

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA ELÉTRICA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

MIRELLA DE SOUSA VIEIRA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ARCABOUÇOS NANOFIBROSOS MAGNÉTICOS
DE PLA-PEG-ÓXIDO DE FERRO VISANDO DESENVOLVIMENTO DE
SUBSTITUTO DÉRMICO**

Uberlândia

2021

MIRELLA DE SOUSA VIEIRA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE ARCABOUÇOS NANOFIBROSOS MAGNÉTICOS
DE PLA-PEG-ÓXIDO DE FERRO VISANDO DESENVOLVIMENTO DE
SUBSTITUTO DÉRMICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheira Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Mayumi Omi Simbara

Coorientadora: Dra. Letícia de Souza Castro-Filice

Uberlândia

2021

Dedico este trabalho à minha mãe, uma mulher muito guerreira e responsável, que me criou sozinha, contra todo o mundo.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pela vida, pelo suporte e incentivo para que eu pudesse focar sempre em minha formação acadêmica.

Aos meus amigos, desde a infância, ensino médio, graduação e pesquisa. Conhecer e compartilhar momentos com vocês ao longo dessa jornada foi um privilégio, me ajudaram a crescer, viver em sociedade e me suportaram durante os momentos que sozinha eu não conseguiria passar, mas com vocês esses se tornaram histórias divertidas.

Ao Guilherme e alguns familiares que acreditaram e acreditam em mim como pessoa e em minhas possibilidades, me ajudando a me manter autêntica e verdadeira.

Agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Márcia, e à minha coorientadora, Profa. Dra. Letícia, por terem aceitado fazer parte dessa minha trajetória, por meio do compartilhamento de visões e conhecimentos, bem como pela paciência, dedicação e por todo auxílio e apoio que me deram, estarei eternamente grata.

Tenho muito a agradecer ao Laboratório de Nanobiotecnologia pelo espaço compartilhado, apoio de todos, suporte oferecido sem receios. As amizades que cultivei neste laboratório guardarei para sempre com carinho.

De coração, obrigada!

RESUMO

A pele age como uma proteção a estímulos biomecânicos, mantém a homeostase e é responsável pela termorregulação. Quando lesionada, o organismo é capaz de fechar a ferida, porém caso a lesão seja grande, a cicatrização é prejudicada e o organismo é exposto a infecções. A Engenharia Tecidual pode ser usada para desenvolver estruturas vivas que poderiam restaurar a pele danificada. Além dessa aplicação, essa área vem sendo explorada para produção de substitutos dérmicos usados em testes toxicológicos e de eficácia de produtos farmacêuticos e cosméticos. A chamada tríade da Engenharia Tecidual é composta por células, arcabouços e estímulos, sendo a escolha do material do arcabouço importante, pois influencia na formação do tecido. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento de fibroblastos em uma matriz de blenda polimérica fibrosa, testando sua biocompatibilidade e capacidade proliferativa de fibroblastos para construção de um substituto de pele nacional *in vitro*. Os ensaios de colorimetria e de imunofluorescência associados mostraram que as células se mantiveram íntegras, sem nenhuma alteração morfológica, cresceram em profundidade e conseguiram produzir matriz extracelular endógena. Ademais, os resultados sobre a viabilidade celular mostraram que o material não foi citotóxico. Portanto, pôde-se concluir que os arcabouços utilizados neste trabalho se mostraram promissores para o desenvolvimento de substituto dérmico.

Palavras-chave: Pele, Engenharia Tecidual, Biomateriais, Nanotecnologia, Medicina Regenerativa, Arcabouços, Nanopartículas.

ABSTRACT

The skin acts as a protection against biomechanical stimuli, maintains homeostasis and is responsible for thermoregulation. When injured, the body is able to close the wound, but if the injury is large, the healing is impaired, and the body is exposed to infections. Tissue Engineering aims to develop living structures that could restore damaged skin. In addition to this application, this area has been explored for the production of dermal substitutes used in toxicological and efficacy tests of pharmaceuticals and cosmetics. The so-called triad of Tissue Engineering is composed of cells, scaffolds and stimuli, and the choice of the scaffold material has an important role because it influences the formation of the tissue. The objective of this work was to evaluate the cellular growth of skin cells in a matrix of fibrous polymeric blends, testing its biocompatibility and capacity of proliferation of fibroblasts to build a natural skin substitute *in vitro*. The associated colorimetry and immunofluorescence assays showed that the cells remained intact, without any morphological alteration, grew in depth and were able to produce endogenous extracellular matrix. In addition, the results on cell viability showed that the material is not cytotoxic. Therefore, it could be concluded that the scaffolds used in this work could be considered promising for the development of a dermal replacement.

Keywords: Skin, Tissue Engineering, Biomaterials, Nanotechnology, Regenerative Medicine, Scaffolds, Nanoparticule.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Equivalentes de pele disponíveis no mercado.....	19
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama das duas principais estratégias na Engenharia Tecidual.....	14
Figura 2 – Representação da anatomia da pele.....	18
Figura 3 – Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade por MTTs em porcentagem.....	28
Figura 4 – Visualização pelo microscópio de luz branca do ensaio colorimétrico H&E: (a) Dia 1, fibra de PLA/PEG; (b) Dia 1, fibra de PLA/PEG enriquecido com NPs; (c) Dia 14, fibra de PLA/PEG; (d) Dia 14, fibra de PLA/PEG enriquecido com NPs.....	30
Figura 5 – Leitura Confocal, Dia 8, PLA/PEG + NPs Marcação Citoesqueleto e Núcleo (a) Evidenciando a marcação dos núcleos; (b) Evidenciando a marcação de citoplasma.....	32
Figura 6 – Leitura Confocal com captura sequencial em diferentes angulações, Dia 8, PLA/PEG + NPs.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D – Bidimensional

3D – Tridimensional

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMSO - Sulfóxido de Dimetilo

ET – Engenharia Tecidual

EUA – Estados Unidos da América

FEELT – Faculdade de Engenharia Elétrica

H&E - Hematoxilina e Eosina

HFF – Human Foreskin Fibroblast

INFIS – Instituto de Física

LAMAB – Laboratório de Materiais e Biosistemas

LNMI – Laboratório de Novos Materiais Isolantes

MEC – Matriz Extracelular

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio]

NANOBIOTECNOLOGIA – Laboratório de Nanobiotecnologia

NPLs – Nanopartículas

PBS – Tampão fosfato-salino

PEG – poli (etilenoglicol)

PLA – poli (ácido láctico)

RELAM - Rede de Laboratórios Multiusuários

RPMI - Roswell Park Memorial Institute

SBS – *Solution Blow Spinning*

SFB – Soro fetal bovino

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ENGENHARIA TECIDUAL	13
1.2	BIOMATERIAIS E ARCABOUÇOS	15
1.2.1	Mantas poliméricas	16
1.3	ENGENHARIA TECIDUAL DA PELE	17
1.3.1	Produtos disponíveis no mercado	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	NANOPARTÍCULAS	22
3.2	ARCABOUÇO FIBROSO	22
3.3	METODOLOGIA	22
3.3.1	<i>Cultura Celular</i>	22
3.3.2	<i>Plaqueamento</i>	23
3.3.3	<i>Ensaio colorimétrico de viabilidade por MTT</i>	24
3.3.4	<i>Ensaio colorimétrico de hematoxilina e eosina (H&E)</i>	25
3.3.5	<i>Ensaio de Imunofluorescência</i>	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1	ENSAIO COLORIMÉTRICO DE VIABILIDADE POR MTT	27
4.2	ENSAIO COLORIMÉTRICO DE HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)	29
4.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA	31
5	CONCLUSÕES	34
5.1	PERSPECTIVAS FUTURAS	34
6	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 ENGENHARIA TECIDUAL

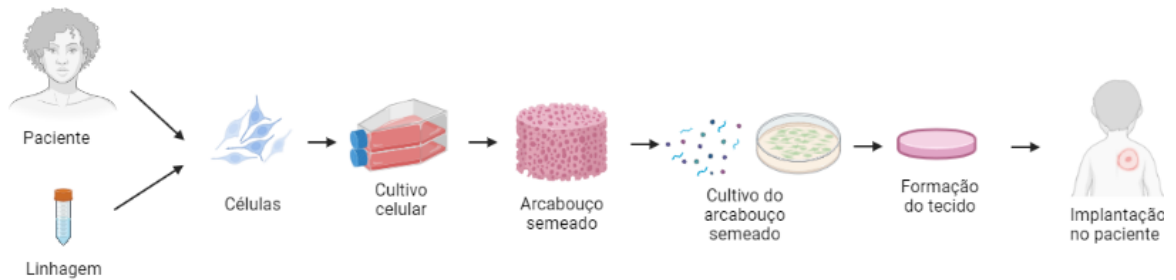
A Engenharia Tecidual (ET) compreende um campo vasto e interdisciplinar de estudos que combina conhecimentos aplicados em pesquisa clínica, biomecânica, biofísica e biomateriais com intuito de desenvolver suportes biocompatíveis que auxiliem na regeneração ou substituição de tecidos perdidos ou órgãos danificados (BERTHIAUME; MAGUIRE; YARMUSH, 2011).

A origem do termo e o conceito que o acompanha foram introduzidos durante o I Encontro da Fundação de Ciência Nacional (*National Science Foundation* - NSF) em 1988. O conceito mais difundido do termo Engenharia Tecidual ocorreu com a publicação, em 1993, de um artigo na Science por Robert Langer e Joseph Vacanti. Esses definiram a área como: “*área interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da vida através do desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm, ou melhoram a função tecidual* (LANGER; VACANTI, 1993).

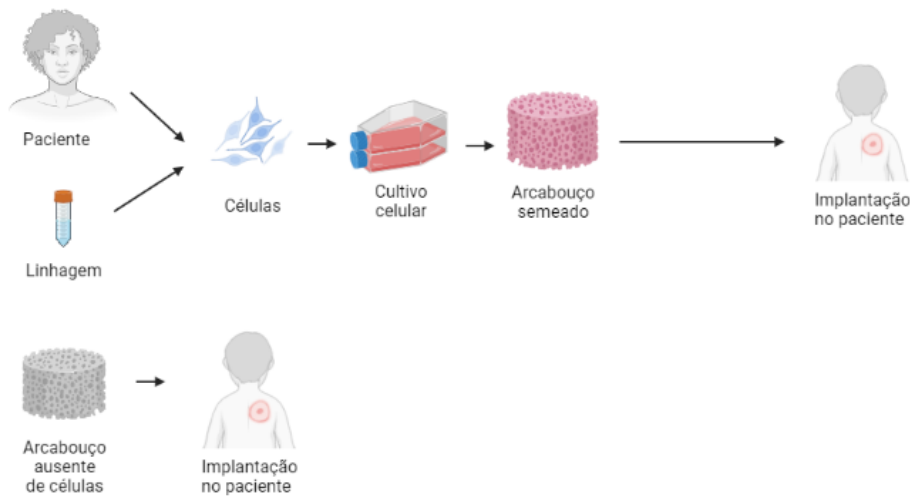
A Engenharia Tecidual usa células vivas, materiais biocompatíveis, estímulos bioquímicos (fatores de crescimento) e físicos adequados, bem como combinações desses, para criar estruturas semelhantes a tecidos ou estimular a recuperação de tecidos já existentes. A partir desse conceito, pode-se dizer que existem duas estratégias principais na ET (Figura 1); a primeira requer geração *in vitro* do tecido, através do isolamento e expansão de células de linhagem ou autólogas e sua sementeação em arcabouço apropriado. Posteriormente, as células nesse conjunto são cultivadas para formação de tecidos *in vitro*, para por fim esse construído ser implantado no paciente. Já a segunda estratégia chamada de Engenharia Tecidual *in situ*, contorna a extensa fase de cultura de tecido *in vitro* por implantação direta do arcabouço pré-semeado com células ou não, que objetiva a potencial atração celular do hospedeiro e subsequente remodelação *in vivo* (BERTHIAUME et al., 2011; WEBER et al., 2012; JANA et al., 2014).

Figura 1 – Diagrama das duas principais estratégias na Engenharia Tecidual.

Engenharia Tecidual *in vitro*



Engenharia Tecidual *in situ*



Fonte: autoria própria através do software online BioRender.

Essa área de pesquisa surgiu como solução terapêutica à crítica situação de alta demanda de transplante de órgãos e de escassez de órgãos doados. Além disso, ela configura como uma alternativa ao uso de animais para testes laboratoriais de grandes empresas de fármacos, cosméticos, tatuagens e afins (SHAFIEE; ATALA, 2017).

Transplante de órgãos é a melhor e por muitas vezes a única forma de tratamento quando o paciente se encontra em estágio avançado de falência do órgão ou ferida extensa (RUDGE et al., 2012). A problemática em feridas extensas ocasionadas por queimaduras severas, úlceras de pele ou traumas diversos é preocupante pois comprometem a imunidade do paciente, deixando-o exposto a novas infecções e outras decorrências, podendo levar o mesmo a óbito (CHURCH et al., 2006; LOSS et al., 2000; PEREZ-FAVILA et al., 2019). Da mesma maneira que há escassez de doadores disponíveis, pode ocorrer a rejeição do organismo ao órgão transplantado por incompatibilidade, o que poderia ser minimizado

com a engenharia tecidual através do uso de células autólogas (do próprio paciente) (FURTH; ATALA, 2013; LAVIK; LANGER, 2004).

Também se vê a importância da área de estudo de Engenharia Tecidual quando há o crescente incentivo legal em fomento de outras opções de testes toxicológicos, cosméticos e demais alternativas aos testes em animais. Em 2014, por meio das Resoluções Normativas nº 17 e nº 18 do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), foi estabelecido que houvesse a diminuição ou substituição do uso de animais por métodos alternativos em pesquisas no Brasil.

Essas novas metodologias são validadas por vários países e possuem aceitação regulatória internacional. Além das preocupações éticas em relação a experimentação animal, também é repetidamente demonstrado que nem todos os modelos animais representam de forma fiel a biologia humana, por isso, podem resultar em dados incorretos. Em consequência a essa inadequação, é crescente a procura de alternativas, uma delas sendo o desenvolvimento de tecnologias médicas que mimetizam um organismo ou parte dele (HOLMES; BROWN; SHAKESHEFF, 2009).

1.2 BIOMATERIAIS E ARCABOUÇOS

O ponto chave para conquista de bons resultados dentro da Engenharia Tecidual recai sobre o desempenho do ambiente onde sucede o crescimento celular, permitindo que a atividade celular ocorra como se estivesse no tecido nativo. Por essa razão, muitas pesquisas da área de Engenharia Tecidual têm como foco o desenvolvimento e caracterização de arcabouços, estruturas que proporcionam apoio tridimensional, com particularidades que permitam o desenvolvimento das células até que elas sejam capazes de produzir sua própria matriz extracelular (MEC) (CARLETTI; MOTTA; MIGLIARESI, 2011). Em resumo, características como arquitetura e composição de um arcabouço visam colaborar para a proliferação, o crescimento e a migração celulares semelhantes aos nativos, sendo esse um desafio na elaboração de um arcabouço ideal.

Para cumprir adequadamente sua função, um arcabouço deve ser composto por materiais biocompatíveis e biodegradáveis. Biocompatibilidade é a base para o uso de arcabouços em Engenharia Tecidual, pois refere-se à interação do tecido e o sistema biológico, pois a resposta inflamatória do organismo deve ser controlada para ser a mínima possível. A degradação do material deve acontecer de tal forma que não desencadeie respostas inflamatórias do organismo ou outras complicações, por meio de vias fisiológicas

já que o arcabouço é projetado para ser um suporte temporário e deve ser eliminado à medida que o neotecido é formado (SHICK et al., 2019).

O poli(ácido láctico) (PLA) é um polímero amplamente usado em aplicações terapêuticas justamente por suas propriedades biocompatíveis e biodegradáveis. O PLA consiste em ácido láctico produzido pela fermentação de *Lactobacillus*, e suas características químicas permitem sua degradação por desesterificação. Isso leva à diminuição de tamanho das cadeias e, posteriormente, à eliminação por vias naturais, pois o corpo já contém mecanismos regulados para remoção de componentes como os ácidos lácticos. Ele possui algumas desvantagens que podem limitar suas aplicações e comprometer seu processamento e desempenho, sendo elas: hidrofobicidade, alta fragilidade, baixa taxa de cristalização, sensibilidade à umidade e a degradação em altas temperaturas (INKINEN et al., 2011; REZWAN et al., 2006).

O polímero polietilenoglicol (PEG) também é reconhecido pela literatura no uso de fármacos por possuir desempenho e resposta no organismo semelhante aos integrantes nativos da MEC. Este promove respostas biológicas semelhantes ao PLA em relação à citotoxicidade, sendo classificado como atóxico não imunogênico. No entanto, ao contrário do PLA, possui caráter hidrofílico, sendo solúvel em água, proteínas e outras biomoléculas (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016).

Com o propósito de combinar as propriedades de polímeros individuais para obter um material com novas características, vários trabalhos buscam a fabricação de blendas poliméricas (mistura física de dois ou mais polímeros, sem que haja reação química entre eles).

1.2.1 Mantas poliméricas

Um dos aspectos mais importantes da Engenharia Tecidual é a fabricação de biomateriais porosos tridimensionais que possam promover um ambiente apropriado para regeneração de tecidos e órgãos. Atualmente, uma das composições mais utilizadas de arcabouços envolve materiais de escala nanométrica. Nanotecnologia é o termo usado para denominar o uso de materiais em uma faixa entre 1 e 100 nanômetros (10^{-9} metros) (BAYDA et al., 2020).

A tecnologia de produção de mantas poliméricas ganhou foco devido à proximidade que suas características estruturais podem chegar a MEC nativa. Medeiros e colaboradores desenvolveram um método de produção de mantas poliméricas, o *Solution Blow Spinning*

(SBS) (ou fiação por sopro em solução), que se diferencia das demais metodologias por não necessitar do uso de tensões elevadas, pois as forças elétricas são substituídas pelas forças aerodinâmicas utilizando ar pressurizado. Durante o processo de fabricação, as mantas poliméricas não tecidas são formadas em escalas micro ou nanométricas dependendo das condições experimentais estabelecidas, como a escolha do solvente de composição mais adequada para o objetivo do construído (MEDEIROS et al., 2009).

Nanopartículas de óxido de ferro (III) (Fe_2O_3) são de interesse em uma ampla gama de aplicações biomédicas devido às suas propriedades magnéticas únicas, podendo auxiliar na suspensão celular em co-culturas (KARAMI; HENKEL; OFFRINGA, 2017). Esse material possui propriedades magnéticas que fazem dele uma escolha comum para uso como agente de contraste para exames médicos, essa característica magnética pode servir como estratégia para co-cultura de células. Isto é, por meio do uso de uma fonte de atração magnética, como o ímã, pode-se obter uma bicamada de diferentes tipos celulares no mesmo espaço (LAURENT et al., 2010). Além disso, vê-se na literatura que tais nanopartículas servem como reforço para arcabouços poliméricos, por seu efeito positivo nas propriedades mecânicas (CAI et al., 2016).

1.3 ENGENHARIA TECIDUAL DA PELE

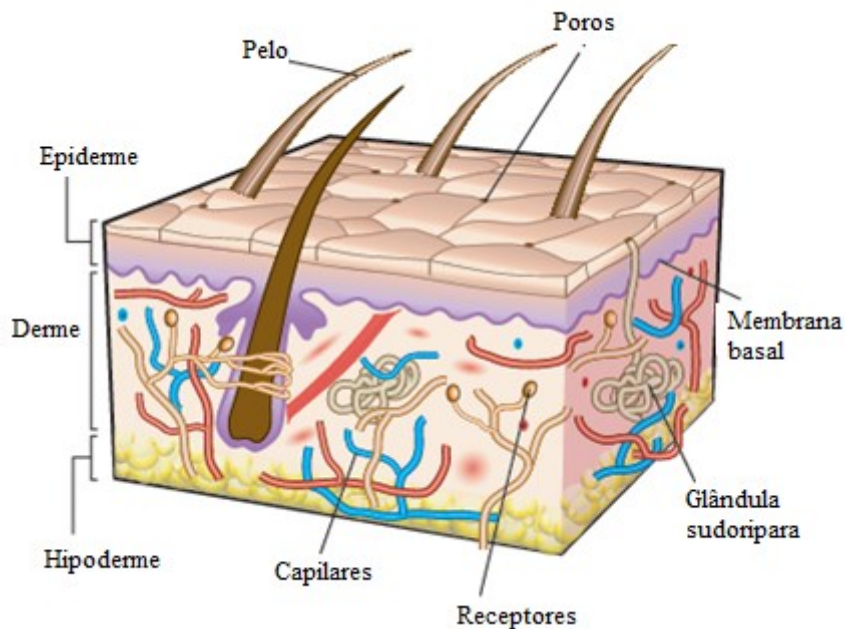
A pele é o maior órgão do corpo humano, representando aproximadamente 16% de toda massa corporal. É a interface primária entre os ambientes interno e externo, agindo como uma barreira que protege outros tecidos de estressantes externos e mantém a homeostase por meio da prevenção da perda de água e eletrólitos (WONG et al., 2016).

Como ilustrado na Figura 2, a pele é formada por três camadas: epiderme, derme e hipoderme, cada uma com funções e características histológicas específicas. A camada mais superficial da pele é a epiderme, de fina espessura que se liga a derme pela membrana basal. A epiderme é composta principalmente por queratinócitos, células que produzem a queratina, uma proteína resistente e impermeável responsável pela proteção da pele. Ela não possui vasos sanguíneos, fazendo com que os nutrientes e o oxigênio cheguem a esta camada por difusão, através dos vasos sanguíneos da derme (MACNEIL, 2007; WONG et al., 2016).

A derme é um sistema integrado de fibras de colágeno, filamentos e tecido conjuntivo amorfo, abaixo da epiderme, no qual estão imersos os anexos cutâneos, vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Aqui os estímulos do

meio ambiente são transmitidos ao cérebro, através dos nervos, estes estímulos são traduzidos em sensações. É na derme que estão localizados os folículos pilosos, os nervos sensitivos, as glândulas sebáceas, responsáveis pela produção de sebo, e as glândulas sudoríparas, responsáveis pelo suor. Na camada mais profunda da pele, a hipoderme é formada por lóbulos de adipócitos, confere à pele proteção mecânica, atua como isolante térmico, depósito de calor e possui função endócrina. Estão presentes nesta camada, além de adipócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (MACNEIL, 2007; NICOL, 2005)

Figura 2 - Representação da anatomia da pele.



Fonte: Traduzido do artigo “*Progress and opportunities for tissue-engineered skin*” (MACNEIL, 2007)

Em caso de lesão, o organismo tem a capacidade de cicatrizar a ferida, porém o processo é complexo e precisa ser bem orquestrado, pois envolve a ação de diversos agentes em diferentes etapas até que ocorra a remodelação do tecido (ZENG et al., 2011). Por esse motivo, no caso de feridas profundas e queimaduras extensas, o curso padrão de cicatrização acaba não sendo suficiente. Essa inabilidade de reparo do tecido dérmico pode levar a perda de sua capacidade de regulação de temperatura, desenvolvimento de ferida crônica e em muitos casos, até a morte por sepse do paciente. Se a perda for mais extensa que 4 cm de diâmetro em todas as camadas da pele, faz-se necessário o uso de enxertos como tratamento (ROGER et al., 2019; VIG et al., 2017). Lesões na pele acabam por expor

outros tecidos a vírus e bactérias que podem levar a infecções ou a outras doenças, possibilitando o desenvolvimento de úlceras crônicas. Por essa razão, é indispensável o desenvolvimento de novas tecnologias com substitutos artificiais para regeneração de pele. (FALANGA; FARIA; BOLLENBACH, 2013; KENGLA et al., 2019)

1.3.1 Produtos disponíveis no mercado

Os equivalentes de pele disponíveis no mercado são variados, podendo até mesmo serem desprovidos de células, ou seja, acelulares. Como demonstrado anteriormente, há inúmeras possibilidades de materiais, células e métodos para o desenvolvimento de peles artificiais, mesmo assim, apesar de ser um produto difuso, cada tecnologia possui suas limitações. No quadro a seguir estão alguns dos produtos comercializados.

Quadro 1 - Equivalentes de pele disponíveis no mercado

Produto	Fabricante	Componentes celulares	Material do arcabouço
Epiderme			
Epicel	Vericel Corp., Cambridge, MA, EUA	Queratinócitos autólogos	Gaze de petrolatum
Affinity	Organogenesis Holdings Inc., Canton, MA, EUA	N/A	Placenta humana
Skin Temp II	Human BioSciences, Kollagen, Gaithersburg, MD, EUA	N/A	Colágeno Nativo Bovino Tipo 1 não hidrolizado
Derme			
Dermagraft	Organogenesis Holdings Inc., Canton, MA, EUA	Fibroblastos da pele humana de origem neonatal alogênicos	Poliglactina
OASIS Wound Matrix	Cook Biotech Inc., West Lafayette, IN, EUA	N/A	Submucosa intestino suíno
Epiderme – Derme (Compósito)			
Apligraf	Organogenesis Holdings Inc., Canton, MA, EUA	Células tronco, fibroblastos e queratinócitoa da pele de origem neonatal alogênicos	Colágeno Bovino Tipo I

ReadiGRAFT CryoSkin	LifeNet Health, Virginia Beach, VA, EUA	Fibroblastos e queratinócitos alógenicos	Silicone
Integra	Integra LifeSciences, Billerica, MA, EUA	N/A	Colágeno Bovino Tipo I, glicosaminoglicano e silicone

Fontes: (KAMEL et al., 2013; PRZEKORA, 2020; VIG et al., 2017; ZENG et al., 2011, 2017)

Os produtos mencionados na tabela são utilizados para auxiliar no fechamento de feridas crônicas, queimaduras e outros. Entretanto, as limitações desses produtos disponíveis no mercado envolvem, por exemplo risco de rejeição. Podemos citar como exemplo o Dermagraft, que pode ocasionar insuficiente nutrição das células com fatores de crescimento necessários (MARSTON et al., 2003). Existem algumas contraindicações que reduzem o âmbito para uso dos produtos, o tempo para manufatura que chega a 3 semanas e o principalmente o alto custo, como o do Epicel e Apligraf, que inviabiliza o tratamento de lesões extensas (CARLSON et al., 2011; CARSIN et al., 2000).

Diante do exposto, o presente trabalho visa explorar metodologias alternativas para elaboração de um substituto dérmico *in vitro*, a partir do uso de biomateriais nanométricos como suporte celular, sendo eles uma matriz polimérica não-tecido de blenda PLA/PEG e nanopartículas de óxido de ferro (III), fornecidos respectivamente pelas universidades federais da Paraíba (UFPB) e de Uberlândia (UFU) combinado ao cultivo de fibroblastos. Com base nos fundamentos reunidos, foram realizados experimentos sobre a interação entre os arcabouços e as células, avaliando expansão celular sobre o biomaterial.

Este trabalho visa à valorização do campo de pesquisa brasileira, tal como tenta minimizar a dependência financeira de produtos internacionais. Pois, apesar de a legislação brasileira permitir a importação de substitutos dérmicos produzidos no exterior, sabe-se que o valor de compra é alto e o processo de chegada do produto ao requisitante muitas vezes compromete a qualidade e eficácia do mesmo, tornando a importação um meio oneroso.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento inicial de substituto dérmico *in vitro* para aplicações nas áreas de medicina regenerativa e testes laboratoriais, através do cultivo de fibroblastos em matrizes poliméricas de blenda de PLA e PEG enriquecidas com nanopartículas de óxido ferro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tem-se como objetivos específicos:

- Avaliação da citotoxicidade das matrizes poliméricas de PLA/PEG, enriquecida e não enriquecida com nanopartículas de óxido de ferro (III);
- Análise da composição e organização do tecido formado sobre a matriz polimérica de PLA/PEG, enriquecida e não enriquecida com nanopartículas de óxido ferro.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 NANOPARTÍCULAS

Nanopartículas de óxido de ferro (III), com aproximadamente 1 - 100 nm de diâmetro, foram sintetizadas pelo método de precipitação e cedidas por meio da parceria com a Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva, Laboratório de Novos Materiais Isolantes (LNMIS), do Instituto de Física (INFIS) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (Uberlândia, MG, Brasil). Estas foram enviadas ao Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (João Pessoa, PB, Brasil) para incorporação nas mantas fibrosas.

3.2 ARCABOUÇO FIBROSO

Os arcabouços foram obtidos através de parceria com o Laboratório de Materiais e Biosistemas (LAMAB) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (João Pessoa, PB, Brasil), cedidas pelo Prof. Dr. Eliton Souto de Medeiros. Composição do material: poli(ácido láctico) (PLA – Mn 7500 g/mol) (Biomater, São Paulo, SP, Brasil) e polietilenoglicol (PEG – Mn 8000 g/mol) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A produção foi por SBS, as mantas foram obtidas a partir da proporção em massa de PLA/PEG 7:3; concentração de 15% m/v, utilizando o clorofórmio PA (pureza analítica) obtido da Vetec Química Fina Ltda (Brasil), com incorporação de 8% nanopartículas de óxido de ferro (III) em relação a massa polimérica no grupo de amostras composta pela blenda de PLA/PEG enriquecida com nanopartículas (FERREIRA, 2017).

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Cultura Celular

A linhagem de células fibroblastos de origem humana (HFF) na terceira passagem utilizada nesse trabalho foi obtida através da parceria com o Laboratório de Imunologia da UFU (Uberlândia, MG, Brasil), pelo Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Junior.

Primeiramente, foi efetuado o protocolo de descongelamento das células para garrafas de cultura celular de tamanho médio (75cm²), utilizando meio celular RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e 1% de antifúngico e

antibiótico (10.000 U/mL de penicilina/ 100mg/mL estreptomicina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). O *vial* foi retirado do ultrafreezer e, com o auxílio do banho maria digital CT2459 (Cientec, Belo Horizonte, MG, Brasil) à 37°C, foi descongelado ao adicionar meio aquecido. O conteúdo do *vial* foi transferido ao tubo Falcon de 50 mL já contendo 1 mL de meio aquecido, esse foi centrifugado na Centrifuge 5702 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 1500 RPM por 5 minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi retirado e descartado, e as células no fundo do tubo foram vigorosamente ressuspensas em 2 mL de meio. Ao final, o meio homogêneo foi transferido para uma garrafa média com 10 mL de meio de cultivo.

Logo após o procedimento de descongelamento, as células HFF foram visualizadas através do Microscópio EVOS™ XL Digital Inverted Brightfield and Phase Contrast Microscope (Invitrogen, Waltham, MA, EUA), e por meio desse foi feito o acompanhamento visual das mesmas. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida a uma taxa de 5% de CO₂, na incubadora de cultivo celular FORMA Series II Water Jacketed CO₂ Incubator, 184L, (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) com três trocas semanais de meio de cultura até a cultura atingir a taxa de 80% de confluência, ou seja, etapa em que a camada de células no fundo da garrafa torna-se mais densa e eventualmente ocupa toda a superfície da garrafa.

3.3.2 Plaqueamento

Foi feito o recorte, em formato circular, das mantas enriquecidas e não enriquecidas com nanopartículas magnéticas, e estas foram posicionadas em quatro placas de 96 poços. Dos 14 poços utilizados, foi feita triplicata dos testes de viabilidade MTT, duplicata do ensaio de imunofluorescência e H&E, onde foram feitos ensaios avaliando o controle, a interação das células com as mantas não enriquecidas e por fim, a interação com as mantas enriquecidas. As análises foram realizadas nos dias 1, 4, 8 e 14 de cultura. Como controle, poços sem as mantas poliméricas foram mantidos. As placas montadas foram esterilizadas através de exposição a luz UV do fluxo, pelo período de uma hora.

Em seguida, utilizando o método de contagem de células com auxílio da Câmara de Neubauer, contabilizou-se a quantidade de fibroblastos por mL. A partir disto, as HFF foram semeadas a uma densidade de 1×10^4 células por poço, com 200µL de meio de cultura por poço. Para realização desse processo foi seguido o protocolo de tripsinização, onde primeiro retirou-se o meio de cultura da garrafa e inseriu-se 1,5 mL de enzima tripsina 1X a 0,05% de

concentração (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) deixando com tempo de incubação de 3 minutos na incubadora de cultura para que as células aderidas ao fundo da garrafa se soltassem. Após a reação da enzima, utilizou-se 5 mL de meio RPMI para inativá-la, a solução foi recolhida e centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos. Posteriormente foi ressuspenso vigorosamente, e transferiu-se 10 µL da suspensão para um microtubo, onde adicionou-se o corante azul de Tripán, para visualização das células ativas e inativas (mortas).

O método de exclusão de corante azul de Tripán funciona da seguinte forma: a solução de azul de Tripán penetra nas células não viáveis (mortas por necrose) deixando-as coradas em azul. Esse teste se baseia no princípio de que células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem certos corantes, um desses corantes é o azul de Tripán, por conseguinte, células mortas não fazem o mesmo. Por fim, tal solução foi inserida na câmara de Neubauer e visualizada por meio do microscópio invertido (WARREN S., 2015).

3.3.3 Ensaio colorimétrico de viabilidade por MTT

A avaliação de viabilidade celular foi feita pela técnica colorimétrica por MTT, que dosa a atividade metabólica celular, utilizando o protocolo para células aderentes. Esse método consiste na redução do brometo de [3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT) em cristais de MTT-formazan pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase. Em outras palavras, é a redução do sal tetrazólico, de coloração amarela solúvel em água, que é catalisado pelo sistema desidrogenase metabolicamente ativo através de enzimas oxidorrredutoras em cristais de formazan, de coloração azul arroxeado insolúvel em água (PRÄBST et al., 2017). Essa redução acontece por meio do metabolismo ativo das células, significando que essas células estão vivas, sendo assim a quantidade final do produto MTT-formazan corresponde proporcionalmente ao número de células vivas presentes na solução estudada (MOSMANN, 1983).

Primeiramente, foi feita a diluição de 5 mg de MTT em pó em 1 mL de tampão PBS 1X. Em seguida, a solução foi filtrada.

O ensaio consistiu em inicialmente retirar o meio de cultura de cada poço da placa, lavá-los duas vezes com PBS 1X estéril. Logo depois, adicionou-se 10% do volume do poço de solução de MTT (5mg/mL) e 90% do volume de meio sem soro, incubando pelo período de 4 horas. Após esse tempo, o meio foi retirado com a solução de MTT e adicionados 100µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) puro. Os cristais de Formazan formados foram solubilizados por meio de ressuspenso em DMSO e transferido a outra placa, medidos por

espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm pela leitora de microplaca SpectraMax (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA).

3.3.4 Ensaio colorimétrico de hematoxilina e eosina (H&E)

Ensaio de coloração têm como finalidade evidenciar as diferentes estruturas que compõem os tecidos, permitindo a visualização clara de vários constituintes celulares, como: núcleo, citoplasma e MEC. Os corantes hematoxilina e eosina (H&E) são comumente usados no campo de estudos histológicos, por sua simplicidade na manipulação e protocolo. A hematoxilina é um corante básico que possui característica por afinidade basófila, corando os núcleos celulares com tom azul arroxeado pois estes são ricos em DNA (Ácido desoxirribonucleico), sendo assim ocorre atração pelo corante, evidenciando detalhes intranucleares. Enquanto a eosina é um corante ácido e cora fibras do tecido conjuntivo e citoplasma, que possuem caráter mais básico, em diferentes tonalidade e intensidades de rosa, laranja ou vermelho (BANCROFT; LAYTON; SUVARNA, 2017).

De antemão deve-se realizar a fixação das células, esse processo paralisa o metabolismo celular e preserva as estruturas do tecido, permitindo que as análises possam ser feitas sem prejudicar as células. A fixação foi realizada com formol 4% tamponado aos poços, e após 24 h de fixação retirou-se o formol, adicionando álcool 70% para conservação até inicialização da coloração. Para contra coloração de hematoxilina, primeiro foi retirado o álcool dos poços, as placas foram lavadas com PBS 1X e submergiu-se o material em Hematoxilina de Harris, gotejando a coloração diretamente no poço, por 1 minuto. A manta foi retirada e lavada com 100µL de água destilada por 15 segundos. O mesmo protocolo foi seguido para contra coloração de eosina.

As análises foram feitas a partir das imagens obtidas através de microscopia de luz obtidas pelo Microscópio Binocular Acromático 1600X Iluminação em LED K55-BA (Kasvi, São José do Pinhais, PR, Brasil).

3.3.5 Ensaio de Imunofluorescência

Imunofluorescência é uma técnica imunoquímica amplamente usada que permite a detecção e localização de uma grande variedade de antígenos em diferentes tipos de tecidos, utiliza anticorpos fluorescentes para detecção do alvo específico.

Para marcação do citoesqueleto celular usou-se a técnica de imunofluorescência

indireta, sendo essa mais sensível, método que consiste em um processo de duas incubações. Foram utilizados os anticorpos β -actina de coelho e conjugado com um dos fluorocromos mais utilizados, o isotiocianato de fluoresceína (FITC), marcando o citoesqueleto de coloração verde. Para marcar o núcleo, foi utilizado o marcador de DNA ToPRO-3.

Com as células já fixadas, os poços foram lavados com PBS 1X, primeiro colocou-se 100 μ L de anticorpo primário (β -Actina) na concentração 1:50, diluição em PermWash com saponina 0,1%. Depois de uma hora de incubação em 37°C, os poços foram lavados com PermWash, para adição do anticorpo secundário (Anti β -Actina) na concentração 1:100, diluição em PermWash, na mesma solução foi adicionado o marcador de núcleo ToPro na concentração 1:150, diluído em PermWash com saponina 0,1% com descanso de 20 minutos das lâminas. Em seguida os poços foram lavados e dispostos em lâminas, adicionados 2 μ L de parafenileno-diamino (PPD), um inibidor de decaimento de fluorescência a fim prolongar a marcação fluorescente até a análise microscópica. Após montagem, lamínulas foram colocadas sobre as lâminas e seladas com esmalte. As lâminas foram observadas no Microscópio Confocal LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), situado na Rede de Laboratórios Multiusuários (RELAM), UFU.

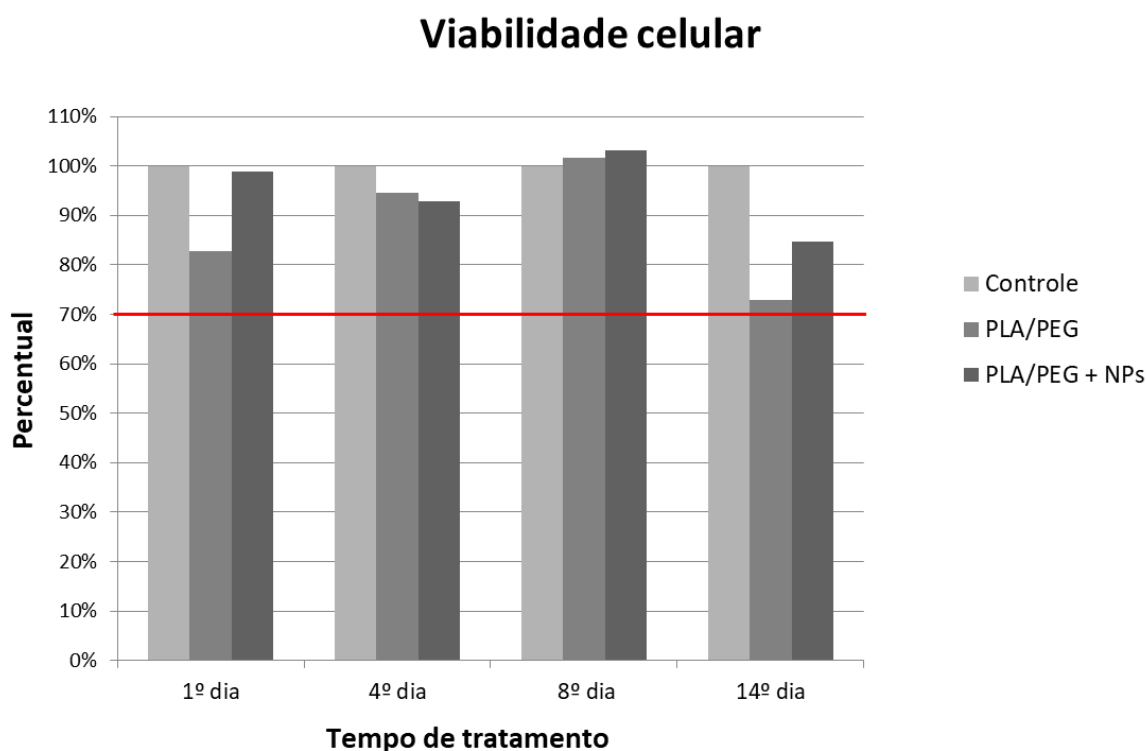
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 ENSAIO COLORIMÉTRICO DE VIABILIDADE POR MTT

A espectrofotometria é um método utilizado para medir a absorbância de um material, em outras palavras, o quanto uma substância química absorve a luz, medindo a intensidade de um feixe de luz quando ele passa através da solução da amostra. No caso do ensaio colorimétrico de viabilidade por MTT, onde a intensidade da coloração púrpura está relacionada a viabilidade celular, quanto maior a concentração de formazan, mais roxa a solução e maior a absorbância apresentada.

Os possíveis efeitos citotóxicos do material do arcabouço sobre as células foram investigados por meio desse ensaio, e os resultados estão expressos no gráfico da Figura 3. A linha vermelha na figura indica o percentual mínimo de absorbância em relação ao controle para que não seja considerado citotóxico.

Figura 3 – Representação gráfica dos resultados do ensaio de viabilidade por MTT em porcentagem



Em comparação ao restante dos tempos analisados, o tempo de 8 dias apresentou visualmente os melhores resultados tanto para o tratamento com nanopartículas e sem nanopartículas, que chegou a ultrapassar a viabilidade do controle. Esse resultado é similar ao

encontrado por Mohiti-Asli *et al*, onde constataram que fibroblastos em arcabouços fibrosos de PLA tinham seu maior nível de proliferação no dia 7, em um período de incubação total de 14 dias. Tal fenômeno pode ser explicado pela inibição de contato entre os fibroblastos no dia 7, que leva à confluência das células, não mais proliferação e uma redução geral no metabolismo celular (MOHITI-ASLI *et al.*, 2017).

Em geral, os resultados sugerem que a presença da manta polimérica e de ambos os materiais em conjunto (manta e NPLs) não mostrou efeitos prejudiciais significativos às células HFF, pois a viabilidade se manteve, em todos os períodos analisados, acima do mínimo estipulado.

A interação entre fibroblastos e polímeros como PLA e PEG tem sido estudada em outras combinações, resultando em efeitos positivos. Como visto na literatura, o PLA mostrou-se biocompatível, ajudando na adesão das células e na penetração das células manta adentro (GAZZOLA; BENSON; CARVER, 2019; JACOBS *et al.*, 2013; SINGHVI; ZINJARDE; GOKHALE, 2019). Por compor métodos seguros e baratos para tratar feridas e queimaduras, o PEG também já foi utilizado em trabalhos semelhantes, se mostrando eficaz para a cicatrização em trabalhos como os de Masood *et al.* de 2019, onde foi usado para acelerar a cicatrização de feridas diabéticas de coelhos (YUN *et al.*, 2012; MASOOD *et al.*, 2019).

Com relação aos arcabouços enriquecidos com NPs de óxido de ferro (III), na literatura, há trabalhos onde resultados semelhantes foram observados a partir da exposição de fibroblastos a nanopartículas de óxido de ferro (III), a viabilidade das células sofreu uma leve queda (ABAKUMOV *et al.*, 2018; GHASEMPOUR *et al.*, 2015). Esse resultado pode estar relacionado às características físicas ou químicas das nanopartículas, que podem afetar a membrana celular ou organelas intracelulares e causar lesões ou até mesmo morte celular. No entanto, esse fenômeno não foi observado no presente trabalho.

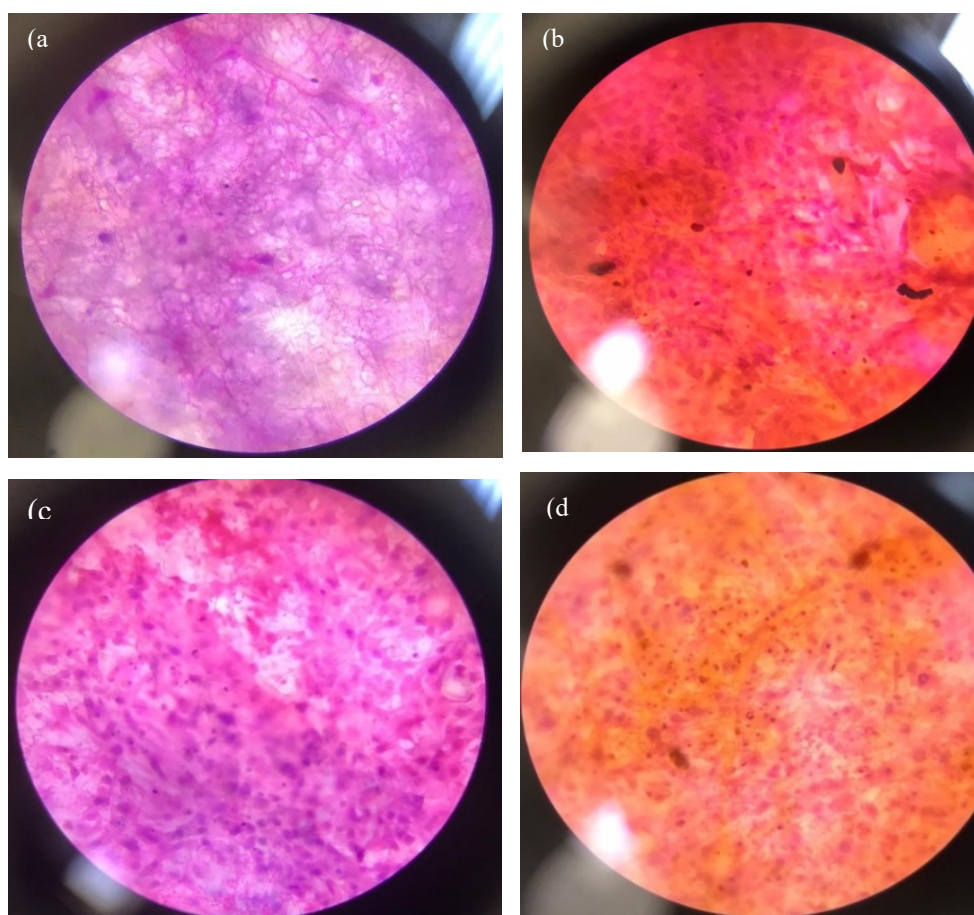
Por exemplo, um estudo de Xia *et al.* (2006) mostrou que a lesão da cadeia respiratória mitocondrial na presença de nanopartículas diminui o ATP, causa a formação de espécie de oxigênio reativo e cria estresse oxidativo que, por fim aumenta a probabilidade de lesão ou morte celular (XIA *et al.*, 2006). No entanto, os resultados sugerem que ao considerar o controle como 100% de células viáveis, a queda não faz com que o tenha potencial citotóxico, por se manter acima de 70% (representado pela linha vermelha), referência de taxa mínima para ser considerado não tóxico. Essa taxa é estipulada pela ISO 10993-5:2009 *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* para o teste de viabilidade MTT.

4.2 ENSAIO COLORIMÉTRICO DE HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)

Como explicado anteriormente, o ensaio H&E é o principal ensaio colorimétrico que permite a visualização de diversos constituintes celulares conforme o pH da estrutura. A hematoxilina que possui afinidade por estruturas ácidas (basófilas), por sua vez, cora de tons entre azul e roxo núcleos celulares, por exemplo. Em contrapartida, a eosina possui afinidade por estruturas básicas (acidófilas) corando estruturas como o tecido conjuntivo e o citoplasma em diferentes tonalidades de vermelho, rosa ou laranja.

Nesse ensaio optou-se por apresentar os registros do primeiro e último dias de testes para resumir os dados, devido à qualidade da marcação e impossibilidade de repetir os testes em decorrência da situação pandêmica. Os registros dos dias 1 e 14 do ensaio estão dispostos na Figura 4.

Figura 4 – Microscopia Óptica - Visualização pelo microscópio de luz branca do ensaio colorimétrico H&E: (a) Dia 1, fibra de PLA/PEG; (b) Dia 1, fibra de PLA/PEG enriquecido com NPs; (c) Dia 14, fibra de PLA/PEG; (d) Dia 14, fibra de PLA/PEG enriquecido com NPs



Fonte: autoria própria

Os fibroblastos são caracterizados pelo seu alto potencial proliferativo e migratório, e

por serem células aderentes, em outras palavras, precisam de uma estrutura de apoio para se proliferarem. São muitas vezes definidos morfológicamente como alongadas, devido ao citoplasma abundante com vários prolongamentos fibrilares e possuem núcleos ovóides (SORREL; CAPLAN, 2009).

Interações entre fibroblastos e outras células dependem da expressão de moléculas de sinalização celular e da MEC. Esses fatores evidenciam a importância entre as junções e comunicações intercelulares quando essas células são cultivadas em ambientes bidimensionais (2D), não fiéis ao ambiente nativo, e tridimensionais, que buscam mimetizar ambiente nativo (SORREL; CAPLAN, 2009).

Eles não só sintetizam e secretam MEC (elastina, colágeno, proteoglicano, glicosaminoglicanos, proteinases), como também produzem uma mistura complexa de fatores bioativos, ambos contribuem para a regulação imunológica e a cicatrização de feridas. Além disso, fibroblastos produzem uma malha interconectada de fibras proteicas extracelulares e proteínas conectoras que fornecem estrutura para o tecido (KENDALL, R. et al., 2014).

Ao observar a estrutura da manta polimérica pelo microscópio, surgiram dúvidas sobre a uniformidade da organização da trama, abrindo questionamento se ela possui dimensões nanométricas em seu todo, pois é possível visualizar que em algumas áreas ela possui características de microfibras. Outras análises são necessárias para sanar essa dúvida.

Em análise dos resultados do ensaio de H&E, observa-se nitidamente a alteração de cor entre as amostras sem a presença das nanopartículas de óxido de ferro (III) em comparação onde essas foram adicionadas, que resultou em coloração mais alaranjada. Com essa mudança a visualização clara das estruturas coradas pelo H&E ficou prejudicada.

Vale lembrar que os óxidos de ferro (III) são amplamente utilizados como pigmentos alimentares industriais, rotulado como aditivo alimentar E172, nas quais as diferentes cores resultam de diferentes estruturas químicas. Os mais comuns são magnetita (Fe_2O_4) que cora de preto, maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$) que cora de amarelo, e hematita ($\alpha - Fe_2O_3$) que cora de vermelho ou alaranjado terroso. Como nesse ensaio foram usadas nanopartículas de óxido de ferro (III) (Fe_2O_3), a coloração alaranjada vem do pigmento que o material produz, esse resultado evidencia que houve a difusão das células no material (VOSS, L. et al., 2020; VOSS, L. et al., 2020).

Outra análise que pode ser feita é em relação a evidenciação dos núcleos, corados de roxo. O controle sobre a morfologia das células dos tecidos é importante, pois através do monitoramento dela, conseguimos avaliar o estado sistema. Esse controle permite analisar se está ocorrendo morte celular, processo ao qual gera alterações morfológicas macroscópicas.

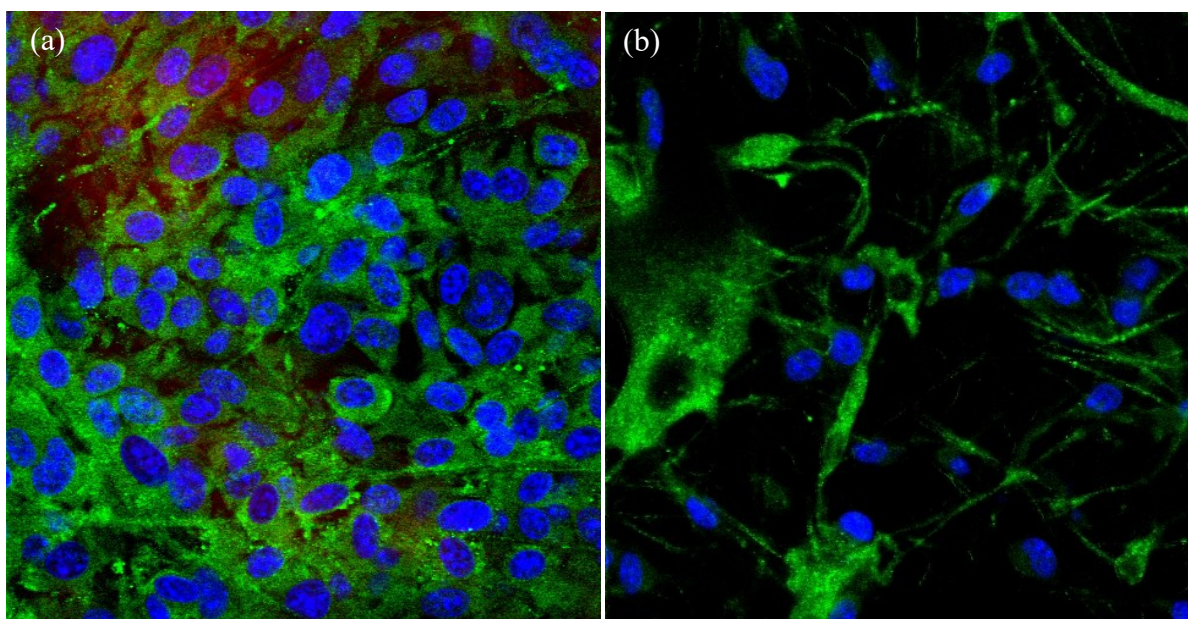
Aumento da célula e ruptura da membrana, são exemplos de alterações ocasionadas pelo processo de morte celular do tipo necrose, já a apoptose tem como uma das características a fragmentação do núcleo. Por isso, a visualização clara dos aspectos das células em ensaios colorimétricos e imunofluorescentes são meios onde é possível verificar o estado dos constituintes celulares. Os resultados obtidos nos ensaios colorimétricos acima, combinados aos resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade MTT, permitem concluir que a blenda não induziu morte celular.

A marcação do citoplasma do HFF corada de tons alaranjados, apesar de ter sido prejudicada pela presença das NPs, evidenciou na amostra sem adição de NPs que as células conseguiram se adaptar à trama do material e expandir. Em outros termos, as células HFF usaram a estrutura do arcabouço como apoio para se proliferarem e secretaram proteínas de MEC, conseguindo depositar sustentação própria. Os resultados obtidos sugerem que as células conseguiram criar um ambiente endógeno, sendo esse o objetivo do estudo.

4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

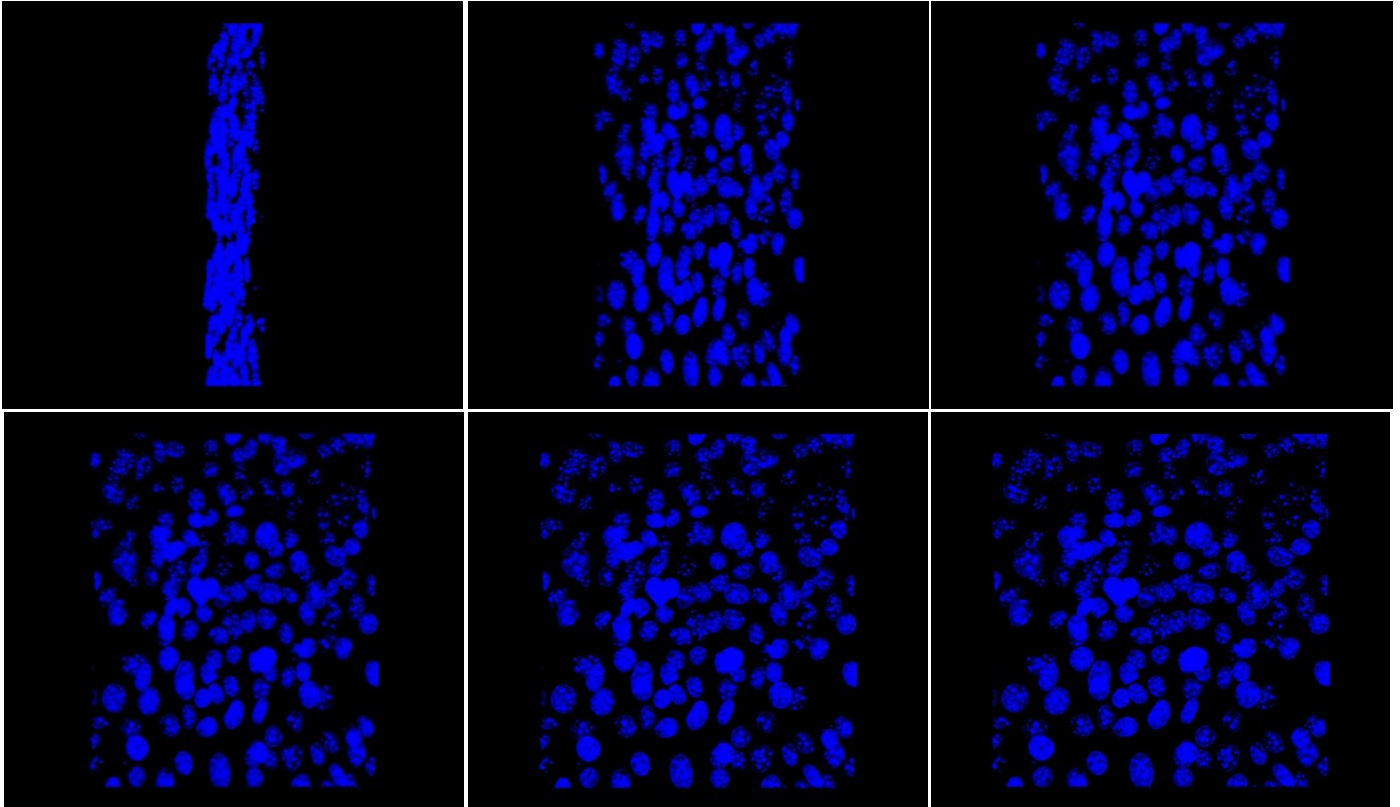
As imagens do ensaio de imunofluorescência foram capturadas por um Microscópio Confocal, obtidas com o uso de marcadores com propriedades fluorescentes, sendo eles o ToPRO-3 para marcação do núcleo e o anticorpo β -Actina para marcação do citoesqueleto. Devido à qualidade da marcação e impossibilidade de repetir os testes, somente os registros do dia 8 estão dispostos neste trabalho (Figuras 6 e 7).

Figura 5 – Leitura Confocal, Dia 8, fibra de PLA/PEG + NPs Marcação Citoesqueleto e Núcleo de fibroblastos (a) Evidenciando a marcação dos núcleos; (b) Evidenciando a marcação de citoplasma



Fonte: autoria própria

Figura 6 - Leitura Confocal com captura sequencial em diferentes angulações, Dia 8, fibra de PLA/PEG + NPs NPs Marcação Citoesqueleto e Núcleo de fibroblastos



Fonte: autoria própria

É possível observar que as células se mantiveram íntegras, sem alterações morfológicas. Bem como, verifica-se pela marcação do citoplasma do HFF, que as células conseguiram se adaptar a trama do material, já que se consegue ver grande área marcada de verde. Em outros termos, os resultados sugerem que as células HFF conseguiram usar a estrutura do arcabouço como apoio.

Além disso, a partir da sequência de imagens capturadas da lâmina referente ao dia 8, dispostas na Figura 6, observa-se a migração das células para vários níveis da trama da matriz polimérica, evidenciando que sua disposição auxilia na sustentação e mimetiza a MEC dérmica tridimensional.

No modelo *in vivo*, a pele é constituída por diversos tipos celulares, que se organizam em diferentes camadas, isso torna a disposição celular complexa ao tentar reproduzi-la, ou seja, um desafio para replicação *in vitro*. O uso de NPs entra como facilitador que tem como potencial, devido as suas características magnéticas que podem ser estimuladas por ímas, dividir em camadas dois tipos celulares em um mesmo ambiente (KARAMI; HENKEL;

OFFRINGA, 2017).

Em relação à estruturação da cultura celular, os resultados obtidos sugerem que o uso de nanotecnologia é promissor, devido à sua arquitetura e porosidade adequadas, onde sua trama permitiu a penetração das células por todo o material, auxiliando no processo de proliferação celular. Assim, garantindo a expansão em diferentes níveis do suporte, por ser uma biomimetização à MEC natural (JAYARAMA REDDY et al., 2013; KEIROUZ et al., 2020).

5 CONCLUSÕES

É possível concluir que o arcabouço não gerou efeitos citotóxicos às células, bem como notou-se, a partir das análises dos ensaios de imunofluorescência que houve migração de células para diferentes camadas da matriz. Isto é, a morfologia das células não sofreu alterações, evidenciando que o material utilizado não provoca alterações celulares negativas, sendo promissora a possibilidade de testagem para um futuro uso clínico como substituto dérmico em feridas e como alternativa ao uso de testes em animais. Os resultados sugerem que a organização não tecida da manta proporcionou sustentação suficiente para que ocorresse a proliferação saudável dos fibroblastos de pele humana (HFF), se aproximando mais ao *habitat* das células no organismo *in vivo*, onde ocorre o crescimento e sobreposição celular pela MEC.

5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho abre espaço para perspectivas futuras, com a possibilidade de trabalhar com a co-cultura de células cutâneas através do uso da linhagem de queratinócitos HaCat, assim como o acréscimo de colágeno tipo 1, para aperfeiçoamento da MEC *in vitro*.

Por fim, consideramos que ensaios adicionais devem ser realizados, como testes colorimétricos em paralelo com os de imunohistoquímica para análise da MEC endógena, produzido pelas células em cultivo, bem como testes de imunofluorescência para visualização de outros componentes, como elastina, colágeno, fatores de crescimento e outros. Da mesma maneira, deve haver complementação dos protocolos, a fim de obter um substituto dérmico laboratorial completo, onde é possível a introdução de mais estruturas da pele e de receptores sensitivos.

6 REFERÊNCIAS

- ABAKUMOV, M. A. et al. Toxicity of iron oxide nanoparticles: Size and coating effects. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 32, n. 12, p. 1–6, 2018.
- BANCROFT, J. D.; LAYTON, C.; SUVARNA, K. **Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques**. Eighth Ed ed. Nottingham and Sheffield, UK: Elsevier, 2017.
- BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.
- BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 2, p. 403–430, 2011.
- CAI, N. et al. Tailoring mechanical and antibacterial properties of chitosan/gelatin nanofiber membranes with Fe₃O₄ nanoparticles for potential wound dressing application. **Applied Surface Science**, v. 369, p. 492–500, 2016.
- CARLETTI, E.; MOTTA, A.; MIGLIARESI, C. Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. In: HAYCOCK, J. W. (Ed.). **3D Cell Culture: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2011. v. 695p. 17–39.
- CARLSON, M. et al. Epidermal stem cells are preserved during commercial-scale manufacture of a bilayered, living cellular construct (apligraf®). **Tissue Engineering - Part A**, v. 17, n. 3–4, p. 487–493, 2011.
- CARSIN, H. et al. Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: A five year single-center experience with 30 patients. **Burns**, v. 26, n. 4, p. 379–387, 2000.
- CHAUDHARI, A. A. et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.
- CHURCH, D. et al. Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 403–434, 2006.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. Resolução Normativa nº 17, de 3 de julho de 2014. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014.
- D'SOUZA, A. A.; SHEGOKAR, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 9, p. 1257–1275, 2016.
- DE SIMONE, U. et al. Human Co-culture Model of Neurons and Astrocytes to Test Acute Cytotoxicity of Neurotoxic Compounds. **International Journal of Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 463–477, 2017.
- FALANGA, V.; FARIA, K.; BOLLENBACH, T. **Bioengineered Skin Constructs**. Fourth Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2013.
- FERREIRA, K. N. **Estudo da liberação controlada de sinvastatina utilizando nanofibras de PLA/PEG produzidas por fiação por sopro em solução**. Dissertação (Mestrado em Ciência e

- Engenharia de Materiais) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2017.
- FURTH, M. E.; ATALA, A. **Tissue Engineering: Future Perspectives**. Fourth Ed ed. [s.l.] Elsevier, 2013.
- GAZZOLA, W. H.; BENSON, R. S.; CARVER, W. Meltblown Polylactic Acid Nanowebs as a Tissue Engineering Scaffold. **Annals of plastic surgery**, v. 83, n. 6, p. 716–721, 2019.
- GHASEMPOUR, S. et al. Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 10, p. 509–515, 2015.
- HOLMES, A.; BROWN, R.; SHAKESHEFF, K. Engineering tissue alternatives to animals: Applying tissue engineering to basic research and safety testing. **Regenerative Medicine**, v. 4, n. 4, p. 579–592, 2009.
- IM, K. et al. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In: H.YONG, W. (Ed.). . **Biobanking: Methods and Protocols**. [s.l.] Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019, 2019. v. 1897p. 299–311.
- INKINEN, S. et al. From lactic acid to poly(lactic acid) (PLA): Characterization and analysis of PLA and Its precursors. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 3, p. 523–532, 2011.
- INTERNATIONAL STANDARD. **Biological evaluation of medical devices**, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Switzerzland, 2009.
- JACOBS, T. et al. Plasma surface modification of polylactic acid to promote interaction with fibroblasts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 2, p. 469–478, 2013.
- JAYARAMA REDDY, V. et al. Nanofibrous structured biomimetic strategies for skin tissue regeneration. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 1, p. 1–16, 2013.
- KAMEL, R. A. et al. Tissue engineering of skin. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 217, n. 3, p. 533–555, 2013.
- KARAMI, O.; HENKEL, C.; OFFRINGA, R. Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications Lorena. In: SARAH HURST PETROSKO AND EMILY S. DAY (EDS.) (Ed.). . **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Springer Science+Business Media LLC, 2017. v. 1570p. 47–71.
- KEIROUZ, A. et al. 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1–32, 2020.
- KENDALL, R. et al. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 123, 2014.
- KENGLA, C. et al. 3-D bioprinting technologies for tissue engineering applications. **Rapid Prototyping of Biomaterials: Techniques in Additive Manufacturing**, p. 269–288, 2019.
- LANGER, R.; VACANTI, J. Tissue Engineering. **Science**, v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993.
- LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Future**

Medicinal Chemistry, v. 2, n. 3, p. 427–449, 2010.

LAVIK, E.; LANGER, R. Tissue engineering: Current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 1, p. 1–8, 2004.

LOSS, M. et al. Artificial skin, split-thickness autograft and cultured autologous keratinocytes combined to treat a severe burn injury of 93% of TBSA. **Burns**, v. 26, n. 7, p. 644–652, 2000.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 874–880, 2007.

MARSTON, W. et al. The Efficacy and Safety of Dermagraft in. **Diabetes care**, v. 26, n. 6, p. 1701–1705, 2003.

MASSOD, N. et al. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 559, 23–36, 2019.

MEDEIROS, E. et al. Solution Blow Spinning: A New Method to Produce Micro- and Nanofibers from Polymer Solutions. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 113, p. 2322–2330, 2009.

MOHITI-ASLI, M. et al. Ibuprofen loaded PLA nanofibrous scaffolds increase proliferation of human skin cells in vitro and promote healing of full thickness incision wounds in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 2, p. 327–339, 2017.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, p. 55–63, 1983.

NICOL, N. H. Anatomy and physiology of the skin. **Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association**, v. 17, n. 1, p. 62, 2005.

PEREZ-FAVILA, A. et al. Current therapeutic strategies in diabetic foot ulcers. **Medicina (Lithuania)**, v. 55, n. 11, p. 1–21, 2019.

PRÄBST, K. et al. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. **Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin**, v. 1601, p. 1–17, 2017.

PRZEKORA, A. A Concise Review on Tissue Engineered Artificial Skin Grafts for Chronic Wound Treatment: Can We Reconstruct Functional Skin Tissue In Vitro? **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1–29, 2020.

Resolução Normativa N° 17, de 3 de julho de 2014. . [s.l: s.n.].

Resolução Normativa N° 18, de 24 de setembro de 2014. . [s.l: s.n.].

REZWAN, K. et al. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, n. 18, p. 3413–3431, 2006.

ROGER, M. et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. **Journal of Anatomy**, v. 234, n. 4, p. 438–455, 2019.

RUDGE, C. et al. International practices of organ donation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 48–55, 2012.

SHAFIEE, A.; ATALA, A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. **Annual Review of Medicine**, v. 68, p. 29–40, 2017.

SHICK, T. M. et al. A review of biomaterials scaffold fabrication in additive manufacturing for tissue

- engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 34, n. 6, p. 415–435, 2019.
- SINGHVI, M. S.; ZINJARDE, S. S.; GOKHALE, D. V. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 6, p. 1612–1626, 2019.
- SORREL, J.; CAPLAN, A. Fibroblasts - A diverse population at the center of it all. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 276, p. 162-202, 2009.
- VIG, K. et al. Advances in skin regeneration using tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, 2017.
- VOSS, L. et al. Impact of iron oxide nanoparticles on xenobiotic metabolism in HepaRG cells. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 4023-4035, 2020.
- VOSS, L. The Presence of Iron Oxide Nanoparticles in the food pigment E172. **Food Chemistry**, v. 327, n. 127000, 2020.
- XIA, T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v. 6, n. 8, p. 1794–1807, 2006.
- WARREN, S.. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, Apêndice 3, 2015.
- WEBER, B. et al. Stem cells for heart valve regeneration. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, n 13622, 2012.
- WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 95, p. 92-98, 2016.
- YUN, E. J. et al. Cell therapy for skin wound using fibroblast encapsulated poly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) thermogel. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 4, p. 1106–1111, 2012.
- ZENG, Q. et al. **Skin Tissue Engineering**. [s.l.] Elsevier Ltd., v. 6, 2011.