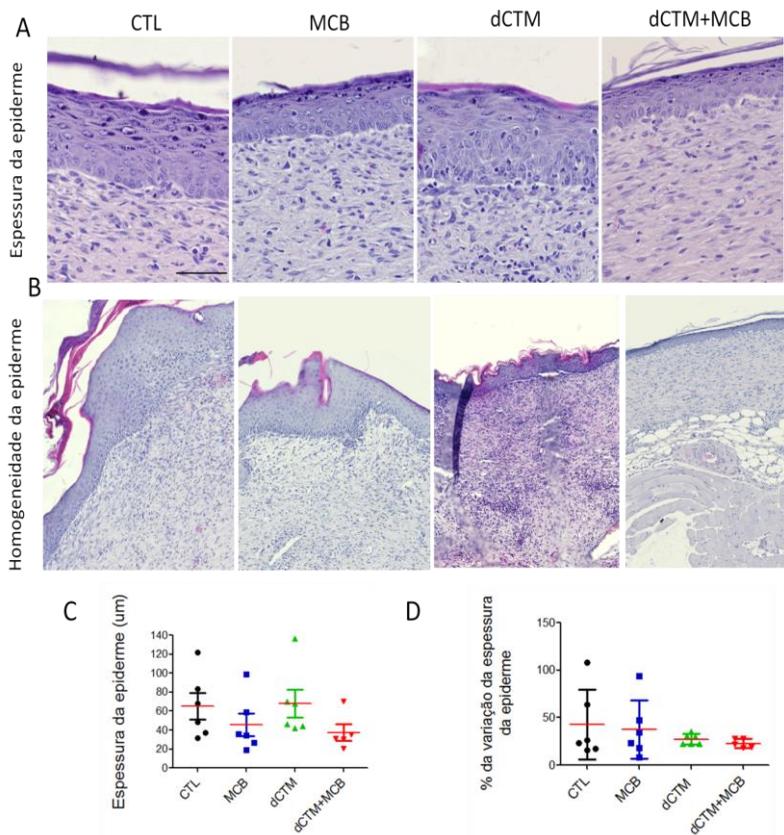
A média da espessura da epiderme para os grupos CTL e dCTM foi bastante semelhante: $65,09 \pm 33,87$ e $67,90 \pm 35,86$ μm , respectivamente. Os grupos tratados com MCB e MCB+dCTM apresentaram as menores espessuras: $45,83 \pm 29,33$ e $37,49 \pm 19,10$ μm , respectivamente. Apesar dos valores distintos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figura 24 - C).

Outro parâmetro analisado em relação à epiderme foi a sua homogeneidade, isto é, se a sua espessura é a mesma em toda a sua extensão. Para isso, foi avaliada a variação da epiderme em relação à sua espessura média. Desse modo, quanto menores os desvios, mais parecidos são os valores e mais homogênea é a amostra. Assim, na Figura 24 - D, é possível observar que as variações do grupo dCTM+MCB são menores do que dos outros grupos, e mais semelhantes entre si, sugerindo que os animais desse grupo apresentaram uma epiderme mais homogênea, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas.

Os gráficos comparando cada grupo individualmente ao CTL podem ser consultados no Apêndice D.

Figura 24 - Espessura e Homogeneidade da Epiderme

Imagens representativas de cortes histológicos corados com HE (A) Detalhe da espessura da epiderme nos 4 grupos analisados. Escala: 50 μ m. (B) Imagens demonstrando a variação da espessura da epiderme neoformada ao longo da lesão. Escala: 200 μ m. (C) Representação gráfica da espessura média da epiderme em cada grupo. (D) Gráfico demonstrando a porcentagem de variação da espessura da epiderme em cada grupo. Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o grupo CTL (teste T não pareado). Gráficos montados a partir do apêndice D.



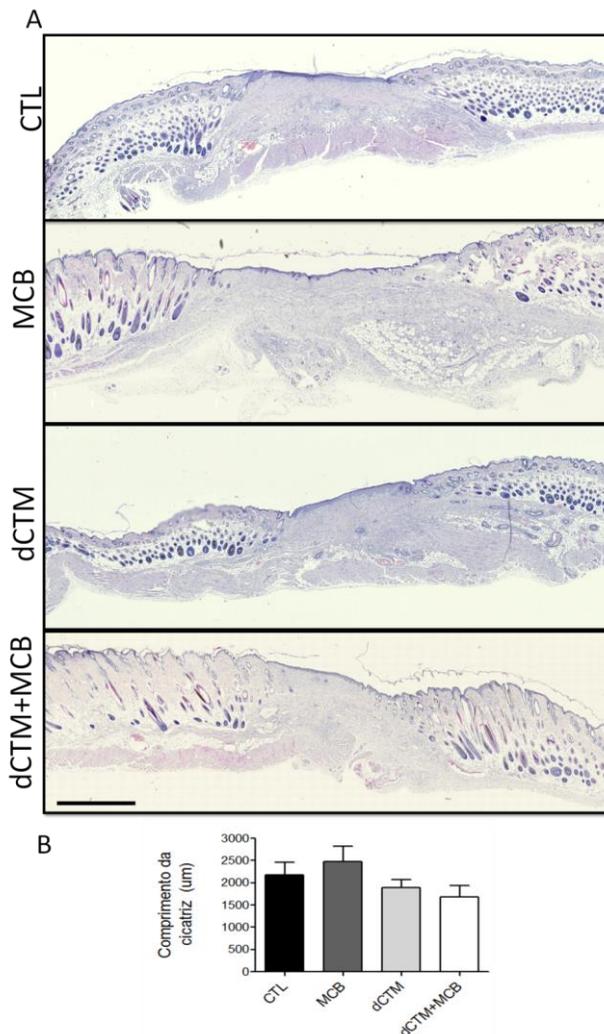
4.3.7 Comprimento da Cicatriz

Ao final do processo de reparo foi possível notar que, mesmo com todas as biópsias sendo realizadas no 14º dia pós-operatório, as cicatrizes dos animais possuíam formatos e tamanhos diferentes. Desse modo, o comprimento das cicatrizes foi mensurado a partir de lâminas coradas com HE (Figura 25 - A).

Não houve diferença estatística entre os tratamentos e o CTL, sendo que o grupo dCTM + MCB apresentou o menor comprimento $1684 \pm 618,4 \mu\text{m}$, seguido pelos grupos dCTM ($1895 \pm 419,2 \mu\text{m}$), CTL ($2175 \pm 700,8 \mu\text{m}$) e MCB ($2470 \pm 851,5 \mu\text{m}$) (Figura 25 - B).

Figura 25 - Comprimento das cicatrizes 14 dias pós lesão

(A) Imagens representativas de cortes histológicos corados com Hematoxilina/Eosina, após 14 dias de tratamento. As fotos mostram variações no comprimento das cicatrizes nos diferentes grupos analisados. Escala: 1000 μ m. (B) Representação gráfica, montada a partir dos gráficos do apêndice E, dos comprimentos da cicatriz nos diferentes grupos analisados (n=6). Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Teste T não pareado).



5. DISCUSSÃO

O processo de reparo cutâneo tem sido alvo de diversos estudos que buscam desde entender suas etapas e funcionamento (GANTWERKER; HOM, 2012; LI; CHEN; KIRSNER, 2007; MARTIN; LEIBOVICH, 2005; MARTINS; ANDRADE, 2007), até métodos de modificá-lo, tornando-o mais eficiente e com menos sequelas físicas e emocionais para os pacientes (JU *et al.*, 2016; METCALFE; FERGUSON, 2007). Para tanto, o uso de biomateriais associados a moléculas bioativas, ou células, tem sido um dos caminhos sugeridos para acelerar e melhorar o reparo (KHANBANHA *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2015)

Entre os biomateriais, as MCBs vêm se destacando no reparo ou substituição de diversas estruturas e tecidos, como vasos sanguíneos, córnea, uretra, ossos, cartilagem, válvulas cardíacas, e pele (FU; ZHANG; YANG, 2013b). Este grande interesse em sua utilização reside em suas características nanoestruturais, que conferem a estes polímeros estabilidade mecânica, flexibilidade, alta porosidade e capacidade de retenção de água, além de ser permeável a gases e líquidos (CZAJA *et al.*, 2006b). Quanto ao reparo de pele, apesar das MCBs apresentarem resultados promissores *in vitro* e *in vivo*, apenas recentemente começou-se a estudar de qual modo as MCBs estariam auxiliando no reparo de tecidos como a pele (KWAK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2013c).

Visando potencializar os efeitos das MCBs, trabalhos têm agregado CTs a estas matrizes (BODIN *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA, 2012; OLYVEIRA *et al.*, 2013). Entre as CTs, as CTMs são atrativas para o reparo tecidual pois são pouco imunogênicas e tumorigênicas (ELISSEFF *et al.*, 2005), e podem participar de processos de reparo por meio de diferenciação celular ou secreção de fatores parácrinos, agindo na migração, proliferação e sobrevivência de células nas lesões (WONG *et al.*, 2012). A derme é uma das fontes mais acessíveis de CT adultas (MACNEIL, 2007) e estas apresentam potencial para melhorar o reparo cutâneo. Em 2013, Jeremias demonstrou que a associação de dCTMs com MRDs, em lesões cutâneas de camundongos, estimula a vascularização, o depósito de colágeno e a re-epitelização, demonstrando uma relação entre as dCTMs e um reparo tecidual mais rápido (JEREMIAS, 2013).

No presente trabalho buscou-se avaliar a associação de dCTMs com MCBs, considerando os aspectos físicos do biomaterial, sua

biocompatibilidade com células tronco e o efeito dessa associação no reparo de feridas de camundongos *in vivo*.

5.1 Caracterização física das MCBs

Mesmo já sendo extensamente descritas na literatura faz-se importante a caracterização das MCBs produzidas, uma vez que pequenas variações no método de cultivo e esterilização podem modificar as características deste material (LU *et al.*, 2016; LU; JIANG, 2014; SHEYKHNAZARI *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2010). As MCBs produzidas neste trabalho, mostraram-se naturalmente hidratadas, macroscopicamente homogêneas, translúcidas, maleáveis e resistentes à manipulação. Estando essas características de acordo com a literatura (DE OLIVEIRA, 2012). Além disso, as MCBs são descritas como um biomaterial bastante hidrofílico (FU *et al.*, 2012).

Para a caracterização física, as MCBs hidratadas e liofilizadas foram analisadas segundo os seguintes parâmetros: peso, espessura, CRA, TR, espessura das fibras e porosidade das membranas. As MCBs hidratadas produzidas em placas de 96 poços, apresentaram uma média de peso de 54.52 mg e espessura média de 0.86 cm. Os pesos e espessuras das MCBs relatadas na literatura são bastante distintos pois variam de acordo com o meio de cultivo, tempo, modo de produção e recipiente de cultivo, sendo encontradas membranas com espessuras variando de 2mm (CHEN *et al.*, 2013) até 2.5 cm (LIN *et al.*, 2013b).

A propriedade das MCBs de reter grandes quantidades de líquidos é explicada através de seu método de produção pelas bactérias do gênero *Gluconacetobacter* (LIN *et al.*, 2009). Estas bactérias sintetizam as fibras de maneira extracelular, em um meio de cultivo líquido, levando à formação de diversas micelas, que aprisionam grande quantidade de líquido. Outro fator, também responsável pela hidrofiliabilidade das MCBs, é sua grande área de superfície interna, conferida pelo emaranhado de diversas fibras ultrafinas (CHEN *et al.*, 2013).

A CRA das MCBs hidratadas produzidas neste estudo mostraram que essas membranas contêm, em água, 156,88 vezes o seu peso seco. O valor encontrado está de acordo com dados da literatura, que relatam que as MCBs podem reter 100 (SHODA; SUGANO, 2005), 200 (CZAJA *et al.*, 2007b) ou até 300 vezes (SCHRECKER; GOSTOMSKI, 2005) seu peso seco em água. Essas grandes variações ocorrem devido ao método de produção ou até mesmo devido ao método de medição da CRA. Entretanto, mesmo com as variações citadas, todos os estudos

concordam que a CRA das MCBs é alta, sendo uma de suas propriedades mais importantes para aplicações médicas, como confecção de curativos e vasos artificiais (SCHRECKER; GOSTOMSKI, 2005).

A manutenção da grande CRA das MCBs exige que as mesmas sejam armazenadas em ambientes aquosos. A água é essencial à vida, sendo sua presença necessária para suportar processos metabólicos celulares, porém esse solvente também pode levar a degradação de materiais armazenados, assim como favorecer o crescimento de microorganismos que podem deteriorar os produtos (ADAMS, 2007). Desse modo, as MCBs hidratadas têm algumas limitações de armazenamento, podendo requerer conservantes ou embalagens assépticas, o que aumentaria seu custo produtivo (CHEN *et al.*, 2013). Considerando esses fatores, além de caracterizar as membranas em seu estado hidratado natural, neste estudo também foi realizada a caracterização das MCBs liofilizadas.

O processo de liofilização consiste na remoção completa de líquidos de um material por dessecação a vácuo, de modo a manter sua estrutura e composição (MATEJTSCHUK, 2007). Este procedimento é relevante por diversos fatores, por exemplo, o fato de retirar a água de materiais pode impedir que eles estraguem ou se contaminem por longos períodos de tempo. O transporte de produtos liofilizados também é facilitado uma vez que o processo pode reduzir significativamente o peso do material produzido, além do armazenamento ser realizado em ambientes secos e fechados (CHEN *et al.*, 2013). Considerando estas características, o processo de liofilização poderia trazer vantagens se aplicado nas MCBs do presente estudo.

As MCBs liofilizadas produzidas, apresentaram um peso médio 157 vezes menor do que as MCBs hidratadas, o que indica que a maior parte da massa destas membranas (99.37%) é composta de água. Após o processo de liofilização, as MCBs ficaram semelhantes a folhas de papel, achatadas e rugosas, tendo uma espessura média 5.53 vezes menor do que as MCBs hidratadas. De acordo com esses resultados é possível inferir que a água retirada desse material, durante o processo de liofilização é fator essencial para que sua conformação fosse mantida.

De modo a avaliar se as MCBs liofilizadas voltariam ao seu estado original, estas foram imersas em água, para análise do processo de reabsorção. A partir dos experimentos foi constatado que as MCBs não absorveram a mesma quantidade de água que possuíam no estado natural, apresentando uma taxa de reabsorção de apenas 22% a taxa de reabsorção encontrada é um pouco maior do que relatado na literatura,

onde esta varia entre 15 e 20% (CHEN *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2009). Além disso, a CRA destas membranas reidratadas mostrou-se inferior (34.40 vezes) ao das MCBs hidratadas (156.88 vezes). Em conjunto, estas análises nos mostram que as MCBs liofilizadas possuem uma baixa capacidade de reidratação após o processo de liofilização, não retornando a seu estado natural. A baixa TR e a baixa CRA das MCBs liofilizadas ocorrem pois, o aumento de sua cristalinidade, durante o processo de secagem, interfere com a permeação e adsorção das moléculas de água (CHEN *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2009; NAKAYAMA *et al.*, 2004).

Neste sentido, a disposição das fibras das matrizes é fator essencial para determinar a sua interação com diversos compostos, incluindo moléculas de água (SHEZAD *et al.*, 2010). As imagens obtidas através de MEV auxiliaram no entendimento dos resultados referentes a CRA e TR. Ao se comparar as membranas hidratadas e liofilizadas, foi possível observar que as hidratadas têm estrutura reticulada com fibras de celulose ultrafinas, intercaladas com poros de tamanhos variados. Já nas MCBs liofilizadas ocorreu um achatamento das fibras, que se agregaram e não permitiram a manutenção da porosidade. Em suma, as MCBs hidratadas apresentaram uma maior área de superfície, resultante da grande relação superfície/volume das nanofibras, que permite uma maior ligação de moléculas de água aos grupos hidroxil e, conseqüentemente, fornece uma grande capacidade de reter líquidos (GELIN *et al.*, 2007).

As MCBs produzidas neste estudo possuem fibras nanométricas variando entre 20 e 120 nm, semelhante à maioria os trabalhos na literatura, que relataram nanofibras entre 10-180 nm (FU; ZHANG; YANG, 2013a; SHEZAD *et al.*, 2010). Biomateriais compostos de nanofibras tendem a apresentar alta porosidade, fornecendo espaço para o alojamento celular, e permitindo uma troca mais eficiente de nutrientes e metabólitos entre o material e o ambiente no qual ele está inserido (VENUGOPAL; RAMAKRISHNA, 2005). Além de nanométricas, as MCBs apresentam a vantagem de serem polímeros naturais, com um processo de produção simples que não necessita de equipamentos como o *eletrospinnig* para sua confecção.

Quanto à análise dos poros nas MCBs hidratadas, estes apresentaram medidas muito variáveis (0,035 - 0,820 μm), tendo em média 0,16 μm . Outros estudos também indicam grande variação do tamanho dos poros em MCBs. Como exemplo pode-se citar, Zong-Liang *et al.*, 2009, que descreve as MCBs com poros variando de 0,6 μm a 2,8 μm (WANG *et al.*, 2009); e Yin *et al.*, 2015 que indica uma grande

variação no tamanho dos poros, com medidas entre 0,02 e 10 μm (YIN *et al.*, 2015). Apesar de ser descrito que condições de cultivo, como o volume do inóculo e o tempo de cultivo também influenciem a porosidade das MCBs, esse processo ainda não é completamente compreendido (TANG *et al.*, 2010).

A porosidade das MCBs foi considerada como a porcentagem de sua área superficial coberta por poros, resultando em uma média de 30%. Outros trabalhos que também utilizaram medições por imagem apresentam resultados semelhantes, com a porosidade variando entre 30-35% (PÉRTILE, 2007). Entretanto, muitos estudos relatam que as MCBs possuem porosidade mais alta, em torno de 66% (SANTOS *et al.*, 2015). Diferenças em relação à literatura também foram encontradas quanto à porosidade das MCBs liofilizadas, as quais apresentaram uma porosidade quase nula neste estudo. Existem dados na literatura que sugerem que a liofilização previne a diminuição dos poros durante a secagem (TANG *et al.*, 2010), e inclusive relatam porosidades de até 90% nas celuloses liofilizadas (WANG *et al.*, 2009). Provavelmente, as diferenças na medida da porosidade ocorreram devido ao método de medição empregado. Existem diversos métodos de medição de porosidade, sendo que muitos utilizam tecnologia de ponta e consideram toda a tridimensionalidade do material para defini-la (ESPINAL, 2012). Tendo em vista que as medidas deste estudo foram realizadas através da análise de imagem de MEV, a porosidade foi calculada com base nos poros da superfície superior e não em toda a estrutura das MCBs.

A superfície superior das MCBs possui uma rede de fibras mais densa e uma menor porosidade em relação à superfície inferior deste material (HELENIUS *et al.*, 2006b). Os poros observados nas MCBs são na verdade espaços entre as nanofibras, e nem sempre é trivial inferir quais nanofibras delimitam os poros, uma vez que em uma imagem de MEV várias camadas de nanofibras são observadas (Figura 13 - D).

É importante caracterizar fisicamente os biomateriais para que sua função esperada seja melhor prevista ou para entender sua participação nos processos em que serão aplicados. As características das MCBs hidratadas apresentadas aqui, como sua alta CRA, fibras em escala nanométrica e porosidade, são promissoras para o estudo da associação de células a estas membranas. Uma vez que as MCBs liofilizadas não mantiveram sua estrutura tridimensional, apresentaram baixa porosidade, CRA e reabsorção, os testes de associação com

células e ensaios pré-clínicos foram realizados apenas com as MCBs hidratadas.

5.2 Interação e Biocompatibilidade entre dCTMs e MCBs

É cada vez mais evidente que a composição e as propriedades mecânicas do ambiente extracelular tem participação na adesão, migração, proliferação e divisão celular, além de serem essenciais para a função e formação dos tecidos e nichos de CTs (SHIN; MOONEY, 2016). Por sua vez, as CTs demonstram alta sensibilidade ao seu ambiente extracelular (KIM *et al.*, 2013) e, em razão disso, a análise de sua interação com biomateriais é fundamental para sua aplicação na medicina regenerativa (CUKIERMAN; PANKOV; YAMADA, 2002; LUND *et al.*, 2009). No presente estudo, a interação e biocompatibilidade das dCTMs com as MCBs foi avaliada através de microscopia confocal e de varredura, e pelo ensaio de MTS.

A adesão das dCTMs nas MCBs foi observada através de imagens de MEV, sendo que após 24 horas já foi possível observar células aderidas e algumas iniciando o processo de adesão. Esse resultado vai de encontro ao artigo de Torres e colaboradores (2012), que relata a necessidade de utilização de moléculas aderentes para possibilitar a adesão celular sobre MCBs (TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012). Outros estudos na literatura relatam a adesão de diversos tipos celulares sobre MCBs como: fibroblastos e condrócitos (WANG *et al.*, 2009); CTs derivadas do tecido adiposo (DE OLIVEIRA, 2012; FU *et al.*, 2012); CTs pluripotentes induzidas (iPS) (DE OLIVEIRA, 2012), 2012); CTMs equinas derivadas de medula óssea (FAVI *et al.*, 2013); CTMs caninas derivadas de medula óssea (MENDES *et al.*, 2009); CTMs derivadas da placenta humana (HECK, 2012); entre outras. Porém, não foram encontrados relatos de trabalhos utilizando dCTMs sobre estas matrizes.

As dCTMs apresentaram extensões citoplasmáticas e fortes conexões com as matrizes. Em alguns pontos é bastante evidente a interação das células com as nanofibras. As células aderidas apresentaram morfologia fibroblastóide típica de CTMs, semelhante àquela encontrada em culturas bidimensionais (BEYER NARDI; DA SILVA MEIRELLES, 2006). A biocompatibilidade dos biomateriais está intimamente ligada com a adesão celular à sua superfície, sendo que o processo de adesão pode influenciar a capacidade das células em sobreviver, proliferar e se diferenciar (ANSELME, 2000). A adesão das dCTMs nas MCBs também deve ter sido favorecida pela alta

hidrofilicidade das membranas, já que as células geralmente se aderem mais fortemente a superfícies de materiais hidrofílicos (COLLART-DUTILLEUL *et al.*, 2014).

A análise de viabilidade celular, realizada através do ensaio de MTS, demonstrou uma manutenção da viabilidade das dCTMs associadas às MCBs. Entretanto, não houve um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo, diferente do relatado por Favi *et al.* (2013) e Oliveira *et al.* (2012), os quais cultivaram, respectivamente CTs de origem da medula óssea e do tecido adiposo sobre MCBs e encontraram um aumento da viabilidade e proliferação celular (DE OLIVEIRA, 2012; FAVI *et al.*, 2013). A origem, o potencial replicativo ou até mesmo a passagem das células utilizadas poderia contribuir para tal variação.

Apesar de apresentar muitos poros, e ser sugerido na literatura que células são capazes de migrar através das MCBs reposicionando suas nanofibras (BACKDAHL *et al.*, 2006), neste estudo as dCTMs se mantiveram na região superficial das membranas, como observado por microscopia confocal. É provável que as células não tenham migrado, devido ao tamanho dos poros das MCBs. Em trabalho recente, Yin e colaboradores, 2015, mostraram que condrócitos cultivados sobre MCBs permanecem apenas em sua região superficial, corroborando o encontrado no presente estudo (YIN *et al.*, 2015). Apesar de não ser observado aumento na viabilidade celular, foram observadas células na fase de mitose, o que indica que as dCTMs podem proliferar quando associadas as membranas. A capacidade de proliferação de células aderidas a MCBs tem sido demonstrada na literatura, normalmente por métodos colorimétricos como MTS e CCK-8 (FAVI, 2013; Fu, 2012).

A composição e as propriedades mecânicas do ambiente extracelular regulam cascatas de sinais intracelulares que influenciam diferentes aspectos do comportamento celular, como espalhamento, proliferação, diferenciação e morte das células. As CT são especialmente sensíveis a MEC e sua capacidade de mecanossensitividade pode levá-las a perder muitas de suas funções durante seu isolamento ou cultivo em biomateriais (SHIN; MOONEY, 2016). Desse modo foi analisado neste trabalho se as MCBs modificam ou mantém os marcadores imunofetípicos das dCTMs. Através de citometria de fluxo, foi observado que o perfil imunofenotípico das dCTMs foi mantido após cultivo sobre as MCBs, sendo as células positivas para os marcadores típicos de CTMs: CD105, CD90 e CD73, e negativas para os marcadores hematopoiéticos, CD34 e CD45. Os

valores de expressão são semelhantes aos valores encontrados na literatura referentes à marcação de dCTMs (JEREMIAS *et al.*, 2014).

Apesar desses marcadores serem expressos em CTMs, eles não são exclusivos destas células (LIN *et al.*, 2013a), assim, seria interessante ainda estudar marcadores de pluripotencialidade para analisar se as dCTMs mantêm sua expressão após o cultivo sobre as MRDs, ou se estas estão levando as células para caminhos mais diferenciados. Também seria possível realizar experimentos de diferenciação das dCTMs sobre as matizes, para analisar essa potencialidade.

De modo geral, os resultados *in vitro* demonstram que as MCBs permitem a adesão, viabilidade e provável proliferação das dCTMs, sendo consideradas assim biocompatíveis com as dCTMs humanas. Além disso, essas matrizes permitem a manutenção dos marcadores típicos de CTMs. Esses resultados se mostraram fundamentais para a aplicação das dCTMs associadas às MCBs *in vivo*, como uma estratégia terapêutica para reparar lesões cutâneas. Desse modo os efeitos das MCBs e das CTMs poderiam ser somados, potencializando e auxiliando o reparo tecidual.

5.3 As MCBs como curativos ou arcabouços

Na literatura, termos como *scaffolds* (aqui traduzidos como arcabouços) e *wound dressings* (aqui tratados como curativos), são muitas vezes empregados como sinônimos. Os arcabouços são materiais que suportam a proliferação e crescimento celular, e que normalmente substituem o tecido lesado, degradando-se ao longo do tempo e sendo substituídos por células do próprio paciente (O'BRIEN, 2011). Já os curativos são materiais colocados sobre as feridas, com o intuito de proteger a lesão e manter sua umidade, estes podem ser produzidos através de diversos biomateriais e modificados para induzir um melhor reparo cutâneo (EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

Polímeros de CB vem sendo descritos como arcabouços e/ou curativos para diversas aplicações (BODIN *et al.*, 2010; HELENIUS *et al.*, 2006a; MENDES *et al.*, 2009). Entretanto, de acordo com os resultados de caracterização das MCBs e de sua interação com as dCTMs, é possível observar que estas membranas não apresentaram características consideradas fundamentais para a confecção de arcabouços, como: biodegradabilidade e tamanhos de poros suficiente para permitir a migração celular (O'BRIEN, 2011). É esperado que arcabouços se degradem após implantação, em uma taxa que

corresponda a deposição de MEC, permitindo o reestabelecimento do tecido lesado (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010). O fato das MCBs não permitirem infiltração celular, também pode representar um problema, pois pode inibir a infiltração de células do tecido circundante que levariam ao fechamento das lesões

Atualmente, por diversos processos de produção diferenciados, é possível criar celulosas com poros de variados tamanhos e em diferentes densidades, por meio da utilização de porogênicos durante a síntese das MCBs (RAMBO *et al.*, 2008; ZABOROWSKA *et al.*, 2010), ou até mesmo com a modificação dos meios de cultivo (GRANDE *et al.*, 2009), além de aderir moléculas á sua superfície que facilitam a adesão e proliferação celular. Certamente a produção de poros auxiliaria na colonização das MCB por dCTMs, porém a estabilidade física e a baixa degradação deste material no corpo humano podem representar grandes desafios para esse biomaterial ser considerado um arcabouço ideal para a engenharia de tecidos (TORRES; COMMEAUX; TRONCOSO, 2012).

Desse modo, no presente trabalho as MCBs foram consideradas como um curativo para auxiliar a regeneração cutânea e não como um arcabouço para engenharia de tecidos.

5.4 Potencial de Reparo Cutâneo da associação de dCTMs com MCBs

As CTMs vêm demonstrando grande potencial no tratamento de lesões de pele, incluindo feridas crônicas. A ação dessas células ocorre através de mecanismos variados, ainda não compreendidos completamente (ISAKSON *et al.*, 2015). Entretanto, sua ação é descrita nas três fases do reparo cutâneo (MAXSON *et al.*, 2012), afetando a migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação celular. Estudos recentes tem mostrado que terapias baseadas em injeção de CT, resultam em baixos índices de retenção e enxerto, sendo um dos maiores problemas em sua utilização clínica. Essas dificuldades se dão por dois motivos principais: no momento da injeção, as células sofrem danos irreparáveis em suas membranas devido à forças mecânicas, e após injetadas, elas não tem uma matriz 3D para suportar sua viabilidade (CAI; DEWI; HEILSHORN, 2015; LÜ *et al.*, 2015).

Visando melhorar o transporte e manutenção das CTMs em lesões de pele, é necessário que haja, além de uma fonte de células, uma matriz artificial para levá-las e permitir sua viabilidade nos locais das lesões (YEUM *et al.*, 2013). Considerando os resultados obtidos nos

experimentos *in vitro* deste trabalho, as MCBs podem ser consideradas como um biomaterial adequado para integrar as dCTMs nas lesões cutâneas. Desse modo, buscamos unir os benefícios das MCBs e das CTMs para o tratamento de lesões como um modo de potencializar o reparo cutâneo.

Com o intuito de analisar o efeito da associação das dCTMs com MCBs no reparo das lesões cutâneas, essa associação foi testada *in vivo* e comparada com o CTL (curativo comercial TegadermTM). Para avaliar se os efeitos observados não eram provenientes de nenhum componente da associação separadamente, analisamos ainda o efeito individual das dCTMs e MCBs em relação ao grupo CTL. Como resultado foi possível observar que o tratamento com a associação dCTM+MCB levou a um aumento significativo da neovascularização e do número de neutrófilos. Já a aplicação de MCBs sozinhas não demonstrou nenhuma diferença em comparação ao grupo CTL e administração de dCTMs diminuiu o infiltrado de neutrófilos no 3º dia pós-operatório.

Outros parâmetros como: fechamento das feridas; espessura do tecido de granulação; quantidade de macrófagos; espessura e homogeneidade da epiderme e o comprimento da cicatriz também foram analisados, mas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos e o CTL. Apesar disso, algumas variações biológicas observadas nesses parâmetros são discutidas a seguir.

5.4.1 Avaliação dos Curativos

A aplicação de MCBs em modelo murino para estudo do reparo cutâneo aparece em alguns artigos da literatura, em sua maioria bastante recentes (FU *et al.*, 2012; KWAK *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2013c; SOUZA *et al.*, 2014). Porém, a metodologia de fixação e manutenção dessas MCBs no local das lesões não é clara, sendo que a maioria dos artigos trazem imagens das feridas sem os curativos, não deixando claro se os mesmos foram retirados ou caíram naturalmente.

Nos animais utilizados no presente trabalho o curativo de nanomatriz de celulose bacteriana foi posicionado sobre a lesão, e após foi suturado um anel de silicone com 4 pontos cirúrgicos (Figura 8). O objetivo deste procedimento foi diminuir a contração da pele, característica que é responsável por grande parte do reparo em murinos (WONG *et al.*, 2012), além de aumentar o tempo de manutenção dos curativos nas lesões. Ao longo dos dias de pós-operatório, os camundongos foram capazes de retirar os curativos, após aproximadamente 7 dias, sendo que a partir do momento que o

Tegaderm™ foi rompido, as feridas ressecaram e contraíram mais rapidamente. Considerando o ocorrido, para trabalhos futuros sugere-se a padronização da retirada de todos os curativos em um dia definido, para que variações nos resultados, referentes ao dia de queda dos curativos sejam minimizadas.

Tendo em vista que alguns trabalhos demonstram a participação das CTMs apenas no período inicial do reparo cutâneo, curativos com uma fixação de aproximadamente 10 dias seriam suficientes para o tratamento proposto (YEUM *et al.*, 2013). Uma alternativa a necessidade de fixar os curativos por longos períodos seria trocá-los a cada 2 dias como realizado por Lin e colaboradores (2013) (LIN *et al.*, 2013c), porém considerando a utilização de aproximadamente 1×10^6 dCTMs juntamente com as MCBs, como sugerem Yeum e colaboradores, 2013 (YEUM *et al.*, 2013), o número de dCTMs para realizar trocas constantes de curativos seria bastante elevado. Além disso, os animais precisariam ser anestesiados em todas as trocas, o que poderia aumentar seu nível de estresse e influenciar os resultados obtidos.

5.4.2 Fechamento das lesões cutâneas

As taxas de fechamento das lesões seguiram um padrão semelhante em todos os grupos, sendo que não houve diferença significativa em relação ao CTL. Entretanto, a velocidade do fechamento de lesões não deve ser considerada como o único fator importante para um melhor reparo tecidual.

O processo de reparo tem como resultado o fechamento da ferida para recuperar a homeostase tecidual, formando tecidos cicatriciais com pouca ou nenhuma função fisiológica, porém esse processo se dá às custas do processo de regeneração (YANNAS, 2005). Desse modo um atraso ou inibição no aparecimento da cicatriz, ou tecido fibrótico, poderia permitir que um tecido mais funcional se formasse no local da lesão (SILVER; MILLER, 2004).

Apesar de todos os animais apresentarem taxas de fechamento semelhantes ao longo do tempo, aqueles tratados com dCTMs sozinhas ou com a associação de dCTM e MCBs tiveram todas as lesões fechadas anteriormente ao grupo CTL e MCB. Demonstrando assim, que as dCTMs podem estar influenciando a velocidade do fechamento das lesões, como já relatado para outros tipos de CMTs (ISAKSON *et al.*, 2015).

O comportamento dos animais de cada grupo durante o processo de fechamento foi variável. Alguns grupos como o CTL, apresentaram um comportamento mais aleatório, com as primeiras lesões fechando após 11 dias, porém outras levando até 16 dias para fechar. Já os grupos tratados com dCTMs e dCTM+MCB tiveram um comportamento mais homogêneo, com as lesões fechando em um período mais restrito de tempo. A aleatoriedade observada no grupo CTL e também do grupo MCB, não parece ser vantajosa ao se aplicar um tratamento clinicamente, pois não permite uma predição do comportamento das lesões. O fechamento mais homogêneo, por sua vez indica que o tratamento pode estar influenciando fortemente o período no qual a lesão se fecha.

5.4.3 Formação do tecido de granulação, inflamação e neovascularização

A formação do tecido de granulação é muito importante para o reparo de feridas, pois ele preenche a área lesionada, previne infecções bacterianas e fornece uma matriz para a proliferação e migração celular (ZHANG *et al.*, 2015). A espessura do tecido de granulação foi avaliada nos dias 3, 7 e 14 pós-operatório. Não houve diferenças significativas entre os grupos tratados e o CTL nos 3 pontos analisados. Entretanto, ao longo do tempo, houve um aumento significativo na espessura do tecido de granulação do dia 3 para o dia 7 em todos os grupos, exceto o CTL. Além disso, no grupo dCTM no 14º dia o tecido de granulação continuou mais espesso, enquanto que no grupo dCTM+MCB houve uma diminuição do mesmo (Figura 20 - B).

A variação de espessura do tecido de granulação é esperada ao longo tempo, uma vez que ele começa a se formar na fase proliferativa (aproximadamente 2-10 dias após a lesão), e depois é substituído pelo tecido cicatricial na fase de remodelamento (após aproximadamente 2 ou 3 semanas (GURTNER *et al.*, 2008). Desse modo era esperado um aumento deste tecido no dia 7 e uma diminuição no dia 14. Apesar de ser necessário para o processo de cicatrização de lesões (HONG *et al.*, 2013), a sua formação não é sempre benéfica, sendo que desregulações nesse processo podem levar a cicatrizações hipertróficas (DIEGELMANN, 2004; GURTNER *et al.*, 2008; HONG *et al.*, 2013). Assim, não é claro na literatura em quais proporções um aumento ou diminuição deste tecido seria favorável para o reparo cutâneo, tornando difícil inferir se o tecido de granulação formado na fase inicial do reparo é benéfico ou não.

Em comparação com o grupo CTL, onde não foi observado uma variação do tecido de granulação ao longo dos dias, podemos presumir que os tratamentos dos demais grupos estão influenciando a formação deste tecido. O tecido de granulação é formado por diversos elementos como: células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas desorganizadas (PROFYRIS; TZIOTZIOS; DO VALE, 2012). Desse modo, um aumento na sua espessura pode ser relativo ao aumento de um ou vários de seus componentes.

Os neutrófilos estão entre as primeiras células a chegarem no sítio lesionado, tendo como função principal a prevenção da infecção através da liberação de proteases que matam micro-organismos presentes no local. Estas proteases ainda podem auxiliar no debridamento das lesões, e facilitar a migração celular e a angiogênese. Entretanto, uma atividade excessiva dessas células pode levar a um processo inflamatório exacerbado, lesões nos tecidos, problemas na reepitelização e na deposição do colágeno, entre outros (WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013). Mesmo com um maior número de neutrófilos nos animais tratados com a associação dCTM+MCB, não foi constatado nenhum aspecto negativo no processo de reparo, em comparação aos outros grupos.

Frequentemente, uma maior infiltração de neutrófilos é relacionada a um aumento do processo inflamatório, que não é considerado benéfico para a resolução do reparo tecidual. De fato, alguns trabalhos demonstram que a ablação de neutrófilos e macrófagos não impede o reparo, podendo até mesmo acelerá-lo (MARTIN; LEIBOVICH, 2005). Entretanto, estudos recentes sugerem que podem haver subpopulações de neutrófilos, com propriedades pró e anti-inflamatórias (PILLAY *et al.*, 2012). Além disso, em 2012, Christoffersson e colaboradores propuseram que uma subpopulação de neutrófilos apresenta propriedades pró-angiogênicas, através de liberação de MMP-9, uma metaloprotease de MEC (CHRISTOFFERSSON *et al.*, 2012).

Neste estudo, a análise das células inflamatórias das lesões mostrou que o tratamento com a associação dCTM+MCB aumenta a quantidade de neutrófilos no 3º e 7º dia pós-operatório (Figura 22 - D), enquanto que a utilização apenas de dCTMs leva a uma diminuição no infiltrado de neutrófilos no 3º dia pós-operatório. Além disso, mesmo sem apresentar diferenças significativas, o grupo tratado com MCB também apresentou uma maior infiltração de neutrófilos, o que sugere que as MCBs podem agir estimulando essa infiltração.

A maioria dos trabalhos cita uma diminuição da resposta inflamatória com o uso de MCBs, quando comparados com outros curativos como gaze e Tegaderm™, contrariamente ao observado neste trabalho. Entretanto, as células inflamatórias não são quantificadas ou categorizadas nesses trabalhos, dificultando a comparação com os resultados aqui apresentados (FU *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2014).

Já a diminuição no infiltrado de neutrófilos observada no grupo dCTM pode ser explicada pela capacidade dessas células em modular a resposta inflamatória (CHEN *et al.*, 2016). Porém a associação dCTM+MCBs levou a um aumento do infiltrado de neutrófilos, sugerindo que o cultivo das dCTMs sobre as MCBs possa ter modificado seu perfil imunomodulador, ou que a imunorreatividade das MCBs possa estar mascarando o efeito das dCTMs.

Como mencionado acima, no 7º dia pós-operatório, os animais tratados com a associação dCTM+MCB continuaram com uma maior infiltração de neutrófilos em relação ao CTL, porém o grupo dCTM não apresentou variações em relação ao CTL. Estes achados podem sugerir que as dCTMs não estejam mais viáveis (LI *et al.*, 2016), ou que seu efeito mais proeminente após 7 dias não seja mais a imunomodulação da lesão e sim efeitos relacionados as outras fases do processo de reparo. (MAXSON *et al.*, 2012).

A análise no infiltrado de macrófagos, não demonstrou diferenças significativas entre os grupos tratados e o CTL. Estas células são componentes importantes do reparo tecidual, sendo sua redução associada a um atraso no reparo, e sua ativação relacionada ao aceleração deste processo (CHEN *et al.*, 2008). Contudo, apesar de não haver diferença estatística, é possível observar que o grupo dCTM apresentou o maior número de macrófagos, enquanto os grupos com MCBs apresentaram uma menor infiltração destas células. Estes resultados corroboram estudos recentes que mostram que CTMs inoculadas em tecidos lesionados aumentam a infiltração de macrófagos (HONG *et al.*, 2013), efeito que também pode estar sendo modulado negativamente através do cultivo das dCTMs sobre as MCBs no grupo dCTM+MCB.

Em relação a neovascularização, o grupo tratado com a associação dCTM+MCB apresentou maior quantidade de vasos em comparação ao grupo CTL. Durante o processo de reparo, o surgimento de microvasos é importante para transportar nutrientes e oxigênio, possibilitando a formação de um novo tecido (ANDRIKOPOULOU *et al.*, 2011). Mesmo sem apresentar diferenças significativas, o grupo tratado MCB também apresentou maiores valores de neovascularização.

O aumento da vascularização com a utilização de MCBs é relatado em alguns trabalhos, nos quais o modo pelo qual as MCBs estimulam essa vascularização é normalmente atribuído a sua elevada capacidade de retenção de água (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008) ou não é discutido (HELENIUS *et al.*, 2006a; LIN *et al.*, 2013d). Recentemente tem se estudado a influência da MCB na expressão de fatores como fator de crescimento endotelial Vascular (VEGF) e angiopoietina-1 (Ang-1), buscando-se entender o mecanismo da regulação da angiogênese, porém novos estudos são necessários para comprovar essa relação (KWAK *et al.*, 2015).

O grupo que apresentou maior infiltrado de neutrófilos e maior número de vasos em relação ao CTL foi o grupo tratado com a associação dCTM+MCB, seguido pelo grupo MCB, que apresentou aumentos não significativos em relação ao CTL. Tendo em vista estes resultados e os dados relatados no artigo de CHRISTOFFERSSON *et al.*, 2012, citado acima, pode-se hipotetizar que as MCBs estariam estimulando a infiltração de neutrófilos que elevaram a produção de MMPs a níveis não suficientes para atrapalhar o reparo, porém suficientes para estimular uma maior vascularização (CHRISTOFFERSSON *et al.*, 2012).

A capacidade das CTMs em estimular a neovascularização já é bastante relatada na literatura, e sua ação se dá principalmente pela produção de diversos fatores como Ang-1, VEGF, HGF, EGF, PDGF, KGF e TGF- β , que podem atuar diretamente nas células endoteliais (CHEN *et al.*, 2008). Ao contrário do esperado, os resultados obtidos mostram que o grupo dCTM também não apresentou diferenças significativas no número de vasos em relação ao grupo CTL.

5.4.4 Reepitelização e cicatrização

Características da epiderme, como sua espessura e homogeneidade foram avaliadas após 14 dias da cirurgia. Apesar dos valores não apresentarem diferenças significativas, a epiderme dos grupos que receberam dCTM+MCB apresentam-se mais delgadas e homogêneas quando comparadas aos outros grupos analisados. Apesar de uma maior espessura da epiderme ser relatada como uma melhor barreira aos agentes externos, indicando um melhor tratamento (ZHANG *et al.*, 2015), uma menor espessura também pode indicar uma maior maturação da pele reparada. A epiderme neoformada pode ser inicialmente espessa, sofrendo modificações ao passar do tempo e se

tornando mais fina (CHENG *et al.*, 2015). Além disso, a homogeneidade nesta espessura também pode indicar uma maior maturação deste epitélio.

O reparo de feridas cutâneas, sem a formação de uma cicatriz, é altamente desejável para pacientes que passaram por cirúrgias ou traumas que afetam principalmente regiões corpóreas extensas e exposta. Uma vez que CTMs são reconhecidas por seu potencial imunomodulador e reparador, elas poderiam ser um tratamento adequado para uma redução das cicatrizes (DOI *et al.*, 2016). Desse modo, o comprimento das cicatrizes foi avaliado após 14 dias de tratamento. Nenhuma diferença estatística foi encontrada em relação ao grupo CTL, entretanto o tratamento com dCTM+MCB apresentou as menores cicatrizes.

Em 2013, Junker relatou, em um trabalho de revisão, diversos estudos que demonstram a importância de um ambiente úmido para o tratamento de lesões cutâneas. Um dos benefícios de um ambiente com essas características seria uma diminuição no comprimento das cicatrizes (JUNKER *et al.*, 2013). Assim, era esperado que os grupos MCB e dCTM+MCB apresentassem as menores cicatrizes. Porém, há diversos fatores que podem estar influenciando o comprimento da cicatriz no presente trabalho, como as forças de tração nas feridas. Os pontos cirúrgicos que foram necessários para prender o curativo e diminuir o fechamento por contração caíram em tempos diferentes, o que pode ter influenciado este resultado (CHENG *et al.*, 2015).

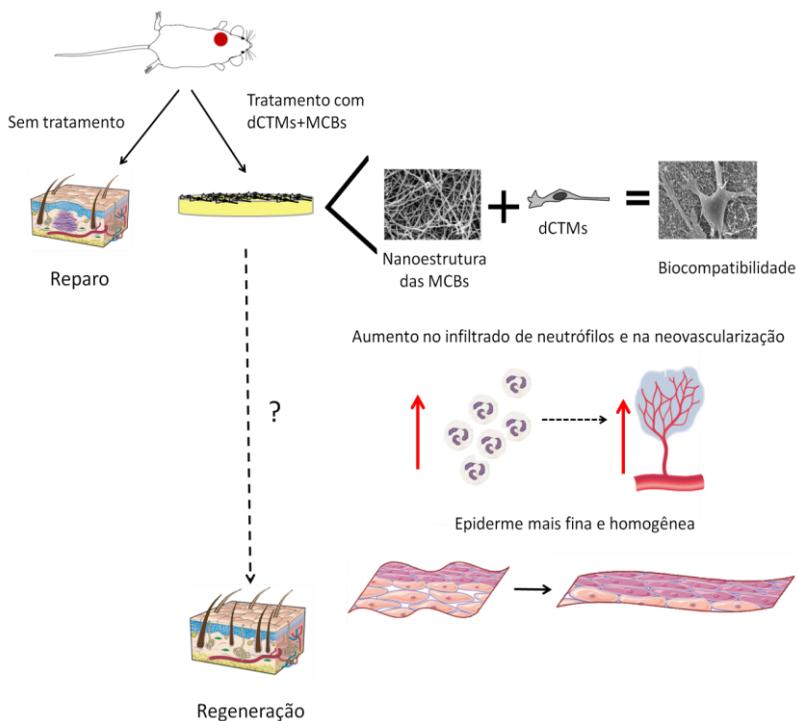
A ausência de diferenças estatísticas em alguns parâmetros analisados neste estudo pode ser atribuída a diferentes fatores. Primeiramente os tratamentos podem realmente não estar surtindo efeito biológico em todos os parâmetros estudados, porém também devemos considerar que o processo de reparo é bastante complexo, e se mostrou variável entre os animais estudados. Desse modo o número de animais em cada grupo pode ter influenciado nas estatísticas. Ainda devemos considerar que o processo de fechamento das lesões nos camundongos é diferente dos humanos, e mesmo que o modelo murino seja o mais descrito na literatura, ele não é o modelo ideal para o estudo de cicatrização.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que as características físicas das MCBs as tornam atrativas para favorecer o processo de reparo cutâneo. Além disso, sua biocompatibilidade e a manutenção do imunofenótipo das dCTMs favorece o uso das MCBs associadas à dCTMs como um novo tratamento para lesões. Unindo suas características físicas e sua biocompatibilidade, as MCBs associadas à

dCTMs se mostram promissoras para uma melhora no reparo cutâneo. Os testes *in vivo* aqui apresentados mostram um aumento no infiltrado de neutrófilos e na vascularização, a qual é considerada um dos principais fatores para um melhor reparo. Desse modo a associação testada mostrou-se uma abordagem promissora para melhorar o reparo tecidual (Figura 26).

Figura 26 - Visão geral do potencial da ação da associação (dCTM+MCB) para o tratamento de lesões de pele

Ao testar a hipótese de que a associação entre dCTMs e MCBs levaria a um melhor reparo cutâneo, foi demonstrado que as MCBs apresentaram características físicas importantes para o tratamento de feridas cutâneas, como alta CRA e nanofibras semelhantes a MEC. Além disso as MCBs foram compatíveis com as dCTMs, permitindo sua adesão, viabilidade, proliferação e manutenção dos marcadores típicos de dCTM. Quando aplicada *in vivo* a associação levou a um aumento no infiltrado de neutrófilos e vasos sanguíneos, além da diminuição da espessura da epiderme e aumento da homogeneidade da mesma. Esses resultados mostram grande potencial dessa associação para melhorar o reparo de feridas cutâneas.



6. CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou as propriedades físicas das membranas de celulose bacteriana com a intenção de entender e correlacionar as características do biomaterial que poderiam influenciar no comportamento das células associadas ao mesmo. Através desta fase do estudo foi possível concluir que as MCBs úmidas apresentaram elevada CRA, fibras nanométricas e porosidade superficial de em média 30%. Sendo sua estrutura tridimensional, altamente dependente da quantidade de água retida entre suas fibras. Após liofilizadas as MCBs apresentaram fibras achatadas, porosidade superficial quase nula e não foram capazes de reabsorver grandes quantidades de água e voltarem a sua estrutura e peso originais. Desse modo, devido a sua elevada CRA e a sua tridimensionalidade as MCBs hidratadas foram consideradas mais adequadas para os ensaios de associação com células e aplicação *in vivo*.

A interação entre as dCTMs e as MCBs demonstrou que MCBs foram biocompatíveis com as dCTMs, permitindo sua adesão, viabilidade, proliferação e manutenção de sua morfologia fibrobláste e de seus marcadores imunofenotípicos. Entretanto as dCTMs não foram capazes de migrar para o interior das MCBs, o que também não impede a utilização deste material como um curativo. O tratamento *in vivo* com a associação de dCTMs com MCBs não causou infecção, formação de pus ou rejeição. Assim como nenhum dos componentes da associação independentemente.

A taxa de fechamento das lesões ao longo do tempo não apresentou diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais, porém todos os animais tratados com dCTMs ou dCTMs+MCBs tiveram suas feridas fechadas em no máximo 15 dias, enquanto que os animais do grupo CTL terminaram seu fechamento com 16 dias e do grupo apenas MCB com 17 dias.

A utilização das MCBs sozinhas não apresentou nenhuma diferença em relação ao grupo CTL, enquanto a utilização apenas das dCTMs levou a uma diminuição de neutrófilos no 3º dia pós-operatório em relação ao CTL. Já o tratamento com a associação de dCTMs e MCBs levou a um aumento da neovascularização e do número de neutrófilos em relação ao CTL. Esses aumentos podem estar relacionados entre si, porém mais estudos seriam necessários para comprovar este mecanismo.

O tratamento das lesões com a associação dCTM+MCB mostrou influência na espessura do tecido de granulação, sendo que o grupo tratado teve a diminuição mais expressiva desse tecido no 14º dia. Além

disso, também houve uma diminuição na espessura da epiderme, acompanhada por uma maior homogeneidade da mesma. Quanto ao tamanho das cicatrizes, as lesões tratadas com a associação apresentaram aparentemente as menores cicatrizes em comparação aos outros grupos experimentais. Em conjunto, os resultados *in vivo* sugerem que a associação esteja acelerando a maturação das lesões cutâneas, e favorecendo o processo de reparo cutâneo.

7. PERSPECTIVAS

A visualização de células em biomateriais tridimensionais, assim como análises simples de adesão, viabilidade e morte celular apresentam um grau de dificuldade mais elevado do que as mesmas análises feitas em culturas bidimensionais. Isto porque, os microscópios e técnicas mais utilizadas não são muito adequadas para observar as células com precisão e foco. A utilização de microscopia confocal e de varredura se faz necessária, para uma análise mais aprofundada sobre quantas células realmente permanecem nas MCBs após o plaqueamento, qual sua taxa de proliferação e de morte, entre outros fatores.

Outras análises histológicas devem ser realizadas para se obter informações mais precisas sobre o efeito da associação dCTM+MCB no reparo cutâneo, por exemplo a análise do depósito de colágeno (quantidade e organização das fibras) nas cicatrizes. Além disso seria interessante conseguir observar se as dCTMs da associação tem a capacidade de migrar para as lesões, e por quanto tempo elas mantêm sua viabilidade após aplicadas nos animais.

O potencial das MCBs em auxiliar no reparo de pele é bem descrito, porém seu mecanismo de ação ainda não é muito compreendido, desse modo análises moleculares são fundamentais para a continuação dos trabalhos com uma maior profundidade.

De acordo com nossos resultados não houve mudança na expressão de marcadores típicos de CTMs após o cultivo sobre as MCBs, porém seria interessante observar se as MCBs modulam a expressão de genes das CTMs que já são reconhecidos por auxiliarem no reparo, e até mesmo se as MCBs por si só modulam a expressão de genes nas lesões de pele podendo melhorar o reparo.

O modelo murino, apesar de bastante estudado, trás diversas limitações para o estudo do reparo tecidual, desse modo está em andamento um trabalho de nosso grupo de pesquisa irá aplicar as MCBs em porcos, para o estudo do reparo cutâneo.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. The Principles of Freeze-Drying. In: DAY, J.G. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. Cap. 2, p 15-38.
- ADOLPHE, C.; WAINWRIGHT, B. Pathways to improving skin regeneration. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 7, n. 20, p. 1–14, 2005.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–22, fev. 2005.
- ALISON, M.; ISLAM, S. Attributes of adult stem cells. **The Journal of pathology**, n. November 2008, p. 144–160, 2009.
- ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100 Suppl , p. 11830–5, 30 set. 2003.
- ANDRIKOPOULOU, E. et al. Current Insights into the Role of HIF-1 in Cutaneous Wound Healing. **Current Molecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 218–235, 1 abr. 2011.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, n. 7, p. 667–681, 2000.
- BACKDAHL, H. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141–2149, 2006.
- BAYAT, A.; MCGROUTHER, D. D.; FERGUSON, M. W. J. Skin scarring. **BMJ**, v. 326, n. 7380, p. 88–92, 11 jan. 2003.
- BEYER NARDI, N.; DA SILVA MEIRELLES, L. Stem Cells. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 174, n. 174, p. 249–82, 2006.
- BODIN, A. et al. Tissue-engineered conduit using urine-derived stem cells seeded bacterial cellulose polymer in urinary reconstruction and diversion. **Biomaterials**, v. 31, n. 34, p. 8889–901, dez. 2010.
- CAI, L.; DEWI, R. E.; HEILSHORN, S. C. Injectable Hydrogels with In Situ Double Network Formation Enhance Retention of Transplanted Stem Cells. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 9, p. 1344–1351, mar. 2015.
- CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, abr. 2015.
- CHEN, D. et al. Insight into Reepithelialization: How Do Mesenchymal Stem Cells Perform? **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- CHEN, H.-H. et al. Modifying bacterial cellulose with gelatin peptides for improved rehydration. **Cellulose**, v. 20, n. 4, p. 1967–1977, 20 ago. 2013.
- CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit

- macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1886, jan. 2008.
- CHENG, L. et al. A facilely fabricated in vivo hypertrophic scar model through continuous gradient elastic tension. **RSC Adv.**, v. 5, n. 130, p. 107430–107444, 2015.
- CHRISTOFFERSSON, G. et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. **Blood**, v. 120, n. 23, p. 4653–4662, 29 nov. 2012.
- CLARK, R. A F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **The Journal of investigative dermatology**, v. 127, n. 5, p. 1018–29, maio 2007.
- COLLART-DUTILLEUL, P.-Y. et al. Adhesion and proliferation of human mesenchymal stem cells from dental pulp on porous silicon scaffolds. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 3, p. 1719–28, 2014.
- COURA, G. S. et al. Human periodontal ligament: A niche of neural crest stem cells. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 5, p. 531–536, 2008.
- CRIGLER, L. et al. Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. v. 18, n. 11, p. 1492–1501, 2007.
- CUKIERMAN, E.; PANKOV, R.; YAMADA, K. M. Cell interactions with three-dimensional matrices. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 633–639, 2002.
- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–51, jan. 2006a.
- CZAJA, W. et al. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145–51, jan. 2006b.
- CZAJA, W. et al. Biomedical Applications of Microbial Cellulose in Burn Wound Recovery. In: BROWN, R. M.; SAXENA, I. M. (Eds.). **Cellulose: Molecular and Structural Biology Selected Articles on the Synthesis, Structure, and Applications of Cellulose**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007a.
- CZAJA, W. K. et al. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 1, p. 1–12, jan. 2007b.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287–2299, set. 2008.
- DE OLIVEIRA, C. R. Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. **Journal of Tissue Science & Engineering**, v. S11, 2012.
- DIEGELMANN, B. Wound Healing: an Overview of Acute, Fibrotic and Delayed Healing. n. 4, p. 1–8, 2004.

- DOI, H. et al. Potency of umbilical cord blood- and Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for scarless wound healing. **Scientific Reports**, v. 6, n. November 2015, p. 18844, 2016.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.
- EGGENHOFER, E. et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. SEP, p. 1–8, 2012.
- ELISSEEFF, J. et al. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 8, n. 3, p. 150–161, 2005.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. STATE OF THE ART REVIEW Wound repair and regeneration : Mechanisms , signaling , and translation. v. 6, n. 265, 2014.
- ESPINAL, L. Porosity and Its Measurement. **Characterization of Materials**, p. 1–10, 2012.
- FAVI, P. M. et al. Cell proliferation, viability, and in vitro differentiation of equine mesenchymal stem cells seeded on bacterial cellulose hydrogel scaffolds. **Materials science & engineering C. Materials for biological applications**, v. 33, n. 4, p. 1935–44, 1 maio 2013.
- FU, L. et al. Skin tissue repair materials from bacterial cellulose by a multilayer fermentation method. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 24, p. 12349, 2012.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–42, 15 fev. 2013a.
- FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v. 92, n. 2, p. 1432–42, 15 fev. 2013b.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and physiology of wound healing. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 39, n. 1, p. 85–97, 2012.
- GELIN, K. et al. Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. v. 48, n. 26, p. 7623–7631, 2007.
- GRANDE, C. J. et al. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605–1615, jun. 2009.
- GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 4, p. 352–366, 2011.
- GURTNER, G. C. et al. Wound repair and regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–21, 15 maio 2008.

- HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–8, fev. 2006a.
- HELENIUS, G. et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431–8, fev. 2006b.
- HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S.; BOX, C. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. v. 316, n. 14, p. 2213–2219, 2010.
- HONG, S. J. et al. Topically Delivered Adipose Derived Stem Cells Show an Activated-Fibroblast Phenotype and Enhance Granulation Tissue Formation in Skin Wounds. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- HSU, Y.-C.; LI, L.; FUCHS, E. Emerging interactions between skin stem cells and their niches. **Nature medicine**, v. 20, n. 8, p. 847–56, 2014.
- HUANG, H. C. et al. In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6084–6091, 2010.
- HUANG, H.-C. et al. Nano-biomaterials application: In situ modification of bacterial cellulose structure by adding HPMC during fermentation. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 2, p. 979–987, jan. 2011.
- HUTCHENS, S. A. et al. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4661–4670, 2006.
- IN 'T ANKER, P. S. et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 22, n. 7, p. 1338–45, 2004.
- ISAKSON, M. et al. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing : Current Evidence and Future Potential. v. 2015, 2015.
- JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: Potential tool for skin regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- JU, H. W. et al. Wound healing effect of electrospun silk fibroin nanomatrix in burn-model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 29–39, 2016.
- JUNKER, J. P. E. et al. Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist , Wet , and Dry Environments. v. 2, n. 7, p. 348–356, 2013.
- KHANBANHA, N. et al. Healing Efficacy of an EGF Impregnated Triple Gel Based Wound Dressing : In Vitro and In Vivo Studies. v. 2014, 2014.
- KIM, J. et al. Designing nanotopographical density of extracellular matrix for controlled morphology and function of human mesenchymal stem cells. **Scientific reports**, v. 3, p. 3552, 2013.
- KWAK, M. H. et al. Bacterial cellulose membrane produced by *Acetobacter*

- sp. A10 for burn wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 387–398, maio 2015.
- LAGANA, G.; ANDERSON, E. H. Moisture Dressings: The New Standard in Wound Care. **Journal for Nurse Practitioners**, v. 6, n. 5, p. 366–370, 2010.
- LARSON, B. J.; LONGAKER, M. T.; LORENZ, H. P. Scarless fetal wound healing: a basic science review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 126, n. 4, p. 1172–80, out. 2010.
- LAVOIE, J. R.; ROSU-MYLES, M. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2212–2221, dez. 2013.
- LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.
- LI, L. et al. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? **Stem Cells International**, v. 2016, n. 2, p. 1–14, 2016.
- LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 21, p. 605–31, jan. 2005.
- LI, Y. et al. Evaluation of the Effect of the Structure of Bacterial Cellulose on Full Thickness Skin Wound Repair on a Microfluidic Chip. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 3, p. 780–789, 2015.
- LIN, C. S. et al. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. **Histology and Histopathology**, v. 28, n. 9, p. 1109–1116, 2013a.
- LIN, S. et al. Food Hydrocolloids Adding enzymatically modified gelatin to enhance the rehydration abilities and mechanical properties of bacterial cellulose. **Food hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2195–2203, 2009.
- LIN, S.-P. et al. Biosynthesis, production and applications of bacterial cellulose. **Cellulose**, v. 20, n. 5, p. 2191–2219, 14 out. 2013b.
- LIN, W. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, abr. 2013c.
- LIN, W.-C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–11, 15 abr. 2013d.
- LO, D. D. et al. Scarless fetal skin wound healing update. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 96, n. 3, p. 237–47, set. 2012.
- LU, B. et al. Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 884–891, 2016.
- LU, H.; JIANG, X. Structure and Properties of Bacterial Cellulose Produced Using a Trickle Bed Reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3844–3861, 28 abr. 2014.

- LÜ, S. et al. Injectable and Self-Healing Carbohydrate-Based Hydrogel for Cell Encapsulation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 23, p. 13029–13037, 17 jun. 2015.
- LUND, A. W. et al. The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 15, n. 3, p. 371–380, 2009.
- MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874–80, 22 fev. 2007.
- MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43–51, 2008.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 599–607, 2005.
- MARTINI, M. M. et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under the appropriate niche conditions. **DNA and cell biology**, v. 32, n. 2, p. 58–65, 2013.
- MARTINS, C. DE G.; ANDRADE, S. DE. Queimaduras em crianças e adolescentes: análise da morbidade hospitalar e mortalidade. **Acta Paul Enferm**, v. 20, n. 4, p. 464–469, 2007.
- MATEJTSCHUK, P. Lyophilization of proteins. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**, v. 368, p. 59–72, 2007.
- MAXSON, S. et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 2, p. 142–149, 1 fev. 2012.
- MENDES, P. N. et al. In vivo and in vitro evaluation of an Acetobacter xylinum synthesized microbial cellulose membrane intended for guided tissue repair. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 51, p. 12, jan. 2009.
- METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 4, n. 14, p. 413–37, 2007.
- MOHD HILMI, A. B.; HALIM, A. S. Vital roles of stem cells and biomaterials in skin tissue engineering. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 428–436, 2015.
- MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068–1074, 29 jun. 2006.
- NAKAYAMA, A. et al. High mechanical strength double-network hydrogel with bacterial cellulose. **Advanced Functional Materials**, v. 14, n. 11, p. 1124–1128, 2004.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011.

- OLYVEIRA, G. M. et al. Human Dental Pulp Stem Cell Behavior Using Natural Nanolith/Bacterial Cellulose Scaffolds for Regenerative Medicine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 9, n. 8, p. 1370–1377, 2013.
- OPALENIK, S. R.; DAVIDSON, J. M. during wound repair. v. 19, n. 2, p. 1–19, 2005.
- PARK, S. U. et al. The possibility of microbial cellulose for dressing and scaffold materials. **International Wound Journal**, v. 11, n. 1, p. 35–43, 2014.
- PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277–86, set. 2011.
- PILLAY, J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 1, p. 327–336, 3 jan. 2012.
- PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71–74, 4 abr. 1997.
- PROFYRIS, C.; TZIOTZIOS, C.; DO VALE, I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 1, p. 1–10; quiz 11–2, jan. 2012.
- RAMBO, C. R. et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 549–554, 2008.
- RAMOS, R. Análise histológica da integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo: estudo experimental em ratos. 2004.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes**, v. 49, n. 1, p. 35–43, jan. 2012.
- RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.** *Cell*, 1975.
- SANDERS, R. C. et al. Stem cell research. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–140, 2006.
- SANTOS, S. M. et al. Characterization of purified bacterial cellulose focused on its use on paper restoration. **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 173–181, 2015.
- SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1075–1079, 29 jun. 2006.
- SCHIPANI, E.; KRONENBERG, H. Adult mesenchymal stem cells. **StemBook**, p. 1–12, 2009.
- SCHRECKER, S. T.; GOSTOMSKI, P. A. Determining the water holding capacity of microbial cellulose. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 19, p.

1435–1438, 2005.

SCHULTZ, G. S. et al. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 19, n. 2, p. 134–48, 2011.

SEIFERT, A. W. et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*). **Nature**, v. 489, n. 7417, p. 561–5, 2012.

SEN, C. K. et al. **Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy: PERSPECTIVE ARTICLE** **Wound Repair and Regeneration**, 2009.

SHAH, J. B. The history of wound care. **Journal of the American College of Certified Wound Specialists**, v. 3, n. 3, p. 65–66, 2011.

SHAI, A.; MAIBACH, H. Milestones in the History of Wound Healing. In: **Wound Healing and Ulcers of the Skin**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p. 19–29.

SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 7, n. 43, p. 229–58, 6 fev. 2010.

SHEYKHNAZARI, S. et al. Bacterial synthesized cellulose nanofibers; Effects of growth times and culture mediums on the structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1187–1191, ago. 2011.

SHEZAD, O. et al. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 1, p. 173–180, 2010.

SHIEH, S.; CHENG, T. Regeneration and repair of human digits and limbs : fact and fiction. **Regeneration**, v. 2, n. 4, p. 149–168, 2015.

SHIN, J.; MOONEY, D. J. Forum Improving Stem Cell Therapeutics with Mechanobiology. **Stem Cell**, v. 18, n. 1, p. 16–19, 2016.

SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2005.

SILVER, J.; MILLER, J. H. Regeneration beyond the glial scar. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 2, p. 146–156, 2004.

SOUZA, C. M. C. O. et al. Regeneration of Skin Tissue Promoted by Mesenchymal Stem Cells Seeded in Nanostructured Membrane. **Transplantation Proceedings**, v. 46, n. 6, p. 1882–1886, jul. 2014.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547–1571, dez. 2015.

TANG, W. et al. The influence of fermentation conditions and post-

- treatment methods on porosity of bacterial cellulose membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 125–131, 2010.
- TORRES, F.; COMMEAUX, S.; TRONCOSO, O. Biocompatibility of Bacterial Cellulose Based Biomaterials. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 864–878, 5 dez. 2012.
- TRAN, C.; DAMASER, M. S. Stem cells as drug delivery methods: Application of stem cell secretome for regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 82–83, p. 1–11, mar. 2015.
- VAN BRUNT, J.; KLAUSNER, A. growth factors wound healing review. **Nature biotechnology**, v. 6, 1988.
- VENUGOPAL, J.; RAMAKRISHNA, S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. **Tissue engineering**, v. 11, n. 5–6, p. 847–854, 2005.
- VISHNUBALAJI, R. et al. Skin-derived multipotent stromal cells – an archrival for mesenchymal stem cells. **Cell and Tissue Research**, v. 350, n. 1, p. 1–12, out. 2012.
- WANG, X. et al. The mouse excisional wound splinting model, including applications for stem cell transplantation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 2, p. 302–309, 17 jan. 2013.
- WANG, Z. L. et al. **Research on characterization and biocompatibility of bacterial cellulose tissue engineering scaffold** 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, iCBBE 2009. **Anais...IEEE**, 2009Disponível em: <http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5163329>. Acesso em: 14 out. 2011
- WILGUS, T. A; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. **Advances in wound care**, v. 2, n. 7, p. 379–388, 2013.
- WILLIAMS IV, J. T. et al. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **American Surgeon**, v. 65, n. 1, p. 22–26, 1999.
- WINTER, G. D. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. **Nature**, v. 193, p. 293–294, 1962.
- WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International journal of biomaterials**, v. 2012, p. 1–8, jan. 2012.
- YANNAS, I. V. Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. **Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society**, v. 2, n. 5, p. 403–17, 2005.
- YATES, C. C.; HEBDA, P.; WELLS, A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 96, n. 4, p. 325–33, dez. 2012.

- YEUM, C. E. et al. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 7, n. 4, p. 279–91, abr. 2013.
- YIN, N. et al. Agarose particle-templated porous bacterial cellulose and its application in cartilage growth in vitro. **Acta Biomaterialia**, v. 12, p. 129–138, jan. 2015.
- ZABOROWSKA, M. et al. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 7, p. 2540–7, jul. 2010.
- ZENG, Y. et al. Acta Biomaterialia Preformed gelatin microcryogels as injectable cell carriers for enhanced skin wound healing. **ACTA BIOMATERIALIA**, p. 1–13, 2015.
- ZHANG, N.; KOHN, D. H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. **Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews**, v. 96, n. 1, p. 63–81, 2012.
- ZHANG, X. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: Reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1206–1218, abr. 2011.
- ZHANG, X. et al. A systematic and quantitative method for wound-dressing evaluation. **Burns & Trauma**, v. 3, n. 1, p. 15, 2015.
- ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 2, n. 5, p. 510–525, 2010.
- ZUK, P.; ZHU, M.; MIZUNO, H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele”.

Pesquisador Responsável: Prof^ª Dr^ª Andréa Gonçalves Trentin; Dr. Rogério Gomes.

Pesquisadores participantes:, Michele Patrícia Rode, Priscila Barros Delben, Patrícia Alves de Almeida, Rafaela Grecco Machado e Talita da Silva Jeremias.

Telefones para contato: (48) 37216905/ (48) 96728334

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), do trabalho de pesquisa “Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele”, de responsabilidade da pesquisadora Prof^ª Dr^ª Andréa Gonçalves Trentin. A seguir lhe serão apresentadas informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o(a) Sr(a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele. Atualmente as células tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados fragmentos de pele retirados durante as cirurgias plásticas, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células tronco da pele para compreendermos melhor o comportamento destas células.

Estudos como estes são necessários, uma vez que nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias, como por exemplo, no tratamento de pacientes com lesões cutâneas.

Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o(a) Sr(a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, entre em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o(a) Sr(a) assine esse documento (verso).

Assinatura do pesquisador : _____

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____,
RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Caracterização e avaliação do potencial terapeutico de células tronco derivadas da pele” e concordo em participar do estudo, como voluntário.

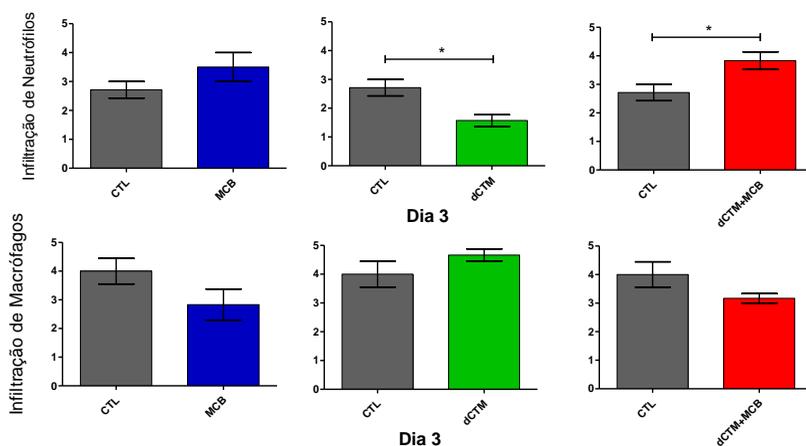
Assinatura do paciente ou responsável:

Florianópolis, ____ de _____ de 201 .

APÊNDICE B - Infiltração de Células Inflamatórias

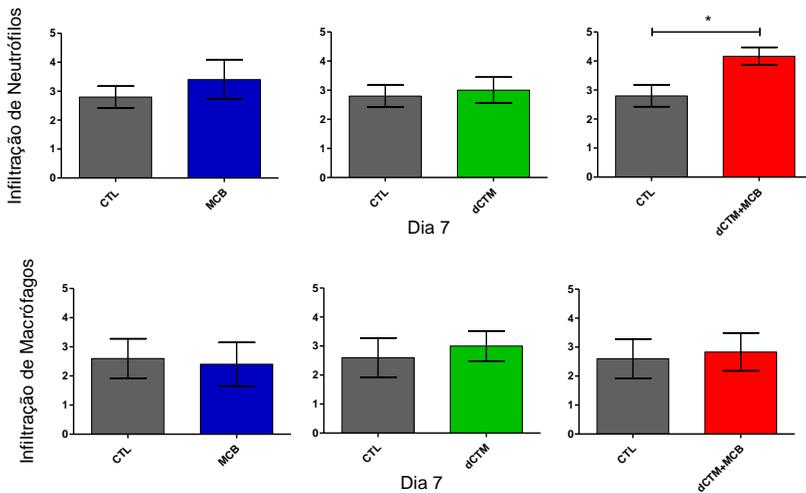
B.1 Infiltração de células inflamatórias no dia 3 pós-operatório.

Representação gráfica da infiltração de Neutrófilos e Macrófagos no dia 3 pós-operatório. Os neutrófilos e macrófagos foram contabilizados, por sistema de *score*, de maneira independente e suas quantidades não são comparáveis. Os gráficos mostram as médias \pm SEM. No 3º dia o grupo dCTM apresentou um menor infiltrado de neutrófilos em relação ao CTL, já o grupo dCTM+MCB apresentou uma maior infiltração de neutrófilos em comparação ao CTL. Não houve diferenças estatísticas na infiltração de macrófagos no 3º dia pós-operatório. * $p < 0.05$, calculado por teste de *Mann Whitney*.



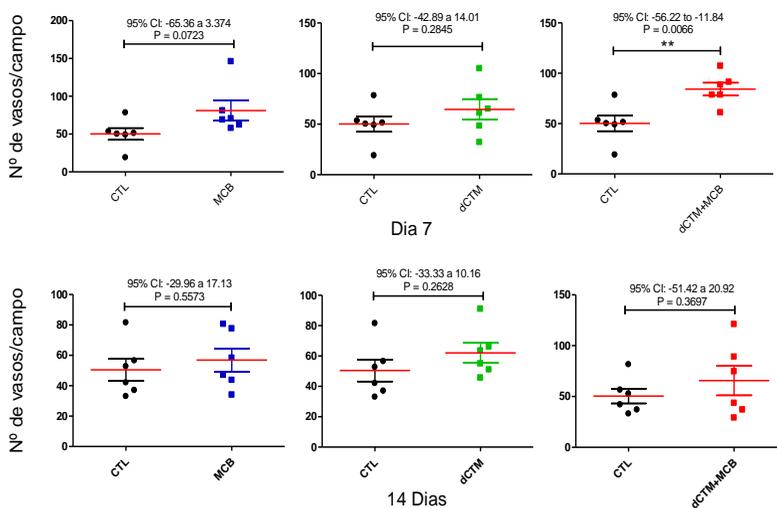
B.2 Infiltração de células inflamatórias no dia 7 pós-operatório.

Representação gráfica da infiltração de Neutrófilos e Macrófagos no dia 7 pós-operatório. Os neutrófilos e macrófagos foram contabilizados, por sistema de *score*, de maneira independente e suas quantidades não são comparáveis. Os gráficos mostram as médias \pm SEM. No 7º dia o grupo dCTM+MCB apresentou um maior infiltrado de neutrófilos em relação ao CTL. Não houve diferenças estatísticas na infiltração de macrófagos no 7º dia pós-operatório. * $p < 0.05$, calculado por teste de *Mann Whitney*.



APÊNDICE C - Angiogênese das lesões de pele

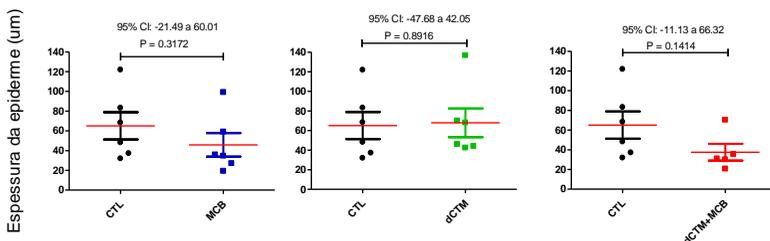
Angiogênese nos dias 7 e 14 pós-operatório. Representações gráficas do número de novos vasos contabilizados por campo (1100x700 μ m) em cada grupo, em comparação com o CTL. Os gráficos mostram as médias \pm SEM, o intervalo de confiança e o P para cada comparação. Diferenças estatísticas ($p=0.0066$) foram observadas no dia 7 entre o grupo tratado com a associação dCTM+MCB e o grupo CTL, indicando maior vascularização no grupo tratado. Não foram encontradas diferenças significativas no dia 14 pós-operatório ($p<0.05$). Estatísticas calculadas por Teste T não pareado.



APÊNDICE D- Características da epiderme e da cicatriz

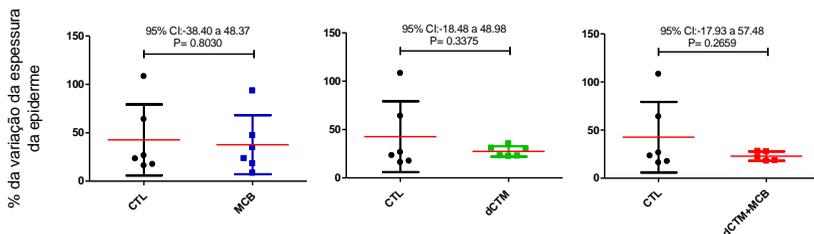
D.1 Espessura da Epiderme após 14 dias do procedimento cirúrgico.

Gráficos representando a espessura da epiderme nos diferentes grupos em relação ao CTL. Os gráficos mostram as médias \pm SEM, o intervalo de confiança e o P para cada comparação. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o CTL, isto é todos os valores de $p > 0.05$. Estatísticas calculadas por Teste T não pareado.



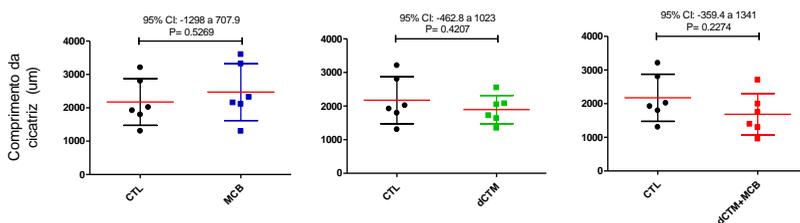
D.2 Homogeneidade da Epiderme após 14 dias do procedimento cirúrgico.

Gráficos representando a variação da espessura da epiderme em relação ao desvio padrão, nos diferentes grupos. Todos os grupos foram comparados com o CTL e não houve diferença significativa entre eles, isto é todos os valores de $p > 0.05$. Estatísticas calculadas por Teste T não pareado.



APÊNDICE E- Comprimento das cicatrizes após 14 dias

Comprimento das cicatrizes após 14 dias do procedimento cirúrgico. Representação gráfica do comprimento das cicatrizes, medido a partir das lâminas coradas com HE. Os gráficos mostram as médias \pm SEM, o intervalo de confiança e o P para cada comparação. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o CTL, isto é todos os valores de $p > 0.05$. Estatísticas calculadas por Teste T não pareado.



ANEXO A - Aprovação Plataforma Brasil



andrea.trentin@ufsc.br
Esqueceu a senha? Cadastre-se

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:
 Caracterização e avaliação do potencial terapêutico de células tronco derivadas da pele

Número do CAAE: 37167014.9.0000.5355	Número do Parecer: 1082454
Quem Assinou o Parecer: Luiz Roberto Medina dos Santos	Pesquisador Responsável: Andrea Gonçalves Trentin
Data Início do Cronograma: 30/10/2014	Data Fim do Cronograma: 31/10/2018
Contato Público: Diana Heck	

ANEXO B - Parecer CEUA (Protocolo PP00810)

23/04/13

notes.ufsc.br/aplic/ceua.nsf49652b669031c988325702e0075533b62360c87568b4e7d83257ac5004e428e70OpenDocument

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo
PP00810

Título

Protocolos experimentais utilizados pelo LACERT/UFSC que envolvem animais da espécie *Mus musculus*

Data de Entrada

21/06/2012

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

29/11/2012

Considerações

Ofício nº 113/CEUA/PRPE/2012

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Andréa Gonçalves Trentin - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por quatro anos, para a utilização de dois mil seiscientos e cinquenta e seis camundongos (*Mus musculus*).

Procedência Biotério Setorial LACERT (BEG/CCB)

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 28/02/2017

Data 29/11/2012

Parecer(es):

Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE