



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Juliana Almeida Domingues

DISPOSITIVO HÍBRIDO DE PVA/COLÁGENO-ÁCIDO
HIALURÔNICO CULTIVADO COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PARA REGENERAÇÃO DÉRMICA

CAMPINAS

(2018)

Juliana Almeida Domingues

**DISPOSITIVO HÍBRIDO DE PVA/COLÁGENO-ÁCIDO
HIALURÔNICO CULTIVADO COM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS PARA REGENERAÇÃO DÉRMICA**

*Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Doutora em Biologia Celular e
Estrutural, na Área de Biologia
Celular.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNA JULIANA ALMEIDA DOMINGUES E
ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ ANGELO
CAMILLI

Orientador: JOSÉ ANGELO CAMILLI

Co-Orientador: ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK

CAMPINAS

(2018)

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D713d Domingues, Juliana Almeida, 1986-
Dispositivo híbrido de PVA/colágeno ácido hialurônico cultivado com células-tronco para regeneração dérmica / Juliana Almeida Domingues. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: José Angelo Camilli.

Coorientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Ácido hialurônico. 2. Nanopartículas de prata. 3. Células mesenquimais estromais. 4. Colágeno. 5. Engenharia tecidual. 6. Macrófagos. 7. Poli (álcool vinílico). I. Camilli, José Angelo, 1963-. II. Duek, Eliana Aparecida de Rezende, 1961-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Hybrid device of PVA/collagen hyaluronic acid cultured with mesenchymal stem cell for dermal regeneration

Palavras-chave em inglês:

Hyaluronic acid

Silver nanoparticles

Mesenchymal stromal cells

Collagen

Tissue engineering

Macrophages

Polyvinyl alcohol

Área de concentração: Biologia Celular e Estrutural

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

José Angelo Camilli [Orientador]

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Monica Beatriz Mathor

André Luis Bombeiro

Data de defesa: 14-05-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 14 de maio de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Angelo Camilli (orientador)

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor

Prof. Dr. André Luis Bombeiro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à minha filha, por ser o motivo que me encorajou e exigiu de mim que acreditasse no meu potencial, além de poder proporcionar a ela um espelho de determinação.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Angelo Camilli, por sempre acreditar no meu trabalho e potencial.

À minha co-orientadora professora Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek, por sempre me incentivar a acreditar no meu trabalho.

À minha filha Mariane, por ter que compreender minha ausência.

À Dra. Moema Hausen pelo auxílio durante o projeto.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Betinha do laboratório de Histologia da PUC-SP por sempre que necessário, com toda boa vontade, fazer a coleta de sangue.

As técnicas Priscila e Jéssica, aos pesquisadores Daniel e Moema e aos alunos do Laboratório de Biomateriais que participaram de alguma forma para execução desse projeto.

Aos colaboradores Felipe Garbaz (Doutorando em Biotecnologia - Instituto Butantan – USP), Renata Ricardi (Merk), Wesley Luzetti (Doutorado em Ciências (Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro - usp), Profa. Dra. Elaine C. Oliveria (Faculdade De Tecnologia De Sorocaba), Domingos da Silva Leite (Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes - Instituto de Biologia – Unicamp) e Fernando Guimarães (Centro de Atenção Integral a Saúde da Mulher – Unicamp), que foram imprescindíveis na realização desse trabalho.

Resumo

Neste estudo, obteve-se um equivalente cutâneo composto por membrana de poli(álcool vinílico) (PVA) contendo nanopartículas de prata (AgNPs) e um arcabouço de colágeno-ácido hialurônico (col-AH) cultivado com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (ASC). O material foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), micro-CT, ensaio microbiológico, citocompatibilidade com as ASC e liberação de Ag⁺ no meio de cultivo por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma (ICP-OES). Além disso, também foi analisado o potencial imunomodulatório das ASC cultivadas no col-AH sobre os macrófagos. A imunomodulação foi analisada por citometria de fluxo. A produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias foi analisada pelo Imunoensaio Multiplex. Foi demonstrado que o material apresenta poros e que uma pequena concentração de Ag⁺ é liberada do PVA. A presença das AgNPs não interferiu no crescimento das ASC. As ASC modularam a resposta dos macrófagos a um fenótipo anti-inflamatório por aumentarem a expressão de CD206, além de reduzirem também a quantidade de macrófagos M1(CD86+CD206-). O arcabouço de col-AH aumentou a modulação pelas ASC. O dispositivo desenvolvido é apropriado como substituto cutâneo, pois evita perda de água e infecção por microrganismos, além de modular a resposta dos macrófagos para M2. O sistema de co-cultura tridimensional (3D) desenvolvido, permite maiores estudos a respeito da modulação das mesenquimais sobre os macrófagos, em ambiente *in vitro* de forma mais semelhante ao *in vivo*.

Palavras-Chave: Ácido hialurônico, Células mesenquimais, Colágeno, Engenharia tecidual da pele, macrófago, AgNPs, PVA.

Abstract

In this study, a cutaneous equivalent composed of poly (vinyl alcohol) (PVA) membrane containing silver nanoparticles (AgNPs) and a collagen-hyaluronic acid scaffold (col-HA) cultured with adipose derived mesenchymal stem cells (ASC). The material was characterized by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), micro-CT, microbiological assay, cytocompatibility with ASCs and release of Ag⁺ into the culture medium by optical emission spectrometry with plasma source (ICP-OES). Additionally, it was analyzed the potential immunomodulatory effects of ASCs cultured in col-HA in macrophages response. Flow cytometry was performed to analyze immunomodulation. The production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines was analyzed by Multiplex Immunoassay. It was shown by SEM and Confocal Microscopy that both PVA and collagen had porous structure and PVA had a slight release of Ag⁺. Such release did not interfere in the ASC growth. The ASC modulated the macrophages response into an anti-inflammatory phenotype due to the increased CD206 expression, as well as reduced type M1 macrophages (CD86⁺ CD206⁻). The col-HA scaffold increased the ASC modulation. The developed device is suitable as a cutaneous substitute, since it avoids loss of water and microorganisms infection, and also modulates macrophages response to type M2. The three-dimensional (3D) co-culture system here developed open news insights for further studies directed to the *in vitro* modulation of mesenchymal cells over macrophages response, mimicking a similar environment with *in vivo* features.

Keywords: Hyaluronic Acid, Mesenchymal Cells, Collagen, Skin Tissue Engineering, Macrophage, AgNPs, PVA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquema ilustrativo da anatomia da pele. 19
- Figura 2.** Representação esquemática das fases do processo de cicatrização. (A) Fase inflamatória, (B) Fase proliferativa e (C) Fase de remodelamento. 21
- Figura 3.** Dispositivo bilaminar de PVA-AgNPs/col-AH. A membrana de PVA (material transparente e quadrado) encontra-se abaixo do arcabouço de col-AH (material opaco em formato circular). 38
- Figura 4.** Eletromicrografias das fraturas dos materiais que compõe o dispositivo bilaminar. (A) PVA; (B) PVA-1µg/mL AgNPs; (C) PVA-2µg/mL AgNPs. (E) Imagem 3D da membrana de PVA intumescida e arcabouço de col-AH analisado por MVCL. Imagem 3D da membrana de PVA intumescida por Micro-CT. Escala para membranas de PVA de 5 µm e para o col-AH 100 µm. 39
- Figura 5.** Eletromicrografia das AgNPs em solução. 40
- Figura 6.** Propriedade mecânica da membrana de PVA com diferentes concentrações de AgNPs. (A) Módulo de Young; (B) Deformação. 41
- Figura 7.** Atividade antimicrobiana das membranas de PVA puro e contendo diferentes concentrações de AgNPs. (A) *Escherichia coli*; (B) *Pseudomonas aeruginosa* e (C) *Staphylococcus aureus*. Ab - antibiótico utilizado como controle. 42
- Figura 8.** Análise do crescimento fúngico nas membranas de PVA com e sem AgNPs. (A). Análise macroscópica do crescimento de colônias fúngicas na membrana de PVA sem AgNPs expostas a condições ambientais por 7 dias. Análise por MVCL após marcação com DAPI do crescimento de colônias de *Candida albicans* sobre as membranas de PVA sem AgNPs. (B) Colônias observadas em menor aumento, escala de 100 µm; (C) Colônia observada em maior aumento, escala de 250 µm. Houve crescimento de colônias apenas nas membranas sem AgNPs, como mostrado em A e B. 43
- Figura 9.** Morfologia das ASC em confluência 7 dias após isolamento. Microscopia de contraste de fase, aumento 200X. 44
- Figura 10.** Análise da citometria de fluxo demonstrando as características fenotípicas das ASC. 45
- Figura 11.** Análise do potencial de diferenciação das células isoladas do tecido adiposo, após 14 dias em meio indutor. As células diferenciadas em osteoblastos

foram coradas com Alizarin Red e em adipócitos foram coradas com Oil Red. Escala de 100µm.	46
Figura 12. Análise do crescimento das ASC no arcabouço de col/AH após 1, 7 e 14 dias de cultivo (A, B e C respectivamente). Núcleo das ASC marcado com DAPI (azul) e observados por MCVL. Representação gráfica do crescimento das ASC no arcabouço. Resultado expresso em média com desvio padrão, n=3. Significância estatística p<0.01 (* 1 vs. 7 dias; # 1 vs. 14 dias; ns 7 vs. 14 dias). Escala de 100 µm.	47
Figura 13. Crescimento das ASC no dispositivo bilaminar PVA/col-AH e PVA contendo 1 ou 2 µg/mL de AgNPs/col-AH após 1, 7 e 14 dias de cultivo. Resultado expresso em média com desvio padrão, n=3.	48
Figura 14. Morfologia das ASC no arcabouço de colágeno/AH após 1 dia de cultivo (A), 7 dias (B) e 14 dias de cultivo, analisadas por MVCL após reconstrução 3D (C). Núcleo marcado com DAPI (azul), citoesqueleto marcado com Alexa-Fluor 647 (vermelho). Escala de 50 µm.	49
Figura 15. Morfologia das ASC após 1, 7 e 14 dias de cultivo nos dispositivos bilaminar PVA/col-AH e PVA-AgNPs/col-AH analisadas por MVCL após reconstrução 3D. Citoesqueleto marcado com Faloidina-Alexa FLuor 594 (vermelho) e DAPI para núcleo (azul).	50
Figura 16. Liberação de Ag ⁺ no sobrenadante da cultura das ASC sobre os dispositivos bilaminar analisada por ICP-OES.	51
Figura 17. Macrófagos cultivados em frascos de cultivo celular de baixa adesão na presença de M-CSF após 5 dias. Escala de 250 µm.	52
Figura 18. Macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS +INFγ e ASC, após 14 dias de cultivo. Em A, B, E e F células tratadas com LPS + INFγ. Em C, D, G e H células sem tratamento. Células analisadas por MVCL após reconstrução 3D. Citoesqueleto marcado com Faloidina-Alexa FLuor 594 (vermelho) e DAPI para núcleo (azul).	53
Figura 19. Estratégia de análise utilizada para identificação do fenótipo M1 ou M2 nas culturas. A análise inicial foi feita por um primeiro gate de tamanho e granulosidade, seguido de outro gate de “singlets”, que prioriza células únicas. Posteriormente, as análises fenotípicas dos macrófagos foram feitas por meio de um gate duplo positivo para CD14 e CD45, a fim de excluir as ASC. Dessa	

população, CD14+CD45+, analisou-se as células positivas e negativas para CD206. Após, dentro das positivas e negativas para CD206, foi verificado também a expressão de CD86. A análise da presença de macrófagos M1, foi realizada dentro da população CD206 negativa.54

Figura 20. Expressão de CD206 pelos macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. *p<0,05, #P<0,01.55

Figura 21. Expressão de CD86 pelos macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. *p<0,05, #P<0,01.56

Figura 22. Macrófagos CD86+CD206- cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. *p<0,05, #P<0,01.57

Figura 23. Citocinas anti e pró-inflamatórias provenientes do cultivo celular das ASC com macrófagos. Resultados expressos em média com desvio padrão. **P<0,01..58

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNPs – nanopartículas de prata

APC - Aloficocianina

ASC – células-tronco mesenquimais de tecido adiposo

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

Col I – colágeno tipo I

Col-AH – arcabouço de colágeno bovino tipo I e ácido hialurônico

DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM - Meio de Eagle Modificado de Dulbecco

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EDTA - Etilenodiaminotetraacetato de sódio

ELISA - Ensaio imunoenzimático

FITC - Fluoresceína isotiocianato

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Óptica com Fonte de Plasma

INF γ – Interferon gama

LPS – Lipopolissacarídeo

M - Macrófago

M1 – macrófago inflamatório

M2 – macrófago anti-inflamatório

M-CSF - fator estimulante de colônias de macrófagos

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – microscopia eletrônica de varredura

Micro CT – Microtomografia Computadorizada de Raios X

MMP2 – metaloproteinase - 2

MSCs - células-tronco mesenquimais

PB – Azul Pacífico

PBS - tampão fosfato-salino (PBS)

PE - Ficoeritrina

PE/Cy7 – Sistema de tandem conjugado, combinação do PE e cianina.

PerCP - Piridina

PFA - paraformaldeído

PLGA - Poli (ácido láctico – co- glicólico)

PVA – Poli (álcool vinílico)

α -SMA - α -actina de musculo liso

SUMÁRIO

Resumo	4
1. Introdução.....	17
2. Revisão de literatura	18
2.1. Pele.....	18
2.2. Regeneração e Cicatrização de Feridas	20
2.3. Queimaduras	22
2.4. Pós-queimadura - Cicatrizes.....	22
2.5. Materiais utilizados em queimadura.....	24
2.6 Papel dos macrófagos na regeneração tecidual e fibrose	25
2.7 Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo humano (ASC) e seu papel na redução de fibrose	27
3. Objetivo	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. Material e Métodos	30
4.1 Preparação do dispositivo híbrido de PVA-AgNPs/col-AH.....	30
4.2 Caracterização física do material	30
4.2.1 Morfologia do dispositivo – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microtomografia Computadorizada de Raios X (Micro CT)	30
4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	31
4.2.3 Ensaio Mecânico.....	31
4.3 Ensaio microbiológico	31
4.4 Obtenção, isolamento, caracterização e cultura das ASC	32
4.5 Citocompatibilidade.....	32
4.6 Morfologia das ASC na presença de PVA-AgNPs/col-AH.....	33
4.7 Quantificação de Ag ⁺ no meio de cultivo celular	33

4.8	Determinação da capacidade imunorregulatória das células-tronco mesenquimais.....	33
4.8.1	Amostras de Sangue Periférico Humano.....	33
4.8.2	Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e células CD14+	34
4.8.3	Co-cultura dos macrófagos com as ASC na placa e arcabouço de col-AH ..	34
4.8.4	Fenótipo dos macrófagos após cultivo e co-cultivo na placa e arcabouço de col-AH.....	37
4.8.5	Citocinas	37
4.9	Análise estatística	37
5.	Resultados	38
5.1	Obtenção do dispositivo	38
5.2	Morfologia do dispositivo por MEV.....	39
5.3	Morfologia das AgNPs	40
5.4	Ensaio de tração	41
5.5	Atividade antimicrobiana	42
5.6	Obtenção das ASC	44
5.7	Caracterização das ASC.....	45
5.8	Potencial de diferenciação.....	46
5.9	Citocompatibilidade.....	47
5.9.1	Fenótipo das ASC após cultivo no arcabouço de col-AH e dispositivo bilaminar	49
5.9.2	Liberação de Ag ⁺ no meio de cultura.....	51
5.9.3	Obtenção dos macrófagos.....	52
5.9.4	Morfologia dos macrófagos e ASC após cultivo e co-cultivo na placa de poliestireno e col-AH.....	53
5.9.5	Fenótipo dos macrófagos após cultura e co-cultura na placa de poliestireno e col-AH por citometria de fluxo.....	54

5.9.6 Produção de citocinas pró e anti-inflamatória	58
6. Discussão	59
7. Conclusões.....	66
8. Referências Bibliográficas	67
9. Anexos	79
Documento referente a bioética e/ou biossegurança.....	79
Declaração referente a direitos autorais	83

1. Introdução

A pele é o maior órgão do corpo e fornece proteção contra agentes externos físicos, químicos e biológicos. É constituída de três camadas a epiderme, a derme e a hipoderme (Gurtner et al. 2008a). Lesões extensas de espessura total, que atingem toda a derme, resultante de queimaduras, traumas, ulcerações dentre outras, necessitam de enxerto de pele (Papini 2004).

O autoexerto (pele proveniente do próprio paciente) é o padrão-ouro utilizado, porém lesões extensas limitam a área doadora (Böttcher-Haberzeth, Biedermann, and Reichmann 2010). Sendo assim, vários materiais têm sido desenvolvido como curativo ou alternativa ao enxerto autogênico (Borda, Macquhae, and Kirsner 2016).

Um polímero sintético bastante utilizado como curativo cutâneo é o PVA (Bhowmick and Koul 2016; Shankhwar et al. 2016; Morgado et al. 2014). No entanto, por ser úmido, esse material permite o crescimento de microrganismos. Muitos trabalhos têm associado AgNPs a matrizes poliméricas devido a seu largo espectro antimicrobiano, visando inibir o crescimento de microrganismos (Bhowmick and Koul 2016; Loo et al. 2014; Salih, Reicha, and El-Sherbiny 2016). O PVA puro ou contendo AgNPs não pode ser utilizado individualmente como substituto cutâneo, uma vez que devido a sua alta hidrofiliçidade, não permite o crescimento celular (Nuttelman et al. 2001).

Buscando utilizar o PVA como substituto cutâneo, trabalhos têm associado esse polímero a materiais que permitem o crescimento de células (Zarekhalili et al. 2017; Eghbalifam, Frounchi, and Dadbin 2015; Mahnama et al. 2017). Um material citocompatível bastante utilizado em substitutos cutâneos é o colágeno. Essa proteína corresponde a cerca de 60 a 80% do peso seco da derme (Xu, Lu, and Seffen 2008). Visando mimetizar a matriz extracelular o colágeno tem sido associado ao ácido hialurônico, além disso esse glicosaminoglicano estimula a formação de vasos (Park et al. 2002).

Outro problema de pacientes com queimaduras extensas de terceiro grau é a formação de cicatriz hipertrófica (van den Broek et al. 2014). A principal célula envolvida na formação de fibrose é o macrófago (Wynn and Barron 2010). Essas células, dependendo do estímulo ao qual estão expostas podem polarizar para fenótipo inflamatório M1, ou anti-inflamatório M2 (Novak and Koh 2013). Tem-se

mostrado que ASC possuem propriedades imunomodulatórias e anti-fibrótica (Navone et al. 2014; Chung and Son 2014).

As ASC, devido a seu potencial imunomodulatório, são capazes de modular a o fenótipo dos macrófagos para M2 (Guillén et al. 2018). Ainda há controvérsias a respeito do qual subtipo de macrófago está envolvido na formação de fibrose (Wynn and Barron 2010). Porém, tem-se mostrado que a presença das ASC em lesões cutâneas reduzem a formação de fibrose e promovem a polarização dos macrófagos para M2 (Hu et al. 2018).

Sendo assim, nesse estudo obteve-se um dispositivo híbrido de PVA-AgNPs/colágeno-ácido hialurônico cultivado com células tronco mesenquimais humanas como substituto dérmico. O material foi avaliado através de MEV, teste biomecânico para flexibilidade e ensaio de citocompatibilidade. Também, foi analisado o potencial imunomodulatório das ASCs cultivadas no arcabouço de colágeno/AH sobre os macrófagos.

2. Revisão de literatura

2.1. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. Constitui-se de uma eficiente barreira mecânica contra agentes externos tais como, radiação UV e microrganismos, além disso, previne a perda de fluídos corpóreos e é responsável pela termorregulação (Böttcher-Haberzeth, Biedermann, & Reichmann, 2010). É composta pela epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

A camada mais externa, a epiderme, é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Essa camada possui espessura de 0,1 – 0,2 mm é composta predominantemente pelos queratinócitos e melanócitos. (Gurtner et al. 2008b). Os queratinócitos, são responsáveis pela produção de queratina e representam cerca de 80% das células da epiderme. Os melanócitos são responsáveis pela produção do pigmento melanina (Junqueira, Carneiro 2017).

Outras células presentes na epiderme são as células de Langherans e de Merckel. As células de Langherans são um subtipo de células dendríticas, que

participam da resposta imune da pele (Seneschal et al. 2012). As células de Merckel, localizam-se próximas a terminações nervosas e apresentam função sensorial (Dangelo 2008).

A derme, é composta principalmente por fibroblastos, responsáveis pela produção da matriz extracelular. Os vasos sanguíneos presentes na derme fornecem nutrientes para todos os tipos celulares, inclusive para as células da epiderme que é avascular. Os anexos como glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos estão situados entre a derme e a epiderme. Na derme, são encontradas terminações nervosas. Essas terminações podem ser livres ou conjugadas a receptores em forma de corpúsculos, como os de Vater-Pacini, sensíveis a pressão e os de Krause, sensíveis ao frio (Dangelo JG 2008).

A membrana basal separa fisicamente a derme da epiderme, porém funcionalmente conecta ambas. A hipoderme é composta principalmente pelo tecido adiposo, cuja função é servir como isolante térmico e fonte de energia (Geoffrey C. Gurtner, Werner, Barrandon, & Longaker, 2008).

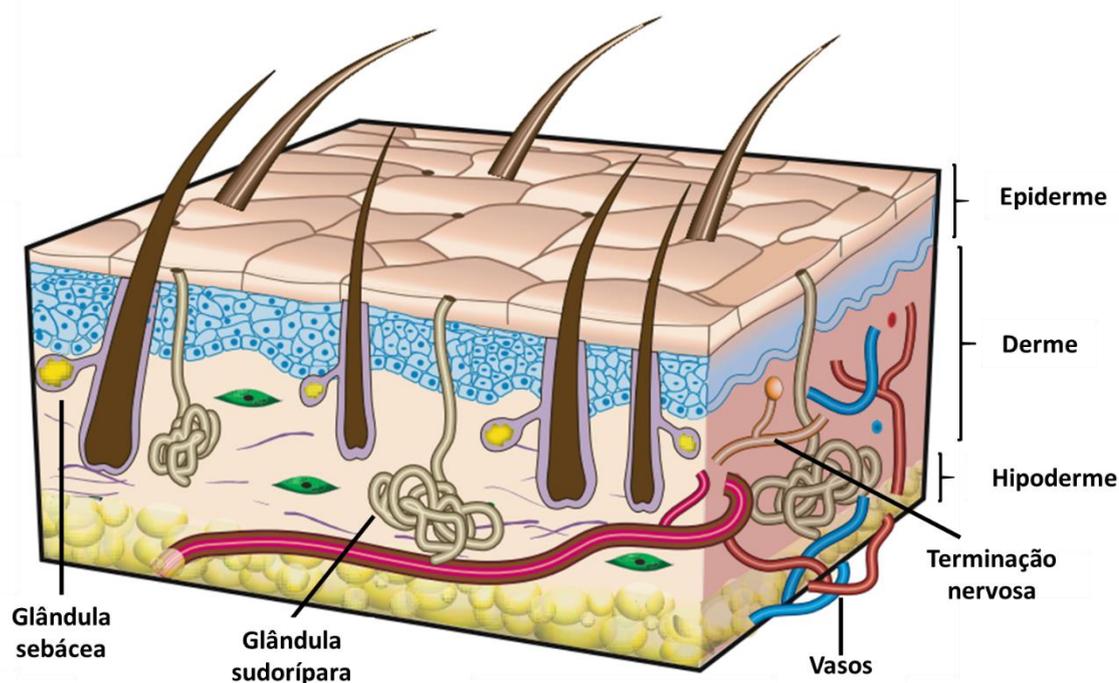


Figura 1. Esquema ilustrativo da anatomia da pele.

2.2. Regeneração e Cicatrização de Feridas

A pele possui capacidade de regeneração, porém apenas em casos de ferimentos leves como cortes e escoriações. Em lesões de terceiro grau acima de 1 cm de diâmetro, ocorre a cicatrização ao invés da regeneração (Papini, 2004).

Na regeneração o tecido morto é substituído por outro morfofuncionalmente idêntico, sem perda da sua atividade funcional, enquanto que na cicatrização ocorre a substituição do tecido lesionado por tecido fibroso, com perda da atividade do tecido.

O processo de cicatrização está dividido basicamente em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (Figura 2) (Geoffrey C. Gurtner et al., 2008).

A fase inflamatória ocorre logo após o dano ao tecido, com o recrutamento de componentes da cascata de coagulação, vias inflamatórias e sistema imune, necessários para evitar a perda de sangue e fluídos corpóreos, e remoção do tecido morto o que previne infecções. A hemostase é obtida pela formação de um trombo rico em plaquetas, que provisoriamente tampona a lesão endotelial (Epstein, Lefkovits, Plow, & Topol, 1995), é seguida pela deposição de uma matriz de fibrina, que se tornará um arcabouço para infiltração celular. Os neutrófilos são, geralmente, as primeiras células a surgirem no local da inflamação aguda, seguidos pelos macrófagos e linfócitos, após 2-3 dias. Os neutrófilos permanecem apenas nos estágios iniciais da lesão, enquanto que os macrófagos persistem por todos os estágios do processo de cicatrização (Adamson, 2009). O número de macrófagos aumenta durante a fase inflamatória, com pico durante a formação de tecido de granulação e declínio no final da fase de remodelamento (Martin et al., 2005).

A fase proliferativa tem início aproximadamente de 3 a 10 dias após a lesão. Nessa etapa ocorre a formação do tecido de granulação, reepitelização, angiogênese e deposição de colágeno (Bauer, Bauer, & Velazquez, 2005).

A última fase é a de remodelamento ou cicatrização, essa ocorre do 21º dia até um ano após a lesão. O colágeno tipo III, produzido na fase proliferativa, é substituído por colágeno tipo I. Miofibroblastos promovem a contração da lesão e reduzem sua área de superfície (G C Gurtner & Evans, 2000).

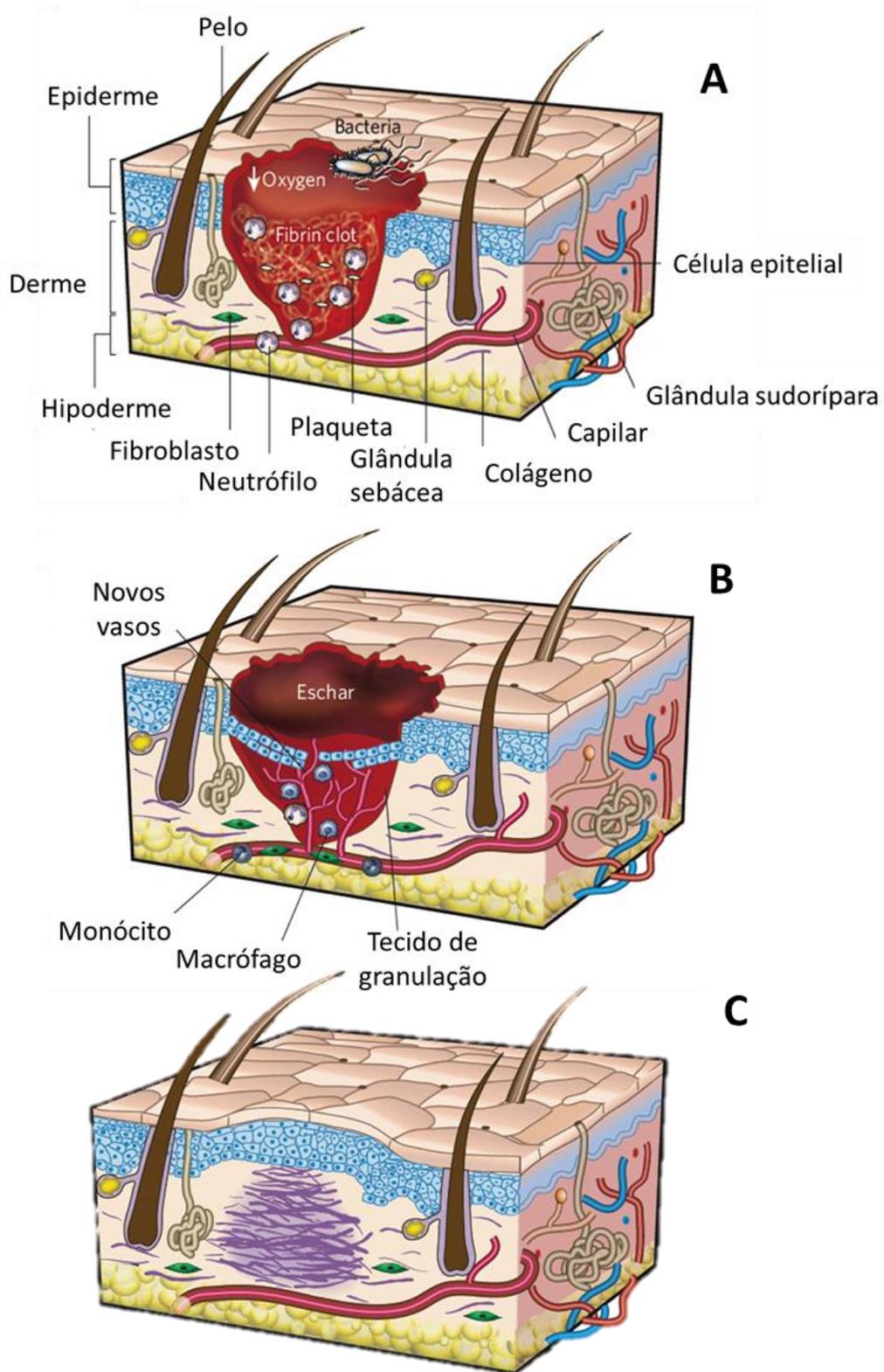


Figura 2. Representação esquemática das fases do processo de cicatrização. (A) Fase inflamatória, (B) Fase proliferativa e (C) Fase de remodelamento.

2.3. Queimaduras

A perda de apenas 15% da área total da superfície da pele é o suficiente para pôr em risco a vida do paciente. A destruição da barreira epitelial pode acarretar na perda massiva de água podendo acarretar rapidamente na morte por choque hipovolêmico (Blais, Parenteau-Bareil, Cadau, & Berthod, 2013). Além disso, essas lesões estão sujeitas a invasão por microrganismos que podem levar à sepse, falência de múltiplos órgãos e morte (Bang, Sharma, Sanyal, & Al Najjadah, 2002).

A principal causa de perda substancial da pele são as queimaduras. Essas são responsáveis por mais de 300.000 mortes por ano em todo mundo (Peck, 2011). No Brasil, segundo a Sociedade Brasileira de Queimaduras, estima-se que ocorram anualmente um milhão de casos de queimaduras, dos quais 200 mil são atendidos em unidades de emergência e 40 mil requerem hospitalização.

As queimaduras podem ser divididas em epidérmica (1º grau), superficial de espessura parcial (2º grau), profunda de espessura parcial (2º grau) e de espessura total (3º grau) (Papini, 2004).

A queimadura epidérmica (1º grau), não requer tratamento cirúrgico, o processo de regeneração é rápido sem formação de cicatriz, já que não ocorre deposição de matriz extracelular.

A superficial de espessura parcial (2º grau) afeta a epiderme e superficialmente a derme. A cicatrização dessa lesão ocorre por meio da migração dos queratinócitos basais da margem da lesão e células epiteliais das glândulas sudoríparas e sebáceas presentes na derme remanescente que é preservada neste tipo de lesão.

Queimadura profunda de espessura parcial (2º grau) promove grande dano a derme resultando em poucos apêndices remanescentes levando, portanto, há um tempo maior de cura e formação de cicatriz.

Queimaduras de espessura total (3º grau) são caracterizadas pela completa destruição da epiderme e derme e, portanto, dos elementos epiteliais capazes de promover a regeneração da pele.

2.4. Pós-queimadura - Cicatrizes

Indivíduos com extensas lesões de pele, como em caso de queimaduras de 3º grau, sofrem de perda substancial da derme, a qual não se regenera espontaneamente (Yannas & Burke, 1980). O reparo desse tipo de lesão ocorre por

meio da reepitelização somente das bordas, estando associada a consideráveis contrações da pele (Papini, 2004) acarretando em problemas estéticos e funcionais para o paciente (Yannas & Burke, 1980).

O processo de cicatrização quando não acometido de inflamação persistente promove formação de cicatriz normotrófica. Porém, quando há o prolongamento e exacerbação da fase inflamatória, pode ocorrer a formação de cicatrizes hipertróficas ou queloides (van den Broek, Limandjaja, Niessen, & Gibbs, 2014).

A cicatriz normotrófica ocorre quando a pele adquire características similares a pele saudável em termos de espessura, cor e elasticidade (Verhaegen et al., 2009).

A cicatriz hipertrófica é uma lesão elevada, que não ultrapassa os limites da ferida inicial (Gauglitz, 2013). É caracterizada pela proliferação do tecido dérmico, com excessiva produção de componentes da matriz extracelular pelos fibroblastos, principalmente colágeno. Essa cicatriz ocorre geralmente após 4 a 8 semanas da lesão e tende a regredir ao longo do tempo. O principal colágeno nesse tipo de lesão é do tipo III e apresenta padrão ondulado paralelo a epiderme (Berman, Maderal, and Raphael 2017).

O queloide é uma cicatriz elevada que ultrapassa as margens da lesão (Gauglitz, 2013). Essa cicatriz pode aparecer muitos anos após a lesão. Nesse tipo de cicatriz, os colágenos presentes são principalmente do tipo I e III e estão organizados de forma aleatória (Berman, Maderal, and Raphael 2017).

A principal célula do sistema imune a participar do processo de formação de fibrose é o macrófago. Os macrófagos são provenientes da diferenciação e recrutamento dos monócitos. Essas células são recrutadas na fase inflamatória, onde liberam citocinas inflamatórias e sinais pró-fibróticos (Thomas Wynn & Barron, 2010a).

A principal citocina secretada pelos macrófagos e envolvida na formação de fibrose é o Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF- β 1), o qual promove a expressão de alfa actina de musculo liso (α -SMA) em fibroblastos e sua conversão a miofibroblastos, responsáveis pela contração da ferida (Greenhalgh, 2007). Além disso, estimula a síntese exacerbada de colágeno, levando a formação de fibrose (Beanes, Dang, Soo, & Ting, 2003). O processo de formação de fibrose ocorre na

fase de remodelamento ou de cicatrização. Essa fase é caracterizada pela redução da proliferação celular, inflamação e neovascularização. A matriz extracelular provisória, constituída de colágeno tipo III, é substituída por colágeno tipo I (Epstein, Singer, & Clark, 1999).

2.5. Materiais utilizados em queimadura

A cobertura imediata de lesões cutâneas provocadas não apenas por queimaduras, mas também por trauma ou diabetes, é geralmente dificultada pela falta de pele doadora (H. Zhang et al., 2013). A engenharia tecidual tem fornecido novas estratégias para o tratamento dessas lesões (Mansbridge, 2009).

Vários materiais estão disponíveis comercialmente como substitutos para pele, como por exemplo: Epicel[®], composto de camadas de queratinócitos cultivados a partir de uma biópsia do paciente (Wright et al., 1998) , Integra[®], (Stern, McPherson, & Longaker, 1990) composto de matriz 3-D porosa formada por colágeno tipo I e glicosaminoglicanos como equivalente dérmico, associado a uma camada de silicone, para porção epidérmica, Permacol[®], derme porcina acelular, Apligraf[®] (Organogênese), combinação de queratinócitos e fibroblastos alogênicos com colágeno bovino que fornece uma pele substituta temporária para o uso em feridas crônicas, mas não em áreas com queimaduras extensas (Bello & Falabella, 2002). Além dos produtos citados acima, que utilizam polímeros naturais, existe também o Dermagraft[®] que emprega o polímero sintético denominado Poli (ácido láctico – coglicólico) - PLGA, esse produto é comercializado após cultivo de fibroblastos humanos obtidos de prepúcio de recém-nascido e utilizado como substituto dérmico. O material biorreabsorvível serve como suporte para a proliferação e secreção da matriz extracelular (Seal, Otero, & Panitch, 2001).

Outro polímero sintético que está sendo bastante estudado como curativo cutâneo é o Poli(álcool vinílico) – PVA (Kamoun, Kenawy, Tamer, El-Meligy, & Mohy Eldin, 2015; Morgado et al., 2014; Shahzad et al., 2015), uma vez que possui muitas das propriedades requeridas a um curativo. Esses materiais são resistentes mecanicamente, capazes de manter o local hidratado, transparentes e não-adesivos o que permite o acompanhamento da lesão (Jones & Vaughan, 2005a; Luo et al., 2009). Porém, por se manter úmido permite o crescimento de fungos e bactérias. Para

atuar como agente antimicrobiano, vários trabalhos têm associado nanopartículas de prata (AgNPs) ao PVA (Eghbalifam, Frounchi, & Dadbin, 2015; Salih, Reicha, & ElSherbiny, 2016; Z. Zhang et al., 2016). No entanto, esse material não é passível de ser utilizado como substituto dérmico, uma vez que não degrada e nem permite a proliferação celular.

Desde o primeiro arcabouço composto de colágeno e glicosaminoglicano relatado por Yannas e Burke, o colágeno tem sido amplamente utilizado na engenharia tecidual para a pele (Gopinath et al., 2004). Isso se deve ao fato do colágeno ser o principal componente dérmico, com cerca de 60-80% do peso seco da pele livre de gordura (Xu, Lu, & Seffen, 2008). O colágeno apresenta inúmeras propriedades vantajosas como, propriedades hemostáticas e baixa antigenicidade (O'Brien, Harley, Yannas, & Gibson, 2005) e também características que podem ser modificadas (Geutjes et al., 2006) como por exemplo, a formação de uma estrutura tridimensional porosa, isto é, um arcabouço ou ainda filmes densos (Geutjes et al., 2006).

O arcabouço construído por colágeno fornece espaço estrutural para a acomodação, proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais, além de permitir troca de nutrientes entre o material e o meio (Kim & Kim, 2007). O ácido hialurônico (AH) tem sido incorporado a arcabouços de colágeno uma vez que estimula a migração celular e angiogênese (Pardue, Ibrahim, & Ramamurthi, 2008). O AH é também um dos principais componentes da pele que está associado com o reparo tecidual. A síntese do ácido hialurônico é induzida durante a reparação de feridas. No processo de cicatrização fetal são observadas altas concentrações de ácido hialurônico que se acredita estar associado ao reparo sem formação de cicatriz (Prosdocimi & Bevilacqua, 2012).

2.6 Papel dos macrófagos na regeneração tecidual e fibrose

Quando o tecido é lesionado uma resposta inflamatória é induzida, sendo caracterizada pelo recrutamento e ativação de células hematopoiéticas e não - hematopoiéticas incluindo neutrófilos, macrófagos, natural killer, células B, células T, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e células tronco, que orquestram a reparação tecidual (TA Wynn, 2008). Quando a resposta inflamatória é bem organizada e controlada, essa é rapidamente resolvida e a arquitetura do tecido é

restaurada. Entretanto, se essa reposta é crônica ou desregulada pode levar ao desenvolvimento de fibrose (T. A. Wynn & Ramalingam, 2012). Embora vários tipos celulares estejam envolvidos na reparação tecidual, os macrófagos são essenciais em todos os estágios de reparação (Thomas Wynn & Barron, 2010a). Além da fagocitose e apresentação de antígenos, macrófagos produzem muitas citocinas e quimiocinas que estimulam o crescimento de novos capilares, síntese de colágeno e fibrose (Mirza, DiPietro, & Koh, 2009).

Após lesão tecidual, os monócitos (células precursoras dos macrófagos) são recrutados da medula óssea via gradiente de quimiocinas (quimiotaxia), como as CX3CL1 e moléculas de adesão como as molécula de adesão intercelular do tipo 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) (Behm et al. 2012). Essas células recrutadas juntamente com os macrófagos residentes no tecido irão se diferenciar em macrófagos M1 (inflamatórios) ou M2 (anti-inflamatórios), dependendo dos fatores de crescimento e citocinas presentes no local da lesão (Martin et al., 2005). Os macrófagos são células cuja a plasticidade permite a repolarização do fenótipo M1 para M2 e vice-versa dependendo do estímulo. Macrófagos M1 são associados a destruição do tecido, enquanto que macrófagos M2 estão associados ao remodelamento tecidual.

Componentes de membrana de bactéria como lipopólissacarídeo (LPS) e citocina como interferon gama (INF γ) polarizam os macrófagos para fenótipo M1 (Mosser et al., 2008). Esses macrófagos sintetizam citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-12 e expressam receptor de superfície CD86 (Barrientos et al., 2008). Enquanto que citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 polarizam os macrófagos para M2, os quais expressam CD206, que exibe propriedades anti-inflamatórias e de reparo tecidual (Gordon, 2003). Os macrófagos M1 são geralmente encontrados nos estágios iniciais do processo de cicatrização, enquanto que M2 são encontrados nos estágios mais tardios, orquestrando o reparo tecidual (Crane et al., 2014).

Os macrófagos são conhecidos por regularem o processo de fibrose, pois atuam ativando diretamente os fibroblastos e interferem na dinâmica da matriz extracelular por regularem o balanço entre metaloproteínases e seus fatores inibitórios como TGF- β 1 (Thomas Wynn & Barron, 2010). Há três isoformas do TGF- β presente em mamíferos, que são TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Entre essas isoformas há homologia de 64 a 85% na sequência de aminoácidos (Graycar et al. 1989).

A presença de TGF- β 1 aumenta a deposição de colágeno pelos fibroblastos e reduz sua degradação por diminuir a expressão de metaloproteínases, além disso, promove a transição de fibroblasto para miofibroblasto. Os miofibroblastos são caracterizados pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) que está envolvido na contração das feridas (Gabbiani, 2003). Devido a expressão tardia de TGF β -3 nos processos de cura, supõe-se que essa isoforma limite a formação de fibrose (Frank, Madlener, & Werner, 1996).

Ainda não é consenso qual subtipo de macrófago, M1 ou M2, está associado a formação de fibrose. Macrófagos M1, contribuem para proliferação de miofibroblastos e fibrócitos (Thomas Wynn & Barron, 2010b). Porém, essas células também produzem metaloproteínases, que são importantes no controle da fibrose.

Macrófagos M2, são considerados pró-fibróticos por estimularem a síntese de colágeno (Endo et al., 2003), porém produzem IL-10, a qual tem demonstrado efeitos direto na redução de TGF- β 1 (Moore, de Waal Malefyt, Coffman, & O'Garra, 2001). Tem se demonstrado que lesões em fetos de camundongos nocaute para IL-10, perdem a capacidade de regeneração, ocorrendo a formação de cicatriz nessa situação (Liechty, Kim, Adzick, & Crombleholme, 2000).

2.7 Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo humano (ASC) e seu papel na redução de fibrose

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são células-tronco adultas multipotentes. Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular, definiu os critérios mínimos para caracterização das MSCs, os quais incluem a capacidade dessas células em diferenciarem em adipócito, osteoblasto e condrócito; apresentarem em sua superfície a expressão de CD73, CD90 e CD105 e não expressarem CD14, CD34, CD45, 79 e HLA-DR e serem aderentes à placa de poliestireno. Essas células podem ser obtidas de vários órgãos como medula óssea (BM-MSC), placenta (PMSC), tecido adiposo (ASCs) entre outros (Hass, Kasper, Böhm, & Jacobs, 2011). O tecido adiposo tem emergido como um forte candidato para o isolamento dessas células, por ser de fácil obtenção e abundante no corpo (Zimmerlin et al., 2009).

Células-tronco de tecido adiposo (ASC), participam de diferentes fases da cicatrização (Maxson, Lopez, Yoo, Danilkovitch-Miagkova, & Leroux, 2012),

promoverem neovascularização e regularem o fenótipo de fibroblasto e deposição de matriz extracelular (Navone et al., 2014). Essas células possuem propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias, o que poderia suprimir a expressão de TGF- β 1 e diminuir a formação de fibrose e contração da lesão (Ren et al., 2008).

É conhecido que células-tronco mesenquimais podem polarizar os macrófagos para o fenótipo M2. Acredita-se que essa polarização seja devido a secreção de PGE2, IL-4, IL-6, e IL-10 pelas MSCs (Chung & Son, 2014a). Macrófagos cocultivados com MSCs apresentam reduzida expressão de TNF α e aumento na expressão de IL-10 (Navone et al., 2014). Tem-se demonstrado que a expressão de IL-10, diminui a resposta inflamatória e previne a formação de fibrose (S. Liu et al., 2014).

Estudo realizado por Paul Martin et al. (2003) em camundongos nocaute para PU. 1 (fator de transcrição envolvido na regulação e maturação dos macrófagos) que não possuem células mielóides maduras, demonstra a cura das lesões sem formação de cicatriz. A depleção de macrófagos somente nos estágios iniciais da lesão (1 a 5 dias) promove redução de cicatriz, e, portanto, evidencia sua relação com a formação de cicatrizes (Lucas et al., 2010).

Sabe-se que a cicatrização de feridas em fetos ocorre sem formação de cicatriz. Nesse processo, como o sistema imune é pouco desenvolvido, ocorre mínima inflamação e deposição normal de colágeno. Durante a cicatrização fetal são observados altos níveis de TGF- β 3 e baixos níveis de TGF- β 1 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Leung, Crombleholme, & Keswani, 2012).

Acredita-se que a secreção de VEGF e HGF pelas MSCs também possua efeito anti-fibrótico e mantenha o balanço apropriado entre os TGF- β 1 e TGF- β 3 durante a fase de remodelamento das feridas (Maxson et al., 2012). Além disso, a adição de TGF- β 3 em lesões de espessura-total em murinos, resultou na redução do influxo de monócitos e macrófagos, e deposição de fibronectina, colágenos tipo I e III (Shah, Foreman, & Ferguson, 1995).

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um dispositivo híbrido constituído de PVA-AgNPs/col-AH cultivado com ASC, visando a utilização em queimaduras graves para redução de cicatriz hipertrófica e infecção por microrganismos.

3.2 Objetivos específicos

- Obter um dispositivo bilaminar composto por membrana de PVA contendo AgNPs e arcabouço de colágeno-ácido hialurônico;
- Analisar a morfologia do material por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Analisar a resistência mecânica do material através do Ensaio de Tração;
- Analisar o potencial bactericida e fungicida do material;
- Isolar, cultivar e caracterizar as ASC através das seguintes técnicas:
Citometria de fluxo;
Potencial de diferenciação em células do tecido mesodérmico.
- Analisar a citocompatibilidade do dispositivo frente às ASC;
- Isolar monócitos humanos do sangue periférico;
- Analisar se as ASC serão capazes de imunomodular o macrófago para um fenótipo anti-inflamatório (M2) após cultivo no arcabouço de colágeno-AH.

4. Material e Métodos

4.1 Preparação do dispositivo híbrido de PVA-AgNPs/col-AH

Para obtenção do PVA-AgNPs uma solução de 8% m/v de PVA (Sigma Aldrich, ref. 363146) em água destilada foi aquecida a 80°C e colocada sob agitação. Após completa homogeneização, a solução de AgNPs contendo 20µg/mL foi adicionada à solução de PVA nas concentrações de 1 µg/mL e 2 µg/mL. Então, o hidrogel foi vertido em placas e colocadas em temperatura de -18°C por 16 horas, seguido por ciclos de resfriamento/descongelamento, para a reticulação do hidrogel, em temperatura ambiente por 8 horas. Esses ciclos foram repetidos por 2 vezes.

Após o desenvolvimento do hidrogel, uma solução de colágeno de pele bovina (6mg/mL) contendo 10% de ácido hialurônico foi colocada sobre o hidrogel, congelados por 24 horas e liofilizados. Para o processo de reticulação, o arcabouço foi colocado em uma solução de 95% de etanol (pH 7,0) suplementada com 50mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), por 7 horas à temperatura ambiente. O dispositivo foi lavado duas vezes por 1 h com fosfato dissódico a 0,1M, duas vezes por 2 h com cloreto de sódio a 1 M, 6 vezes por 24 h com cloreto de sódio a 2M e 10 vezes com água bidestilada para remover o EDC residual. Em seguida, foi novamente congelado a -20°C por 24 horas e liofilizado.

4.2 Caracterização física do material

4.2.1 Morfologia do dispositivo – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microtomografia Computadorizada de Raios X (Micro CT)

Para análise morfológica do dispositivo por meio da microscopia eletrônica de varredura, a membrana de PVA foi desidratada por uma série crescente de etanol, 80, 95 e 100%, 15 minutos cada. Após, foi seca em ponto crítico. O arcabouço de col-AH não recebeu nenhum tratamento adicional. Para a obtenção das imagens, as amostras foram levadas em um suporte adequado e metalizadas (Balzers 050) pela deposição de uma fina camada de ouro em suas superfícies e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA-840A).

A análise por Micro-CT foi realizada por tomógrafo de transmissão de raio X de terceira geração (Oliveira et al., 2009). As amostras foram colocadas em câmara e analisadas com voltagem de 29 kV e corrente elétrica de 415 µA. As imagens foram

obtidas após reconstrução 3D e processadas pelo software NRecon™ from Bruker microCT (version 1.6.9.4).

4.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia e diâmetro das AgNPs foram caracterizados por MET. Para isso, uma gota da solução contendo AgNPs foi colocada sobre uma grade de cobre e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-902 (80 kV).

4.2.3 Ensaio Mecânico

A propriedade mecânica da membrana de PVA foi determinada usando uma máquina de teste de materiais uniaxial para tração (MTS 810-FlexTest 40) equipada com uma célula de carga de 1500 N. Para isso, as membranas em formato retangular (55mm x 10 mm x 2,5 mm) foram tracionadas a uma velocidade constante de 50 mm/minuto. Foram testadas 5 amostras de cada. O comportamento da carga de alongamento dos dispositivos e modo de falhas foi registrado. A propriedade dos dispositivos foi representada pelo módulo de Young (MPa) e deformação na ruptura (%).

4.3 Ensaio microbiológico

O ensaio microbiológico foi realizado após desinfecção das membranas de PVA puro e contendo diferentes concentrações de AgNPs com etanol por 30 min. Após, as membranas foram lavadas em tampão fosfato-salino (PBS) estéril e seu potencial antimicrobiano analisado pela técnica de difusão em disco (método de Kirby Bauer), frente as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Pseudomonas* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC25922) e ao fungo *Candida albicans* (ATCC 1023). As bactérias foram incubadas em ágar de Mueller – Hinton à 37°C por 24 horas. Para análise dos fungos, esses foram cultivados nas membranas na concentração de 5×10^5 /mL por 24 horas à 37°C, e mantidos em placas de cultura de 24 poços. Após 24 horas, as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas por 30 minutos em PFA 4%. O material foi analisado por microscopia confocal, após marcação do DNA com DAPI.

4.4 Obtenção, isolamento, caracterização e cultura das ASC

Para obtenção das ASC foi utilizado gordura de lipoaspiração do abdome, descartada de paciente do sexo feminino. A cirurgia foi realizada no Hospital Santa Lucinda localizado no município de Sorocaba-SP. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - Campus Campinas (nº1.650.961). O tecido foi coletado em seringa e enviado ao laboratório.

O tecido foi digerido com solução de Tripsina/EDTA à 37°C por 30 min. Após, foi centrifugado à 1500 rpm. O *pellet* foi ressuspendido em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram semeadas em garrafas de cultivo celular T 75 e mantidas em estufa contendo 5% CO₂ à 37°C.

A caracterização das ASC foi realizada por meio da sua capacidade de diferenciação em adipócito e osteoblasto. Para isso, as células foram mantidas em meios indutores StemPro™ Adipogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher, A1007001) e StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit (ThermoFisher, A1007201) para cada tipo celular por 14 dias. Após as células foram coradas com Oil red, que evidenciam o acúmulo intracelular de lipídeos, e Alizarin Red, que cora cálcio presente na matriz mineralizada.

As células também foram avaliadas por marcadores de superfície comumente definidos, uma vez que essas não possuem marcadores específicos. Para isso, as células foram marcadas com anticorpos pré-conjugados com fluoresceína isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE), azul pacífico (PB) ou aloficocianina (APC). Os marcadores selecionados para caracterização das células-tronco mesenquimais foram: ausência de marcadores CD45 e HLA-DR e marcadores de MSCs comumente citados (CD105, CD73, CD90 e CD29). Utilizou-se o citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA) para as medições, foram adquiridos 30.000 eventos. As análises foram realizadas com o software FlowJo (Tree Star, OR).

4.5 Citocompatibilidade

O ensaio de citocompatibilidade foi inicialmente realizado apenas para o arcabouço de col-AH desenvolvido, para que se pudesse observar o efeito desse material sobre as ASC. Para isso, os arcabouços foram desinfetados por 1 hora em etanol 70%, em seguida, lavados com DMEM sem soro e mantidos por 24 horas em

estufa à 37°C contendo 5% CO₂. As ASC foram cultivadas na concentração de 5 X 10⁴ células/poço, na placa de 24. As análises foram realizadas após 1, 7 e 14 dias de cultivo por microscopia confocal de varredura à laser (Leica TCS SP5). Transcorridos os tempos, as células foram fixadas com PFA 4%, permeabilizadas com Triton-X 100 e incubadas com DAPI. Para que se pudesse obter a quantificação de todas as células contidas no arcabouço, realizou-se a reconstrução 3D do material. O limite estabelecido para a reconstrução foi a amostra de 14 dias, cuja a infiltração máxima foi de 150µm.

4.6 Morfologia das ASC na presença de PVA-AgNPs/col-AH

A morfologia das células foi analisada por MCVL. Para isso, as células foram fixadas com PFA 4%, permeabilizadas com Triton-X 100 e incubadas com DAPI e Faloidina conjugada com Alexa Fluor® 594. As imagens de alta resolução foram obtidas por meio de cortes ópticos, agrupados a fim de realizar a reconstrução tridimensional da topografia do arcabouço.

4.7 Quantificação de Ag⁺ no meio de cultivo celular

A quantificação da Ag⁺ liberada pela membrana de PVA-AgNPss, foi analisada após 1, 7 e 14 dias no sobrenadante proveniente do cultivo das ASCs no dispositivo bilaminar. Para isso, as amostras foram digeridas com ácido nítrico e quantificadas por ICP-OES (Optima 8000 ICP-OES spectrometer Perkin Elme).

4.8 Determinação da capacidade imunorregulatória das células-tronco mesenquimais

4.8.1 Amostras de Sangue Periférico Humano

Amostra de sangue periférico de 5 pacientes foi coletada. Os pacientes foram submetidos à punção venosa de 80 mL de sangue periférico, realizada por pessoa devidamente habilitadas em tubo contendo heparina sódica. A coleta foi realizada na Pontifícia Universidade Católica de São Paulo – *Campus* Sorocaba. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp - *Campus* Campinas (nº1.650.961).

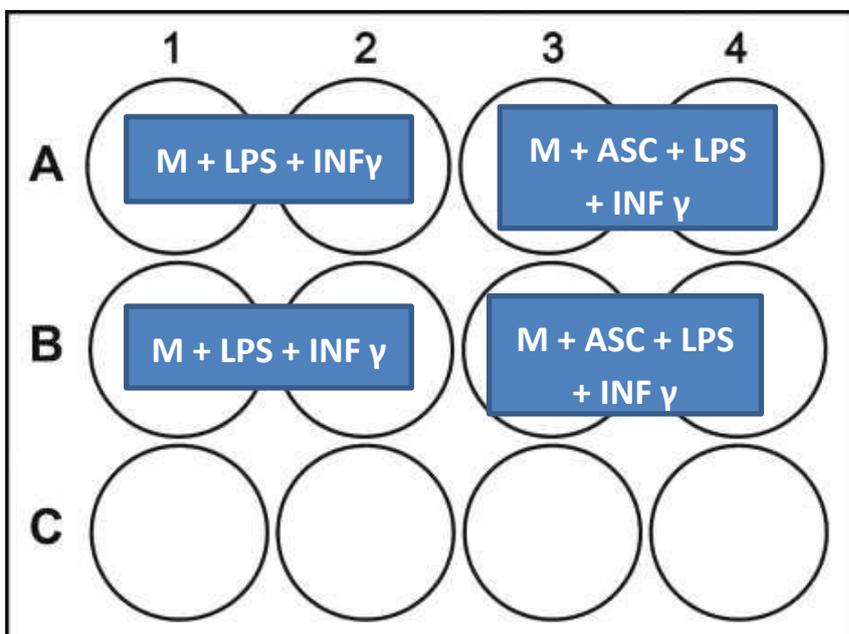
4.8.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) e células CD14+

As CMSP obtidas do sangue foram centrifugadas sobre uma solução de Ficoll-Hypaque (densidade 1,077) a 1500 rpm por 30 minutos, sendo as células mononucleares (anel sobre a solução de Ficoll-Hypaque) transferidas para outros tubos tipo Falcon de 15 mL. As CMSP foram submetidas a duas lavagens com meio RPMI (300 g por 10 minutos a 4°C). Os monócitos CD14+ (Mo) foram separados através de kit comercial CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Ref. 130.090.329), seguindo as instruções do kit. Os monócitos foram cultivados por 5 dias em frasco de cultura celular com superfície de baixa adesão (Corning® Ultra Low attachment cell culture flasks), na presença de 50 ng/mL de fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (Sigma Aldrich, M6518) para conversão dos monócitos em macrófagos.

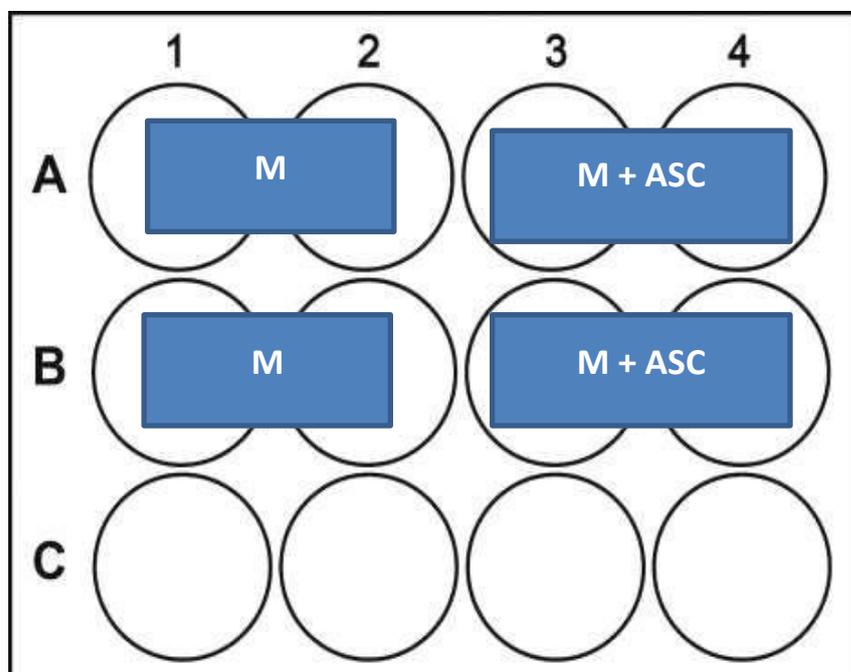
4.8.3 Co-cultura dos macrófagos com as ASC na placa e arcabouço de col-AH

A análise fenotípica dos macrófagos foi realizada após 14 dias de co-cultivo. Para isso, as ASC foram cultivadas na placa e no arcabouço de col-AH por 4 dias na concentração de 2×10^4 cel/poço, na placa de 12 poços. Após os macrófagos, tratados com M-CSF, foram cultivados na concentração de 1×10^5 cel/poço, na placa e no arcabouço de col-AH, contendo ou não as ASC previamente cultivadas. Foram analisados dois grupos: com e sem indução para fenótipo M1. A indução foi realizada por meio da adição de 50ng/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (Sigma Aldrich, L5668) e 10ng/mL de interferon gama (INF γ) (Sigma Aldrich, I3265) ao meio de cultivo RPMI + 10% SFB + antibiótico, conforme esquema a seguir.

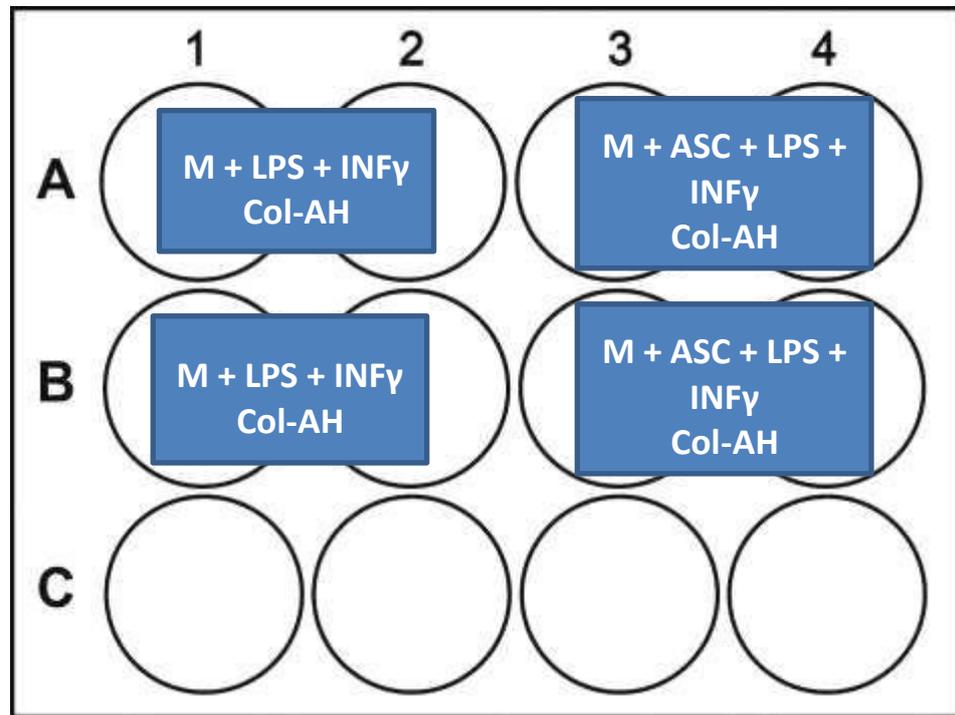
- **FENÓTIPO M1/PLACA:** células cultivadas na placa de poliestireno induzidas para fenótipo M1 (inflamatório) com LPS e $\text{INF}\gamma$.



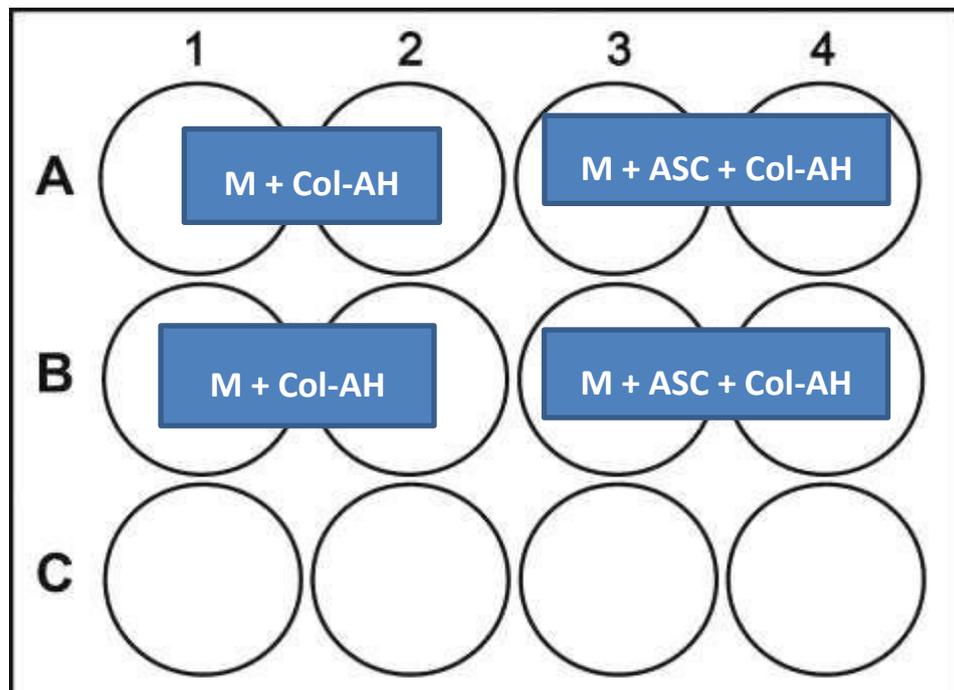
- **SEM INDUÇÃO/PLACA:** células cultivadas na placa de poliestireno sem indução.



- **FENÓTIPO M1/col-AH:** células cultivadas no arcabouço de col-AH induzidas para fenótipo M1 (inflamatório) com LPS e INF γ .



- **SEM INDUÇÃO/col-AH:** células cultivadas no arcabouço de col-AH sem indução.



4.8.4 Fenótipo dos macrófagos após cultivo e co-cultivo na placa e arcabouço de col-AH

Após 14 dias de cultivo nas placas e nos arcabouços, os macrófagos foram analisados por citometria de fluxo para detecção do fenótipo inflamatório (M1 – CD86) ou anti-inflamatório (M2 – CD206). Os anticorpos utilizados foram: CD14Pey7 (Abcam, cód. Ab195192), CD45 Pacif Blue (Abcam, cód. ab123626), CD 86 PE (Abcam, cód.305406), CD 206 FITC (Biolegend, cód. Ab321104). Para isso, transcorridos os tempos de cultivo, as células cultivadas na placa de poliestireno, foram soltas após incubação com PBS - 10mM EDTA no gelo, enquanto que, as células cultivadas no arcabouço de col-AH, foram soltas por meio da incubação do arcabouço com colagenase. Os anticorpos foram adicionados às células por 20 minutos à temperatura ambiente e transferidos para tubos de leitura de FACS.

4.8.5 Citocinas

As amostras do sobrenadante de cultura foram utilizadas para determinar as concentrações de IL12p40, TNF α e IL-10 por meio do ensaio Multiplex (Milipore, ID.HCYTOMAG0K-08.Human Cytokine MAGNETIC Kit). O preparo das amostras foi realizado de acordo com as instruções do kit, as análises foram realizadas em duplicata.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média com desvio padrão e analisados pelo teste de análise de variância ANOVA um critério para comparação nos mesmos tempos e dois critérios para comparação em tempos diferentes. A diferença entre os grupos foi analisada pelo teste de Tukey, valores de $p < 0,05$ indicam diferença estatística.

5. Resultados

5.1 Obtenção do dispositivo

O dispositivo bilaminar consistiu em membrana de PVA-AgNPs contendo aproximadamente 4 mm de espessura e arcabouço de col-AH com aproximadamente 2 mm de espessura como mostrado abaixo (Figura 3).



Figura 3. Dispositivo bilaminar de PVA-AgNPs/col-AH. A membrana de PVA (material transparente e quadrado) encontra-se abaixo do arcabouço de col-AH (material opaco em formato circular).

5.2 Morfologia do dispositivo por MEV

Na membrana de PVA caracterizada por MVCL, foi possível observar poros com diâmetros variados entre 0,94 μm a 11,3 μm . A análise por MEV demonstrou que a presença das AgNPs não interferiu na porosidade das membranas. Na análise por micro-CT observou-se que 50% do volume total das membranas de PVA era constituído por poros. O arcabouço de col/AH também apresentou poros com diâmetros de 60,6 μm a 104 μm (Figura 4).

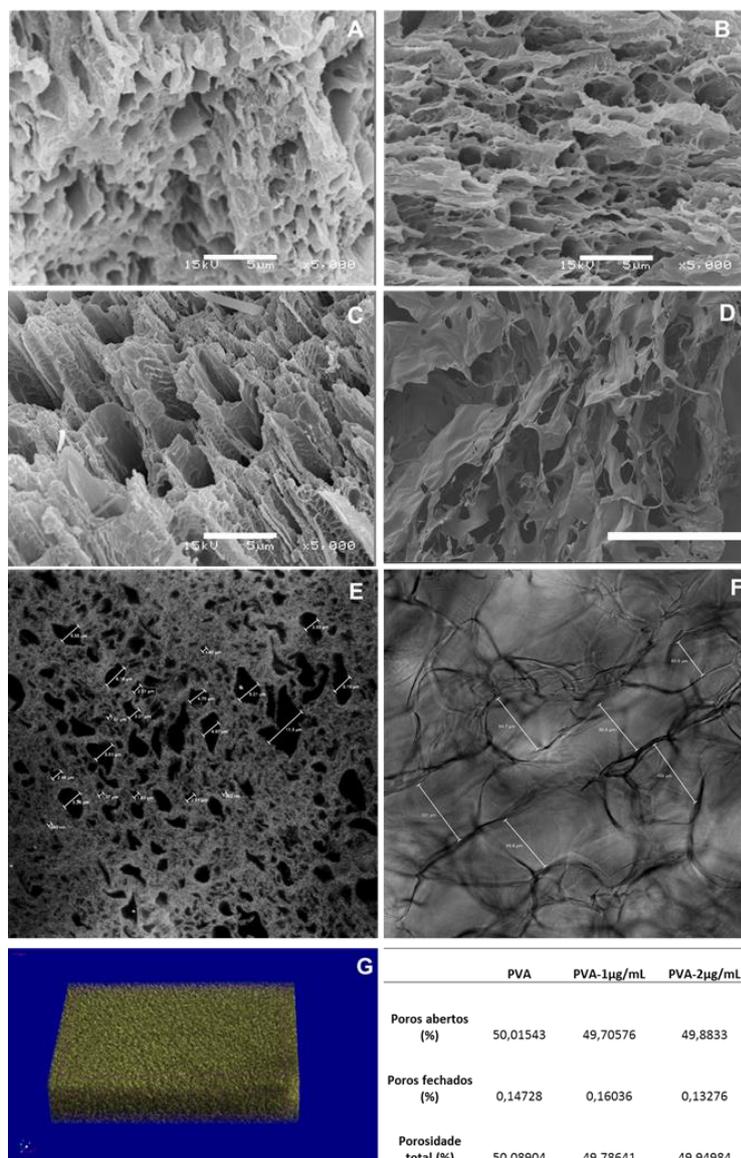


Figura 4. Eletromicrografias das fraturas dos materiais que compõe o dispositivo bilaminar. (A) PVA; (B) PVA-1 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs; (C) PVA-2 $\mu\text{g/mL}$ AgNPs. (E) Imagem 3D da membrana de PVA intumescida e arcabouço de col-AH analisado por MVCL. Imagem 3D da membrana de PVA intumescida por Micro-CT. Escala para membranas de PVA de 5 μm e para o col-AH 100 μm .

5.3 Morfologia das AgNPs

As AgNPs foram caracterizadas por MET e apresentaram diâmetro entre 5 a 20 nm (Figura 5).

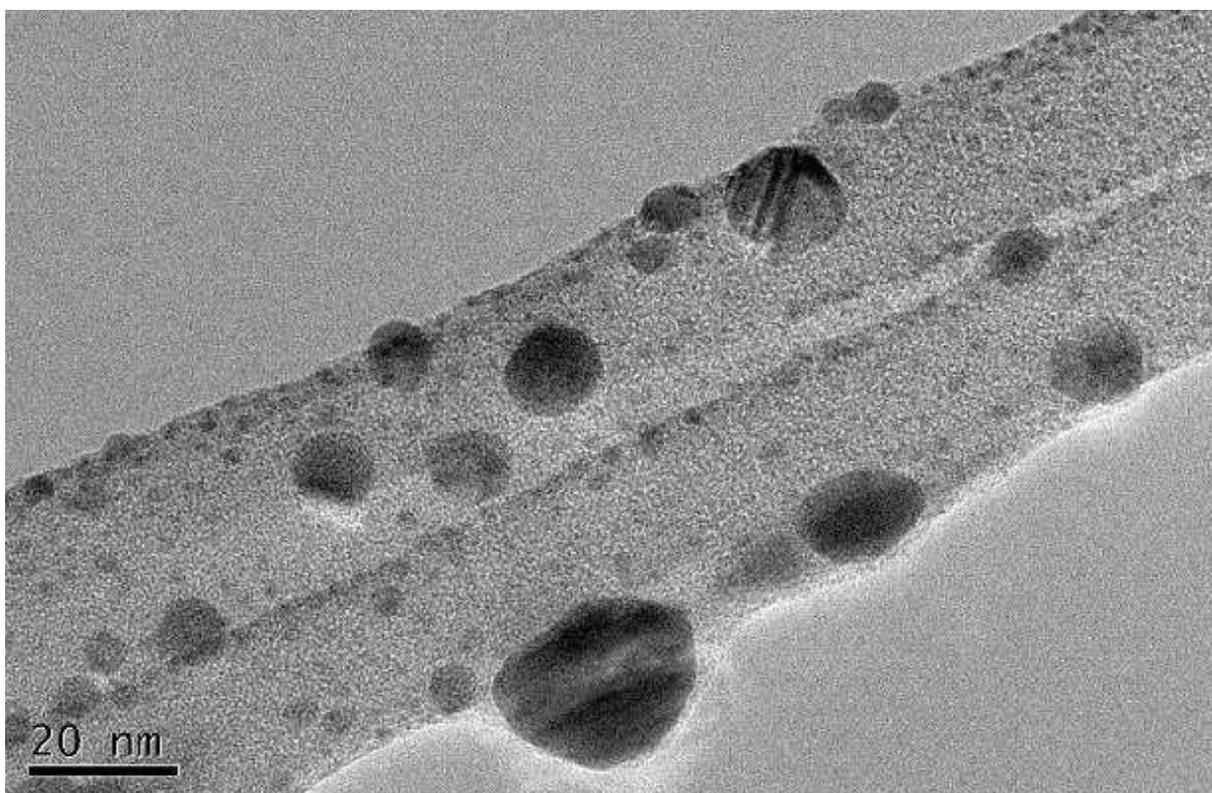


Figura 5. Eletromicrografia das AgNPs em solução.

5.4 Ensaio de tração

O ensaio de tração mostrou que a presença de 2 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs na membrana de PVA, promoveu redução do módulo de Young, mas não interferiu na deformação da membrana de PVA (Figura 6).

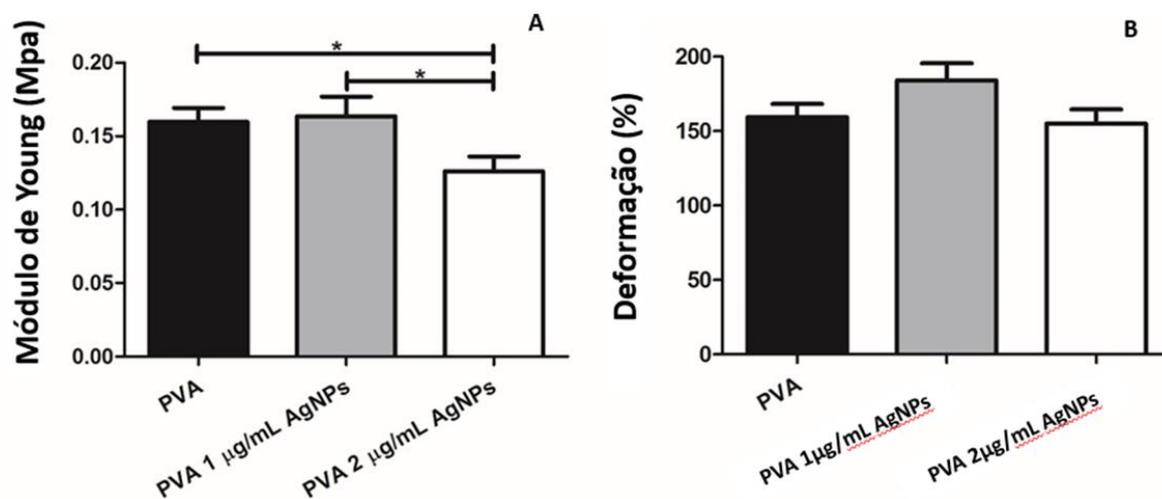


Figura 6. Propriedade mecânica da membrana de PVA com diferentes concentrações de AgNPs. (A) Módulo de Young; (B) Deformação.

5.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras de PVA contendo diferentes concentrações de AgNPs foram testadas pelo método de difusão de disco. Foi observado que nenhuma das concentrações apresentou formação significativa de halo, apenas na amostra contendo 2µg/mL foi observado uma pequena formação de halo (Figura 7).

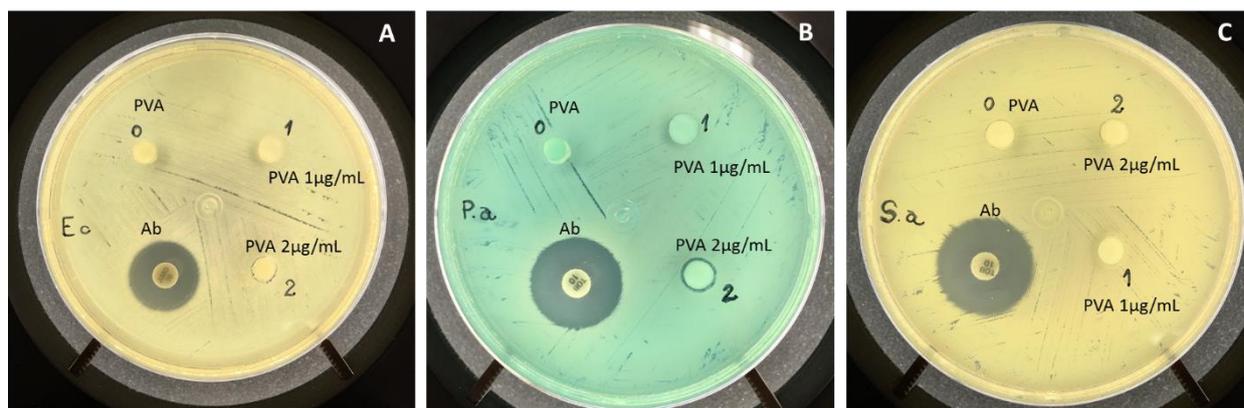


Figura 7. Atividade antimicrobiana das membranas de PVA puro e contendo diferentes concentrações de AgNPs. (A) *Escherichia coli*; (B) *Pseudomonas aeruginosa* e (C) *Staphylococcus aureus*. Ab - antibiótico utilizado como controle, demonstrando presença de halo.

A análise macro e microscópica para constatação do crescimento fúngico, nas membranas de PVA, evidenciou que houve formação de colônias apenas nas membranas sem AgNPs (Fig. 13). A análise por confocal, demonstra o crescimento de colônias de *Candida albicans* apenas na membrana sem AgNPss (Figura 8).

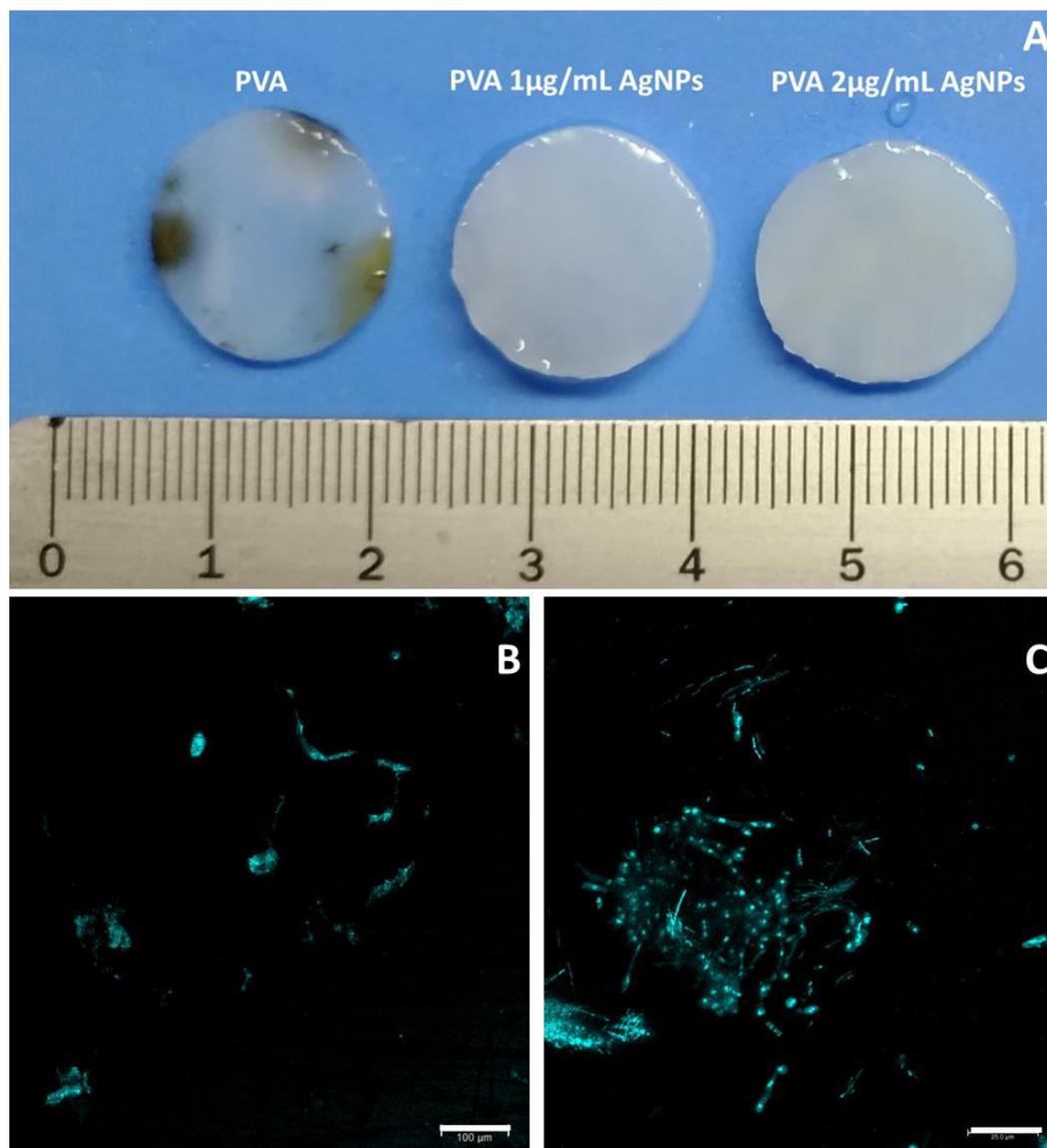


Figura 8. Análise do crescimento fúngico nas membranas de PVA com e sem AgNPs. (A) Análise macroscópica do crescimento de colônias fúngicas na membrana de PVA sem AgNps expostas a condições ambientais por 7 dias, o tipo de fungo presente nessa situação não foi identificado. Análise por MVCL após marcação com DAPI do crescimento de colônias de *Candida albicans* sobre as membranas de PVA sem AgNPs. (B) Colônias observadas em menor aumento, escala de 100 μm; (C) Colônia observada em maior aumento, escala de 250 μm. Houve crescimento de colônias apenas nas membranas sem AgNPs, como mostrado em A, B e C.

5.6 Obtenção das ASC

As células isoladas do tecido adiposo foram capazes de aderir a placa de cultivo. Essas células apresentam morfologia fibroblastóide com aproximadamente 200 μm de tamanho (Figura 9).

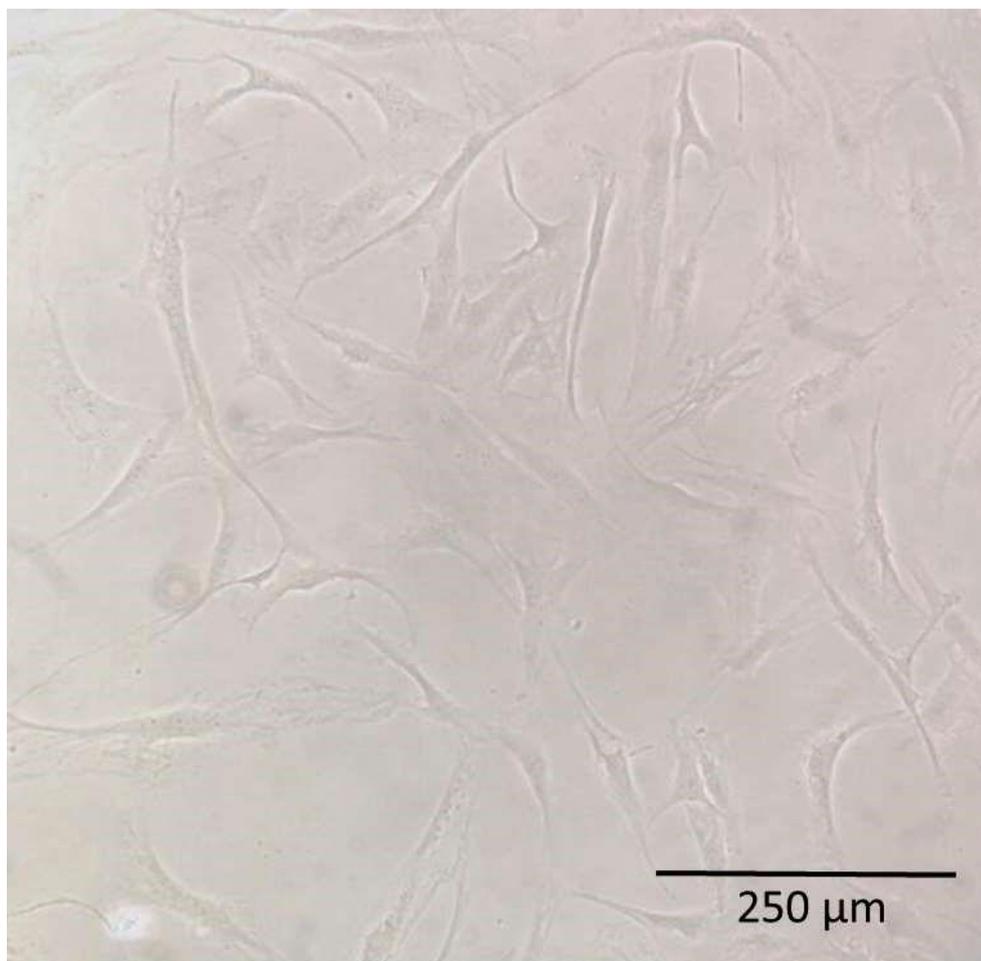


Figura 9. Morfologia das ASC em confluência 7 dias após isolamento. Microscopia de contraste de fase, aumento 200X.

5.7 Caracterização das ASC

Imunofenótipo

O estudo imunofenotípico das ASC foi realizado na quarta passagem. Para isso, utilizou-se um painel de marcadores bem estabelecidos para identificação das mesmas, as quais foram analisadas por citometria de fluxo. Inicialmente as células foram separadas por granulosidade, após realizou-se um *gate* para proceder com as marcações específicas. As ASCs apresentaram-se 98% positivas para CD105 (endoglina), 100% positivas para CD90 (Thy-1), CD73 (5' nucleotidase) e CD29 (integrina beta-1), e negativas para HLA-DR (não expresso em células-tronco mesenquimais) e CD45 (expresso em linfócito). As marcações estão representadas na Figura 10.

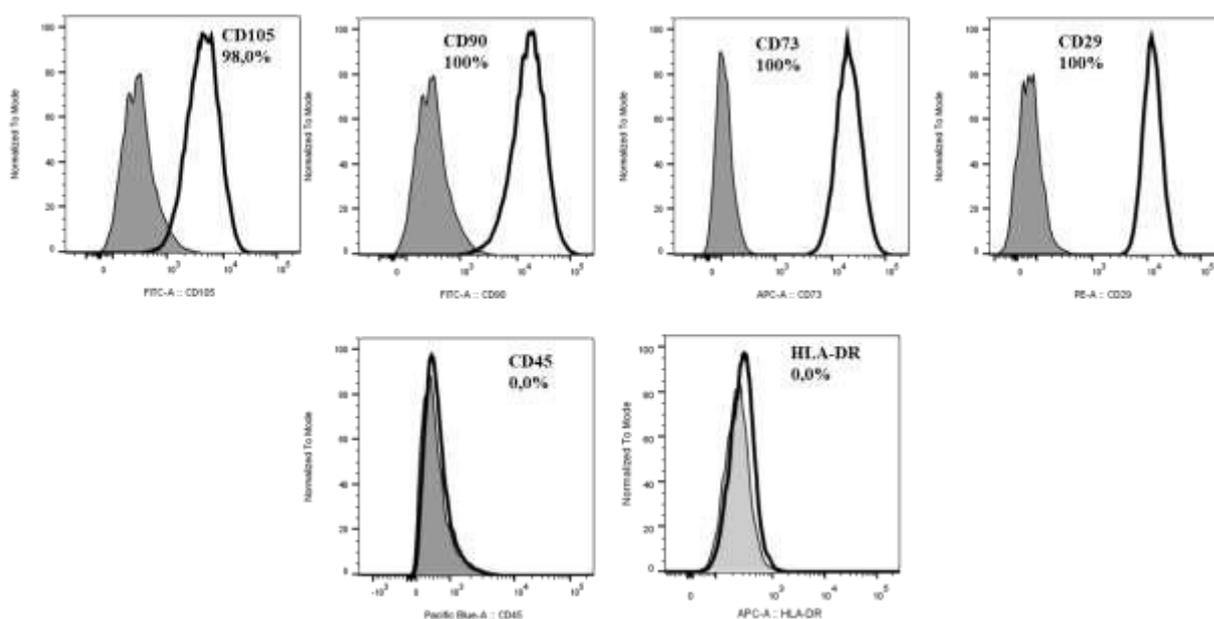


Figura 10. Análise da citometria de fluxo demonstrando as características fenotípicas das ASC.

5.8 Potencial de diferenciação

Na quarta passagem analisou-se o potencial de diferenciação das células isoladas do tecido adiposo. Após 14 dias de diferenciação essas células foram coradas com Alizarin red (depósito de cálcio) e Oil red (depósito de lipídeo). As ASC isoladas e cultivadas em meios indutores foram capazes de se diferenciar em osteoblasto e adipócitos, demonstrando a capacidade de diferenciação dessas células (Figura 11).

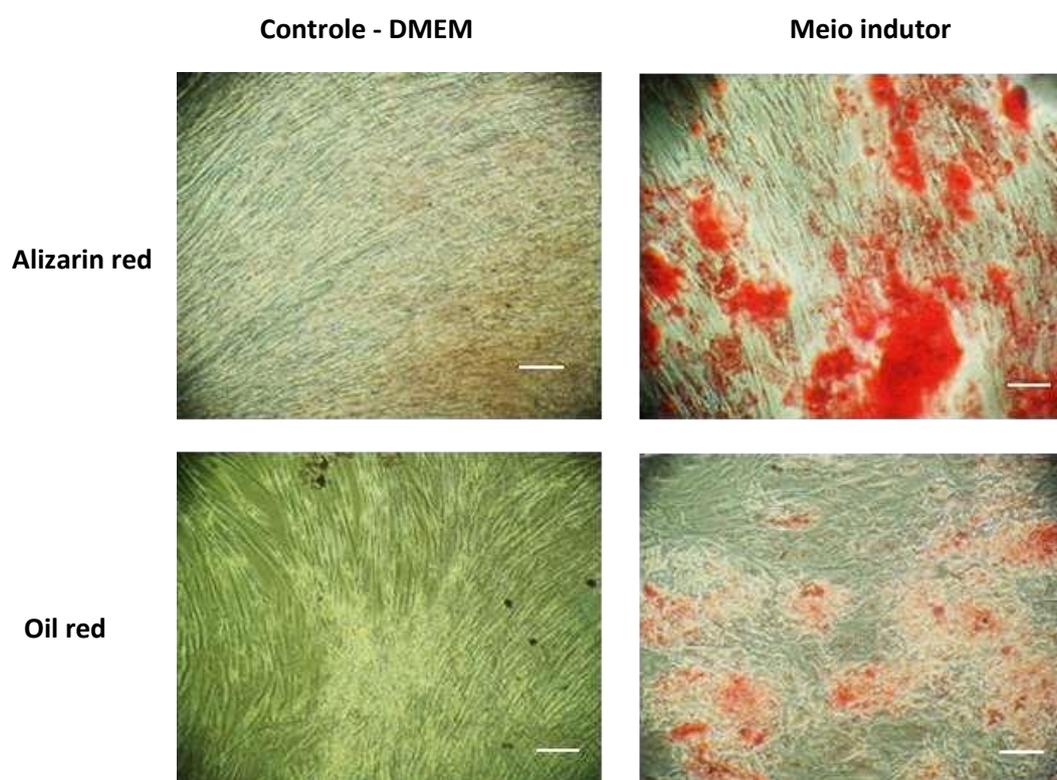


Figura 11. Análise do potencial de diferenciação das células isoladas do tecido adiposo, após 14 dias em meio indutor. As células diferenciadas em osteoblastos foram coradas com Alizarin Red e em adipócitos foram coradas com Oil Red. Microscopia de contraste de fase. Escala de 100 μ m.

5.9 Citocompatibilidade

O ensaio de citocompatibilidade foi realizado após 1, 7 e 14 dias cultivo no arcabouço de col-AH. É possível observar que houve crescimento celular ao longo do tempo e invasão das células para o interior do arcabouço (Figura 12). Essa análise foi realizada após a reconstrução 3D do material. O tempo de 14 dias foi utilizado como controle para que se pudesse determinar a espessura a ser analisada, nesse tempo, foi observado que a profundidade máxima onde havia células era de 150 μ m.

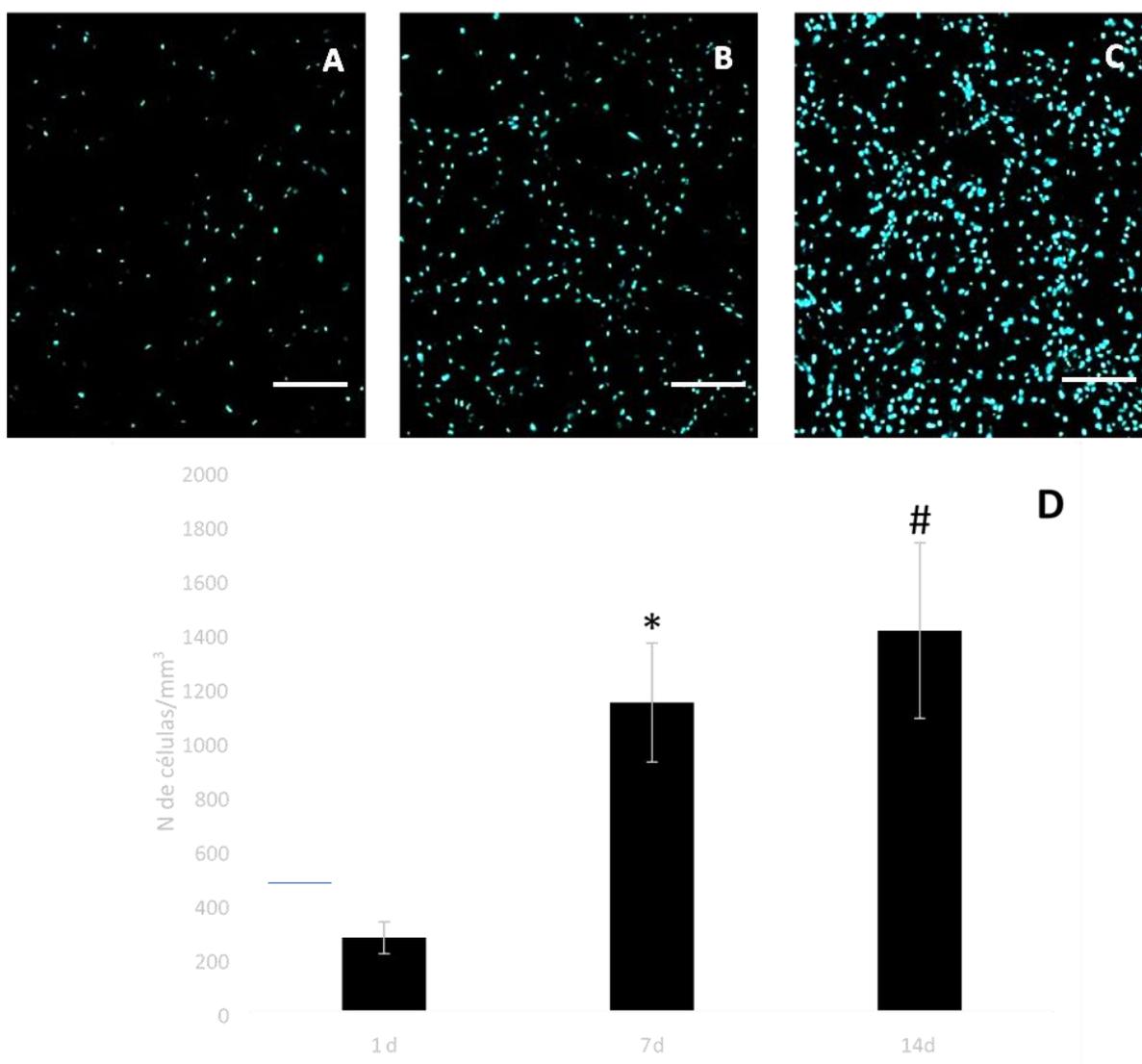


Figura 12. Análise do crescimento das ASC no arcabouço de col/AH após 1, 7 e 14 dias de cultivo (A, B e C respectivamente). Núcleo das ASC marcado com DAPI (azul) e observados por MCVL. Representação gráfica do crescimento das ASC no arcabouço. Resultado expresso em média com desvio padrão, n=3. Significância estatística $p < 0.01$ (* 1 vs. 7 dias; # 1 vs. 14 dias; ns 7 vs. 14 dias). Escala de 100 μ m.

O ensaio de citocompatibilidade no dispositivo bilaminar contendo AgNPs também foi realizado após 1, 7 e 14 dias. Como se trata de um material espesso e poroso, a quantificação celular foi feita após a reconstrução 3D do material. É possível observar que houve crescimento celular ao longo do tempo e que a presença de AgNPs nas membranas de PVA não interferiram no crescimento das ASC (Figura 13).

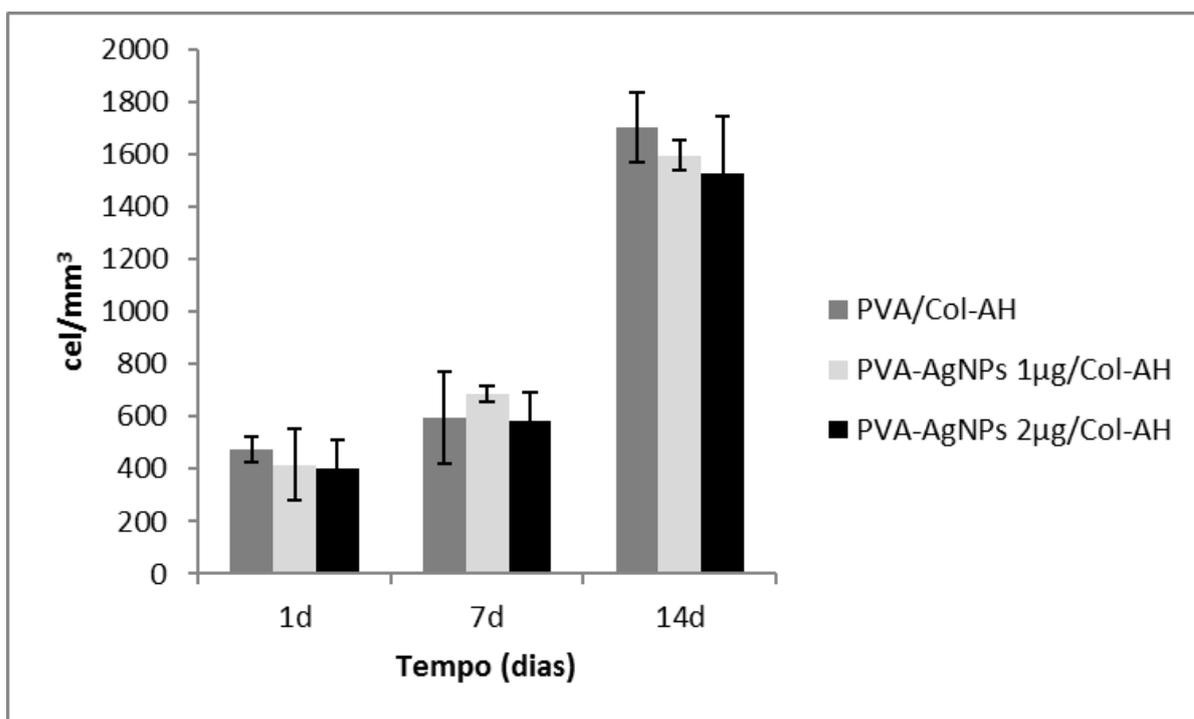


Figura 13. Crescimento das ASC no dispositivo bilaminar PVA/col-AH e PVA contendo 1 ou 2 µg/mL de AgNPs/col-AH após 1, 7 e 14 dias de cultivo. Resultado expresso em média com desvio padrão, n=3.

5.9.1 Fenótipo das ASC após cultivo no arcabouço de col-AH e dispositivo bilaminar

O fenótipo das ASC foi analisado após 1, 7 e 14 dias de cultivo nos arcabouços. Após 1 dia de cultivo as células encontram-se espalhadas e agrupadas, com 7 e 14 dias o citoesqueleto está organizado em fibras de estresse e as células estão mais espalhadas (Figura 14).

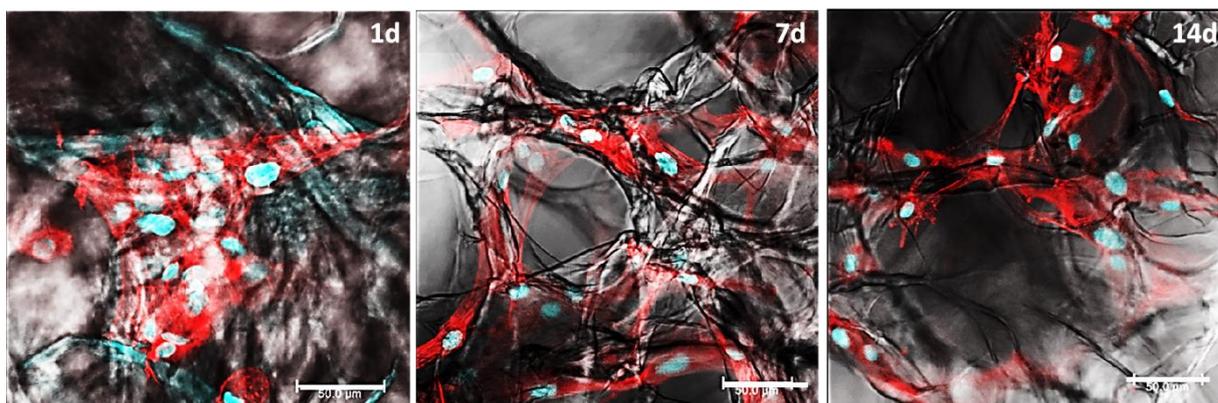


Figura 14. Morfologia das ASC no arcabouço de colágeno/AH após 1 dia de cultivo (A), 7 dias (B) e 14 dias de cultivo, analisadas por MVCL após reconstrução 3D (C). Núcleo marcado com DAPI (azul), citoesqueleto marcado com Alexa-Fluor® 647 (vermelho). Escala de 50 μm .

A morfologia das ASC foi analisada após 1, 7 e 14 dias de cultivo nos dispositivos bilaminar composto por PVA/col-AH, PVA 1 μ g/mL/col-AH e PVA 2 μ g/mL/col-AH. As células encontram-se aderidas e espalhadas em todos os materiais analisados, demonstrando que a presença das AgNPs não interferiu na adesão e morfologia das ASC (Figura 15).

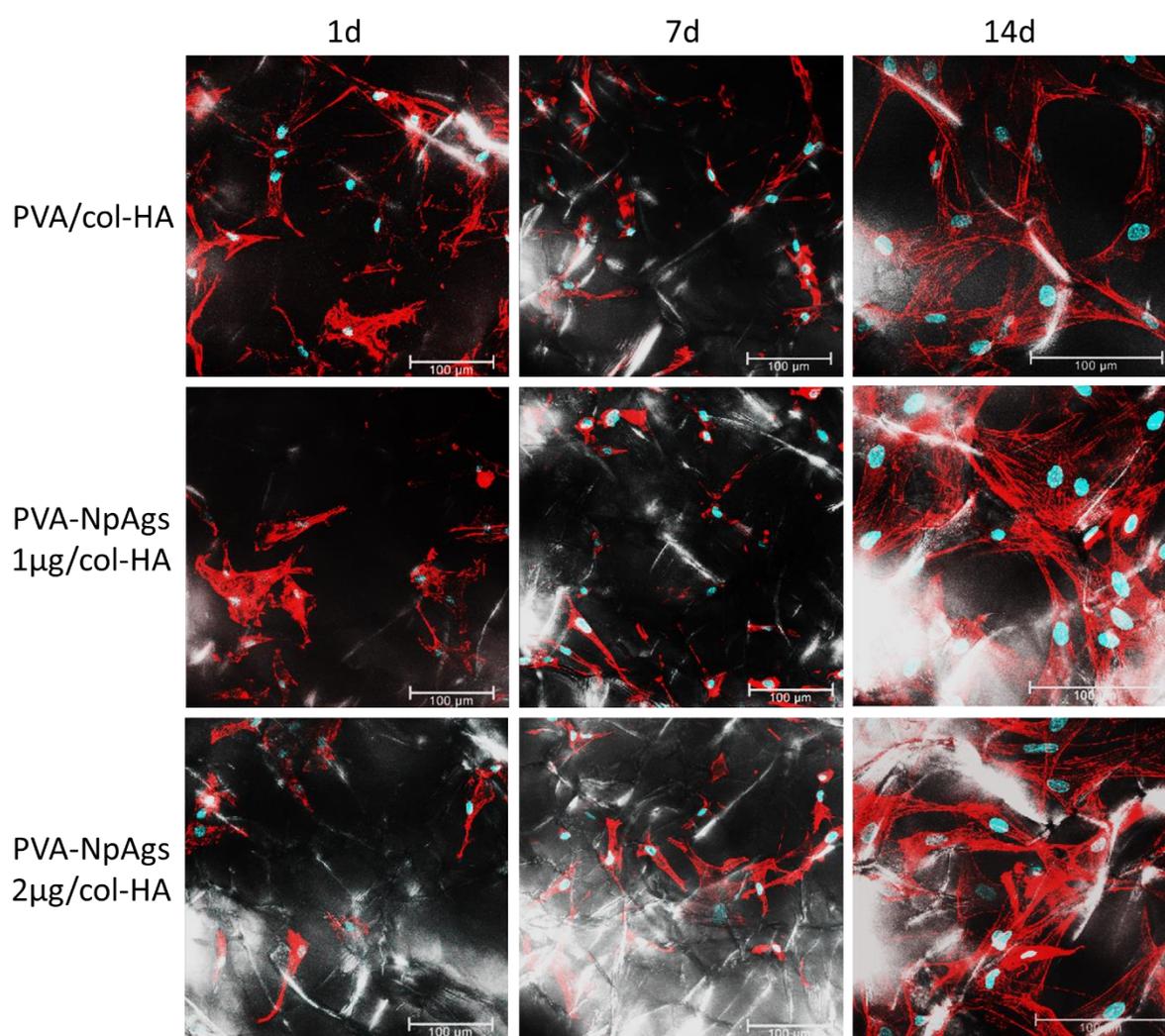


Figura 15. Morfologia das ASC após 1, 7 e 14 dias de cultivo nos dispositivos bilaminar PVA/col-AH e PVA-AgNPs/col-AH analisadas por MVCL após reconstrução 3D. Citoesqueleto marcado com Faloidina-Alexa FLuor 594 (vermelho) e DAPI para núcleo (azul).

5.9.2 Liberação de Ag⁺ no meio de cultura

O sobrenadante proveniente do cultivo das ASC sobre os dispositivos bilaminar, foi coletado após 1, 7 e 14 dias do cultivo. É possível observar que ocorreu uma pequena liberação de Ag⁺, cerca de 3×10^{-3} ppm para PVA-AgNPs $1 \mu\text{g}/\text{col-AH}$ e 35×10^{-3} ppm para PVA-AgNPs $2 \mu\text{g}/\text{col-AH}$ apenas no primeiro dia de cultivo. Após 7 e 14 dias não houve mais liberação das AgNPs para o meio (Figura 16).

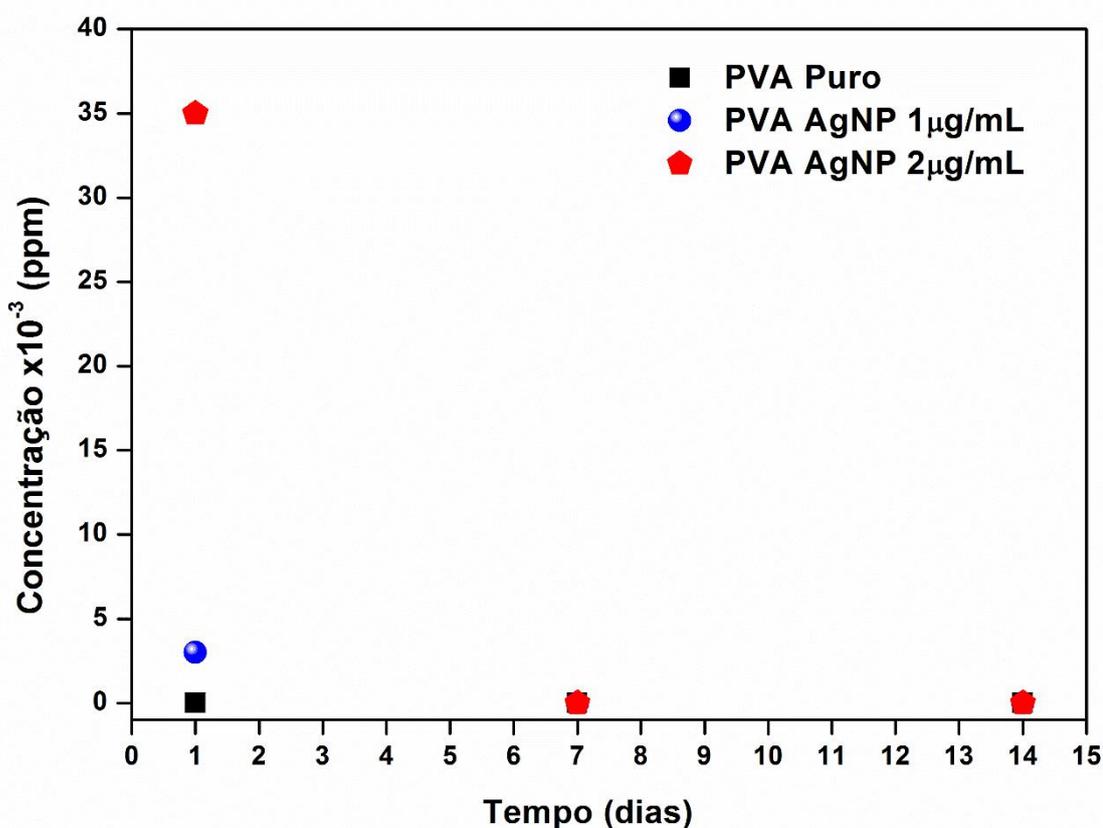


Figura 16. Liberação de Ag⁺ no sobrenadante da cultura das ASC sobre os dispositivos bilaminar analisada por ICP-OES.

5.9.3 Obtenção dos macrófagos

Os monócitos separados com o kit comercial CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) e cultivados em frasco de cultura celular com superfícies que evitam a adesão, na M-CSF para conversão dos monócitos em macrófagos por 5 dias, apresentarem-se aderidos a placa formando colônias (Figura 17).

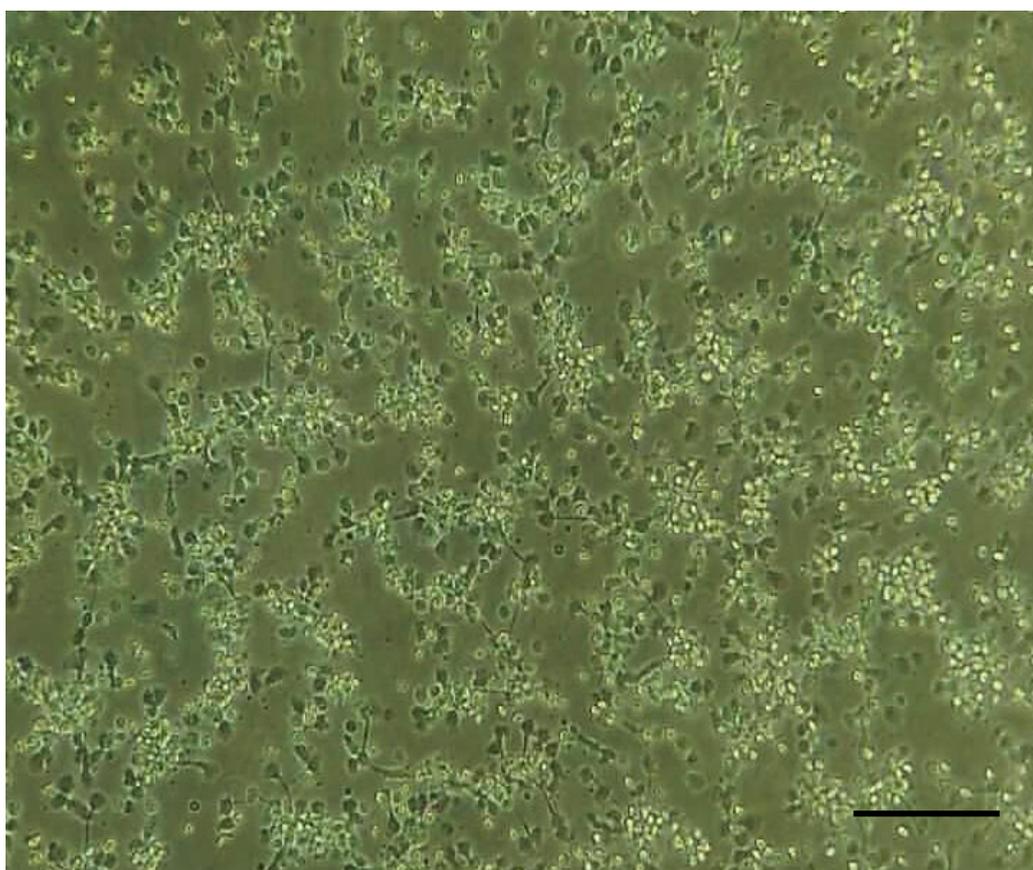


Figura 17. Macrófagos cultivados em frascos de cultivo celular de baixa adesão na presença de M-CSF após 5 dias. Microscopia de contraste de fase. Escala de 250 μm .

5.9.4 Morfologia dos macrófagos e ASC após cultivo e co-cultivo na placa de poliestireno e col-AH

Com 14 dias de cultivo, os macrófagos apresentaram-se arredondados em todos os tratamentos. As ASC na presença dos macrófagos tratados com LPS+INF γ , cultivadas na placa, apresentaram-se organizadas paralelamente uma as outras e afiladas, já as ASC co-cultivadas com macrófagos sem tratamento estão dispostas em várias direções. As ASC no arcabouço de col-AH cultivadas com macrófagos tratados com LPS+INF γ , apresentam-se afiladas e aderidas as paredes dos poros. Enquanto que as ASC na presença dos macrófagos sem tratamento, crescem no arcabouço e uma sobre as outras. Aparentemente, houve redução na quantidade das mesenquimais na presença dos macrófagos tratados com LPS+INF γ quando comparadas as ASC com macrófagos sem tratamento (Figura 18).

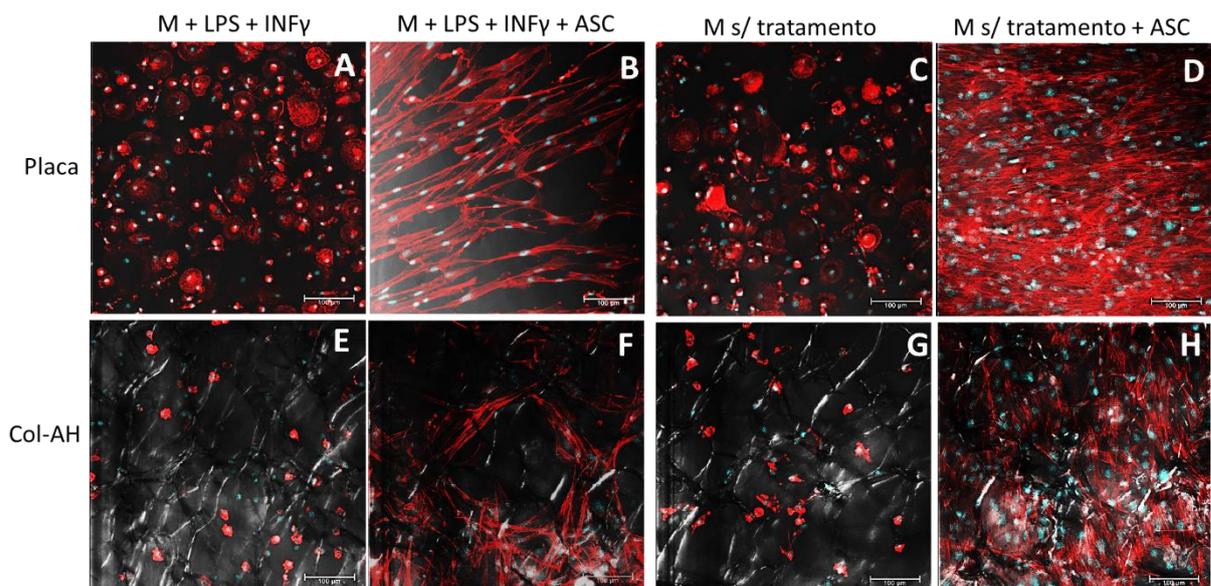


Figura 18. Macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS + INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Em A, B, E e F células tratadas com LPS + INF γ . Em C, D, G e H células sem tratamento. Células analisadas por MVCL após reconstrução 3D. Citoesqueleto marcado com Faloidina-Alexa FLuor 594 (vermelho) e DAPI para núcleo (azul).

5.9.5 Fenótipo dos macrófagos após cultura e co-cultura na placa de poliestireno e col-AH por citometria de fluxo

A presença de M1 e M2 foi analisada por meio da citometria de fluxo, a estratégia de análise utilizada está demonstrada na figura 19.

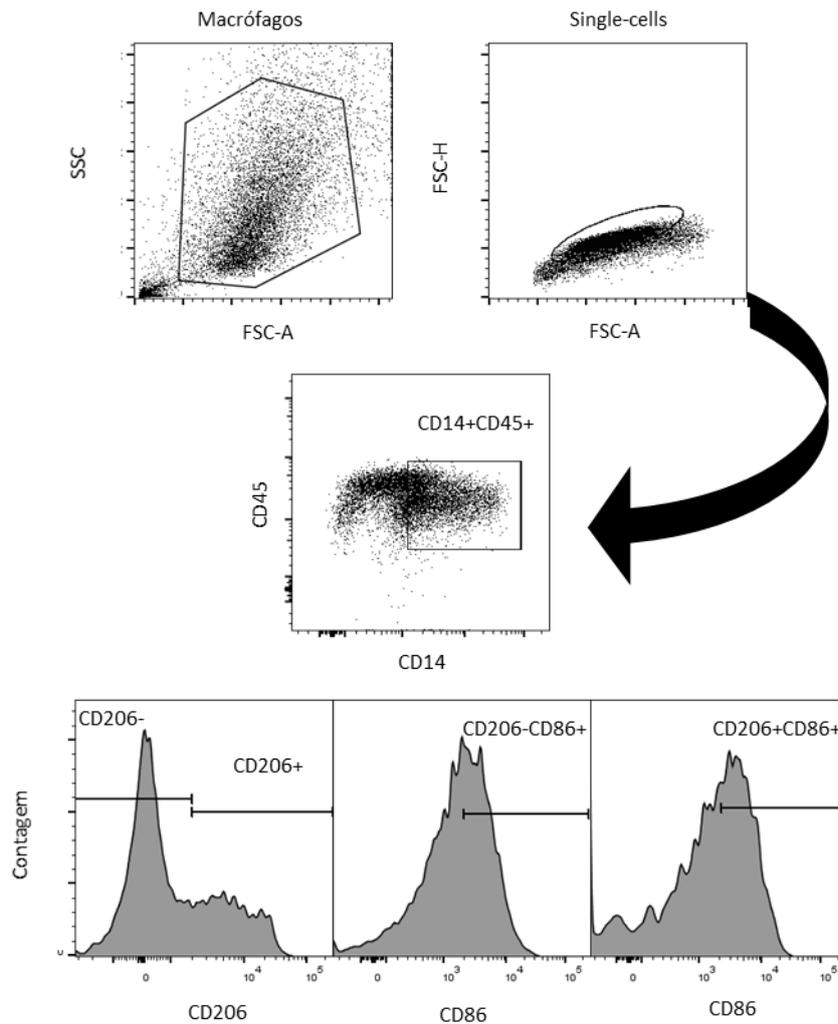


Figura 19. Estratégia de análise utilizada para identificação do fenótipo M1 ou M2 nas culturas. A análise inicial foi feita por um primeiro *gate* de tamanho e granulosidade, seguido de outro *gate* de “*singlets*”, que prioriza células únicas. Posteriormente, as análises fenotípicas dos macrófagos foram feitas por meio de um *gate* duplo positivo para CD14 e CD45, a fim de excluir as ASC. Dessa população, CD14+CD45+, analisou-se as células positivas e negativas para CD206. Após, dentro das positivas e negativas para CD206, foi verificado também a expressão de CD86. A análise da presença de macrófagos M1, foi realizada dentro da população CD206 negativa.

A presença das ASC modulou a resposta dos macrófagos para um fenótipo M2 (anti-inflamatório) por aumentar a quantidade de células expressando CD206, cultivados na placa sem tratamento ou no arcabouço de col-AH. Exceto na amostra tratada com LPS+INF γ , não foi notado o aumento na quantidade de macrófago expressando CD206 (Figura 20).

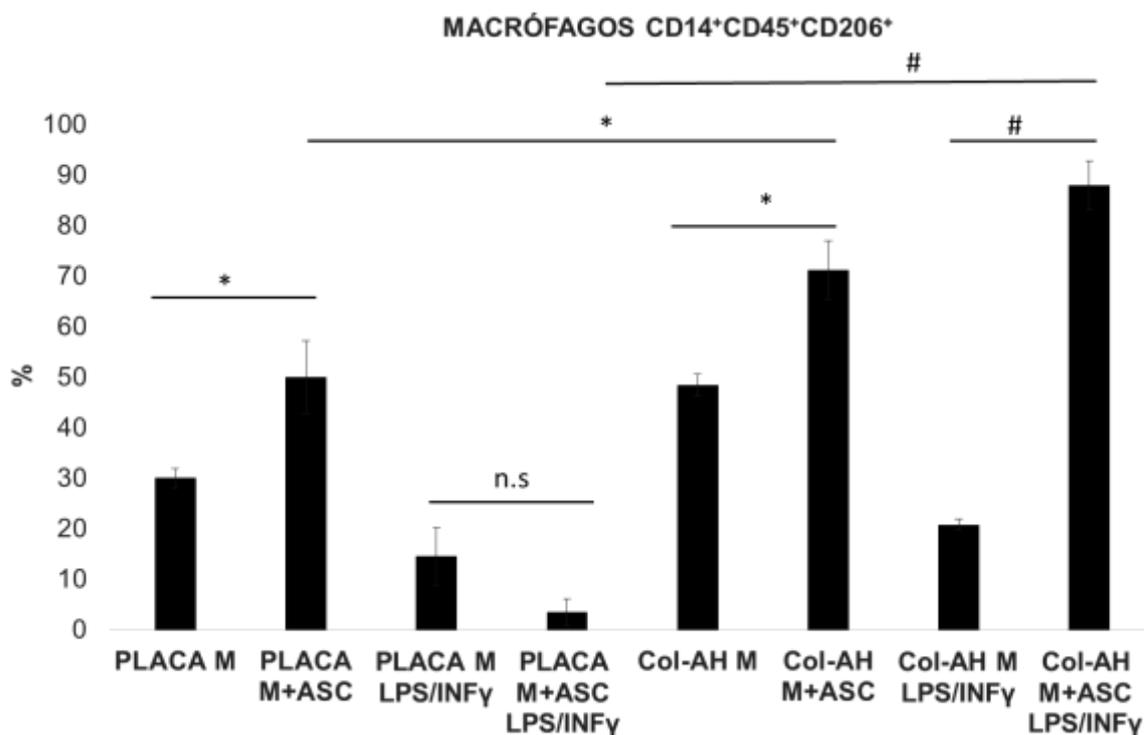


Figura 20. Expressão de CD206 pelos macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. * $p < 0,05$, # $P < 0,01$.

Nos macrófagos positivos para CD206 foi observado redução na expressão de CD86, marcador para M1, após co-cultura dos macrófagos com as ASC no grupo ColAH. Nas amostras col-AH tratada com LPS+INF γ , houve aumento na expressão

de CD86 na presença das ASC, provavelmente devido a supressão do CD86 no grupo Col-AH M LPS+INF γ sem ASC, o qual pode ter sido acarretado pelo excesso de estímulo inflamatório promovido pelo arcabouço e LPS+INF γ . Na placa não foi observado diferença com relação a expressão de CD86 (Figura 21).

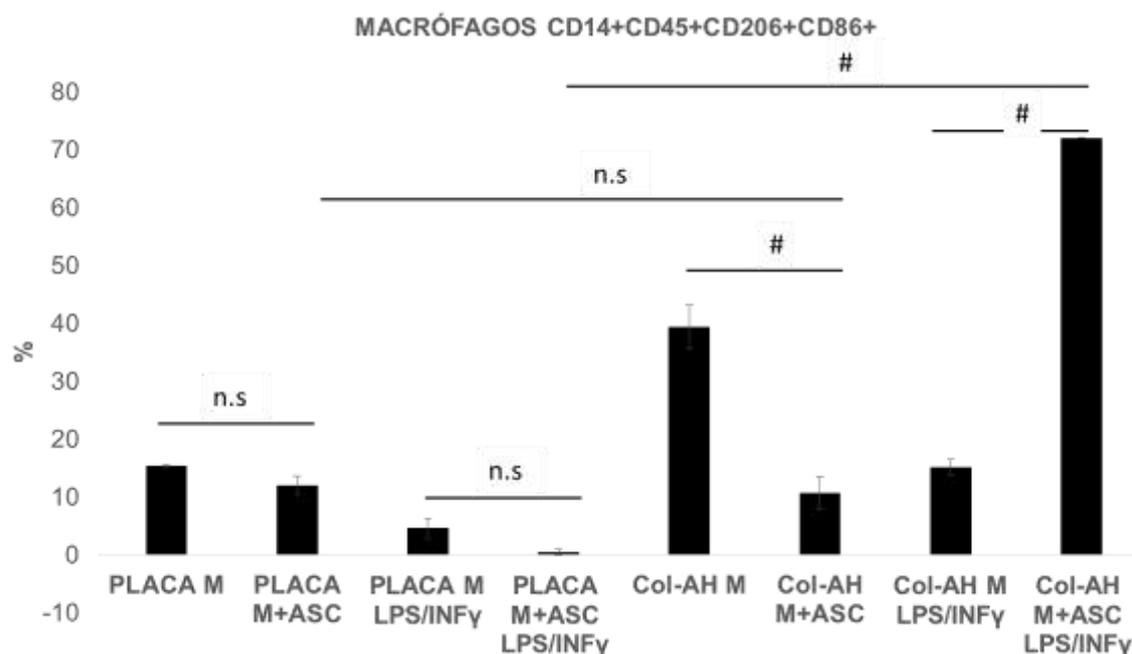


Figura 21. Expressão de CD86 pelos macrófagos cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. * $p < 0,05$, # $P < 0,01$.

Foi observado redução na população de células M1 na presença das ASC (Figura 22).

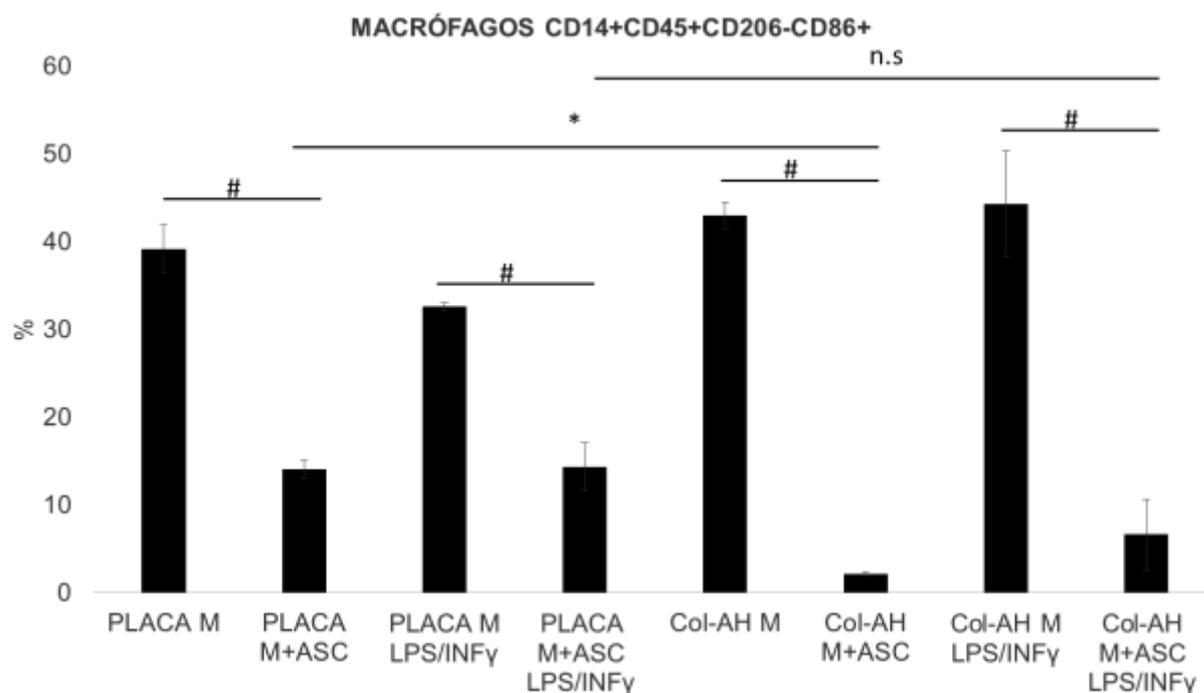


Figura 22. Macrófagos CD86+CD206- cultivados na placa de poliestireno e arcabouço de col-AH, na presença ou ausência de LPS+INF γ e ASC, após 14 dias de cultivo. Resultados expressos em média com desvio padrão. *p<0,05, #P<0,01.

5.9.6 Produção de citocinas pró e anti-inflamatória

Analisou-se a produção de citocinas pró-inflamatórias IL12p40 e TNF α e antiinflamatória IL10, provenientes do sobrenadante da cultura celular. A presença das ASC promoveu redução das três citocinas (Figura 23).

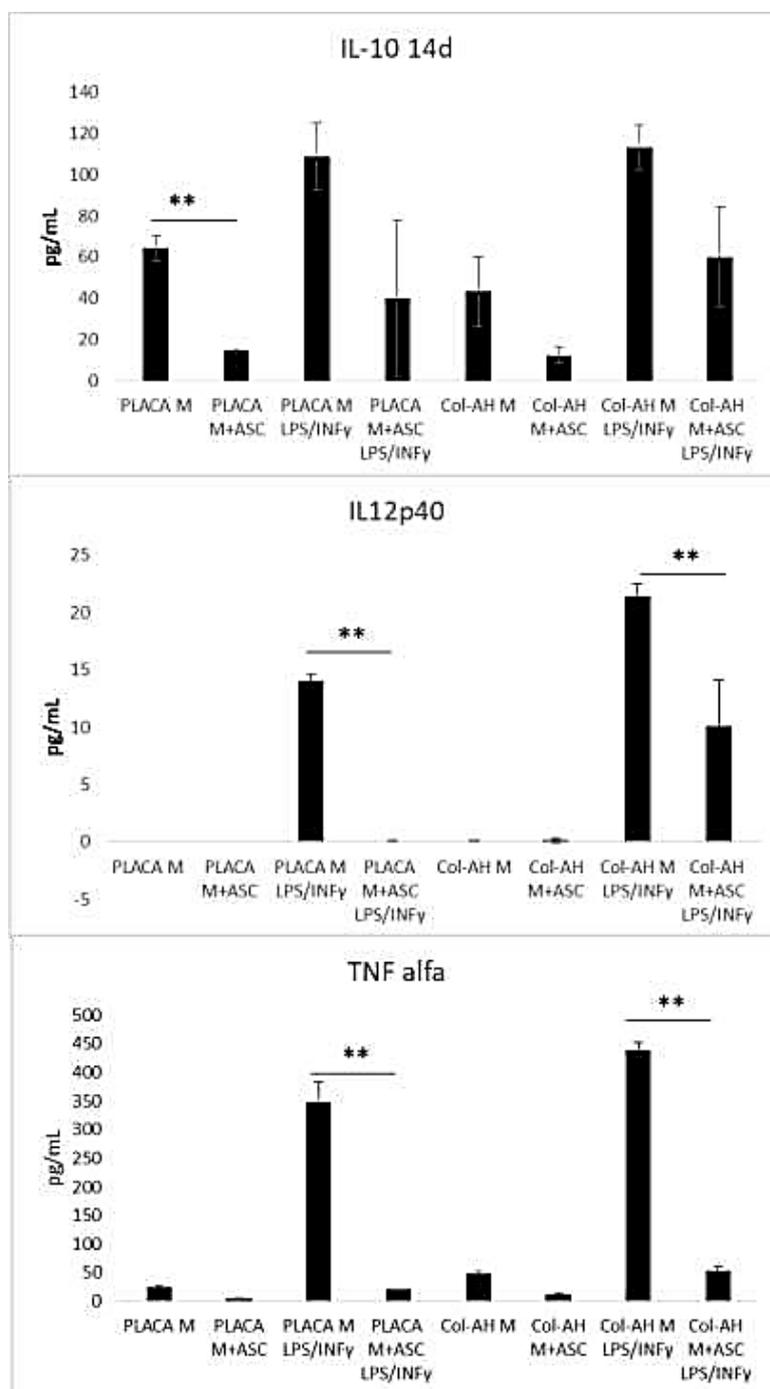


Figura 23. Citocinas anti e pró-inflamatórias provenientes do cultivo celular das ASC com macrófagos. Resultados expressos em média com desvio padrão. **P<0,01.

6. Discussão

Neste estudo, desenvolveu-se um dispositivo bilaminar composto por PVA-AgNPs/col-HA cultivado com ASC, como substituto cutâneo. Essa estrutura bilaminar visa mimetizar a pele, a qual é basicamente composta por uma camada mais externa avascular, a epiderme, sobre uma camada vascularizada, a derme (Nyame, Chiang, & Orgill, 2014).

A membrana de PVA contendo AgNPs seria utilizada temporariamente a fim de exercer algumas funções da epiderme, como manter a lesão hidratada e evitar infecções por microrganismos (Jones & Vaughan, 2005b). O arcabouço de colágeno ácido hialurônico seria utilizado como equivalente dérmico, por mimetizar a matriz extracelular da derme, enquanto que, é esperado que as ASC cultivadas no arcabouço de col-AH associado a membrana de PVA-AgNPs produzam moléculas que auxiliarão no reparo da derme com redução na formação de fibrose.

Trabalhos têm proposto que a polarização dos macrófagos para o fenótipo M2, está relacionado a melhor aceitação dos biomateriais implantados e melhora da regeneração do tecido ao invés de cicatrização (Guo, Merkel, Sterling, Davidson, & Guelcher, 2015; S. Hanson, D'Souza, & Hematti, 2014). ASC são conhecidas por serem imunomodulatórias, promovendo a polarização dos macrófagos para fenótipo M2, e anti-fibróticas (Chung & Son, 2014; Zonari et al., 2015). Sendo assim, também se analisou a retenção da imunomodulação das ASC sobre os macrófagos após cultivo no arcabouço de col-AH desenvolvido.

Devido ao importante papel dos macrófagos no processo de cicatrização, intervir nas suas funções pode resultar em menor ulcerações, ferimentos crônicos, redução de cicatriz hipertrófica e queloides (Delavary, van der Veer, van Egmond, Niessen, & Beelen, 2011). Porém, para intervir é necessário maior conhecimento sobre o papel dos diferentes fenótipos assumidos pelos macrófagos na cicatrização. O sistema de co-cultura desenvolvido nesse trabalho, possibilita maior conhecimento da resposta dos macrófagos a biomateriais e da imunomodulação promovida pelas ASC.

A análise morfológica mostrou que a presença de AgNPs na membrana de PVA não interferiu na porosidade desse material, a qual apresentava poros com diâmetro entre 0,94 a 11,3 μm . A presença de poros nessa membrana é importante, pois permite aumento na concentração de oxigênio na lesão, que é necessário em vários processos celulares como fagocitose, mitose e expressão de fatores de crescimento, imprescindíveis para o reparo da lesão (Vowden, 2014). O arcabouço de colágeno/HA também se mostrou extremamente poroso, possuindo poros interconectados, o que proporciona a interação entre as células, pois permite a passagem de citocinas e fatores de crescimento (Hunt, Shelton, & Grover, 2009). Os poros presentes no arcabouço possuem diâmetro entre 60,6 a 100 μm , tamanho esse considerado ideal para infiltração celular e angiogênese (O'Brien et al., 2005).

Outra característica importante para um curativo cutâneo são suas propriedades mecânicas, esses materiais precisam ser resistentes a deformação, macios e flexíveis, permitindo seu uso em qualquer parte do corpo (Khan, Peh, & Ch'ng, 2000). O módulo de Young da membrana de PVA variou entre 0,16 a 0,17 Mpa. A presença de 2 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs promoveu redução do módulo de Young. Baek et al. (2015), têm demonstrado que a presença das AgNPs reduz a densidade de reticulação do hidrogel o que interfere nas propriedades mecânicas desse material. A deformação máxima das membranas variou de 160 a 170%, maior que a da pele humana que apresenta elasticidade de 75% para recém-nascido e 60% para adultos idoso (Pawlaczyk, Lelonkiewicz, & Wieczorowski, 2013).

Pacientes com queimaduras estão expostos a invasão da lesão por microrganismos que podem levar a morte por septicemia (Bang et al., 2002). Para reduzir o risco de infecção das lesões adicionou-se AgNPs na membrana de PVA. As nanopartículas apresentaram diâmetro entre 5 a 20 nm. Segundo Xiu, et al., 2012 quanto menor a partícula maior é a liberação de Ag^+ e, portanto, maior seu potencial bactericida. Acredita-se que a oxidação da AgNPs a Ag^+ , possa interagir com moléculas presentes nas membranas das bactérias promovendo a despolarização da membrana, levando a morte da bactéria (Mahmoudi & Serpooshan, 2012). Além disso, foi demonstrado que o mecanismo inibitório dos íons de prata (Ag^+) em

microrganismos, promovem a perda da capacidade de replicação do DNA, inativação de genes (Feng et al., 2000).

O ensaio microbiológico por difusão de disco, demonstrou a presença de um pequeno halo apenas na amostra de PVA-AgNPs 2µg/mL. Esse resultado pode ser explicado pela pequena quantidade de Ag⁺ liberada da membrana de PVA demonstrada pelo ensaio de ICP-OES. A presença das AgNPs, em ambas concentrações, inibiu o crescimento fúngico na superfície das membranas. Dessa forma, podemos propor que houve retenção da Ag⁺ pela membrana de PVA e que essas não atuam liberando as AgNPs, mas sim inibindo o crescimento microbiológico por contato.

As ASC foram cultivadas nos arcabouços de colágeno-HA associado a membrana de PVA-AgNPs para estimular a vascularização e reduzir a formação de fibrose. Segundo Dominici et al. (2006), os critérios mínimos para caracterização das células-tronco mesenquimais seriam a capacidade dessas células em aderir a placa de poliestireno, expressar CD73, CD90 e CD105 e não expressar CD11b, CD19, CD34 e HLA-DR e capacidade de diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito. Nesse trabalho demonstrou-se que foi possível o isolamento das ASC de tecido adiposo humano e essas foram confirmadas com células-tronco mesenquimais, por meio dos ensaios de citometria de fluxo e capacidade de diferenciação em células do tecido mesodérmico.

O ensaio de citocompatibilidade é necessário em qualquer biomaterial desenvolvido, para que se possam analisar possíveis efeitos danosos do material as células. Dessa forma, para que se pudesse determinar o crescimento celular no arcabouço, marcamos o núcleo das células com DAPI e após obtenção da reconstrução 3D das imagens, realizou-se a contagem dos núcleos. Nesse ensaio, foi possível observar que o arcabouço permitiu o crescimento das ASC ao longo do tempo, além de sua infiltração. Além disso, por meio da análise morfológica das células foi possível notar que com 1 dia de cultivo as ASC se encontravam espalhadas no arcabouço, com 7 e 14 dias o citoesqueleto está organizado em fibras de estresse, o que indica forte adesão das células ao biomaterial (Zigmond, 1996). O dispositivo

bilaminar desenvolvido nesse trabalho, demonstra potencial uso como substituo cutâneo, uma vez que apresenta características necessárias a esses biomateriais.

Atualmente, a resposta dos macrófagos aos biomateriais tem recebido grande atenção da comunidade científica (Fearing & Van Dyke, 2014; S. E. Hanson et al., 2011; Witherel, Graney, Freytes, Weingarten, & Spiller, 2016). Essas células, dependendo do estímulo a qual são expostas, podem se diferenciar em macrófagos pró-inflamatórios (M1) e promover a destruição do tecido, ou em macrófagos anti-inflamatórios (M2) responsáveis pelo remodelamento tecidual. Macrófagos M2, são células imunomodulatórias responsáveis pela remoção de restos apoptóticos e celulares, e estimulam o reparo tecidual e a angiogênese por meio da produção de citocinas e quimiocinas (Mosser & Edwards, 2008).

As ASC, cultivadas no arcabouço de col-AH, foram utilizadas para analisar a manutenção do seu potencial de modular os macrófagos para fenótipo M2 e a influência dessa modulação sobre a expressão gênica dos fibroblastos. A co-cultura dos macrófagos com as ASC, demonstrou que as células permanecem vivas, tanto na placa quanto no arcabouço de col-AH, após 14 dias. Além disso, a presença dos macrófagos sem tratamento permitiu maior proliferação das ASC, quando comparado com macrófagos tratados com LPS+INF γ . Witherel et al., 2016, também reportaram aumento na sobrevivência das células tronco mesenquimais quando expostas a macrófago M2 comparada com M1. Esses resultados demonstram que é possível o estudo da co-cultura dessas células no arcabouço de col-AH desenvolvido nesse estudo.

O estudo fenotípico dos macrófagos demonstrou que, após 14 dias de cultivo, a presença das ASC promoveu aumento na expressão de CD206, marcador para M2. Além disso, houve redução na quantidade de M1 na presença das mesenquimais. Também foi possível observar que o arcabouço de col-AH sem tratamento, aumentou a imunomodulação das ASC sobre os macrófagos, pois além do aumento de CD206, também houve redução de CD86. Outros trabalhos também têm demonstrado aumento no potencial imunomodulatório parácrino das células tronco mesenquimais em sistema de cultivo tridimensional (3D) quando comparado com sistema

bidimensional (2D) (Bartosh et al., 2010; Ylöstalo, Bartosh, Coble, & Prockop, 2012). Acredita-se que esse resultado possa ser devido a alguns fatores divergentes entre o sistema de cultivo bi e tridimensional, como polarização das células em resposta a força e rigidez do substrato, troca gasosa e gradiente de concentração de citocinas (Follin et al., 2016).

A polarização das células em sistema 2D, como na placa de poliestireno, difere de um sistema 3D. No sistema 2D a força no aparato de mecanossensação promovida pela interação célula-matriz ocorre somente na superfície basal das células, enquanto que no sistema 3D é espalhada por toda superfície celular (Sart, Tsai, Li, & Ma, 2014).

Diferença no gradiente de oxigênio e citocinas promovidos em sistema de cultura 3D, estão relacionados com mudanças no comportamento das células. A hipóxia que ocorre no interior de biomateriais porosos em condições estáticas, pode levar a aumento na produção de VEGF, proliferação e diferenciação celular (Cheema, Brown, Alp, & MacRobert, 2008; Grayson, Zhao, Bunnell, & Ma, 2007).

No sistema de cultura 3D, é observado aumento na secreção de componentes da matriz extracelular pelas células tronco mesenquimais, o qual é atribuído a retenção de fatores de crescimento (Duggal et al., 2009).

Notamos que o arcabouço de col-AH sem as ASC e sem estímulo para M1, promove um fenótipo intermediário dos macrófagos, com alta expressão de CD86 e CD206. Esse mesmo resultado foi observado no grupo contendo as ASC e macrófagos tratado com LPS+INF γ no arcabouço de col-AH, isso indica que essas células estão recebendo ambos estímulos, pró e anti-inflamatório. Os macrófagos são células o qual devido sua plasticidade podem polarizar para o fenótipo M1 ou M2, essa polarização não é fixa, podendo um fenótipo ser convertido a outro dependendo das citocinas e quimiocinas as quais estão expostas (Stout, Watkins, & Suttles, 2009). Devido a essa plasticidade é possível haver macrófagos em situações intermediárias (Mosser & Edwards, 2008).

Era esperado aumento na expressão de CD86 no grupo col-AH M LPS+INF γ , quando comparado ao grupo col-AH M, acredita-se que esse resultado seja devido a supressão do receptor devido sua superestimulação, a qual pode ter sido causada pelo colágeno bovino tipo I e pela presença de LPS+INF γ . O aumento na expressão do CD86, no grupo col-AH M+ASC LPS+INF γ , pode ter ocorrido por causa da presença das ASC, a qual conseguiu atenuar a superestimulação desse receptor. A supressão da resposta inflamatória, devido ao excesso de estímulo, com redução na expressão de genes como CD86, é um mecanismo de tolerância essencial a homeostase da resposta imunológica (Carmody, O 'carroll, Fagan, & Shanahan, 2018).

Nesse estudo, foi observado conversão do macrófago para o fenótipo M2, no arcabouço de col-AH, por meio do cultivo das ASC. Acredita-se que a indução do fenótipo M2, logo após implante do biomaterial, seja desejável por evitarem a reação de corpo estranho (RCE) desencadeada pela presença do biomaterial. Nesse tipo de resposta imune, células inflamatórias são recrutadas no local tecidual do implante e os macrófagos por não conseguirem fagocitar o material, estimulam um processo inflamatório crônico. Esse processo inflamatório crônico, com presença de macrófagos M1, pode levar a perda do biomaterial implantado, além de trauma adicional ao tecido. Dessa forma, tem se proposto que a indução da resposta antiinflamatória possa contribuir para o sucesso do implante e permitir o reparo tecidual (S. Hanson et al., 2014).

Tanto na placa quanto no arcabouço, a presença das ASC reduziu a quantidade de M1. Dessa forma podemos pressupor que as ASC podem reduzir a RCE gerada pelo arcabouço, a qual tem-se demonstrado estar relacionada a presença de M1 no local do implante (S. Hanson et al., 2014).

A presença das ASC, promoveu redução das citocinas pró-inflamatórias, IL12p40 e TNF α , e anti-inflamatória, IL10, em todos os casos analisados. Esses resultados corroboraram com os encontrados na análise fenotípica dos macrófagos, onde observou-se aumento na expressão de CD206 nos grupos contendo ASC. Houve aumento dessas citocinas nos grupos tratados com LPS+INF γ . O aumento da

IL10 seguido do aumento de citocinas inflamatórias é devido ao papel autorregulatório da IL10, a fim de solucionar a inflamação (Moore et al., 2001).

Foi observado no arcabouço de col-AH aumento na expressão de CD86, CD206 e na quantidade de macrófago M1 quando comparado a placa. O fenótipo misto observado com alta expressão de CD86 e CD206, pode ser devido a presença de estímulos anti e pró-inflamatório promovidos pelo arcabouço. No entanto, deve ser testado *in vivo* o potencial desse material em provocar uma RCE, uma vez que é conhecido que esse processo é desencadeado por macrófagos M1 (S. Hanson et al., 2014). O estudo *in vivo* do arcabouço de col-AH com e sem ASC, com estímulo para M1 e M2, seria um modelo interessante para analisar a RCE e formação de fibrose.

A manipulação do fenótipo inflamatório dos macrófagos pode contribuir para regeneração tecidual por alterar os mecanismos de formação de fibrose. Tem-se demonstrado que o aumento na regeneração versus fibrose, em implantes subcutâneos 3D, está relacionada com aumento na polarização de macrófagos para fenótipo M2 (Guo et al., 2015).

O sistema desenvolvido nesse estudo possibilita aprofundar o conhecimento da resposta dos macrófagos aos biomateriais e entender o mecanismo da imunomodulação promovida pelas ASC, de forma a melhorar os resultados obtidos com o implante dos biomateriais, visando reduzir rejeição imune, contribuir com a regeneração do tecido e estudar o mecanismo com células humanas.

7. Conclusões

- A membrana de PVA-AgNPs apresenta características apropriadas como curativo, com potencial em permitir troca gasosa, ser flexível e reduzir infecção por microrganismos;
- O arcabouço de col-AH demonstrou-se com poros interconectados e compatível com o crescimento das ASC;
- A associação da membrana de PVA-AgNPs com o arcabouço de col-AH não interferiu no crescimento das ASC;
- A presença das ASC, no arcabouço de col-AH, modulou a reposta dos macrófagos para M2 com redução das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias;
- O arcabouço de col-AH promoveu fenótipo intermediário dos macrófagos não induzidos e aumento na quantidade de M1.

8. Referências Bibliográficas

- Adamson R. Role of macrophages in normal wound healing: an overview. *J Wound Care*. 2009 Aug;18(8):349-51.
- Bang, R. L., Sharma, P. N., Sanyal, S. C., & Al Najjadah, I. (2002). Septicaemia after burn injury: A comparative study. *Burns*, 28(8), 746–751.
[https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00183-3](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00183-3)
- Bartosh, T. J., Ylostalo, J. H., Mohammadipoor, A., Bazhanov, N., Coble, K., Claypool, K., ... Prockop, D. J. (2010). Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13724–13729. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008117107>
- Bauer, S. M., Bauer, R. J., & Velazquez, O. C. (2005). Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Vascular and Endovascular Surgery*, 39(4), 293–306.
<https://doi.org/10.1177/153857440503900401>
- Beanes, S. R., Dang, C., Soo, C., & Ting, K. (2003). Skin repair and scar formation: the central role of TGF-beta. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(8), 1–22.
<https://doi.org/doi:10.1017/S1462399403005817>
- Bello, Y. M., & Falabella, A. F. (2002). The role of Graftskin (Apligraf) in difficult-to-heal venous leg ulcers. *Journal of Wound Care*, 11(5), 182–183.
<https://doi.org/10.12968/jowc.2002.11.5.26402>
- Blais, M., Parenteau-Bareil, R., Cadau, S., & Berthod, F. (2013). Concise Review: Tissue-Engineered Skin and Nerve Regeneration in Burn Treatment. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(7), 545–551.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0181>
- Böttcher-Haberzeth, S., Biedermann, T., & Reichmann, E. (2010). Tissue engineering of skin. *Burns*, 36(4), 450–460.
<https://doi.org/10.1016/j.burns.2009.08.016>

- Carmody, R. J., O'carroll, C., Fagan, A., & Shanahan, F. (2018). Recovery from Lipopolysaccharide Tolerance Macrophage-Polarization State following Identification of a Unique Hybrid Identification of a Unique Hybrid Macrophage-Polarization State following Recovery from Lipopolysaccharide Tolerance. *J Immunol Material SupplementaryDC1 The Journal of Immunology The Journal of Immunology*, 192(192), 427–436. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301722>
- Cheema, U., Brown, R. A., Alp, B., & MacRobert, A. J. (2008). Spatially defined oxygen gradients and vascular endothelial growth factor expression in an engineered 3D cell model. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(1), 177–186. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7356-8>
- Chung, E., & Son, Y. (2014a). Crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in tissue repair. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(6), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s13770-014-0072-1>
- Chung, E., & Son, Y. (2014b). Crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in tissue repair. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(6), 431–438. <https://doi.org/10.1007/s13770-014-0072-1>
- Delavary, B. M., van der Veer, W. M., van Egmond, M., Niessen, F. B., & Beelen, R. H. J. (2011). Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216(7), 753–762. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.01.001>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Drago, H., Marín, G. H., Sturla, F., Roque, G., Mártire, K., Díaz Aquino, V., ... Mansilla, E. (2010). The Next Generation of Burns Treatment: Intelligent Films and Matrix, Controlled Enzymatic Debridement, and Adult Stem Cells. *Transplantation Proceedings*, 42(1), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.11.031>

- Duggal, S., Frønsdal, K. B., Szöke, K., Shahdadfar, A., Melvik, J. E., & Brinchmann, J. E. (2009). Phenotype and Gene Expression of Human Mesenchymal Stem Cells in Alginate Scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, *15*(7), 1763–1773. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0306>
- Eghbalifam, N., Frounchi, M., & Dadbin, S. (2015). Antibacterial silver nanoparticles in polyvinyl alcohol/sodium alginate blend produced by gamma irradiation. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.042>
- Endo, M., Oyadomari, S., Terasaki, Y., Takeya, M., Suga, M., Mori, M., & Gotoh, T. (2003). Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *285*(2), L313–L321. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00434.2002>
- Epstein, F. H., Lefkovits, J., Plow, E. F., & Topol, E. J. (1995). Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine. *New England Journal of Medicine*, *332*(23), 1553–1559. <https://doi.org/10.1056/NEJM199506083322306>
- Epstein, F. H., Singer, A. J., & Clark, R. A. F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, *341*(10), 738–746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>
- Fearing, B. V., & Van Dyke, M. E. (2014). In vitro response of macrophage polarization to a keratin biomaterial. *Acta Biomaterialia*, *10*(7), 3136–3144. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.04.003>
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Journal of Biomedical Materials Research*, *52*(4), 662–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033548>
- Follin, B., Juhl, M., Cohen, S., Pedersen, A. E., Kastrup, J., & Ekblond, A. (2016). Increased Paracrine Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *22*(4), 322–329. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0532>

- Frank, S., Madlener, M., & Werner, S. (1996). Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(17), 10188–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626581>
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, 200(4), 500–503.
<https://doi.org/10.1002/path.1427>
- Gauglitz, G. G. (2013). Management of keloids and hypertrophic scars: current and emerging options. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 103–14. <https://doi.org/10.2147/CCID.S35252>
- Geutjes, P. J., Daamen, W. F., Buma, P., Feitz, W. F., Faraj, K. A., & van Kuppevelt, T. H. (2006). From Molecules to Matrix: Construction and Evaluation of Molecularly Defined Bioscaffolds (pp. 279–295). Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-34133-0_19
- Gopinath, D., Ahmed, M. R., Gomathi, K., Chitra, K., Sehgal, P. K., & Jayakumar, R. (2004). Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. *Biomaterials*, 25(10), 1911–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738855>
- Grayson, W. L., Zhao, F., Bunnell, B., & Ma, T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(3), 948–953.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2007.05.054>
- Greenhalgh, D. G. (2007). Consequences of excessive scar formation: dealing with the problem and aiming for the future. *Wound Repair and Regeneration*, 15(s1), S2–S5. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00220.x>
- Guo, R., Merkel, A. R., Sterling, J. A., Davidson, J. M., & Guelcher, S. A. (2015). Substrate modulus of 3D-printed scaffolds regulates the regenerative response in subcutaneous implants through the macrophage phenotype and Wnt signaling. *Biomaterials*, 73, 85–95.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2015.09.005>

- Gurtner, G. C., & Evans, G. R. (2000). Advances in head and neck reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *106*(3), 672–82; quiz 683. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987478>
- Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, *453*(7193), 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>
- Hanson, S., D'Souza, R. N., & Hematti, P. (2014). Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, *20*(15–16), 2162–8. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0359>
- Hanson, S. E., King, S. N., Kim, J., Chen, X., Thibeault, S. L., & Hematti, P. (2011). The Effect of Mesenchymal Stromal Cell–Hyaluronic Acid Hydrogel Constructs on Immunophenotype of Macrophages. *Tissue Engineering Part A*, *17*(19–20), 2463–2471. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0716>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, *9*(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hunt, N. C., Shelton, R. M., & Grover, L. (2009). An alginate hydrogel matrix for the localised delivery of a fibroblast/keratinocyte co-culture. *Biotechnology Journal*, *4*(5), 730–737. <https://doi.org/10.1002/biot.200800292>
- Jackson, W. M., Nesti, L. J., & Tuan, R. S. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. *Stem Cell Research & Therapy*, *3*(3), 20. <https://doi.org/10.1186/scrt111>
- Jiang, D., Qi, Y., Walker, N. G., Sindrilaru, A., Hainzl, A., Wlaschek, M., ... Scharffetter-Kochanek, K. (2013). The effect of adipose tissue derived MSCs delivered by a chemically defined carrier on full-thickness cutaneous wound healing. *Biomaterials*, *34*(10), 2501–15. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.12.014>

- Jones, A., & Vaughan, D. (2005a). Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *Journal of Orthopaedic Nursing*, 9, S1–S11. [https://doi.org/10.1016/S1361-3111\(05\)80001-9](https://doi.org/10.1016/S1361-3111(05)80001-9)
- Jones, A., & Vaughan, D. (2005b). Hydrogel dressings in the management of a variety of wound types: A review. *Journal of Orthopaedic Nursing*, 9, S1–S11. [https://doi.org/10.1016/S1361-3111\(05\)80001-9](https://doi.org/10.1016/S1361-3111(05)80001-9)
- Kalra A, Lowe A, & Am, A.-J. (2016). Mechanical Behaviour of Skin: A Review. *J Material Sci Eng Mechanical Behaviour of Skin: A Review. J Material Sci Eng*, 5(5). <https://doi.org/10.4172/2169-0022.1000254>
- Kamoun, E. A., Kenawy, E.-R. S., Tamer, T. M., El-Meligy, M. A., & Mohy Eldin, M. S. (2015). Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.003>
- Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2000). Mechanical, Bioadhesive Strength and Biological Evaluations of Chitosan films for Wound Dressing. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 3(3), 303–311. Retrieved from [https://sites.ualberta.ca/~csp/JPPS3\(3\)/K.Peh/chitosan.htm](https://sites.ualberta.ca/~csp/JPPS3(3)/K.Peh/chitosan.htm)
- Kim, G., & Kim, W. (2007). Highly porous 3D nanofiber scaffold using an electrospinning technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 81B(1), 104–110. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30642>
- Leung, A., Crombleholme, T. M., & Keswani, S. G. (2012). Fetal wound healing. *Current Opinion in Pediatrics*, 24(3), 371–378. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283535790>
- Liechty, K. W., Kim, H. B., Adzick, N. S., & Crombleholme, T. M. (2000). Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10–deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *Journal of Pediatric Surgery*, 35(6), 866–873. <https://doi.org/10.1053/jpsu.2000.6868>

- Liu, S., Jiang, L., Li, H., Shi, H., Luo, H., Zhang, Y., ... Jin, Y. (2014). Mesenchymal Stem Cells Prevent Hypertrophic Scar Formation via Inflammatory Regulation when Undergoing Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, *134*(10), 2648–2657. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.169>
- Liu, Y.-L., Liu, W.-H., Sun, J., Hou, T.-J., Liu, Y.-M., Liu, H.-R., ... Deng, F.-M. (2014). Mesenchymal stem cell-mediated suppression of hypertrophic scarring is p53 dependent in a rabbit ear model. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(6), 136. <https://doi.org/10.1186/scrt526>
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., ... Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3964–3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
- Luo, Y.-L., Wei, Q.-B., Xu, F., Chen, Y.-S., Fan, L.-H., & Zhang, C.-H. (2009). Assembly, characterization and swelling kinetics of Ag nanoparticles in PDMAAg-PVA hydrogel networks. *Materials Chemistry and Physics*, *118*(2), 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2009.07.063>
- Mahmoudi, M., & Serpooshan, V. (2012). Silver-Coated Engineered Magnetic Nanoparticles Are Promising for the Success in the Fight against Antibacterial Resistance Threat. *ACS Nano*, *6*(3), 2656–2664. <https://doi.org/10.1021/nn300042m>
- Mansbridge, J. N. (2009). Tissue-engineered skin substitutes in regenerative medicine. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(5), 563–567. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.08.008>
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science (New York, N. Y.)*, *276*(5309), 75–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082989>
- Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., & McKercher, S.

- R. (2003). Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Current Biology : CB*, 13(13), 1122–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842011>
- Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A., & Leroux, M. A. (2012). Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(2), 142–9. <https://doi.org/10.5966/sctm.20110018>
- Mirza, R., DiPietro, L. A., & Koh, T. J. (2009). Selective and Specific Macrophage Ablation Is Detrimental to Wound Healing in Mice. *The American Journal of Pathology*, 175(6), 2454–2462. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090248>
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). I NTERLEUKIN -10 AND THE I NTERLEUKIN -10 R ECEPTOR. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 683–765. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683>
- Morgado, P. I., Lisboa, P. F., Ribeiro, M. P., Miguel, S. P., Simões, P. C., Correia, I. J., & Aguiar-Ricardo, A. (2014). Poly(vinyl alcohol)/chitosan asymmetrical membranes: Highly controlled morphology toward the ideal wound dressing. *Journal of Membrane Science*, 469, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.06.035>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Navone, S. E., Pascucci, L., Dossena, M., Ferri, A., Invernici, G., Acerbi, F., ... Parati, E. A. (2014). Decellularized silk fibroin scaffold primed with adipose mesenchymal stromal cells improves wound healing in diabetic mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 7. <https://doi.org/10.1186/scrt396>
- Nyame, T. T., Chiang, H. A., & Orgill, D. P. (2014). Clinical Applications of Skin Substitutes. *Surgical Clinics of North America*, 94(4), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.05.013>

- O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*, *26*(4), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>
- Papini, R. (2004). Management of burn injuries of various depths. *BMJ*, *329*(7458), 158–160. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7458.158>
- Pardue, E. L., Ibrahim, S., & Ramamurthi, A. (2008). Role of hyaluronan in angiogenesis and its utility to angiogenic tissue engineering. *Organogenesis*, *4*(4), 203–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19337400>
- Pawlaczyk, M., Lelonkiewicz, M., & Wieczorowski, M. (2013). Age-dependent biomechanical properties of the skin. *Postepy Dermatologii I Alergologii*, *30*(5), 302–306. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.38359>
- Peck, M. D. (2011). Epidemiology of burns throughout the world. Part I: Distribution and risk factors. *Burns*, *37*(7), 1087–1100. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.06.005>
- Prosdocimi, M., & Bevilacqua, C. (2012). Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Medica*, *54*(2), 129–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22525567>
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., ... Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, *2*(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>
- Salih, E., Reicha, F. M., & El-Sherbiny, I. M. (2016). Electrochemical Synthesis of New Silver-Chitosan/Polyvinyl Alcohol Hybrid Nanoparticles and Evaluation of Their Antibacterial Activities. *Journal of Nanoscience and Technology*, *2*(22), 94–96.
- Sart, S., Tsai, A.-C., Li, Y., & Ma, T. (2014). Three-Dimensional Aggregates of Mesenchymal Stem Cells: Cellular Mechanisms, Biological Properties, and Applications. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *20*(5), 365. <https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2013.0537>

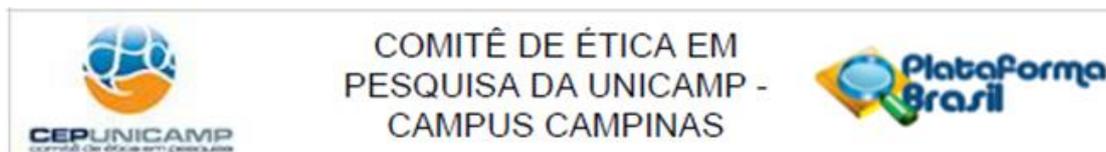
- Seal, B. ., Otero, T. ., & Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34(4), 147–230. [https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(01\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(01)00035-3)
- Shah, M., Foreman, D. M., & Ferguson, M. W. (1995). Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of Cell Science*, 985–1002. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542672>
- Shahzad, S., Yar, M., Siddiqi, S. A., Mahmood, N., Rauf, A., Qureshi, Z.-A., ... Afzaal, S. (2015). Chitosan-based electrospun nanofibrous mats, hydrogels and cast films: novel anti-bacterial wound dressing matrices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(3), 136. <https://doi.org/10.1007/s10856-0155462-y>
- Sindrilaru, A., Peters, T., Wieschalka, S., Baican, C., Baican, A., Peter, H., ... Scharffetter-Kochanek, K. (2011). An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(3), 985–997. <https://doi.org/10.1172/JCI144490>
- Stern, R., McPherson, M., & Longaker, M. T. (1990). Histologic study of artificial skin used in the treatment of full-thickness thermal injury. *The Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 11(1), 7–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2179224>
- Stout, R. D., Watkins, S. K., & Suttles, J. (2009). Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1105–1109. <https://doi.org/10.1189/jlb.0209073>
- van den Broek, L. J., Limandjaja, G. C., Niessen, F. B., & Gibbs, S. (2014). Human hypertrophic and keloid scar models: principles, limitations and future challenges from a tissue engineering perspective. *Experimental Dermatology*, 23(6), 382–386. <https://doi.org/10.1111/exd.12419>
- Verhaegen, P. D. H. M., van Zuijlen, P. P. M., Pennings, N. M., van Marle, J., Niessen, F. B., van der Horst, C. M. A. M., & Middelkoop, E. (2009). Differences

- in collagen architecture between keloid, hypertrophic scar, normotrophic scar, and normal skin: An objective histopathological analysis. *Wound Repair and Regeneration*, 17(5), 649–656. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00533.x>
- Vowden, K. (2014). Wound dressings: principles and practice. *Surgery (Oxford)*, 32(9), 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2014.07.001>
- Witherel, C. E., Graney, P. L., Freytes, D. O., Weingarten, M. S., & Spiller, K. L. (2016). Response of human macrophages to wound matrices *in vitro*. *Wound Repair and Regeneration*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/wrr.12423>
- Wright, K. A., Nadire, K. B., Busto, P., Tubo, R., McPherson, J. M., & Wentworth, B. M. (1998). Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury. *Burns*, 24(1), 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(97\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(97)00075-2)
- Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214(2), 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Wynn, T. A., & Ramalingam, T. R. (2012). Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*, 18(7), 1028–1040. <https://doi.org/10.1038/nm.2807>
- Wynn, T., & Barron, L. (2010a). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(3), 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
- Wynn, T., & Barron, L. (2010b). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease*, 30(3), 245–257. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1255354>
- Xu, F., Lu, T. J., & Seffen, K. A. (2008). Biothermomechanics of skin tissues. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, 56(5), 1852–1884. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2007.11.011>
- Yannas, I. V., & Burke, J. F. (1980). Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of Biomedical Materials Research*, 14(1), 65–81. <https://doi.org/10.1002/jbm.820140108>

- Ylöstalo, J. H., Bartosh, T. J., Coble, K., & Prockop, D. J. (2012). Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an antiinflammatory phenotype. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *30*(10), 2283–96. <https://doi.org/10.1002/stem.1191>
- Zhang, H., Duan, B., Feng, X., Guo, J., Wang, L., Zhao, G., ... Cao, W. J. (2013). Engineering of epidermis skin grafts using electrospun nanofibrous gelatin/polycaprolactone membranes. *International Journal of Nanomedicine*, *8*, 2077. <https://doi.org/10.2147/IJN.S42384>
- Zhang, Z., Wu, Y., Wang, Z., Zou, X., Zhao, Y., & Sun, L. (2016). Fabrication of silver nanoparticles embedded into polyvinyl alcohol (Ag/PVA) composite nanofibrous films through electrospinning for antibacterial and surface-enhanced Raman scattering (SERS) activities. *Materials Science and Engineering: C*, *69*, 462–469. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.015>
- Zigmond, S. H. (1996). Signal transduction and actin filament organization. *Current Opinion in Cell Biology*, *8*(1), 66–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791404>
- Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Pfeifer, M. E., Meyer, E. M., Péault, B., Rubin, J. P., & Donnenberg, A. D. (2009). Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry Part A*, *9999A*(1), NA-NA. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20813>
- Zonari, A., Martins, T. M. M., Paula, A. C. C., Boeloni, J. N., Novikoff, S., Marques, A. P., ... Goes, A. M. (2015). Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. *Acta Biomaterialia*, *17*, 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.043>

9. Anexos

Documento referente a bioética e/ou biossegurança



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Dispositivo híbrido de PVA/Colágeno-Ácido Hialurônico cultivado com células-tronco mesenquimais para regeneração dérmica

Pesquisador: Juliana Almeida Domingues

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 54922116.8.0000.5404

Instituição Proponente: Instituto de Biologia - Unicamp

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.650.961

Apresentação do Projeto:

Atualmente existem vários substitutos dérmicos, porém esses ainda estão associados com uma gama de problemas tais como reduzida vascularização, excessiva formação de fibrose, falta de flexibilidade, incapacidade de manter a hidratação da lesão, dentre outros. Nesse estudo pretende-se desenvolver um equivalente cutâneo que supra algumas das necessidades acima. O dispositivo bilaminar desenvolvido será composto por membrana de poli (álcool vinílico) – PVA, como análogo epidérmico, visando à hidratação da lesão e absorção de exsudato, e como análogo dérmico será utilizado um arcabouço de colágeno/ácido hialurônico, mimetizando a matriz extracelular. O arcabouço de colágeno/HA será cultivado com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (ASCs). As ASCs serão utilizadas devido seu potencial anti-fibrótico e angiogênico. Acredita-se que esse potencial anti-fibrótico seja devido à capacidade imunomodulatória das ASCs, uma vez que a formação de fibrose está relacionada com processos inflamatório persistente no local da lesão. Uma das principais células do sistema imune envolvidas no processo de cicatrização de feridas é o macrófago. Vários trabalhos têm demonstrado a polarização dos macrófagos induzidos pelas ASCs para um fenótipo antiinflamatório. Portanto nesse estudo além do desenvolvimento do dispositivo bilaminar e suas caracterizações, será também analisado a manutenção do potencial imunomodulatório das ASCs sobre os macrófagos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.650.961

após cultivo no arcabouço de colágeno/HA. Para que possamos relacionar a capacidade imunomodulatória das ASCs com seu potencial anti-fibrótico será realizado o cultivo dessas células e de macrófagos no arcabouço de colágeno/HA e co-cultivadas com fibroblastos em sistema Transwell®. Essa co-cultura com fibroblastos irá permitir analisar os efeitos parácrinos da imunomodulação das ASCs.

Objetivo da Pesquisa:

Obter o arcabouço de colágeno/ácido hialurônico e membrana de PVA. Caracterizar os materiais. Isolar, cultivar e caracterizar as ASCs e os macrófagos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos: Não há riscos previsíveis da obtenção e uso das células-tronco do tecido adiposo. O único desconforto, previsto, será a punção venosa, que pode acarretar em hematoma local, tontura, queda da pressão arterial e infecção.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos a participante, mas benefícios a nível de conhecimento científico que poderá futuramente ser utilizado em indivíduos com queimaduras de terceiro grau.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa que realizará cultivo celular a partir de dois tipos de tecidos diferentes, sangue venoso e tecido adiposo. Ambos serão provenientes de voluntários, sendo o segundo tecido obtido de descarte de cirurgias de lipoaspiração. Para cada grupo estão previstos 5 voluntários. Este estudo será desenvolvido como projeto de doutorado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram anexados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As correções das pendências anteriores foram atendidas e a realização do projeto foi aprovada pelo CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 1.650.951

aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	19/07/2016		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

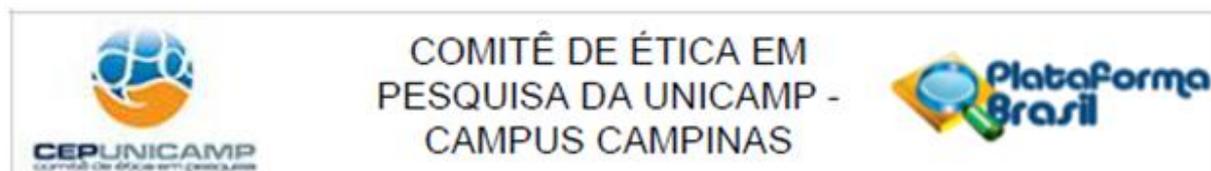
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 1.650.961

Básicas do Projeto	ETO_676392.pdf	10:51:06		Aceito
Outros	Biorrepositorio.pdf	19/07/2016 10:46:46	Juliana Almeida Domingues	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	19/07/2016 10:41:12	Juliana Almeida Domingues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.pdf	01/07/2016 14:23:31	Juliana Almeida Domingues	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	01/07/2016 14:23:14	Juliana Almeida Domingues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto1.pdf	23/05/2016 16:14:38	Juliana Almeida Domingues	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	04/04/2016 12:24:24	Juliana Almeida Domingues	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	15/03/2016 10:19:26	Juliana Almeida Domingues	Aceito
Outros	Cartadeautorizacao.pdf	15/03/2016 10:15:53	Juliana Almeida Domingues	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 27 de Julho de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Declaração referente a direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Dispositivo híbrido de PVA/colágeno-ácido hialurônico cultivado com células-tronco mesenquimais para regeneração dérmica**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de julho de 2018

Assinatura :

Nome do(a) autor(a): **Juliana Almeida Domingues**

RG n.º 34.073.428-0

Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): **José Angelo Camilli**

RG n.º 10.482.118-8