

UNIVERSIDADE POSITIVO
LUANA GARCIA

**ESTUDO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS EM MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA E
DE POLIPROPILENO**

CURITIBA
2025

LUANA GARCIA

**ESTUDO DA ADESÃO, PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS EM MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA E
DE POLIPROPILENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado Profissional em Biotecnologia Industrial como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia Industrial em Saúde.

Orientador(a): Prof. Dr. João César Zielak.

CURITIBA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central – Universidade Positivo

G216 Garcia, Luana.

Estudo de adesão, proliferação e viabilidade de células-tronco mesenquimais em membranas de celulose bacteriana e de polipropileno / Luana Garcia. — Curitiba : Universidade Positivo, 2025.

110 f. ; il. col.

Dissertação (Mestrado) – Biotecnologia Industrial – Universidade Positivo, 2025.

Orientador(a): Prof. Dr. João César Zielak.

1. Biotecnologia industrial. 2. Arcabouço. 3. Célula-tronco mesenquimal. 4. Medicina regenerativa. I. Zielak, João César. II. Título.

CDU 663.1:576.3

RESUMO

Na medicina regenerativa há uma demanda crescente por abordagens inovadoras que aprimorem o tratamento de feridas cutâneas de difícil cicatrização. Nesse contexto, este estudo investiga o uso de células-tronco mesenquimais derivadas da Geleia de Wharton (CTM-GW), devido às suas notáveis propriedades imunomoduladoras e de diferenciação, em associação com arcabouços, a fim de investigar, em um estudo pré-clínico, as características básicas de um material de partida para registro de um futuro produto de terapia avançada. A pesquisa incluiu uma revisão integrativa da literatura, bem como uma análise experimental da adesão, viabilidade e citotoxicidade das CTM-GW cultivadas em dois arcabouços distintos: celulose bacteriana (Membracel[®]) e polipropileno (*BoneHeal*[®]). No artigo de revisão, foram identificados 24 artigos relevantes sobre o tema, dos quais sete foram selecionados para análises mais aprofundadas. No âmbito experimental, as CTM-GW foram isoladas e cultivadas em contato com os arcabouços, sendo avaliadas em diferentes densidades por meio de ensaios de adesão (Cristal Violeta) e de viabilidade/citotoxicidade (*Alamar Blue*[®]). Os resultados evidenciaram que ambos os arcabouços, Membracel[®] (MCB) e *BoneHeal*[®] (MP), permitiram adesão e proliferação celular, com desempenhos influenciados pela densidade. A MCB apresentou maior cobertura em alta densidade, enquanto a MP favoreceu o espalhamento em baixa densidade. Quanto à viabilidade/proliferação, ambas foram semelhantes ao controle, confirmando ausência de citotoxicidade. Na MCB, observou-se discreta redução na atividade metabólica, possivelmente por saturação do espaço e acúmulo de resíduos; na MP, o crescimento celular foi mais expressivo na densidade menor, sugerindo microambiente potencialmente mais favorável. Com base na literatura revisada e nos resultados obtidos no presente estudo, a associação entre CTM-GW e arcabouços pode vir impactar positivamente o manejo de feridas cutâneas, com potencial para reduzir a sensibilidade à dor e as limitações funcionais, e, assim, contribuir para a melhora da qualidade de vida dos pacientes. Além disso, essa abordagem pode levar à diminuição dos custos operacionais, beneficiando os sistemas de saúde. Contudo, é necessário reconhecer que os resultados podem variar de acordo com as condições do cultivo celular e da variabilidade nas propriedades dos arcabouços. Dessa forma, torna-se fundamental a realização de novos estudos que contemplem esses fatores e avaliem diferentes combinações, a fim de garantir a segurança e a eficácia dessa metodologia no contexto da terapia celular avançada.

Palavras-chaves: Arcabouço; Célula-Tronco Mesenquimal; Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

In regenerative medicine, there is a growing demand for innovative approaches to improve the treatment of difficult-to-heal cutaneous wounds. In this context, the present study investigates the use of mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (WJ-MSC), due to their remarkable immunomodulatory and differentiation properties, in combination with scaffolds, aiming to explore, in a preclinical study, the fundamental characteristics of a starting material for the future registration of an advanced therapy medicinal product. The research included an integrative literature review as well as an experimental analysis of adhesion, viability, and cytotoxicity of WJ-MSC cultured on two distinct scaffolds: bacterial cellulose (Membracel[®]) and polypropylene (BoneHeal[®]). In the review, 24 relevant articles were initially identified, of which seven were selected for further analysis. Experimentally, WJ-MSC were isolated and cultured in contact with the scaffolds and evaluated at different densities through adhesion assays (Crystal Violet) and viability/cytotoxicity assays (Alamar Blue[®]). Results demonstrated that both scaffolds, Membracel[®] (MCB) and BoneHeal[®] (MP), supported cell adhesion and proliferation, with performance influenced by cell density. MCB exhibited greater coverage at high density, whereas MP favored cell spreading at low density. Regarding viability and proliferation, both scaffolds showed results similar to the control, confirming the absence of cytotoxicity. In MCB, a slight reduction in metabolic activity was observed, possibly due to space saturation and waste accumulation; in MP, cell growth was more pronounced at lower density, suggesting a potentially more favorable microenvironment. Based on the reviewed literature and the findings of this study, the combination of WJ-MSC and scaffolds may positively impact the management of cutaneous wounds, with potential to reduce pain sensitivity and functional limitations, thereby contributing to improved patient quality of life. Moreover, this approach may reduce operational costs, benefiting healthcare systems. However, it is important to acknowledge that outcomes may vary depending on cell culture conditions and scaffold property variability. Therefore, further studies are essential to address these factors and evaluate different combinations, ensuring the safety and efficacy of this methodology in the context of advanced cell therapy.

Palavras-chaves: Scaffold; Mesenchymal Stem Cell; Regenerative Medicine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma da Sistematização e Critérios de Busca, Adaptado de Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Metaanálises (PRISMA)	33
--	----

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma Cronológico do Experimento Prático	51
Figura 2. Expressão dos Marcadores Avaliados na Caracterização das CTM-GW.....	60
Figura 3. Evidência da Diferenciação Adipogênica, Condrogênica e Osteogênica de CTM-GW, em 10×.	62
Figura 4. Imagens representativas de CTM-GW nas densidades de 7×10^3 (A, D e G), 1×10^4 (B, E e H) e 5×10^4 (C, F e I) células/poço, correspondentes aos grupos Controle (A – C), MCB (D – F) e MP (G – I), obtidas a 40× de aumento.....	64
Figura 5. Proliferação Celular de CTM-GW nas densidades de 7×10^3 (A, D), 1×10^4 (B, E) e 5×10^4 (C, F) células/poço, em contato com MCB (A – C) e MP (D – F).....	66
Figura 6. Proliferação Celular de CTM-GW em 1×10^4 células/poço na placa de MCB (A) e MP (B).	68
Figura 7. Estrutura das CTM-GW em Ausência de MCB e MP.....	69
Figura 8. Evidências da Interação entre CTM-GW e MCB por MEV.....	71
Figura 9. Evidências da Interação entre CTM-GW e MP por MEV.....	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Caracterização e Síntese dos Artigos Seleccionados	34
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE – Código de Aprovação de Projeto de Pesquisa
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
COL-1 – Colágeno Tipo I
CPC – Centro de Processamento Celular
CT – Células-Tronco
CTA – Células-Tronco Adultas
CTE – Células-Tronco Embrionárias
CTH – Células-Tronco Hematopoéticas
CTM – Células-Tronco Mesenquimais
CTM-GW – Células-Tronco Mesenquimais da Geleia de Wharton
CTM-TA – Células-Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo
CTM-MO – Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea
CV – Cristal Violeta
DC – Células Dendríticas
DeCS – Descritores em Ciência e Saúde
DMEM – Meio de *Eagle* Modificado por *Dulbecco*
DMSO – Dimetilsulfóxido
EGF – Fator de Crescimento Epidérmico
FGF – Fator de Crescimento derivado de Fibroblasto
FSC – *Forward Scatter*
G-CSF – Fator de Crescimento derivado de Colônias de Granulócitos
GM-CSF – Fator de Crescimento derivado de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HCL – Ácido Clorídrico
HDF – Fibroblastos Dérmicos Humano
HGF – Fator de Crescimento Hepatocitário
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
IGF-1 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1
IL-1 – Interleucina 1
IL-6 – Interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
iPSC – Células-Tronco Pluripotentes Induzidas

ISO – Organização Internacional para Padronização
KGF-1 – Fator de Crescimento derivado de Queratinócitos
LTDA – Limitada
MA – Membrana Amniótica
MCB – Membrana de Celulose Bacteriana
MCP-1 – Proteína Quimiotática de Monócito-1
MCS – Meio de Cultivo Suplementado
MD – Meio de Diferenciação
MEC – Matriz Extracelular
MeSH – *Medical Subject Headings*
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP-1 – Proteína Inflamatória de Macrófago-1
MP – Membrana de Polipropileno
MSC – Células-Tronco Multipotentes
MT – Meio de Transporte
MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Di-Fenil Brometo de Tetrazolina
NGF – Fator de Crescimento Nervoso
NK – *Natural Killer*
PBOCI – Revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada
PBS – Salina Tamponada com Fosfato Livre de Cálcio e Magnésio
PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGE2 – Prostaglandina E2
PICO – População, Intervenção, Comparação e Desfecho
PR – Paraná
PRF – Plasma Rico em Fibrina
PSCs – Células-Tronco Pluripotentes
RANTES – Regulado na Ativação, Células T Normais Expressas e Secretadas
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RPM – Rotações por Minuto
SDF-1 – Fator Derivado do Estroma-1
SFB – Soro Fetal Bovino
SITC – Sociedade Internacional de Terapia Celular
SSC – *Side Scatter*

T25 – Garrafa de Cultivo de 25cm²

T75 – Garrafa de Cultivo de 75cm²

TA – Temperatura Ambiente

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- α – Fator de Crescimento Transformador *Alpha*

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador *Beta*

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alpha

TSCs – Células-Tronco Totipotentes

UFPR – Universidade Federal do Paraná

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

ZIF-8 – *Framework* de Imidazolate Zeolítico 8

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
	2.1 CÉLULAS-TRONCO	15
	2.2 UTILIZAÇÃO DE CT NA TERAPIA CELULAR	17
	2.3 CORDÃO UMBILICAL COMO FONTE DE CTM	17
	2.3.1 Células-Tronco Mesenquimais da Geleia de Wharton (CTM-GW).....	18
	2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CTM.....	19
	2.5 ENGENHARIA TECIDUAL.....	20
	2.6 CTM NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E REPARO DE TECIDOS MOLES	21
	2.6.1 Caracterização de Feridas.....	21
	2.6.2 Mecanismo de Reparo Tecidual	21
	2.6.3 Feridas Associadas à CTM.....	23
	2.7 ARCABOUÇOS.....	24
	2.7.1 Membrana de Celulose Bacteriana.....	24
	2.7.2 Membrana de Polipropileno	25
3	CAPÍTULO 1	27
	3.1 Introdução	28
	3.2 Materiais e Métodos	31
	3.2.1 Tipo de Estudo	31
	3.2.2 Estratégia de Busca	31
	3.2.3 Critérios de Inclusão.....	32
	3.2.4 Critérios de Exclusão	32
	3.3 Resultados	32
	3.3.1 Análise e Tratamento dos Dados.....	32
	3.3.2 Caracterização dos Artigos.....	34
	3.3.3 CTM e a Cicatrização de Feridas Cutâneas.....	35
	3.3.4 Caracterização dos Biomateriais	35
	3.3.5 Fontes Originárias de CTM.....	36
	3.3.6 Testes de Caracterização e Diferenciação <i>In Vitro</i>	37
	3.3.7 Preparo do Curativo Bioativo para Feridas	37
	3.3.8 Avaliação <i>In Vivo</i> em Modelo de Defeito Cutâneo.....	38
	3.4 Discussão.....	39
	3.5 Conclusão.....	43
	3.6 Referências	43
4	CAPÍTULO 2	48
	4.1 INTRODUÇÃO	48
	4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	50

4.2.1 Desenho do Estudo.....	51
4.2.2 Obtenção e Caracterização das Células.....	51
4.2.3 Diferenciações Celulares.....	55
4.2.4 Ensaio de Adesão Celular (Cristal Violeta)	57
4.2.5 Ensaio de Proliferação, Viabilidade e Citotoxicidade (<i>Alamar Blue</i> [®]).....	58
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	59
4.3 RESULTADOS.....	60
4.3.1 Caracterização das CTM	60
4.3.2 Diferenciação Celular: Adipócitos, Condrócitos e Osteoblastos.....	61
4.3.3 Avaliação da Adesão Celular (Cristal Violeta)	63
4.3.4 Ensaio de Proliferação, Viabilidade e Citotoxicidade (<i>Alamar Blue</i> [®]).....	65
4.3.4.1 Definição Populacional	65
4.3.4.2 Variabilidade Amostral	67
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	69
4.4 DISCUSSÃO.....	73
4.5 CONCLUSÃO	79
4.6 REFERÊNCIAS	80
5 CONCLUSÃO GERAL	86
6 REFERÊNCIAS GERAIS.....	86
APÊNDICES.....	94
APÊNDICE A – Obtenção dos Arcabouços	94
APÊNDICE B – Etapas da Técnica de Explante	94
APÊNDICE C – Manipulação do Cordão Umbilical	95
APÊNDICE D – Etapas da Passagem Celular	95
APÊNDICE E – Contagem Celular	96
APÊNDICE F – Caracterização Mesenquimal	97
APÊNDICE G – Plaqueamento com Cristal Violeta	98
APÊNDICE H – Demonstração da Redução de Resazurina em Resorufina.....	99
APÊNDICE I – Plaqueamento com <i>Alamar Blue</i> [®]	100
ANEXOS.....	102
1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	102
2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	106

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os ensaios clínicos com células-tronco mesenquimais (CTM) avançaram consideravelmente em um curto período de tempo. Inicialmente, o potencial de proliferação e diferenciação dessas células era explorado como uma alternativa para o reparo de regiões teciduais lesionadas, com aplicações diretas no tecido-alvo. No entanto, complicações em relação à migração e ao enxerto celular eram comuns. Com a intenção de contornar esses desafios, as pesquisas passaram a investir no desenvolvimento dos chamados arcabouços (MARTINO, 2012; WONG, 2023).

Os arcabouços foram projetados para imitar ou substituir materiais biológicos e estimular o potencial de reparo do organismo. Eles surgem como uma possibilidade promissora para aprimorar tanto a entrega celular quanto a sobrevivência e o desempenho das células e tecidos transplantados após o procedimento. Sua aplicação em conjunto às CTM torna-se viável, pois os arcabouços funcionam como microambientes que mimetizam nichos fisiológicos. Assim, as CTM, ao interpretar os sinais bioquímicos do ambiente, utilizam esses materiais e respondem de acordo com sua estrutura e composição, o que influencia diretamente seu comportamento e destino celular. A atual abordagem abre espaço para transplantes celulares mais eficazes, com potencial para melhorar os resultados terapêuticos (MARTINO, 2012; KANG, 2020; DU; KATTI; THOMAS, 2022; WONG, 2023).

Neste contexto, o primeiro capítulo desta dissertação compõe um artigo de revisão integrativa, desenvolvido a partir do modelo de submissão da revista “*Evidência: Biociências, Saúde e Inovação*” (ISSN: 1519-5287 | e-ISSN: 2236-6059), classificada como Qualis B1 na área de Biotecnologia. O artigo aborda os desafios associados à cicatrização de feridas, decorrentes de complicações como inflamações, infecções e até mesmo traumas físicos do próprio curativo. Propõe-se, dessa forma, o uso promissor da engenharia tecidual para o desenvolvimento de tecidos funcionais em laboratório, por meio da combinação entre o potencial terapêutico de arcabouços e as CTM, com o objetivo de reparar ou substituir os tecidos danificados. A integração dessas tecnologias é discutida com base nas contribuições dos autores selecionados, cujas perspectivas em relação à biocompatibilidade e à capacidade de suporte de crescimento celular são analisadas, destacando os avanços promissores de regeneração tecidual em modelos experimentais. Tais pesquisas abrem caminho para futuros projetos e terapias inovadoras na medicina regenerativa.

O segundo capítulo foi elaborado com base nas normas da ABNT NBR 14724:2011, que estabelece os princípios gerais para a elaboração de trabalhos acadêmicos, com o propósito

de relatar a realização de experimentos práticos e suas respectivas análises. Este estudo emprega o uso de arcabouços comerciais conhecidos como Membracel[®] e BoneHeal[®], constituídos, respectivamente, de membrana de celulose bacteriana (MCB) e membrana de polipropileno (MP), com o objetivo de realizar uma investigação pré-clínica quanto ao potencial desses materiais como suportes celulares quando associados às propriedades terapêuticas das CTM, considerando uma perspectiva futura de uso na cicatrização de lesões crônicas. A pesquisa será centrada no isolamento e caracterização dessas células e na realização de testes *in vitro* para avaliação de aderência, proliferação, viabilidade, citotoxicidade e morfologia da integração, a partir da interação entre os componentes envolvidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) são caracterizadas por serem células não especializadas, sem comprometimento morfológico e funcional com qualquer tipo celular, e por apresentarem capacidade de autorrenovação. Estão presentes nas fases embrionária, fetal e adulta da vida. Além disso, apresentam extenso potencial de diferenciação, o que lhes permitem contribuir com os mais variados tecidos e órgãos. Com base em sua fonte de origem, as CT são classificadas em dois grupos: as embrionárias (CTE) e as adultas (CTA), sendo que a principal diferença entre elas é o grau de especialização celular (KOLIOS, 2012; ZAKRZEWSKI, 2019).

As CTE são procedentes da massa celular interna do blastocisto embrionário e podem se proliferar indefinidamente, preservando sua capacidade de diferenciação em qualquer célula dos três folhetos germinativos. Nessa categoria, incluem-se as células-tronco totipotentes (TSCs) e as pluripotentes (PSCs). Por outro lado, as CTA são encontradas em nichos nos mais diversos tecidos do corpo humano, como o cordão umbilical e medula-óssea, e possuem sua capacidade de diferenciação mais restrita (CARVALHO, 2014; ZAKRZEWSKI, 2019).

Tais nichos são microambientes especializados que fornecem sustentação e manutenção celular adequada às CT de forma a mantê-las em estado de baixa proliferação e com capacidade de autorrenovação ao longo da vida. O controle da modulação comportamental dessas células é essencial para a regulação homeostática tecidual e para os processos de organogênese. Como o destino da célula é influenciado pelo meio em que ela se encontra, a presença de novos estímulos, como a movimentação para outros nichos, irá influenciar prontamente a atividade intrínseca e extrínseca dessas células. Isto posto, de acordo com sua localização, as CT são capazes de originar os mais diferentes tipos de tecidos (BIRBRAIR, 2017; HICKS; PYLE, 2023; PLAKS; KONG; WERB, 2023).

As CT também são categorizadas de acordo com seu potencial de diferenciação. As TSCs compõem a classe com maior capacidade diferenciadora, sendo capazes de originar tanto o embrião quanto os anexos embrionários, formando, assim, todo o organismo. Um exemplo é o zigoto, cuja totipotência permanece até a formação do blastocisto. A potencialidade de especialização é minimizada a cada etapa de diferenciação celular, o que significa que as PSCs podem originar as três camadas germinativas do embrião, mas não conseguem formar estruturas extraembrionárias, como a placenta. Em seguida, há as células-tronco multipotentes (MSC), que se diferenciam em células de uma única camada germinativa; as oligopotentes, que se

especializam em poucos tipos celulares de um tecido específico; e as unipotentes, caracterizadas por apresentarem propriedades constantes de divisão, porém com especialização limitada a um único tipo de célula específico (KOLIOS, 2012; ZAKRZEWSKI, 2019).

As PSCs são o foco principal de pesquisa na biologia celular e na medicina regenerativa, especialmente em relação ao seu potencial de multiplicação indefinida no estado indiferenciado e à capacidade de diferenciação celular em qualquer tecido somático. Atualmente, a intenção dos estudos é viabilizar o uso das PSCs em terapias celulares e regenerativas, de forma a substituir a estrutura tecidual ou órgãos danificados por defeitos congênitos, doenças ou traumas (BIRESSI; FILARETO; RANDO, 2020; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

O desenvolvimento da maioria das CTE ocorre por meio de óvulos fertilizados *in vitro* e, por esse motivo, gera grande controvérsia ética e legal, juntamente com muitos questionamentos sobre como deve ser o uso responsável e seguro dessas células, uma vez que se é comprovado o potencial teratogênico após transplante *in vivo* (LEZMI; BENVENISTY, 2022; ZAKRZEWSKI, 2019).

Diante disso, o emprego de MSC humanas derivadas de tecidos já diferenciados é eticamente mais aceitável quando comparado às PSCs, por apresentar menores dilemas éticos, morais e de segurança. E, apesar dessas células não se diferenciarem em todos os tipos celulares do organismo, ainda são uma alternativa atraente para utilização clínica, devido às suas características de plasticidade e multipotencialidade. Contudo, para o transplante alogênico, ainda se faz necessário garantir que o procedimento respeitará as normas de biossegurança, de modo a não provocar a contaminação por patologias infecciosas e ser a fonte geradora de desenvolvimento de cânceres (ARRUDA, 2018; BROWN, 2019; OKAMOTO, 2005).

Dentre os diferentes tipos de CTA, as células-tronco mesenquimais (CTM) são as mais reconhecidas. Sua existência foi descrita pela primeira vez em 1970, durante o cultivo de células-tronco hematopoéticas (CTH), quando pesquisadores russos observaram a presença de células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície (MONTEIRO; NETO e CARLO, 2009; FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), reconhece-se que uma população de células será considerada CTM quando possuir aderência ao plástico, for caracterizada por marcadores de superfície específicos e apresentar, após estímulo *in vitro*, capacidade de diferenciação nas três linhagens derivadas da mesoderme embrionária, sendo elas: adipogênica, condrogênica e osteogênica (ARRUDA, 2018; KOLIOS, 2013).

2.2 UTILIZAÇÃO DE CT NA TERAPIA CELULAR

A terapia celular é uma abordagem transformadora de tratamento que utiliza as CT devido às suas propriedades únicas de autorrenovação e especialização em regenerar células e tecidos danificados, sendo viável, ao se implantar células exógenas em um paciente, substituí-las por células e tecidos novos, saudáveis e funcionais. Para esta terapia, as células podem ser obtidas de fontes autólogas, como autotransplante onde o paciente utiliza as próprias células, ou de fontes alogênicas, em que as células partem de um doador saudável (HOANG et al., 2022; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001).

Devido à limitação de obtenção das células autólogas, a melhor opção na engenharia tecidual está sendo a utilização de células-tronco do tipo alogênico. Existe a preocupação de que as células alogênicas possam desencadear rejeição imunológica; contudo, as células originárias de cordão umbilical apresentam reduzida imunogenicidade quando comparadas às CTA e manifestam maior potencial de diferenciação tecidual, em razão de sua multipotência, havendo indícios de que, sob condições específicas *in vitro*, possam ser induzidas a originar células representativas da camada germinativa mesodérmica (LIU et al., 2014; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; TAGHIZADEH et al., 2011).

A vantagem relacionada ao uso de CTM é a obtenção dos tecidos perinatais, que seriam descartados após o nascimento como resíduos biológicos, proporcionando pouco risco para a mãe ou recém-nascido. Entre as fontes de CT perinatais, as células-tronco da Geleia de Wharton (CTM-GW), provindas do cordão umbilical, são a fonte mais propensa e atrativa a tornarem-se úteis no tratamento de doenças clínicas por meio da terapia celular, em consideração à sua facilidade de obtenção e isolamento (ARRUDA, 2018; TAGHIZADEH et al., 2011).

2.3 CORDÃO UMBILICAL COMO FONTE DE CTM

Exclusivamente presente nos mamíferos, o cordão umbilical é um anexo placentário responsável por ligar o embrião à placenta e, entre outras funções, pela respiração e nutrição do feto. É formado por uma veia e duas artérias, envoltas por um tecido gelatinoso denominado Geleia de Wharton (ARRUDA, 2018).

As CT originárias de cordão umbilical podem ser isoladas tanto do sangue quanto do tecido que as envolve. A partir do sangue, é possível isolar as CT hematopoéticas (CTH), as quais oferecem benefícios sobre a medula óssea por serem usadas de forma alógena e não requererem um encaixe perfeito de antígeno leucocitário humano (HLA), desencadeando menor

incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro. No entanto, possuem aplicabilidade clínica restrita, pois diferenciam-se somente em células da linhagem sanguínea e não são obtidas eficientemente por multiplicação em laboratório. Neste caso, a obtenção das CTM oriundas do tecido do cordão umbilical apresenta-se a opção mais apropriada para o uso em terapias regenerativas devido às suas propriedades de diferenciação e multiplicação *in vitro* (MUSHAHARY et al., 2018; ROSSI et al., 2011; WEISS; TROYER, 2006).

2.3.1 Células-Tronco Mesenquimais da Geleia de Wharton (CTM-GW)

Além de maior disponibilidade de obtenção, comparadas às CTH perinatais, as CTM-GW apresentam capacidade elevada de diferenciação em diferentes tipos de células e tecidos, assim como propriedades imunomoduladoras que diminuem o risco de rejeição em transplantes e terapias celulares alogênicas. E, ao considerar a técnica de aspiração da medula óssea, asseguram menor risco de contaminação por infecções, uma vez que são coletadas a partir de tecidos que são descartados no momento após o nascimento (HENDIJANI, 2017; MUSHAHARY et al., 2018; WEISS; TROYER, 2006).

A Geleia de Wharton é um tecido conjuntivo mucoso entre o epitélio amniótico e os vasos umbilicais, composto por miofibroblastos, proteoglicanas, várias isoformas de colágeno e células do estroma. A população de CTM-GW está próxima da vasculatura do cordão, mas há apenas uma pequena porção dessas células em cada amostra, sendo necessário isolá-las e multiplicá-las *in vitro* para se ter um alto rendimento celular. A função dessa estrutura é impedir a compressão, torção e flexão dos vasos sanguíneos, possibilitando o fluxo bidirecional de oxigênio, glicose e aminoácidos para o feto em desenvolvimento e, ao mesmo tempo, a remoção do dióxido de carbono e outros resíduos (ARRUDA, 2018; TAGHIZADEH et al., 2011).

Das MSC disponíveis, a CTM-GW são descritas como a melhor fonte de células para o uso clínico, uma vez que incluem obtenção descomplicada e não invasiva, elevado potencial de proliferação e diferenciação, como também portam menores problemas éticos, já que se trata de células com capacidade reduzida de teratogenicidade em caso de transplantes. E, quando isoladas de células doadoras novas, mais lentamente envelhecem e maior é sua taxa de proliferação (SALEH; KIAEI; KAVIANPOUR, 2022; RANJBARAN et al., 2018).

Por meio do contato célula-célula, as CTM-GW são capazes de suprir e modular efeitos imunomodulatórios, através da inibição da proliferação de células T, maturação de células dendríticas (DC), ativação citotóxica de células *natural killer* (NK) em repouso e de células B. E, quando inseridas no hospedeiro, tendem a acelerar a reparação do tecido ao se acumularem

em regiões danificadas ou áreas inflamadas e secretarem fatores de regulação da sobrevivência e função celular (SALEH; KIAEI; KAVIANPOUR, 2022; RANJBARAN et al., 2018).

Essas células também fazem a secreção de fatores solúveis. Dentre os fatores de crescimento e citocinas, há o fator derivado do estroma-1 (SDF-1), o fator de crescimento epitelial (EGF) e endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator de crescimento hepatocitário (HGF), o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), o fator de crescimento nervoso (NGF), as interleucinas (IL-12, IL-15, IL-6, IL-8, IL-2), RANTES, MCP-1, MIP-1 e PGE2. Juntamente, esses elementos desempenham papéis relevantes no microambiente celular, de forma a promover a manutenção e proliferação celular (SALEH; KIAEI; KAVIANPOUR, 2022; RANJBARAN et al., 2018).

Por isso, as CTM-GW têm aplicação significativa nas mais variadas doenças e tornam-se candidatas adequadas para terapia celular em transplantes alogênicos (SALEH; KIAEI; KAVIANPOUR, 2022; RANJBARAN et al., 2018).

2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CTM

As células apresentam, em sua superfície, receptores e moléculas responsáveis por permitir a interação entre elas e, em razão dessa comunicação, são capazes de executar funções distintas no organismo. Tais estruturas são reconhecidas como marcadores de superfície e, por meio destes, torna-se possível a identificação dos distintos tipos celulares. Essa caracterização pode ser realizada por diferentes técnicas; porém, a mais comumente utilizada é a citometria de fluxo. Em um curto período de tempo, a técnica oferece precisão nos resultados em uma ampla análise de células sinalizadas com anticorpos monoclonais conjugados e marcadores fluorescentes (DELMONTE; FLEISHER, 2019; PEREIRA, 2008).

De acordo com as diretrizes estabelecidas pela SITC, as CTM humanas são caracterizadas por alguns critérios específicos. Elas devem apresentar expressão positiva para marcadores moleculares típicos de células mesenquimais (CD73, CD81, CD90 e CD105) e negativa para marcadores hematopoéticos (CD34, CD45, CD14/CD11b e CD79a/CD19). Além disso, devem apresentarem negatividade para os antígenos de histocompatibilidade HLA-DR e, quando induzidas à especialização, devem demonstrar a capacidade de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos, de forma a confirmar a multipotência (DOMINICI et al., 2006; VISWANATHAN et al., 2019).

A variação na expressão dos marcadores pode ocorrer devido ao uso de protocolos distintos para o isolamento celular e caracterização do cultivo, assim como à variação no tipo

de tecido de onde são obtidas as células, à idade e ao sexo do paciente (DEUS et al., 2012; DOMINICI et al., 2006).

2.5 ENGENHARIA TECIDUAL

Na medicina regenerativa, a engenharia tecidual atua na elaboração de suportes para o crescimento celular, conhecidos como arcabouços (*scaffolds*), e faz parte da função deste fornecer um microambiente biocompatível remetente à matriz extracelular (MEC) do hospedeiro, o qual permita o estímulo ao crescimento, migração, interação e à diferenciação celular por meio de apropriados fatores e sinalizações bioquímicas. Esse suporte consistirá de uma estrutura tridimensional com adequadas propriedades mecânicas e de transporte, almejando ser uma abordagem substituta a enxertos cutâneos (BAUDEQUIN; TRABIZIAN, 2018; NESI; OLIVEIRA; MOLINA, 2013).

As CTM, por sua capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora, são fundamentais no processo de cicatrização e regeneração localizada ou sistêmica. Inclusive, são amplamente indicadas para a terapia alogênica, pois seus riscos de rejeição são significativamente reduzidos, uma vez que são células não apresentadoras de antígenos em sua superfície (BAUDEQUIN; TRABIZIAN, 2018; MURPHY, 2018; NESI; OLIVEIRA; MOLINA, 2013).

Essas células também são muito eficientes como matrizes, em facilitar a aceleração na contração da ferida e formação de tecido cicatricial, com fechamento acentuado da lesão e consequente regeneração do tecido epidérmico e seus anexos (CHAUDHARI et al., 2016; KLAR; ZIMOCH; BIEDERMANN, 2017). Em razão dos seus efeitos terapêuticos promissores, as CTM-GW são uma ótima opção para aplicação no tratamento de feridas, voltadas à melhoria da qualidade de cicatrização em grandes defeitos de pele, como queimaduras e traumas, os quais ainda são desafios clínicos para pacientes e médicos (DEHKORDI et al., 2019; KLAR; ZIMOCH e BIEDERMANN, 2017).

Nesse contexto, a aplicação de CTM-GW combinada a arcabouços visa potencializar os efeitos regenerativos, unindo a capacidade de diferenciação e modulação celular das CTM ao suporte físico e estrutural fornecido pelo arcabouço. Espera-se, com essa abordagem, abrir novas perspectivas de tratamento, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e impulsionando progresso em relação à implementação de novos modelos de suportes que foquem para o crescimento celular de CTM neles inoculados.

2.6 CTM NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS E REPARO DE TECIDOS MOLES

2.6.1 Caracterização de Feridas

Qualquer lesão mecânica que comprometa a integridade física ou metabólica do indivíduo será considerada uma ferida. As lesões podem ser clinicamente separadas entre agudas e crônicas. Os ferimentos com fechamento espontâneo, com progressão ordenada e oportuna que cessa entre quatro e seis semanas, são denominados como agudos e, geralmente, ocorrem por mecanismos ou exposições ambientais. Já os ferimentos crônicos são aqueles onde a cicatrização é retardada pra mais de doze semanas em decorrência de situações como inflamação patológica prolongada e infecções. Em resposta ao processo da ferida, é indispensável que haja restauração da célula ou do tecido danificado por meio de uma breve e adequada regeneração e cicatrização (CHAUDHARI et al., 2016; DEHKORDI et al., 2019).

2.6.2 Mecanismo de Reparo Tecidual

O processo de cicatrização de feridas na pele envolve mecanismos celulares, humorais e moleculares logo no primeiro trauma, podendo durar longos períodos. Comumente, as lesões se restabelecem por meio de uma simples contração e crescimento celular na região afetada. Porém, em casos de lesões extensas, leva-se muito mais tempo para atingir a cura e há maior propensão a riscos de inflamação, infecção e marcas permanentes (CHAUDHARI et al., 2016; REINKE; SORG, 2012).

Após uma lesão, ocorre o primeiro passo de reparação tecidual, que envolve a hemostasia e a formação de novas células por meio da secreção de uma MEC provisória pelas células dos fibroblastos. Em seguida, ocorre a formação de queratinócitos em camadas e sua proliferação até a diferenciação, criando as camadas lúcida e córnea, as mais externas da epiderme. Simultaneamente, há o início do processo inflamatório da cascata de cicatrização, que é dividido no recrutamento de neutrófilos e no surgimento e transformação de monócitos numa fase tardia (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; REINKE; SORG, 2012).

Nos primeiros dias após a lesão, os neutrófilos serão essenciais para eliminar bactérias locais e auxiliar na degradação do tecido necrótico por meio da fagocitose e secreção de proteases. Eles atuam também como quimiotáticos para demais células presentes na fase inflamatória, liberando mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 e IL-6, que amplificam a resposta inflamatória e estimulam a IL-8 e o VEGF (Fator de Crescimento

Endotelial Vascular) para uma resposta adequada de reparo (EMING; KRIEG; DAVIDSON, 2007; DALEY et al., 2005; REINKE; SORG, 2012).

Apoiando a cicatrização, os macrófagos atuam na inflamação local, eliminando células apoptóticas e contribuindo na proliferação celular e na restauração do tecido afetado. Assim, além de suas funções imunológicas como células apresentadoras de antígenos, também realizam a fagocitose de patógenos e restos celulares, permitindo os movimentos celulares e teciduais cruciais para os mecanismos seguintes de reparo. Ainda, secretam quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, como TGF- α , TGF- β , FGF Básico, PDGF e VEGF, os quais promovem a proliferação celular e a síntese de moléculas da MEC pelas células residentes da pele (DALEY et al., 2005; DEHKORDI et al., 2019; GURTNER et al., 2008).

Do terceiro até o décimo dia após a lesão, dá-se início a fase de proliferação na ferida, onde o foco será a reepitelização das bordas até que se alcance a cobertura total dessa superfície, por meio da migração de fibroblastos locais ao longo da rede de fibrina, favorecendo a formação de tecido de granulação, a restauração da rede vascular e a angiogênese no processo de cicatrização. O tecido cicatricial será formado a partir da nova MEC, que será constituída de uma rede densa e dinâmica de colágeno, podendo ser remodelada à medida que ocorrem a síntese, fixação e degradação dessa proteína (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; GURTNER et al., 2008; REINKE; SORG, 2012).

A remodelação, última e mais importante etapa de regeneração, ocorre a partir do vigésimo primeiro dia da lesão, podendo se estender até um ano. Nesta fase, a produção do tecido de granulação é cessado e há deposição de colágeno de maneira organizada na região. De início, o colágeno produzido será mais fino do que o presente normalmente na pele e, com o tempo, será reabsorvido, e um colágeno mais espesso e organizado será criado ao longo das linhas de tensão. A reorganização da nova matriz é essencial para o sucesso da cicatrização, que ocorre quando há o equilíbrio entre a síntese da nova e a lise da matriz antiga, realizada pelas collagenases secretadas por leucócitos e fibroblastos. Essas mudanças refletem a força tênsil da ferida, que poderá atingir cerca de 80% após três meses (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH, 2007; GURTNER et al., 2008; REINKE; SORG, 2012).

Alguns fatores e condições pré-existentes podem afetar o processo normal de fechamento de feridas e, como resultado, a restauração do tecido. Entre eles, cita-se problemas renais e vasculares, infecções, diabetes, presença de corpos estranhos, desnutrição ou obesidade, estado imunocomprometido do corpo, além de idade avançada. Portanto, é de extrema importância considerar tais situações ao desenvolver técnicas de regeneração de

tecidos de pele (CHAUDHARI et al., 2016; REINKE; SORG, 2012).

2.6.3 Feridas Associadas à CTM

Existem inúmeras pesquisas que relacionam o uso de CTM à melhora do quadro clínico de pacientes com feridas de pele em geral. Essas células são capazes de recrutarem macrófagos, envolvidos na remoção de detritos celulares no combate à infecções, secretarem uma ampla variedade de fatores parácrinos responsáveis por promover a proliferação celular, estimularem a angiogênese e auxiliarem na modulação da resposta inflamatória (CHAUDHARI et al., 2016; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

Os enxertos, comumente usados de forma autógena ou alogênica, são uma alternativa na restauração da estrutura do tecido cutâneo de origem dérmica, epidérmica ou dérmico-epidérmica, melhorando o resultado estético da ferida ou do seu fechamento em casos crônicos (HERSKOVITZ et al., 2016; SHARMA et al., 2019).

A técnica de reconstrução do enxerto apresenta algumas condições desfavoráveis, pois, além do risco de o paciente submeter-se à anestesia e cirurgia, é inerente à sua aplicação a dificuldade de compatibilidade estética entre a cor e textura do tecido do doador e receptor, bem como a alta suscetibilidade a traumas, reduzida sensibilidade no local receptor, baixa qualidade da taxa de aderência, contração do tecido recebido e tempo de durabilidade, além da necessidade de cuidados prolongados com a região (DAI; SHIH; KHACHEMOUNE, 2020).

Como alternativa, é possível associar as células ou tecidos bioengenheirados a uma matriz de suporte. Ambas as estruturas, além de serem biocompatíveis com o tecido cutâneo, agem como materiais de curativos adequados para o tratamento de feridas. Isto posto, o arcabouço com população celular pretende oferecer melhores condições de reparo e otimização do processo de cicatrização. Igualmente possível é incorporar à estrutura o uso de fatores de crescimento, antibióticos e medicamentos anti-inflamatórios, visando elevar o potencial da técnica (TSIAPALIS; O'DRISCOLL, 2020; VIG et al., 2017).

A engenharia tecidual surge como uma abordagem revolucionária que promete desenvolver tecidos funcionais em laboratório para substituir ou reparar os tecidos comprometidos ou perdidos em razão de condições degenerativas, lesões e patologias. Devido a isso, os tecidos regenerados a partir de CT têm ganhado maior visibilidade quando associados ao uso de enxertos cutâneos (HERSKOVITZ et al., 2016; SHARMA et al., 2019).

2.7 ARCABOUÇOS

Em 1967, tentou-se definir pela primeira vez o “arcabouço”, porém ainda não se sabia ao certo como descrevê-lo e, em 1982, uma nova definição foi elaborada e amplamente aceita. Hoje, pode-se afirmar que um arcabouço é uma substância ou mistura de substâncias, de origem natural ou sintética, não classificada como remédio e que pode ser aplicada como parte ou por inteira em um sistema que trata, aumenta ou permite a troca de qualquer função de tecido ou órgão do corpo, por qualquer período de tempo (COHEN, 1967; PATEL; GOHIL, 2012; MARIN; BOSCHETTO; PEZZOTTI, 2020).

2.7.1 Membrana de Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana é um composto orgânico resultante da produção de alguns tipos de bactérias. Cada tipo de bactéria é capaz de produzir uma celulose com diferentes morfologias, estruturas, propriedades e aplicações. Um produto resultante é a membrana de celulose bacteriana (MCB), que é capaz de temporariamente atuar como substituta da pele. Tal membrana apresenta características relevantes para ser considerada um ótimo arcabouço e aplicável nas mais diversas rotinas medicinais. Entre elas, está o fato de ser atóxica, inerte, biocompatível, moldável e apresentar textura extremamente fina e alta resistência em superfície úmida, sem trazer impactos adversos para a saúde e ao meio-ambiente (AMORIM et al., 2022; NICOARA et al., 2020, WANG; TAVAKOLI; TANG, 2019).

Seu uso como membrana no tratamento especial de feridas crônicas pode amparar o aceleração da reepitelização, resultando em tratamentos mais curtos, uma vez que imitam a capacidade da MEC do hospedeiro de regular funções celulares importantes, contribuindo com o aumento na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular (AMORIM et al., 2022; DAVIS et al., 2018; MENSAH et al., 2022; NICOARA et al., 2020).

Um estudo feito por Yaguishita (2007) demonstrou que ratos submetidos a ferimentos de retirada total de pele do dorso apresentaram favorecimento de cicatrização quando tratados com a membrana de celulose porosa. Devido a esses fatores, a membrana de celulose bacteriana continua sendo estudada para fins de aplicações biomédicas e entrega de fármacos.

Já conceituada no mercado, a empresa Vuelo Pharma, localizada em Curitiba/PR, comercializa a Membracel[®] (Apêndice A), uma membrana de celulose cristalina sintetizada pela bactéria *Acetobacter xylinum*, constituída de microfibrilas de celulose entrelaçadas entre si, com comprimentos indefinidos, textura fina e estrutura uniforme. As membranas são

desenvolvidas com porosidade artificial e memória de posição, sendo que os poros não mudam de diâmetro com o tempo e facilitam, de forma constante, a troca gasosa e a eliminação do exsudato para um curativo secundário (COELHO et al., 2020; YAGUISHITA, 2007).

Este material é de fácil utilização e permite reduzir as despesas do tratamento por não necessitar de troca diária e, por este motivo, minimiza possíveis traumas à pele, promove o desenvolvimento do tecido de granulação e ainda reduz o processo de dor por meio do isolamento das terminações nervosas, enquanto ajuda na redução do tempo de cicatrização e subsequente epitelização. A Membracel[®] é indicada para ferimento superficial ou profundo e para exsudação escassa ou abundante, englobando uma variedade de lesões que resultam da perda do epitélio, tais como: queimaduras, escoriações, úlceras, epidermólise bolhosa, áreas receptoras e doadoras de enxerto cutâneo, pós-cauterização física e outros (COELHO et al., 2020; YAGUISHITA, 2007).

A intenção deste estudo é agregar as vantagens da aplicação clínica de Membracel[®] às vantagens conhecidas de regeneração tecidual das células-tronco, de forma a intensificar o tratamento de lesões epiteliais e ampliar as opções terapêuticas de tratamento. Já que, apesar da grande quantidade de opções de produtos em uso atual na área médica, estes ainda não contam com o desempenho de ação pretendido. Muitas vezes, aderem-se à crosta do ferimento, impedindo o acompanhamento clínico visual adequado e a própria regeneração tecidual, além de dificultarem a drenagem do exsudato, onde o acúmulo de líquidos excretados da lesão impede ou prolonga o processo de granulação e, como consequência, de regeneração do tecido lesado. Por outro lado, existem produtos mais novos e modernos, porém são comercializados com valores intangíveis (COELHO et al., 2020; YAGUISHITA, 2007).

2.7.2 Membrana de Polipropileno

O polipropileno é categorizado como um polímero sintético constituído por macromoléculas de alta massa molar, formadas pela ligação de unidades repetitivas menores ao longo da cadeia principal. É um material de fácil fabricação, sintetizado de maneira reprodutível e controlada, de custo razoável, altamente resistente, maleável nas mais diferentes formas e apresenta características favoráveis nas aplicações específicas, com destaque para a área de reparos teciduais, devido à sua biocompatibilidade (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015; WONG; BRONZINO, 2007).

A membrana desenvolvida a partir de polipropileno corresponde a um arcabouço aloplástico não reabsorvível que, além de ser biocompatível, apresenta outras características

como ser impermeável e bioinerte. A *BoneHeal*[®] (Apêndice A) é uma membrana comercial de polipropileno que compõem os atributos descritos acima (NESI, 2013; SANTOS, 2020).

Na renovação tecidual, tal membrana atua como uma barreira física na área afetada, permitindo que as células sejam capazes de exercer suas propriedades e estimular o crescimento de tecidos. Sem consequências deletérias ao organismo, pode ser aplicada em casos cirúrgicos, como reconstrução de tecidos moles e enxertos ósseos (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015; NESI, 2013; SANTOS, 2020).

Um estudo realizado por Salomão e Siqueira (2009) mostrou resultados positivos quando, durante os primeiros dias de cicatrização no meio bucal, a membrana foi aplicada, agregando para a manutenção celular de forma que conteve o coágulo sanguíneo até ele ser substituído por tecido de granulação e a infiltração do tecido epitelial reduzida.

Em outro estudo, utilizou-se a membrana de polipropileno (MP) como um material de enxerto para correção de perfuração do septo nasal. Observou-se resultados satisfatórios e eficazes, demonstrando biocompatibilidade e tornando a tela de polipropileno uma opção viável para o reparo tecidual de danos ao septo nasal (YÜCEBAS et al., 2016).

Até o momento, há uma abundância de estudos clínicos que demonstram resultados otimistas com o uso de membranas como arcabouço, evidenciando o fato de acelerarem a cicatrização, melhorarem a qualidade dos tecidos regenerados e reduzirem a formação de marcas irreversíveis. No entanto, a escolha de uma membrana como forma de terapia deve ser realizada com base na avaliação individual, considerando fatores como região da ferida, tamanho e se há presença de infecção (NESI, 2013; YÜCEBAS et al., 2016).

Em síntese, busca-se estabelecer uma abordagem promissora ao combinar arcabouços e CTM. A concepção visa permitir que essa interação estratégica possa maximizar as vantagens individuais de cada componente, acelerando a cicatrização, reduzindo a probabilidade de rejeição e proporcionando uma recuperação mais rápida e completa aos pacientes. Na área regenerativa, a potencialidade desses benefícios irá representar uma significativa contribuição.

3 CAPÍTULO 1¹

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS E BIOMATERIAIS COMO ESTRATÉGIA PARA TERAPIA REGENERATIVA CUTÂNEA: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Resumo: A cicatrização de feridas cutâneas é um problema importante na medicina e uma questão relevante de saúde pública. A indústria farmacêutica ainda procura soluções terapêuticas eficazes que aumentem a previsibilidade e acelere o processo de reparação tecidual. As células-tronco mesenquimais (CTM) são introduzidas como notáveis por suas propriedades cicatrizantes e segurança em terapias celulares, sendo aplicadas para o tratamento das condições de degradação cutânea. Para aprimorar essa eficácia, a engenharia tecidual utiliza os biomateriais como uma abordagem promissora de suporte celular que contribui para a adesão e proliferação dessas células. Diante disso, nesta revisão integrativa foi investigada a efetividade da combinação das CTM com diferentes tipos de biomateriais, consolidando evidências sobre a interação entre esses componentes e seu impacto no tratamento de feridas. A seleção dos estudos primários foi realizada em seis bases de dados científicas, empregando descritores que combinaram termos principais e secundários. A sistematização da busca incluiu a avaliação de títulos, resumos e a leitura na íntegra de 24 publicações, aplicando critérios de inclusão previamente definidos. A amostra final foi composta por 7 pesquisas. A síntese dos dados e análise qualitativa foram realizadas descritivamente. Dos resultados dos estudos, a maioria indexada há menos de 5 anos, revela-se uma tendência crescente sobre o tema. Foram registradas pesquisas originárias de vários países, origens celulares e características dos arcabouços utilizados, indicando uma diversidade nas abordagens. Apesar disso, os desfechos foram similares, demonstrando que a integração pretendida não apenas melhora a regeneração epitelial, mas promove um ambiente favorável à migração celular. Contudo, os autores ressaltam a necessidade de aprofundamento para elucidar os efeitos tardios e otimizar o uso de terapias avançadas neste campo, consolidando evidências sobre a interação entre as CTM e os biomateriais e sua capacidade de oferecer uma solução eficaz e acessível para o manejo e tratamento de feridas de difícil cicatrização.

Palavras-Chave: Biomaterial; Célula-Tronco Mesenquimal; Medicina Regenerativa.

HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS AND BIOMATERIALS AS A STRATEGY FOR CUTANEOUS REGENERATIVE THERAPY: AN INTEGRATIVE REVIEW

Abstract: Wound healing is a significant medical issue and a relevant public health concern. The pharmaceutical industry continues to seek effective therapeutic solutions that increase predictability and accelerate tissue repair processes. The mesenchymal stem cells (MSC) are recognized for their healing properties and safety in cell therapies and are being applied to treat skin degradation conditions. To enhance this efficacy, tissue engineering uses biomaterials as a promising approach for cellular support, contributing to cell adhesion and proliferation. In this context, this integrative review investigates the effectiveness of combining MSC with different biomaterials, consolidating evidence on the interaction between these components and their impact on skin treatment. Primary studies were selected across six scientific databases, employing descriptors that combined primary and secondary terms. The search systematization included evaluating titles, abstracts, and the complete reading of 24 publications,

¹ O artigo a seguir foi aceito em 14/04/2025 para publicação na revista “Evidência: Biociências, Saúde e Inovação”, da Editora UNOESC (ISSN: 1519-5287 | e-ISSN: 2236-6059), classificada como Qualis B1 na área de Biotecnologia. Atualmente, o manuscrito está em editoração e será publicado em edição futura, conforme o cronograma da revista.

applying pre-defined inclusion criteria. The sample comprised seven studies. Data synthesis and qualitative analysis were conducted descriptively. The results of the studies, most indexed within the past 5 years, reveal a growing trend on the topic. Research from various countries, cellular origins, and biomaterials characteristics were recorded, indicating the diversity in approaches. Despite this, the outcomes were similar, demonstrating that the intended integration improves epithelial regeneration and fosters an environment favorable to cell migration. However, the authors highlight the need for further research to clarify the long-term effects and optimize the use of advanced therapies in this field, consolidating evidence on the interaction between MSC and biomaterials and their ability to provide an effective and accessible solution for the management and treatment of hard-to-heal wounds.

Keywords: Scaffold; Mesenchymal Stem Cell; Regenerative Medicine.

3.1 Introdução

Feridas crônicas são descritas como qualquer interrupção na continuidade de um tecido corpóreo que não consegue alcançar a integridade anatômica e funcional dentro de um período de três meses, ou que não obteve um resultado anatômico e funcional duradouro, mesmo após o processo de reparação (Gois et al., 2021; Järbrink et al., 2016). Estima-se que esse tipo de lesões afete cerca de 5% da população adulta no mundo ocidental (Gois et al., 2021; Oliveira et al., 2019). Projeções indicam um aumento significativo desses números nas próximas décadas, devido ao crescimento da expectativa de vida e, em consequência, da população idosa. Isso ocorre pois o fechamento total de feridas está negativamente associado à idade (Järbrink et al., 2016).

No Brasil, os registros estatísticos para feridas crônicas ainda são incipientes. No entanto, um estudo realizado por Vieira e Araújo (2018) demonstrou uma prevalência muito superior àquela observada em países como Alemanha e Irlanda, onde as taxas de prevalência de feridas crônicas são de 1,04% e 3,7%, respectivamente. Os resultados obtidos nessa pesquisa foram de 11,8%, dos quais 5% correspondem a lesões por pressão, 3,2% a úlceras diabéticas e 2,9% a úlceras vasculogênicas.

Relata-se que essa discrepância pode ser causada pelas melhores condições de diagnóstico e tratamento disponíveis, que promovem uma cicatrização mais rápida em países desenvolvidos. Em países subdesenvolvidos, como o Brasil, essa situação assume proporções ainda mais graves, resultando na piora significativa da qualidade de vida do paciente e em índices recorrentes de internações hospitalares prolongadas, que levam a um elevado custo para o sistema de saúde. Isso provém também de constantes cuidados domiciliares, tratamentos complexos e uso de terapias adjuvantes (Gois et al., 2021; Oliveira et al., 2019).

Na indústria farmacêutica, ainda se busca uma solução terapêutica eficaz que aumente a previsibilidade e acelere a cicatrização de feridas. Em decorrência dessa carência, a

engenharia tecidual surge como uma abordagem promissora para desenvolver tecidos funcionais *in vitro* destinados ao reparo ou à substituição de tecidos comprometidos ou perdidos em razão de condições degenerativas, lesões e patologias (Chaudhari et al., 2016; Dehkordi et al., 2019). Isto posto, os tecidos regenerados a partir de células-tronco mesenquimais (CTM) associadas a biomateriais, como matrizes de suporte, têm ganhado maior visibilidade (Herskovitz et al., 2016; Sharma et al., 2019).

A cicatrização de lesões cutâneas representa um problema de saúde pública e um desafio significativo na medicina regenerativa, devido à complexidade dos processos envolvidos, como a inflamação, angiogênese e reepitelização, além da susceptibilidade local a possíveis infecções e traumas (Reinke & Sorg, 2012). Destacam-se os casos em que a manutenção do curativo protetor sobre a região lesionada é custosa (Chaudhari et al., 2016; Souza, 2003).

A aplicação de métodos convencionais de tratamento de feridas crônicas, como o enxerto cutâneo autógeno ou alogênico, pode oferecer riscos ao paciente que se submete à anestesia e cirurgia. Além disso, também é inerente à sua aplicação: a dificuldade de compatibilidade estética entre a cor e textura do tecido do doador e receptor, a redução da sensibilidade do local receptor, a baixa qualidade da taxa de aderência e também a longevidade do tratamento. Todos esses fatores estão combinados aos cuidados prolongados com a região (Dai et al., 2019).

Alguns estudos relacionaram o uso de CTM à melhora do quadro clínico de pacientes com ferimentos de pele. De acordo com a literatura, além de auxiliarem na modulação da resposta inflamatória, as CTM também promovem a proliferação celular por meio da secreção de diversos fatores parácrinos, estimulando a angiogênese e recrutando macrófagos, células essenciais na remoção de detritos celulares e no combate a infecções (Chaudhari et al., 2016; Murphy et al., 2013).

O estudo realizado por Han et al. (2019) aborda diferentes fontes de CTM: medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical. E evidenciam a habilidade de diferenciação dessas células em diferentes linhagens celulares e observam sua interação com o microambiente, promovendo a regeneração cutânea a partir das propriedades imunomoduladoras.

Em vista disso, a associação de biomaterial com as CTM pretende oferecer melhores condições e otimização do processo de reparo tecidual, a fim de reduzir a morbidade provocada por lesões crônicas de pele (Marin et al., 2020; Patel & Gohil, 2012). Entre os tipos de arcabouços disponíveis, destacam-se: a celulose bacteriana, a membrana amniótica e a fibrina rica em plaquetas ou PRF (Cherng et al., 2021; Palaniappan et al., 2023). Esses compostos

apresentam benefícios como não-toxicidade, biocompatibilidade, propriedades físicas, morfológicas e mecânicas moldáveis, permeabilidade e resistência às superfícies úmidas, além de biodegradabilidade.

No trabalho desenvolvido por Hoang & Ma (2021), atribui-se ao arcabouço o direcionamento da diferenciação celular, um papel crucial na organização e funcionalidade do reparo. A escolha do microambiente ideal é capaz de melhorar a viabilidade celular e a estrutura tridimensional dos tecidos. Além disso, saber promover a diferenciação celular adequada permite criar melhores modelos de reparo e abrir novas possibilidades para a medicina personalizada.

A abordagem em questão visa a entrega eficiente de conteúdo celular aos tecidos danificados, com o objetivo de aprimorar o processo de cicatrização de lesões cutâneas por meio da modulação da inflamação local, garantindo a infiltração seletiva de células e a regulação da replicação de fatores de crescimento, citocinas e/ou enzimas, ao mesmo tempo em que reduz o risco de infecções e desidratação, promovendo a atração de componentes da matriz extracelular (Cherng et al., 2021; Marin et al., 2020; Palaniappan et al., 2023).

Cavalcanti et al. (2017) demonstram em estudo randomizado e controlado, 25 úlceras venosas crônicas em membros inferiores tratadas com o uso combinado de CTM e celulose bacteriana, reduzindo a dor e estimulando a regeneração sem efeitos citotóxicos. Nenhum paciente apresentou infecções ou reações adversas.

A versatilidade dos arcabouços oferece uma ampla gama de possibilidades para sua utilização apesar de ainda não se conhecer com exatidão todos os fatores envolvidos no controle da autorrenovação e diferenciação celulares (Barry & Murphy, 2004; Kern et al., 2006; Yarak & Okamoto, 2010).

Assim, busca-se informações sobre como os biomateriais podem influenciar os mecanismos celulares. Diante disto, o objetivo desta revisão integrativa foi investigar a eficácia da combinação das CTM a arcabouços na cicatrização de feridas crônicas. Para tal, foram analisados diferentes estudos com fonte celulares e biomateriais distintos, em diferentes metodologias. Buscou-se dados sobre a interação entre os componentes de produtos de terapia avançada, e sobre o impacto na aplicação em feridas de pele, como também prováveis limitações.

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 Tipo de Estudo

Neste estudo foi utilizada a metodologia da revisão integrativa, que proporciona a síntese do conhecimento e a aplicação prática de resultados relevantes obtidos de estudos sobre um tema em específico (Souza et al., 2010). A busca sistemática foi realizada nas bases de dados da pesquisa científica, enfatizando as terapias baseadas em CTM e sua integração com arcabouços, como abordagem potencialmente inovadora para o desenvolvimento de novos produtos.

Após a identificação do tema, foi definido o problema que norteia os passos subsequentes. Para a melhor construção deste estudo, utilizou-se a formulação PICO (População, Intervenção, Comparação e Desfecho) para estruturar a questão, sendo: P = pacientes com lesões cutâneas crônicas; I = aplicação de biomateriais celularizados; C = CTM e biomateriais isolados; e O = melhora no reparo tecidual. A partir dessa estratégia, formulou-se a seguinte pergunta: “Quais são as evidências disponíveis na literatura sobre o uso de CTM associadas aos biomateriais em pacientes com feridas cutâneas crônicas?”

3.2.2 Estratégia de Busca

A seleção dos artigos foi efetuada em bases de dados que publicam de forma multidisciplinar, como Google Acadêmico, LILACS, PubMed, Scopus, SciELO Brasil e Periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES/MEC). O levantamento literário ocorreu entre os meses de fevereiro e abril, do ano de 2024.

A busca foi elaborada utilizando descritores combinados, obtidos no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) e no MeSH (*Medical Subject Headings*), para identificar palavras-chave adequadas à pesquisa em ambos os idiomas, optando por: arcabouço, células-tronco mesenquimais e medicina regenerativa, associadas aos operadores booleanos AND e OR.

Primeiramente, realizou-se uma busca simples pela combinação “células-tronco multipotentes” OR “células-tronco mesenquimais” OR “*mesenchymal stem cells*” AND “biomaterial” OR “*scaffold*” AND “material biocompatível”. Em seguida, efetuou-se uma busca avançada nas bases de dados com termos adicionais como “células-tronco da Geleia de

Wharton” OR “*Wharton's Jelly Cells*” AND “tecido suporte” AND “medicina regenerativa” OR “*regenerative medicine*” OR “engenharia tecidual” OR “*tissue engineering*”, abrangendo o cruzamento de termos nas combinações.

3.2.3 Critérios de Inclusão

A fim de garantir a qualidade na produção textual, foram incluídos nessa busca apenas: (a) artigos originais completos; (b) publicados desde 2013 em periódicos indexados; (c) que envolvessem o uso de CTM originárias do cordão umbilical, do tecido adiposo e da medula óssea; e (d) que enfatizassem sua associação a biomateriais de origem biológica, tais como: a membrana de celulose bacteriana, a membrana amniótica e a fibrina rica em plaquetas (PRF).

3.2.4 Critérios de Exclusão

Os artigos que não se enquadraram nos requisitos de inclusão citados foram excluídos do estudo. Também foram removidas pesquisas que: (a) fossem revisões sistemáticas, teses, dissertações, editoriais e similares; (b) estivessem duplicadas nas bases de dados; e/ou (c) não estivessem em inglês ou português.

3.3 Resultados

3.3.1 Análise e Tratamento dos Dados

Na primeira busca de artigos relacionados à temática abordada, foram contabilizadas 9.620 publicações, sendo: Google Acadêmico (n = 1.480), LILACS (n = 436), PubMed (n = 2.173), Scopus (n = 624), SciELO Brasil (n = 3) e CAPES/MEC (n = 4.904).

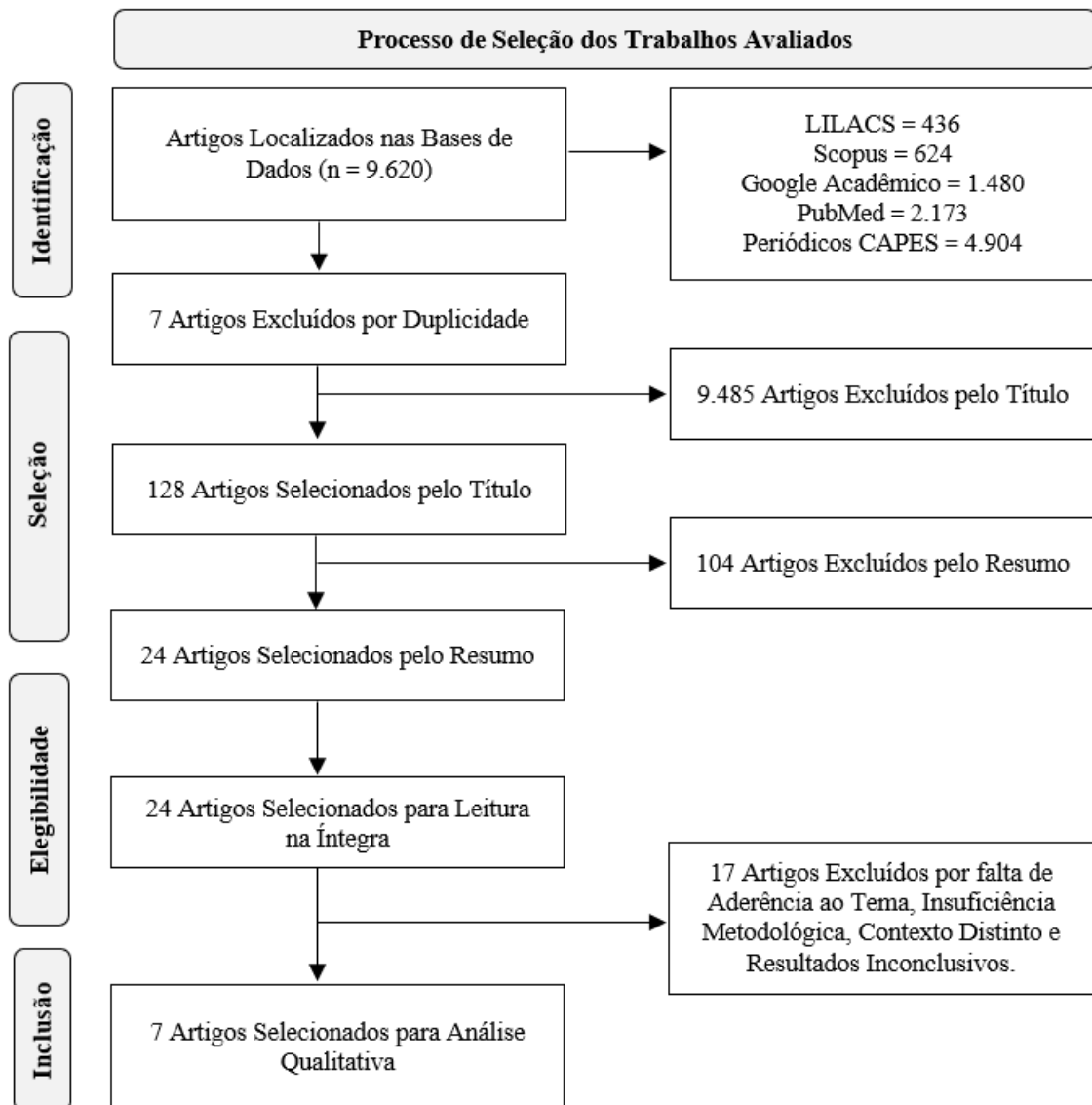
A pré-seleção dos artigos foi realizada por meio da leitura preliminar de títulos e resumos. Após o refinamento da busca, foram selecionados 24 estudos para leitura na íntegra e inclusão na revisão, levando em consideração aspectos como temática, objetivos e metodologias aplicadas, amostras trabalhadas e resultados obtidos na pesquisa.

Em seguida, a leitura completa de cada pesquisa foi efetuada para extração de informações e a formulação de categorias, na tentativa de identificar semelhanças e diferenças entre os estudos, utilizando como recurso o Microsoft Excel e o *software* Atlas TI (Versão 9).

Subsequente à análise metodológica, a amostra desta revisão passou a ser constituída

por 7 artigos. Por fim, os dados e os resultados coletados foram discutidos acompanhados de uma síntese da literatura e avaliação qualitativa dos estudos. O processo de seleção dos estudos primários está detalhado na Figura 1.

Figura 1. Fluxograma da Sistematização e Critérios de Busca, Adaptado de Itens de Relatório Preferidos para Revisões Sistemáticas e Metanálises (PRISMA).



Em relação à distribuição temporal, a maioria das publicações (Cherng et al., 2021; Palaniappan et al., 2023; Sumarta et al., 2021; Wang, 2023) ocorreu em um período posterior a 2020, totalizando quatro artigos. Os demais trabalhos (Sabapathy et al., 2014; Silva et al., 2018; Souza, 2014) foram anteriores a este ano. Os artigos abrangem diferentes periódicos, tanto nacionais (Silva et al., 2018; Souza, 2014) quanto internacionais (Cherng et al., 2021;

Palaniappan et al., 2023; Sabapathy et al., 2014; Sumarta et al., 2021; Wang, 2023), e foram realizados em países como Brasil (Silva et al., 2018; Souza, 2014), China (Cherng et al., 2021, Wang, 2023), Índia (Palaniappan et al., 2023; Sabapathy et al., 2014) e Indonésia (Sumarta et al., 2021). Todos os artigos foram divulgados em inglês e são meramente de caráter experimental.

Os estudos foram publicados nas seguintes revistas: *ACS Omega*; *Frontiers in Surgery*; *Revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada (PBOCI)*; *PeerJ*; *Pharmaceutics*; *PLoS One* e *Transplantation Proceedings*. De um modo geral, os trabalhos foram feitos em parceria, com uma média de oito autores por publicação e envolvendo o apoio de mais de uma instituição.

3.3.2 Caracterização dos Artigos

A caracterização e a síntese dos estudos selecionados ocorreu por meio da organização de informações de identificação, que estão consolidadas e apresentadas na Tabela 1. Os dados extraídos referem-se aos anos de publicação, ao país de origem do primeiro autor, ao periódico de publicação, ao título da pesquisa, à origem celular e ao tipo de arcabouço.

Tabela 1. Caracterização e Síntese dos Artigos Selecionados.

N.º	Ano	País	Periódico de Publicação	Título da Pesquisa	Origem Celular	Arcabouço
1 ¹	2014	Brasil	<i>Transplantation Proceedings</i>	<i>Regeneration of Skin Tissue Promoted by Mesenchymal Stem Cells Seeded in Nanostructured Membrane</i>	Tecido Adiposo	Membrana de Celulose Bacteriana
2 ²	2014	Índia	<i>PLoS One</i>	<i>Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth</i>	Cordão Umbilical	Membrana Amniótica
3 ³	2018	Brasil	<i>PeerJ</i>	<i>Behavior and Biocompatibility of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Bacterial Cellulose Membrane</i>	Medula Óssea	Membrana de Celulose Bacteriana
4 ⁴	2020	Indonésia	Revista Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada	<i>Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Over Platelet Rich Fibrin Scaffold for Mandibular Cartilage</i>	Cordão Umbilical	Fibrina Rica em Plaquetas (PRF)

			(PBOCI)	<i>Defects Regenerative Medicine</i>		
5 ⁵	2021	China	<i>Pharmaceutics</i>	<i>Bacterial Cellulose as a Potential Bio-Scaffold for Effective Re-Epithelialization Therapy</i>	Tecido Adiposo	Membrana de Celulose Bacteriana
6 ⁶	2023	Índia	<i>ACS Omega</i>	<i>Combining Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly and Amniotic Biomaterial Scaffolds for Cell Delivery</i>	Cordão Umbilical	Membrana Amniótica
7 ⁷	2023	China	<i>Frontiers in Surgery</i>	<i>Bacterial Cellulose Membrane Combined with BMSC Promotes Wound Healing by Activating the Notch Signaling Pathway</i>	Medula Óssea	Membrana de Celulose Bacteriana

Legenda: Souza, 2014¹; Sabapathy et al., 2014²; Silva et al., 2018³; Sumarta et al., 2021⁴; Cherng et al., 2021⁵; Palaniappan et al., 2023⁶; X. Wang, 2023⁷.

Os resultados foram apresentados de forma descritiva, de acordo com as informações fornecidas por cada estudo. Para melhor compreensão da ordem cronológica das pesquisas e otimização da introdução do tema e discussão dos artigos, estruturou-se os seguintes tópicos: CTM e a Cicatrização de Feridas Cutâneas; Caracterização dos Biomateriais Biológicos; Fontes Originárias de CTM; Testes de Caracterização e Diferenciação *In Vitro*; Preparo do Curativo Bioativo para Feridas e, quando presente, a Avaliação *In Vivo* em Modelo de Defeito Cutâneo.

3.3.3 CTM e a Cicatrização de Feridas Cutâneas

As CTM são um tema de destaque crescente em razão do seu notável potencial de renovação e diferenciação celular. A associação das células com biomateriais oferece uma alternativa promissora para a entrega celular e a sua manutenção no local transplantado, expandindo as aplicações na área da medicina regenerativa.

Neste contexto, os artigos selecionados também tinham como objetivo compreender e fundamentar os mecanismos envolvidos nessa nova estratégia de suporte e entrega celular para feridas de cicatrização complexa.

3.3.4 Caracterização dos Biomateriais

Dentre os estudos publicados, destacou-se a utilização de três variedades de

biomateriais. O item com o maior número de aplicações (57,14%) foi a membrana de celulose bacteriana (MCB), seguida pela membrana amniótica (MA), com 28,57%, e pela fibrina rica em plaquetas (PRF), com 14,29%.

Das MCBs, três foram fermentadas e produzidas por *Acetobacter xylinum*, e uma pelo cultivo de *Gluconacetobacter xylinus*. Os desenvolvimentos ocorreram em parceria com empresas como a *NanoMed Biotech* (Wang, 2023) e *The Far Eastern Group* (Cherng et al., 2021), ambas localizadas na China; além do Departamento de Farmácia da Universidade de Sorocaba (UNISO) (Silva et al., 2018) e o Laboratório BioPol do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Souza, 2014), ambos situados no Brasil. Todas as membranas apresentavam fina espessura, preparadas para serem inoculadas com CTM.

As MAs foram obtidas pela doação consentida de placentas humanas em cesarianas. Em laboratório, os materiais isolados foram apropriadamente dissecados, com o âmnio separado das demais estruturas e limpos para eliminar resquícios de sangue e muco. Em sequência, foram descelularizados e esterilizados. Esse processo visa empregar a estrutura extracelular do tecido para potenciais aplicações médicas, como regeneração de tecidos ou enxertos cutâneos.

A pesquisa de Sumarta et al. (2021) utilizou o PRF obtido após punção venosa da cauda de rato *Wistar* devidamente anestesiado. O sangue foi coletado sem a adição de anticoagulante e centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, resultando na separação do material em três níveis, sendo o intermediário de interesse para os pesquisadores.

3.3.5 Fontes Originárias de CTM

Sabapathy et al. (2014), Sumarta et al. (2021) e Palaniappan et al. (2023) isolaram e proliferaram células oriundas do cordão umbilical, especificamente da Geleia de Wharton (CTM-GW). As amostras foram obtidas de parturientes saudáveis, submetidas a cesarianas. Após os respectivos protocolos de cultivo primário e expansão celular, as células foram cultivadas até atingirem um volume suficiente para caracterização e testes *in vitro* de diferenciação multilinhagem.

As pesquisas realizadas por Cherng et al. (2021) e Souza (2014) utilizaram células originárias de tecido adiposo (CTM-TA), adquiridas por meio de lipoaspiração de tecido humano; enquanto Wang (2023) e Silva et al. (2018) trabalharam com células da medula óssea (CTM-MO), derivadas do aspirado medular de camundongos *Balb/c* (Cyagen, EUA) e coelhos, respectivamente.

3.3.6 Testes de Caracterização e Diferenciação *In Vitro*

Para confirmar o tipo celular cultivado nos experimentos, os autores Palaniappan et al. (2023), Souza (2014) e Sumarta et al. (2021) realizaram a caracterização celular por meio da citometria de fluxo, para análise dos marcadores específicos de superfície. Observou-se a expressão dos marcadores CD45-, CD73+, CD90+ e CD105+, confirmando a origem mesenquimal dessas células.

Como teste confirmatório para identificação de CTM, procedeu-se à análise de diferenciação multilinhagem. Sob condições *in vitro*, as células cultivadas foram induzidas à especialização adipogênica, condrogênica e osteogênica para confirmação da sua capacidade em originar tecidos de linhagem mesodérmica.

Souza (2014) registrou a tentativa de diferenciação celular de CTM-TA em adipócitos e osteócitos, obtendo resultados satisfatórios. Os demais autores (Palaniappan et al., 2023; Sabapathy et al., 2014; Silva et al., 2018) realizaram análises de diferenciação adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, confirmando a capacidade das CTM-GW e CTM-MO em formar estes determinados tecidos.

A pesquisa de Sumarta et al. (2021) conseguiu confirmar a especialização de CTM-GW em condrócitos, com base na evidência da expressão de marcadores e fatores de transcrição associados à proliferação celular, como Ki67, FGF18 e Sox9.

3.3.7 Preparo do Curativo Bioativo para Feridas

Após as caracterizações celulares, os pesquisadores (Cherng et al., 2021; Palaniappan et al., 2023; Sabapathy et al., 2014; Silva et al., 2018; Souza, 2014; Wang, 2023) prosseguiram com a inoculação das CTM em uma densidade variável entre 5.0×10^4 e 1.6×10^6 de células por poço sobre as respectivas membranas biológicas em condições estéreis, utilizando o Meio de *Eagle* Modificado por *Dulbecco* (DMEM) de Baixa Glicose com L-Glutamina e Piruvato Sólido.

No estudo de Sumarta et al. (2021), um total de 2.0×10^6 CTM-GW foi ressuspensionado no PRF previamente preparado. Esse material foi disperso sobre os defeitos cirurgicamente criados nos modelos animais, com 1mm de diâmetro, e, posteriormente, as feridas foram suturadas completamente e monitoradas.

As placas para cultivo, contendo as células semeadas em biomateriais, foram incubadas

por um tempo mínimo de 24 horas, a uma temperatura constante de 37°C (+/- 2°C), com 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado. As células também foram avaliadas quanto ao potencial de adesão e proliferação por diferentes métodos.

As análises de Souza (2014) foram baseadas em testes monitorados por meio do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, denominado como ensaio MTT, que indica indiretamente a viabilidade celular, por meio da atividade metabólica mitocondrial, quantificada pela absorvância em um espectrofotômetro. Como resultado, a pesquisa identificou uma taxa de adesão celular superior a 50% a partir do inóculo.

Palaniappan et al. (2023) também avaliaram a sobrevivência celular de CTM-GW dispersas na MA utilizando um teste fluorescência, conhecido como K501-100 da *Biovision*[®], que permitiu a visualização fácil tanto de células vivas quanto de células mortas. Entre o primeiro e o sétimo dia, observou-se uma excelente e progressiva proliferação celular. Com base no ensaio realizado, constatou-se que 80% das células estavam igualmente dispersas e vivas sobre o *scaffold*, formando uma matriz que se estendia por toda a camada, ao mesmo tempo em que preservavam sua morfologia.

Para estudar a expansão das MSC-BM e sua integração com o arcabouço, Silva et al. (2018) recorreram à análise por MEV (FEI Quanta FEG 250). Observou-se que, mesmo após ancoragem sutil às fibras dispostas na MCB, a morfologia celular foi mantida. Após 7 dias, formaram-se colônias com vários pontos de fixação, resultando em uma maior adesão ao arcabouço. Depois de 14 dias, as micrografias registradas indicaram que a membrana celular estava totalmente aderida à MCB.

3.3.8 Avaliação In Vivo em Modelo de Defeito Cutâneo

Os protocolos revisados indicaram que, para desenvolver as avaliações experimentais de tratamento de feridas, com CTM associadas ao arcabouço, foi necessário a criação de defeitos na região mandibular de ratos *Wistar* (Sumarta et al., 2021), na região cutânea dorsal dos demais modelos animais, incluindo camundongos *Black SCID* e *Balb/c* (Sabapathy et al., 2014; Wang, 2023) e, em ratos *Sprague-Dawley* (Cherng et al., 2021) e *Wistar* (Souza, 2014), por meio de procedimentos cirúrgicos.

Para a execução dos experimentos foram utilizados grupos controles obrigatórios. De modo predominante, houve a divisão em, no mínimo, três grupos: o primeiro constituído apenas por solução tampão de salina fosfatada, o segundo contendo as células injetadas e o terceiro

formado pelos enxertos de células semeadas em arcabouço (Cherng et al., 2021; Sabapathy et al., 2014; Sumarta et al., 2021; Wang, 2023).

No experimento de Sumarta et al. (2021), as células difusas em PRF foram implantadas nos defeitos, que foram totalmente cobertos e suturados. Os resultados para a regeneração foram notáveis, constatando-se que o *scaffold* de CTM-GW em PRF apresentou o maior valor médio de espessura do tecido.

As lesões induzidas no trabalho de Wang (2023) foram cobertas com um curativo asséptico e observadas nos dias 0, 7 e 14 após a operação. A taxa de cicatrização foi calculada e analisada pelo *software* de imagem. O efeito mais significativo foi observado nas feridas tratadas com o curativo de CTM-MO, no *scaffold* de MCB.

No estudo de Sabapathy et al. (2014), as CTM-GW foram semeadas em uma estrutura de MA anteriormente descelularizada, que foi suturada na superfície da ferida. O período de duas semanas foi considerado para a avaliação do progresso de cicatrização das lesões. A pontuação cicatricial foi efetuada por meio de análises histopatológicas do tecido regenerado, revelando que o *scaffold* celularizado apresentou um valor superior em relação ao controle.

Cherng et al. (2021) descreveram o local da ferida tratado com o *scaffold* como menor em dimensões, ausência de vermelhidão devido à reduzida resposta inflamatória, e epitelização aprimorada durante o tratamento, resultando em um fechamento contínuo da lesão.

3.4 Discussão

A pele é o maior órgão do corpo humano e fornece proteção contra diversos agentes externos. No entanto, devido à sua extensão, a pele pode ser danificada com facilidade (Carvalho, 2014; Cherng et al., 2021). Por essa razão, busca-se continuamente desenvolver novas estratégias que visem recuperar a integridade e a homeostase celulares deste tecido. A cicatrização de lesões cutâneas é um processo complexo, diretamente relacionado à inflamação, angiogênese, migração celular, formação de tecido de granulação, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. Nesse contexto, as CTM podem desempenhar um papel ativo, e sua aplicação terapêutica visa aprimorar os resultados dos tratamentos convencionais para feridas (Lee et al., 2016; Sabapathy et al., 2014). A combinação de suas propriedades com as dos biomateriais surge como uma abordagem promissora na engenharia tecidual (Palaniappan et al., 2023; Sabapathy et al., 2014).

Considerando os artigos selecionados, a linhagem celular mais manipulada nos

experimentos foi a obtida a partir do cordão umbilical, mais especificamente da Geleia de Wharton (CTM-GW). Essa substância é responsável por impedir a compressão, torção e flexão dos vasos sanguíneos, possibilitando o fluxo bidirecional de oxigênio, glicose e aminoácidos para o feto em desenvolvimento, ao mesmo tempo em que permite a remoção do dióxido de carbono e outros resíduos (Saleh et al., 2022; Taghizadeh et al., 2011).

As células dessa origem apresentam alguns benefícios quando comparadas às de outras fontes adultas (Hendijani, 2017; Weiss & Troyer, 2006). O processo de obtenção dos tecidos perinatais, considerado resíduos biológicos após o nascimento, é fácil, descomplicado e proporciona pouco risco tanto para a mãe quanto para o recém-nascido (Liu et al., 2014; Saleh et al., 2022; Taghizadeh et al., 2011). Além disso, as CTM-GW têm capacidade para tempos de cultivo mais extensos, possibilidade de produção em larga escala, prorrogação significativa da senescência, elevados efeitos anti-inflamatórios, potencial de diferenciação tecidual pela sua multipotência e, principalmente, alto potencial de aplicação homóloga, em razão das suas propriedades imunomoduladoras e reduzida imunogenicidade em casos de transplantes (Liu et al., 2014; Odorico et al., 2011; Ranjbaran et al., 2018; Saleh et al., 2022).

Embora a medula óssea e o tecido adiposo se apresentem como fontes eficazes de CTM, elas evidenciam algumas limitações, como a necessidade de procedimentos invasivos e dolorosos para a obtenção celular, a limitada disponibilidade e preocupações éticas (Lee et al., 2016). No entanto, cabe ao pesquisador a responsabilidade de investigar e decidir qual o tipo celular mesenquimal deseja trabalhar, de acordo com o seu propósito específico (Han et al., 2019).

Em um estudo inédito realizado por Wang (2023), o pesquisador buscou explorar o uso de CTM-MO a fim de observar seu efeito na promoção do tratamento de feridas; baseando-se nos estudos de Cherng et al. (2021), Silva et al. (2018) e Souza (2014), referindo-se à indução da produção de colágeno tipo I (COL-1) e, assim, proporcionar estabilidade mecânica e promover a cicatrização aos tecidos.

Dos cultivos manipulados pelos pesquisadores, todos satisfizeram os requisitos mínimos para os marcadores de seleção positiva estabelecidos pelo Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) (Deus et al., 2012).

Durante as expansões em cultivos, registrou-se uma modificação na morfologia celular, que passou de um formato arredondado para uma forma gradualmente fusiforme enquanto as

células aderiram e proliferavam em colônias paralelas. As CTM também se provaram favoráveis a mudanças rápidas e demonstraram aderência às superfícies (Silva et al., 2018).

No que diz respeito ao uso adequado das células de diferentes fontes de obtenção, é fundamental destacar a relevância dos testes de identificação celular. Para a classificação do imunofenótipo das CTM, as células devem expressar os antígenos de membrana CD105, CD73 e CD90 com positividade acima de 70%. Por outro lado, os marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19, e as moléculas de superfície HLA-DR devem ser expressos em menos de 2% (Delmonte & Fleisher, 2019; Dominici et al., 2006). Além disso, para confirmação da multipotência das CTM, estas são induzidas a se especializarem em adipócitos, osteoblastos e condrócitos (Deus et al., 2012; Kolios & Moodley, 2013). O resultado da confirmação dessas células é vital para sua utilização no âmbito terapêutico.

Segundo os conceitos da engenharia tecidual, a regeneração de variados tipos teciduais é possível por meio do emprego de células vivas e de uma matriz adequada (Wang, 2023). Logo, a estrutura tridimensional dos biomateriais fornece espaço para a adesão e proliferação das CTM. Em sua superfície, as fibras entrelaçadas também criam condições essenciais para a troca de gases e o isolamento bacteriano, favorecendo a sustentação da atividade celular sobre o *scaffold*, garantindo uma distribuição uniforme (Cohen, 1967; Marin et al., 2020; Patel & Gohil, 2012).

O potencial da estrutura é aprimorado quando combinado com CTM, de modo que o conjunto desempenha um papel positivo no microambiente da ferida, contribuindo para processo de cicatrização e garantindo o fechamento bem-sucedido da lesão. Essa combinação representa uma estratégia promissora para a entrega, crescimento e adaptabilidade celular (Palaniappan et al., 2023; Patel & Gohil, 2012).

A reepitelização da área lesionada é intensificada pelo estímulo do equilíbrio na reprogramação de macrófagos, que são responsáveis por secretar citocinas e quimiocinas associadas à produção de mediadores pró-inflamatórios, além de promover a fagocitose e regular a resposta imune. Como consequência, alcança-se função imunológica equilibrada e eficaz pela homeostase, evitando respostas inflamatórias ou supressoras excessivas (Cherng et al., 2021; Han et al., 2019).

Nos modelos *in vivo*, a taxa de cicatrização observada foi maior nos ensaios envolvendo o conjunto celular engenheirado em relação aos grupos de controle. Em parte, isso pode estar ocorrendo pela ativação de fibroblastos dérmicos humano (HDF) dispostos de forma próxima e pelas fibras de colágeno ordenadamente arranjadas e abundantes (Lee et al., 2016; Wang,

2023). Além de COL-1, observa-se também a proliferação celular, que leva à síntese da matriz extracelular e, adicionalmente, à produção dos fatores de crescimento necessários para a remodelação tecidual da ferida (Sumarta et al., 2021; Wang, 2023).

O VEGF-A corresponde a uma citocina derivada de células endoteliais vasculares cuja atividade envolve a indução de angiogênese, a elevação da permeabilidade vascular, a promoção da migração celular, o crescimento de células endoteliais e a inibição da apoptose (Wang, 2023). A ativação da via de sinalização *Notch*, crucial no desenvolvimento e na homeostase dos tecidos, também demonstrou um papel essencial na formação e remodelação da rede vascular, coordenando os comportamentos endoteliais na angiogênese. Todos esses elementos aliados desempenham funções fundamentais no reparo celular (Cherng et al., 2021; Ferrara, 2009).

A combinação entre CTM e biomateriais apresenta vantagens significativas para o aprimoramento da recuperação de tecidos danificados. Qiu et al. (2016) esclarecem que, para que o processo regenerativo do tecido seja eficiente, é necessário que a estrutura do *scaffold* seja mantida durante o momento de adesão e disseminação das células. Por este motivo, nos artigos abordados, a viabilidade do arcabouço semeado é medida e comparada em diferentes momentos após semeadura (Palaniappan et al., 2023).

A remoção ou degradação progressiva ideal do *scaffold* celularizado deve ocorrer sem prejudicar ou alterar o tecido recém-formado, de forma a não aumentar a resposta inflamatória local nem comprometer a qualidade do reparo. A intenção do arcabouço biodegradável é garantir sua compatibilidade com o hospedeiro para um uso adequado e seguro (Palaniappan et al., 2023; Silva et al., 2018).

A comparação metodológica e dos resultados ainda representa um obstáculo devido à falta de padronização para o desenvolvimento de biomateriais associados às CTM. A diversidade registrada nos tipos de fontes celulares e biomateriais aplicados, nas formas de cultivo e preparo do produto, e também na natureza dos ferimentos cirúrgicos analisados compromete a interpretação dos dados. Para que esses tratamentos venham a ser adotados amplamente na prática clínica, é essencial estabelecer protocolos objetivos que definam as melhores práticas.

Apesar desses desafios, o avanço demonstrado na aplicação clínica desses tratamentos já consolidou essa abordagem como uma solução viável e funcional. No entanto, a escassez de protocolos e pesquisas clínicas específicas limita a realização de estudos de revisão integrativa que possam avaliar de forma conclusiva a eficiência do arcabouço, como evidenciado nesta

análise. Espera-se que novos estudos possam ampliar a aplicação das CTM em *scaffold*, possibilitando a redução dos custos operacionais associados ao tratamento de feridas crônicas e promovendo benefícios diretos aos pacientes, melhorando sua qualidade de vida.

3.5 Conclusão

De acordo com as evidências demonstradas pelos estudos analisados neste trabalho, conclui-se que a associação de CTM com biomateriais no tratamento de feridas crônicas é promissora. Essa combinação tem o potencial de reduzir a dor, encurtar o tempo de tratamento e otimizar as condições fisiológicas do tecido a ser regenerado.

As principais fontes identificadas de CTM incluem o cordão umbilical, a medula óssea e o tecido adiposo, refletindo a diversidade de opções disponíveis para terapias celulares. Entre os biomateriais de suporte, que foram selecionados por suas propriedades benéficas, estão a membrana de celulose bacteriana, a membrana amniótica e a fibrina rica em plaquetas (PRF).

Em relação ao sucesso da combinação, é crucial que os biomateriais forneçam características favoráveis, como suporte estrutural adequado, mimetização da matriz extracelular, resistência mecânica, permeabilidade e biodegradabilidade. Esses fatores promovem a modulação da resposta inflamatória e o equilíbrio local, garantindo a homeostase sem induzir citotoxicidade, além de reduzir simultaneamente o risco de infecções e desidratação.

Deste modo, o produto de terapia avançada, composto por CTM em conjunto com um *scaffold*, pode impactar positivamente o manejo de feridas cutâneas de difícil cicatrização. Essa inovação propõe melhorias na qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a sensibilidade à dor e as limitações funcionais, bem como potencialmente diminuir os custos operacionais associados, beneficiando os sistemas de saúde.

Entretanto, ainda se tornam necessárias investigações clínicas para consolidar a eficácia e a segurança dessa modalidade de intervenção. É imprescindível reunir evidências adicionais sobre a complexidade das interações biológicas, a variabilidade das respostas individuais e os efeitos a longo prazo, identificando com precisão os benefícios e os potenciais riscos para assegurar uma implementação bem-sucedida.

3.6 Referências

Amorim, J. D. P., Júnior, J. G. S., Medeiros, A. D. M., Nascimento, H. A., Sarubbo, H., Medeiros, T. P. M., Costa,

- A. F. S., & Sarubbo, L. A. (2022). Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. *Molecules*, 27(5580). <https://doi.org/10.3390/molecules27175580>.
- Barry, F. P., & Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(4), 568–584. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001>.
- Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), 1738 – 1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>.
- Carvalho, H. S. (2014). Células-Tronco e Terapias Regenerativas. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*, 3(2). ISSN: 1983-1617.
- Cavalcanti, A. L., Lima, A. L., & Ferreira, L. M. (2017). Eficácia da Membrana de Celulose Bacteriana no Tratamento de Úlceras Venosas de Membros Inferiores: Estudo Randomizado e Controlado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 44(1), 72 – 80. <https://doi.org/10.1590/0100-69912017001011>.
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R., & Pillai, S. R. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1 – 32. <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>.
- Cherng, J., Chou, S., Chen, C., Wang, Y., Chang, S., Fan, G., Leung, F., & Meng, E. (2021). Bacterial Cellulose as a Potential Bio-Scaffold for Effective Re-Epithelialization Therapy. *Pharmaceutics*, 13(1592). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101592>.
- Cohen, J. (1967). Biomaterials in Orthopedic Surgery. *The American Journal of Surgery*, 114, 31 – 41. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(67\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0002-9610(67)90037-2).
- Dai, C., Shih, S., Khachemoune, A. (2019). Skin Substitutes for Acute and Chronic Wound Healing: An Updated Review. *Journal of Dermatological Treatment*, 30(6), 569 – 577. <https://doi.org/10.1080/09546634.2018.153043>.
- Dehkordi, A. N., Babaheydari, F. M., Chehelgerdi, M., & Dehkordi, S. R. (2019). Skin Tissue Engineering: Wound Healing Based on Stem-Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(111), 1 – 22. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1212-2>.
- Delmonte, O. M., & Fleisher, T. A. (2019). Flow Cytometry: Surface Markers and Beyond. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 143(2), 528 – 537. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.08.011>.
- Deus, G. C., Normanton, M., Hamerschlak, N., Kondo, A. T., Ribeiro, A. A. F., Goldberg, A. C., & Marti, L. C. (2012). Isolamento e Caracterização de Células-Tronco Mesenquimais de Filtros Reutilizáveis e Descartáveis de Medula Óssea. *Einstein*, 10(3), 296 – 301.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Müeller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy*, 8(4), 315 – 317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz. (2015). Adult Stem Cells: Hopes and Hypes of Regenerative Medicine. *Acta Biochimica Polonica*, 62(3), 329 – 337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023.
- Ferrara, N. (2009). VEGF-A: A Critical Regulator of Blood Vessel Growth. *European Cytokine Network*, 20(4), 158 – 163. <https://doi.org/10.1684/ecn.2009.0170>.
- Gois, T. S., de Jesus, C. V. F., dos Santos, J., de Oliveira, F. S., Feitosa, L., Santana, M. F., da Silva, M. C., da Silva, R. N., & Teles, W. de S. (2021). Fisiopatologia da Cicatrização em Pacientes Portadores de Diabetes Mellitus. *Brazilian Journal of Health Review*, 4(4), 1227 – 1240. <https://doi.org/10.34119/bjhrv4n4-006>.
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(886). <https://doi.org/10.3390/cells8080886>.
- Hendijani, F. (2017). Explant Culture: An Advantageous Method for Isolation of Mesenchymal Stem Cells From

- Human Tissues. *Cell Proliferation*, 50, 1 – 14. <https://doi.org/10.1111/cpr.12334>.
- Herskovitz, I., Hughes, O. B., Macquhae, F., Rakosi, A., & Kirsner, R. (2016). Epidermal Skin Grafting. *International Wound Journal*, 13(3), 52 – 56. <https://doi.org/10.1111/iwj.12631>.
- Hoang, P., & Ma, Z. (2021). Biomaterial-Guided Stem Cell Organoid Engineering for Modeling Development and Diseases. *Acta Biomaterialia*, 132, 23 – 36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.016>.
- Järbrink, K., Ni, G., Sönnergren, H., Schmidtchen, A., Pang, C., Bajpai, R., & Car, J. (2016). Prevalence and Incidence of Chronic Wounds and Related Complications: A Protocol for a Systematic Review. *Systematic Reviews*, 5(1), Article 152. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0329-y>.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells*, 24, 1294 – 1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3 – 10. <https://doi.org/10.1159/000345615>.
- Lee, D. E., Ayoub, N., & Agrawal, D. K. (2016). Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Novel Methods to Increase Cell Delivery and Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(37). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0303-6>.
- Lezmi, E., & Benvenisty, N. (2022). The Tumorigenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 11(8), 791 – 796. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac039>.
- Liu, S., Hou, K. D., Yuan, M., Peng, J., Zhang, L., Sui, X., Zhao, B., Xu, W., Wang, A., Lu, S., & Guo, Q. (2014). Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of Human Umbilical Cord and for Fabrication of Non-Scaffold Tissue-Engineered Cartilage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(2), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.001>.
- Marin, E., Boschetto, F., & Pezzotti, G. (2020). Biomaterials and Biocompatibility: An Historical Overview. *Journal of Biomedical Materials Research*, 108, 1617–1633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>.
- Monteiro, B. S., Neto, N. M. A., & Del Carlo, R. J. (2009). Células-Tronco Mesenquimais. *Ciência Rural*. Santa Maria. ISSN: 0103-8478.
- Müller, P., Lemcke, H., & David, R. (2018). Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(6), 2607 – 2655. <https://doi.org/10.1159/000492704>.
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal Stem Cells: Environmentally Responsive Therapeutics for Regenerative Medicine. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(11), e54. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>.
- Nicoara, A. I., Stoica, A. E., Ene, D. I., Vasile, B. S., Holsan, A. M., & Neacsu, I. A. (2020). In Situ and Ex Situ Designed Hydroxyapatite: Bacterial Cellulose Materials with Biomedical Applications. *Materials*, 13(21), 4793. <https://doi.org/10.3390/ma13214793>.
- Nicolas, J. (2020). 3D Extracellular Matrix Mimics: Fundamental Concepts and Role of Materials Chemistry to Influence Stem Cell Fate. *Biomacromolecules*, 21, 1968–1994. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00045>.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., & Thomson, J. A. (2011). Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*, 19(3), 193 – 204. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.19-3-193>.
- Oliveira, A. C., Rocha, D. M., Bezerra, S. M., Andrade, E. M., Santos, A. M., & Nogueira, L. T. (2019). Qualidade de Vida de Pessoas com Feridas Crônicas. *Acta Paulista de Enfermagem*, 32(2), 194 – 201. <https://doi.org/10.1590/1982-0194201900027>.
- Palaniappan, U., Kannaiyan, J., Paulraj, B., Karupiah, P., Basavarajappa, S., Syed, A., Elgorban, A. M., Zaghloul, N. S., & Veeramanikandan, V. (2023). Combining Mesenchymal Stem Cells Derived From Wharton's Jelly And

- Amniotic Biomaterial Scaffolds for Cell Delivery. *ACS Omega*, 8, 24.351 – 24.361. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01689>.
- Patel, N. R., & Gohil, P. P. (2012). A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2, 91 – 101. ISSN: 2250-2459.
- Pereira, L. V. (2008). A Importância do Uso das Células-Tronco para a Saúde Pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(1), 7–14. <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000100002>.
- Qiu, Y., Qiu, L., Cui, J., & Wei, Q. (2016). Bacterial Cellulose and Bacterial Cellulose-Vaccarin Membranes for Wound Healing. *Materials Science and Engineering C*, 59, 303 – 309. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.016>.
- Ranjbaran, H., Abediankenari, S., Mohammadi, M., Jafari, N., Khalilian, A., Rahmani, Z., Amiri, M. M., & Ebrahimi, P. (2018). Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Médica Iranica*, 56(1), 28 – 33. PMID: 29436792.
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49, 35 – 43. <https://doi.org/10.1159/000339613>.
- Sabapathy, V., Sundaram, B., Sreelakshmi, V. M., Mankuzhy, P., & Kumar, S. (2014). Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Plasticity Augments Scar-Free Skin Wound Healing with Hair Growth. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093726>.
- Saleh, M., Kiaei, S. Z. F., & Kavianpour, M. (2022). Application of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Pulmonary Fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(71). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02746-x>.
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Bhatt, V. D., & Dhot, O. S. (2019). Tissue Engineering: Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life*, 12(3), 225 – 229. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032>.
- Silva, M. A., Leite, Y. K. C., Carvalho, C. E. S., Feitosa, M. L. T., Alves, M. M. M., Carvalho, F. A. A., Neto, B. C. V., Miglino, M. A., Jozala, A. F., & Carvalho, M. M. A. (2018). Behavior and Biocompatibility of Rabbit Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Bacterial Cellulose Membrane. *PeerJ*, 6(e4656). <https://doi.org/10.7717/peerj.4656>.
- Souza, C. M. C. O. (2014). Regeneration of Skin Tissue Promoted by Mesenchymal Stem Cells Seeded in Nanostructured Membrane. *Transplantation Proceedings*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.05.066>.
- Souza, M. T., Silva, M. D., & Carvalho, R. (2010). Revisão Integrativa: O que é e como fazer?. *Einstein (São Paulo)*, 8(1 Pt 1), 102 – 106.
- Souza, V. F. (2003). Células-Tronco: Uma Breve Revisão. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 2(2), 251–256. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v2i2.4292>.
- Sumam, S., Domingues, A., Ratajczak, J., & Ratajczak, M. Z. (2019). Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. In M. Z. Ratajczak (Ed.), *Stem cells: Therapeutic Applications* (pp. 1 – 22). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-31206-0>.
- Sumarta, N. P. M., Kamadjaja, D. B., Hendrijantini, N., Danudiningrat, C. P., & Rantam, F. A. (2021). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Over Platelet Rich Fibrin Scaffold for Mandibular Cartilage Defects Regenerative Medicine. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*. <https://doi.org/10.1590/pboci.2021.020>.
- Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J., & Cetrulo, C. L. (2011). Wharton's Jelly Stem Cells: Future Clinical Applications. *Placenta*, 32, 311 – 315. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.010>.
- Tsiapalis, D., & O'Driscoll, L. (2020). Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Cells*, 9(991). <https://doi.org/10.3390/cells9040991>.

- Vieira, C. P. de B., & Araújo, T. M. E. de. (2018). Prevalência e Fatores Associados a Feridas Crônicas em Idosos na Atenção Básica. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 52, e03415. <https://doi.org/10.1590/S1980-220X2017051303415>.
- Vig, K., Chaudhari, A., Tripathi, S., Dixit, S., Sahu, R., Pillai, S., Dennis, V. A., & Singh, S. R. (2017). Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(789). <https://doi.org/10.3390/ijms18040789>.
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial Cellulose Production, Properties and Applications with Different Culture Methods – A Review. *Carbohydrate Polymers*, 1(219), 63 – 76. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>.
- Wang, X. (2023). Bacterial Cellulose Membrane Combined with BMSC Promotes Wound Healing by Activating the Notch Signaling Pathway. *Frontiers in Surgery*, 16(9). <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.1027067>.
- Weiss, M. L., & Troyer, D. L. (2006). Stem Cells in The Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2(2), 155 – 162. <https://doi.org/10.1007/s12015-006-0022-y>.
- Yarak, S., & Okamoto, O. K. (2010). Células-Tronco Derivadas de Tecido Adiposo Humano: Desafios Atuais e Perspectivas Clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(5), 647 – 656. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000500008>.
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem Cells: Past, Present, and Future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(68). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.

4 CAPÍTULO 2

POTENCIAL DE PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SEMEADAS EM MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA E POLIPROPILENO

Resumo: Na medicina regenerativa, observa-se uma necessidade crescente por novas estratégias terapêuticas que otimizem o tratamento de feridas cutâneas de difícil cicatrização. Nesse contexto, este estudo investiga o uso de células-tronco mesenquimais derivadas da Geleia de Wharton (CTM-GW), devido às suas notáveis propriedades imunomoduladoras e de diferenciação, em associação com arcabouços, a fim de analisar, em um estudo pré-clínico, as características básicas de um material de partida para registro de um futuro produto de terapia avançada, visando a uma restauração tecidual mais previsível e eficiente. Nesta pesquisa experimental, foram realizadas a caracterização celular e a avaliação do comportamento das CTM-GW quanto à adesão, proliferação e viabilidade celular, quando cultivadas sobre arcabouços à base de celulose bacteriana (Membracel[®]) e de polipropileno (BoneHeal[®]), em diferentes densidades. As CTM-GW foram isoladas com sucesso, exibindo perfil mesenquimal e diferenciação em três linhagens. Ambas as membranas suportaram adesão e crescimento celular sem sinais de citotoxicidade. O ensaio de proliferação/viabilidade (*Alamar Blue*[®]) indicou manutenção da viabilidade celular em ambos os arcabouços, embora sem indução de crescimento expressivo. A MCB mostrou maior estabilidade em baixas (7×10^3 células/poço) e médias (1×10^4 células/poço) densidades, com possível limitação proliferativa em alta confluência (5×10^4 células/poço). Já a MP destacou-se proliferativamente nas maiores densidades e em tempos prolongados de cultivo, sugerindo efeito positivo sobre o metabolismo celular. Com base nos resultados *in vitro*, esta abordagem mostra potencial para futuras aplicações em feridas cutâneas de difícil cicatrização, sendo necessária a realização de estudos adicionais que avaliem aspectos clínicos, funcionais e de segurança, bem como a influência das condições de cultivo e das propriedades dos arcabouços.

Palavras-Chave: Arcabouço; Célula-Tronco Mesenquimal; Medicina Regenerativa; Método *In Vitro*.

4.1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são classificadas como células com elevada capacidade de autorreplicação e de diferenciação nos mais diversos tipos de células e tecidos do organismo. Presentes na maioria dos tecidos e órgãos, cumprem desde a função de desenvolvimento embrionário até a reparação de tecidos. Por esse motivo, essas células se tornaram tópicos principais de pesquisa na temática científica contemporânea (ARRUDA, 2018; KOLIOS, 2012; DULAK et al., 2015).

As células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), responsáveis por originar células de todas as três linhagens germinativas, são de grande interesse para estudos em razão de suas características de multiplicação e especialização ilimitadas. Contudo, o uso dessas células traz muitos questionamentos éticos e legais. As potenciais aplicações clínicas das CTE e iPSC ainda são limitadas e, de certa forma, frustrantes, pois podem resultar em uma variedade de complicações, incluindo a possibilidade de rejeição

imunológica, de instabilidade genômica e o risco de formação de teratomas. Por essas razões, ainda não estão disponíveis para uso em terapias regenerativas (ARRUDA, 2018; DULAK et al., 2015; SUMAM et al., 2019).

Em contrapartida, as células-tronco multipotentes (MSC), oriundas de tecidos adultos, diferenciam-se em uma linhagem específica e seu potencial de diferenciação é mais limitado. Mas, por ser um tecido de origem não fetal, trata-se de uma opção mais segura para ser empregada neste tipo de terapia. A monopotência, observada em células como as hematopoéticas (CTH) e as mesenquimais (CTM), age como uma barreira natural contra diferenciações indesejadas, permitindo que sua aplicação seja mais ampla e segura no âmbito clínico (CARVALHO, 2014; DULAK et al., 2015; SUMAM et al., 2019).

Após sua descoberta inicial, as CTM passaram a ser isoladas e caracterizadas a partir de uma variedade de tecidos fetais e adultos. Desde então, os avanços significativos nos estudos envolvendo esse tipo celular proporcionou maior visibilidade e espaço para pesquisas, em decorrência ao seu potencial terapêutico e aos resultados satisfatórios já vistos na recuperação de múltiplos graus de lesões (ARRUDA, 2018; MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

Na engenharia tecidual, as CTM representam uma importante estratégia terapêutica quando associadas a arcabouços, que fornecem um ambiente tridimensional apropriado para o cultivo e a diferenciação celular. Além disso, quando combinados às estratégias da terapia celular, exibe-se o potencial desses arcabouços quanto à sua capacidade de modular as respostas teciduais locais, promover o reparo anatômico da região afetada e oferecer suporte mecânico funcional, colaborando para um modelo de tratamento mais avançado (ISA *et al.*, 2022; MARTÍN-DEL-CAMPO; ROSALES-IBAÑES; ROJO, 2019).

Os suportes tridimensionais desempenham um papel essencial no reparo de tecidos danificados, atuando como sistemas avançados de entrega celular. Ele têm como função apoiar o transplante de células-tronco para a regeneração de células nativas em áreas teciduais afetadas por lesões de mínimas a graves, incluindo casos pontuais ou crônicos que afetem a pele (DAVIS *et al.*, 2018; ISA *et al.*, 2022; MARTÍN-DEL-CAMPO; ROSALES-IBAÑES; ROJO, 2019).

Nesse contexto, compreender a relação comportamental das CTM junto ao arcabouço, com foco na terapia regenerativa, é indispensável para fornecer informações valiosas sobre os mecanismos celulares, otimizar as condições de cultivo e contribuir para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros para aplicação clínica. Com isso, explorou-se a aderência e a viabilidade da utilização das células caracterizadas obtidas de Geleia de Wharton (CTM-GW) quando semeadas em combinação com membranas comerciais de celulose bacteriana e

polipropileno. A análise se concentrou na investigação das condições ideais de cultivo, e do potencial dessas células para aplicação em terapias celulares regenerativas.

Curar feridas representa um desafio significativo na rotina hospitalar e, considerando a susceptibilidade da região às possíveis infecções e traumas durante o tratamento, existe a dificuldade de cicatrização dessas lesões, com destaque para os casos em que manter o curativo protetor sobre a região lesionada é custoso. Até o momento, o mercado farmacêutico ainda busca por uma solução terapêutica eficaz que aumente a previsibilidade e acelere a cicatrização de tais feridas.

As CT são caracterizadas por seu potencial de diferenciação ilimitado, capacidade de autorrenovação e resposta a estímulos externos, o que lhes permitem originar várias linhagens celulares e tipos teciduais. Em suas superfícies, encontram-se receptores e moléculas que possibilitam a interação celular e, em razão dessa comunicação, executam funções distintas no organismo. Essas características celulares favorecem o surgimento de novos estudos voltados ao seu poder reparador e regenerativo (PEREIRA, 2008; SOUZA et al., 2003).

Com o intuito de minimizar a morbidade provocada pelas lesões e conhecendo a potencialidade das CT, cita-se o benefício do uso da terapia celular avançada, a qual é definida como o "produto biológico, utilizado com fins terapêuticos, obtido a partir de células e tecidos humanos que foram submetidos a um processo de fabricação..." segundo a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 505 de 2021 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). De acordo com a referida resolução, o produto consiste no conjunto de um material de partida, denominado como arcabouço, associado às CT. Neste foco, busca-se o desenvolvimento de um produto de terapia avançada seguro e eficiente, capaz de colaborar para a regeneração ou o reparo tecidual em feridas de difícil cicatrização, especialmente em pacientes oncológicos, diabéticos, queimados e acometidos por outras patologias (MÜELLER; LEMCKE; DAVID, 2018).

O objetivo deste estudo foi analisar a interação de células-tronco mesenquimais humanas provenientes da Geleia de Wharton (CTM-GW) com os arcabouços comerciais Membracel[®] (celulose bacteriana) e *BoneHeal*[®] (polipropileno), visando caracterizar o comportamento celular e verificar a biocompatibilidade dos arcabouços.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

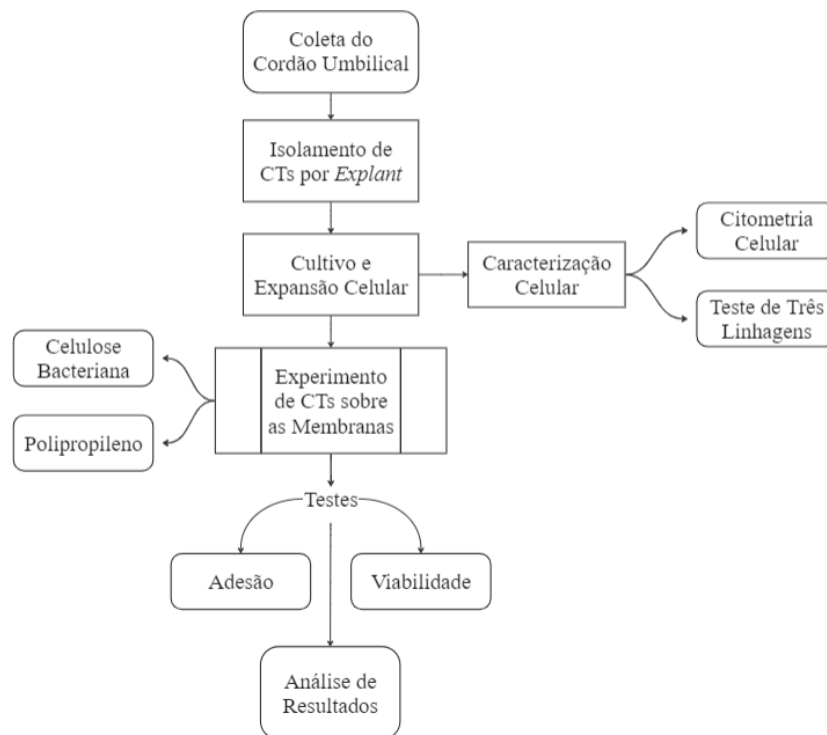
Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo (Parecer: 4.891.662; CAAE: 45671021.3.0000.0093), conforme visto no Anexo I. Além de

contar com financiamento parcial do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 440755/2022-0).

4.2.1 Desenho do Estudo

Na Figura 1 abaixo, está representado o fluxograma cronológico com a descrição das etapas metodológicas adotadas no experimento, contemplando desde os procedimentos iniciais de obtenção e preparo até as fases finais de análise dos resultados deste estudo.

Figura 1. Fluxograma Cronológico do Experimento Prático



Fonte: Foto do Autor, 2025.

4.2.2 Obtenção e Caracterização das Células

Para a obtenção das células, três gestantes saudáveis, com acompanhamento de pré-natal e painel sorológico negativo, concordaram em participar desta pesquisa, doando os cordões umbilicais que comumente são destinados ao descarte após o nascimento da criança. Todos os detalhes referentes ao presente projeto foram repassados às gestantes por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme visto no Anexo II. A coleta do cordão compreendeu de 12 a 15 cm da porção proximal, extremidade mais próxima ao neonato, e

também da distal, mais próxima à placenta. Em tempos diferentes, esse processo foi realizado nos três cordões umbilicais doados.

Os fragmentos de tecido foram divididos em três tubos Falcon[®] (Greiner[®], Kremsmünster, Áustria) contendo 30 mL de Meio para Transporte ou MT [Meio de *Eagle* Modificado por *Dulbecco* ou DMEM de Baixa Glicose com L-Glutamina e Piruvato Sólido (Gibco[®], New York, EUA) + 1% de Solução Antifúngica e Antibiótica (Gibco[®], New York, EUA)]. Em seguida, os frascos foram fechados, vedados com *Parafilm*[®] e identificados com as informações da paciente doadora e do neonato.

Após a coleta, os tubos com os tecidos coletados foram acomodados na embalagem secundária, e acondicionados em caixa de transporte plástica térmica refrigerada à 4°C. Então, enviados até o CPC (Centro de Processamento Celular) da Curityba Biotech para dar início ao processamento das amostras.

As amostras foram manipuladas dentro da Cabine de Segurança Biológica do Tipo II (Telstar Bio II *Advance*, *Dickinson and Company*, Franklin Lakes, EUA), de ISO 5, instalada em Sala Limpa, de classificação ISO 7. Para o isolamento das CT, realizou-se a técnica de explante, cujas etapas podem ser visualizadas no Apêndice B.

As amostras de cordão umbilical humano foram lavadas 3 vezes com Salina Tamponada com Fosfato Livre de Cálcio e Magnésio ou PBS (Gibco[®], New York, EUA) e massageadas manualmente até a eliminação total do sangue presente nos vasos sanguíneos. Depois, foi realizado um corte longitudinal ao longo do cordão umbilical para a posterior remoção dos vasos. Após dissecação, os cordões foram fragmentados em pedaços de cerca de 1 mm² e dispostos sobre uma placa de cultivo de 6 poços, mantendo um espaçamento de aproximadamente 1 cm² entre eles (Apêndice C).

As placas foram mantidas na incubadora (MCO-170AC/CULV-PA, *Panasonic Corporation*, Tóquio, Japão) a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado por 20 minutos para permitir a aderência dos explantes ao fundo do plástico. Inicialmente, foram cultivadas oito placas, sendo que metade foi destinada à coleta da região proximal do cordão umbilical e a outra metade à coleta da região distal. Subsequentemente, em cada placa de cultivo isolada, foram adicionados 3 mL de Meio de Cultivo Suplementado (MCS) [5% de Soro Fetal Bovino ou SFB (Nova Biotecnologia[®], São Paulo, Brasil) + 1% de Solução Antimicótica e Antibiótica (Gibco[®], New York, EUA) + Meio de *Eagle* Modificado por *Dulbecco* ou DMEM de Baixa Glicose com L-Glutamina e Piruvato Sólido (Gibco[®], New York, EUA)] sutilmente, para evitar o descolamento dos fragmentos. Esse momento é denominado de

passagem zero (P0). Em seguida, realizou-se a identificação das amostras de acordo com a região do tecido isolada, e essas foram novamente incubadas por mais 48 horas nas condições descritas anteriormente. Após esse período, iniciou-se o processo de trocas de MCS. Os substratos utilizados foram removidos e substituídos por novos, permitindo a eliminação gradual das células mortas e não aderidas. As manutenções foram feitas duas vezes na semana e, por meio de análises de microscopia invertida (AE31E MOTIC, Xiamen, China), o crescimento celular foi acompanhado e registrado via fotografias até atingirem uma confluência mínima de 70%. Em nenhuma amostra manipulada foram observados sinais macroscópicos de contaminação, e as células demonstravam morfologia adequada e compatível com CTM (Silva et al., 2018).

Por volta do décimo dia após os processamentos, os fragmentos de explante foram removidos das placas de cultivo devido à constatação celular em todos os poços. No entanto, as células ainda apresentavam baixa confluência e foram mantidas por mais alguns dias em expansão. Quando obtida a elevada confluência celular, as células foram submetidas ao processo de passagem celular, que consiste na redistribuição das células para evitar a superlotação e permitir a manutenção da proliferação em densidades adequadas.

As primeiras passagens (P1) ocorreram dentro de um mês, quando se registrou um volume celular suficiente para plaqueamento em garrafas de cultivo de 75 cm² ou T75. Para a execução das passagens, as placas de cultivo contendo as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS (Gibco[®], New York, EUA). Posteriormente, em cada uma foram adicionados 1,5 mL de *TrypLE Express* (Gibco[®], New York, EUA) e incubadas na estufa a 37°C por 5 minutos, para que as células desprendessem da placa. Finalizado o tempo, utilizou-se uma quantidade igual de MCS para neutralizar o efeito da enzima e prosseguiu-se com a centrifugação a 1.500 rpm por 10 minutos. Logo após, desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas novamente em 1 mL de MCS. A partir desta suspensão, as células foram preparadas para serem contabilizadas e distribuídas em garrafas de cultivo (Apêndice D).

As células foram quantificadas em Câmara de Neubauer (SIGMA[®]/Merck, Darmstadt, Alemanha) em uma mistura preparada na proporção de 1:1, combinando 10 µL da suspensão celular com 10 µL de corante vital Azul de *Trypan* 0,4% (Gibco[®], New York, EUA) e de uma lamínula responsável por fornecer a profundidade correta sobre a área demarcada. Essa mistura foi observada inicialmente sob o microscópio invertido (AE31E MOTIC, Xiamen, China) com ampliação de 10× e, em seguida, as células foram contadas com ampliação de 40×, nos quatro quadrantes (Apêndice E). Para o processo de contagem celular foi utilizada a seguinte equação:

$$n^{\circ} \text{ de } \frac{\text{células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000.$$

Este resultado indica, naquela amostra, a quantidade total de células em determinado volume. A partir do valor obtido, é possível estipular a quantia ideal de garrafas que deverão ser distribuídas para permitir a expansão celular de forma adequada. Estima-se que uma confluência inicial de 30% seja um volume satisfatório para uma nova garrafa.

A seguir, para cada frasco de cultivo de 75 cm², as células foram cultivadas na concentração de 2,5 x 10⁵ células e complementadas com 12 mL de MCS para, no mesmo instante, serem incubadas a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado. Nos próximos dias, realizaram-se as suplementações e/ou trocas de meio até haver confluência suficiente para a execução das próximas passagens celulares, a fim de se obter um volume celular ideal para os experimentos. As células isoladas foram uniformemente distribuídas em 12 garrafas T75 da região distal e 15 garrafas T75 da região proximal.

Em seguida, as amostras foram amplificadas até se obter o número celular desejado para as análises fenotípicas, de diferenciação celular e demais testes. As células remanescentes foram criopreservadas em nitrogênio líquido, seguindo o protocolo de congelamento celular da Curityba Biotech: 10% de Dimetilsulfóxido ou DMSO (*OriGen Biomedical*[®], Austin, EUA), agente crioprotetor que evita a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento, com SFB (Nova Biotecnologia[®], São Paulo, Brasil). As células passaram a ser descongeladas de acordo com as necessidades de cada tipo de teste a ser realizado.

Para a realização dos testes, as células criopreservadas em P4 foram primeiramente descongeladas, com os criotubos colocados em banho-maria (*SolidSteel*[®], Piracicaba, Brasil) a 37 °C, realizando-se movimentos circulares até o completo degelo. Em seguida, procedeu-se à inativação do DMSO (*OriGen Biomedical*[®], Austin, EUA) em meio MCS contendo 5% de SFB (Nova Biotecnologia[®], São Paulo, Brasil) e 1% de Solução Antibiótica e Antifúngica (*Gibco*[®], New York, EUA).

A solução foi centrifugada (K14-0815C, *KASVI*[®], São Paulo, Brasil) na velocidade de 1.500 rpm por 10 minutos e, em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em meio MCS. Avaliou-se a viabilidade celular por meio da contagem em Câmara de Neubauer (*SIGMA*[®]/Merck, Darmstadt, Alemanha) e os resultados foram satisfatórios, com valores superiores a 90%. As células foram transferidas para garrafas de cultivo celular T75 e incubadas (MCO-170AC/CULV-PA, *Panasonic Corporation*, Tóquio, Japão) a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado até que a expansão celular alcançasse o volume necessário para o semeadura nas placas de cultivo apropriadas.

As manutenções celulares foram realizadas por aproximadamente sete dias, até as células obterem uma confluência variável entre 70 e 80%. Quando esse nível foi alcançado, são despreendidas do substrato plástico usando o *TrypLE Express* (Gibco[®], New York, EUA) e, em seguida, inativadas e quantificadas. As células foram então distribuídas nas placas de cultivo conforme o protocolo experimental.

Para a caracterização imunofenotípica das CTM, os seguintes marcadores celulares foram utilizados: CD34, CD45, CD14/CD11b, CD73, CD79a/CD19, CD90, CD105, HLA-DR e 7-AAD, sendo este último aplicado para quantificação de viabilidade celular (Apêndice F). O processamento foi realizado no Laboratório de Citometria do Hospital Erasto Gaertner (Curitiba, Brasil) no Citômetro de Fluxo BD FACS Canto II, de 8 Cores, e BD FACS *Lytic*, de 12 Cores (San Jose, EUA); e *software Infinicyt* (San Jose, EUA).

Parte das células previamente multiplicadas foram descongeladas e filtradas em *Cell Strainers* com porosidade de 70 µm (Greiner[®], Kremsmünster, Áustria), sendo ressuspensas em MCS, na concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL de solução, e enviadas em tubo cônico de 15 mL (células em P4) ao Laboratório. As análises foram realizadas com a exclusão das células mortas, identificadas pelo corante 7AAD. Além disso, detritos celulares e resíduos foram removidos por meio de gráficos de dispersão, utilizando os parâmetros FSC (Forward Scatter) e SSC (Side Scatter) para distinguir células viáveis de outras possíveis interferências presentes na amostra. A análise FSC-A (Área) x FSC-H (Altura) foi utilizada para excluir células agregadas, assegurando que apenas células individuais fossem incluídas. Em conjunto, essas abordagens garantiram que somente células viáveis e relevantes fossem consideradas nos resultados finais.

4.2.3 Diferenciações Celulares

A adipogênese foi induzida pela adição de meio adipogênico comercial *StemPro Adipogenesis Differentiation Kit*[®] (GIBCO[®], Waltham, EUA), e a diferenciação realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

Em placas de 24 poços, as células que estavam em P4 foram semeadas em concentração de 1×10^4 células/mL em cada poço contendo 500 µL de MCS e, posteriormente, incubadas a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado.

Após duas horas, o meio da placa foi substituído pelo Meio de Diferenciação (MD) nos poços contendo as células, enquanto os poços de controle permaneceram com o uso do MCS. A troca do meio foi realizada duas vezes por semana e mantida por um prazo de 14 dias. Após

esse período, as células foram fixadas em temperatura ambiente (TA) com a solução de Formaldeído 4% (Merck/Millipore[®], Billerica, EUA) por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a coloração com *Oil Red* (Sigma[®], Billerica, EUA), também em TA por 6 minutos, para avaliar o acúmulo de lipídios no interior das células (DEUS et al., 2012).

A condrogênese foi induzida pela adição de meio condrogênico comercial *StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit*[®] (GIBCO[®], Waltham, EUA), e a diferenciação realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

Em placas de 24 poços, as células que estavam em P4 foram preparadas em culturas de micromassa no volume de 5 µL da solução celular e semeadas na concentração de $1,6 \times 10^7$ células/mL no centro dos poços. Assim, permaneceram por 2 horas incubadas em 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado.

Logo após, o MD foi adicionado aos poços contendo as células, enquanto os poços de controle permaneceram com o uso do MCS. A troca do meio foi realizada duas vezes por semana e mantida por um prazo de 14 dias. Após esse período, as células foram fixadas em TA com a solução de Formaldeído 4% (Merck/Millipore[®], Billerica, EUA) por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a coloração com Azul de Alcian (Sigma[®], Billerica, EUA) por 30 minutos, seguida de três lavagens com solução 0.1N de Ácido Clorídrico ou HCL (Dinâmica[®], Indaiatuba, Brasil). A coloração indica a síntese de proteoglicanas, macromoléculas encontradas no tecido conjuntivo e produzidas pelos condrócitos (DEUS et al., 2012).

A osteogênese foi induzida pela adição de meio osteogênico comercial *StemPro Osteogenesis Differentiation Kit*[®] (GIBCO[®], Waltham, EUA), e a diferenciação realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

Em placas de 24 poços, as células que estavam em P4 foram semeadas em concentração de 5×10^3 células/mL em cada poço contendo 500 µL de MCS e, posteriormente, incubadas a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado.

Após 2 horas, o meio da placa foi substituído pelo MD nos poços contendo as células, enquanto os poços de controle permaneceram com o uso do MCS. A troca do meio foi realizada duas vezes por semana e mantida por um prazo de 21 dias. Após esse período, as células foram fixadas em TA com a solução de Formaldeído 4% (Merck/Millipore[®], Billerica, EUA) por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a coloração com Alizarina Vermelha (Sigma[®], Billerica, EUA), que permitirá detectar o surgimento de mineralização nas células (DEUS et al., 2012).

4.2.4 Ensaio de Adesão Celular (Cristal Violeta)

O ensaio colorimétrico Cristal Violeta (CV) foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Saotome, Morita e Umeda (1989), sendo utilizado para avaliar a adesão celular por meio da marcação de DNA.

Nas primeiras manutenções da cultura, é comum que algumas células morram e sejam removidas da população do cultivo, em decorrência do seu desprendimento do substrato. Essas células não aderentes não são capazes de capturar o CV da mesma forma que as células vivas aderentes e, portanto, há uma redução na quantidade de corante ligado e menor coloração visível. Isso fornece uma medida indireta da quantidade de morte celular (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; SANTHANALAKSHMI; BALAJI, 2001).

O plaqueamento foi realizado com células semeadas sobre os arcabouços de celulose bacteriana (MCB) e de polipropileno (MP) nas densidades de 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/cm² (Apêndice G). Os volumes correspondentes foram distribuídos na placa de cultivo, contemplando os controles e as triplicatas, em poços contendo fragmentos de aproximadamente 1 cm² de cada membrana testada.

As suspensões contendo as concentrações definidas de células foram acomodadas no centro de cada membrana, e a placa incubada por 20 minutos a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado, para promover a adesão celular aos arcabouços. Em seguida, os poços foram brandamente completados com 500 µL de MCS, e a placa novamente incubada nas mesmas condições por 7 dias, sendo o MCS substituído no terceiro dia de plaqueamento.

Para o processo de coloração, o MCS foi removido e a placa cuidadosamente lavada duas vezes com PBS (Gibco[®], New York, EUA), a fim de se evitar que a monocamada de células fosse atingida e para permitir a remoção de resíduos. Em seguida, adicionou-se 500 µL do Cristal Violeta 0,5% (NewProv[®], São Paulo, Brasil) em cada poço e realizada a incubação por 20 minutos à TA, em um agitador de bancada com frequência de 20 oscilações por minuto. Assegura-se que o volume seja ≥ 300 µL por poço para evitar efeitos de evaporação. Finalizado o tempo, a placa foi lavada quatro vezes com PBS (Gibco[®], New York, EUA) para remover o excesso de corante não aderido às células e, logo após, foi deixada para secar naturalmente por um período mínimo de 2 horas, também à TA (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; HEYMOVSKI et al., 2021).

O corante foi eluído com 200 µL de Álcool Metílico (Synth[®], Diadema, Brasil) em cada poço e incubado nas mesmas condições anteriores. Concluída a coloração, as células estavam prontas para serem observadas no microscópio (AE31E MOTIC, Xiamen, China), para

visualização de suas características morfológicas (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986; HEYMOVSKI et al., 2021).

4.2.5 Ensaio de Proliferação, Viabilidade e Citotoxicidade (*Alamar Blue*[®])

Para o ensaio de *Alamar Blue*[®] (Invitrogen[®], Waltham, EUA), utilizou-se o corante azul não fluorescente denominado resazurina, que, após ser metabolizado pelas células, é reduzido à resuforina, mudando para um rosa altamente fluorescente (Apêndice H). Há décadas, ele é usado nos mais distintos estudos de viabilidade celular e citotoxicidade em uma variedade de sistemas biológicos. É uma ótima escolha por ser solúvel em água, estável em meio de cultura, não tóxico e permeável através das membranas das células. Portanto, permite o monitoramento contínuo de células em cultura (BONNIER, 2015; RAMPERSAD, 2012).

Para o plaqueamento das três variáveis genéticas em quadruplicatas, as células foram quantificadas para alcançar densidades de 7×10^3 , 1×10^4 e 5×10^4 células/cm² (Apêndice I). Esses volumes foram distribuídos adequadamente entre as quadruplicatas de controles e nos poços com as membranas a serem avaliadas. As suspensões contendo as concentrações definidas de células foram acomodadas no centro de cada poço e as placas incubadas por 20 minutos à 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado, para promover a adesão celular. Em seguida, foram introduzidos aos poços, exceto nos controles, os insertos com porosidade de 3,0 µm (Greiner[®], Kremsmünster, Áustria) contendo os arcabouços de celulose bacteriana (MCB) e de polipropileno (MP), de forma a manterem contato indireto com as células. Das placas preparadas, os poços foram suavemente completados com 500 µL de MCS contendo 10% de volume do indicador azul de *Alamar Blue*[®], segundo as recomendações do fabricante.

Seguida a adição do corante, as placas foram protegidas da luz e acondicionadas em caixas de transporte para serem encaminhadas ao Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado em Curitiba/PR. Estando lá, foram mantidas incubadas a 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado por 24 horas. No dia seguinte, iniciou-se as leituras de fluorescência nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, mensuradas por espectrofotometria (INFINITE M200 TECAN, Männedorf, Suíça), nos comprimentos de onda variantes de 560 e 590 nm (RISS et al. 2016).

Conforme as leituras eram realizadas, os dados coletados eram compilados no Excel[®] pela facilidade que o programa propõe em organizar e manipular grandes conjuntos de

informações de maneira efetiva. Posteriormente, os registros foram inseridos no *software GraphPad Prism*[®] (Versão 10, San Diego, EUA) para a elaboração dos gráficos e consecutiva análise estatística, garantindo a precisão e clareza na apresentação dos resultados.

4.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O plaqueamento para MEV foi realizado em duplicata na placa de 24 poços. Foram semeadas células sobrepostas à celulose bacteriana (MCB) e polipropileno (MP), nas concentrações de 7×10^3 e 1×10^4 células/poço, respectivamente. Em seguida, as placas foram incubadas à 37°C (+/- 2°C), 5% de CO₂ e 95% de ar saturado umidificado por um período de 7 dias, até haver adesão e migração celular.

Para a fixação do material, as placas foram lavadas com PBS e, logo após, adicionada a solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5% e Paraformaldeído 4% em Tampão de Fosfato 0,2M) por 40 minutos. Posteriormente, os poços contendo as amostras foram novamente lavados em Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4).

Em seguida, as amostras foram submetidas à sequência de desidratação em álcool em série de 30, 50, 70, 80, 95 e 100%, com intervalos de 10 minutos entre as trocas, sendo realizada duas passagens na última concentração, no mesmo intervalo de tempo. Logo após, as lamínulas foram submetidas à secagem ao ponto crítico (*Critical Point Dryer*, BAL-TEC, CPD 010, Balzers, Liechtenstein). Em seguida, as células foram metalizadas (SCD 030, Balzers, Liechtenstein) e analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura Vega 3 (TESCAN, Brno, República Tcheca), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

4.2.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância de dois fatores (*Two-Way ANOVA*), seguida pelo Teste *Post Hoc* de *Tukey*, utilizando o *software GraphPad Prism 6* (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Os níveis de significância foram estabelecidos como: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), e $p \leq 0,0001$ (****). A ausência de asteriscos indica ausência de significância estatística ($p > 0,05$).

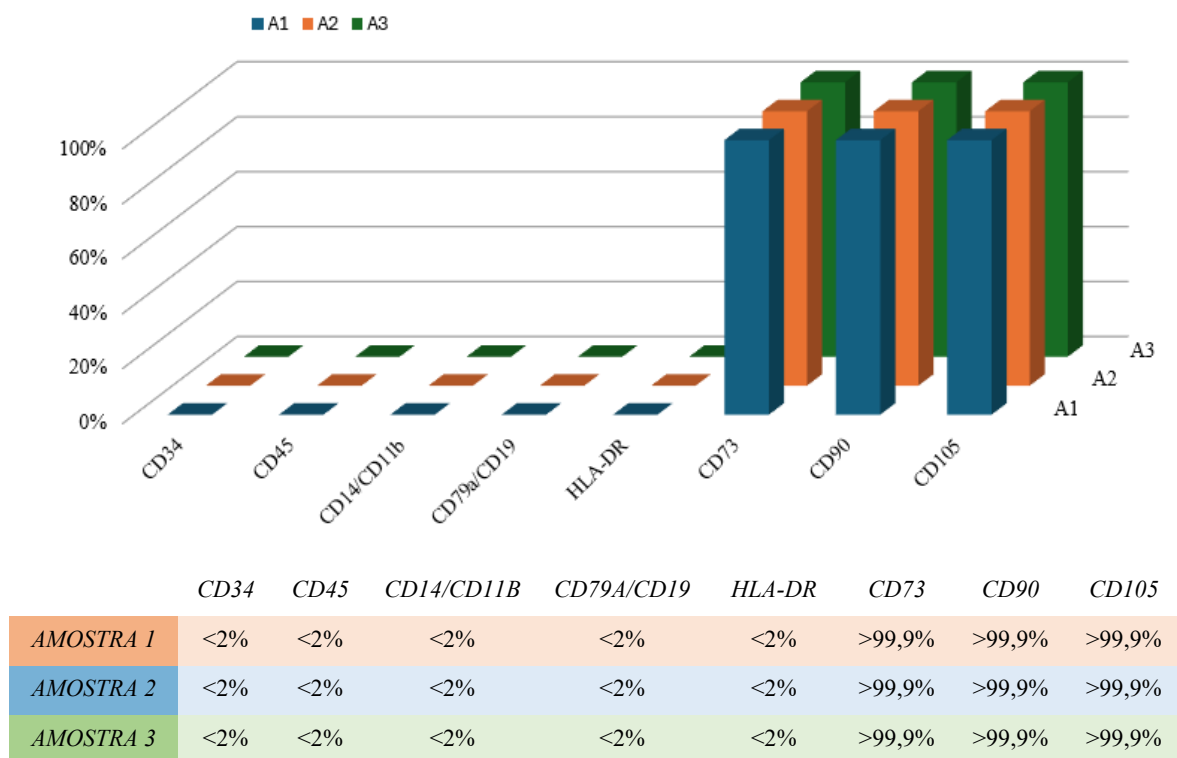
4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização das CTM

A adesão das células ao plástico foi observada durante o período de cultivo inicial, confirmando a capacidade das células de se fixarem ao substrato, característica fundamental de células mesenquimais.

De acordo com os padrões estabelecidos pela SITC, os marcadores devem ser expressos acima de 70% para CD105, CD73 e CD90, e abaixo de 2% para CD34, CD45, CD14/CD11b, CD79a/CD19 e HLA-DR (DEUS et al., 2012; DOMINICI, 2006). Os resultados observados nas três amostras analisadas no experimento exibiram uma alta expressão dos marcadores CD73, CD90, CD105, com 99,9% das células apresentando positividade para esses antígenos, representando um excelente indicativo da identidade mesenquimal dessas células (Figura 2).

Figura 2. Expressão dos Marcadores Avaliados na Caracterização das CTM-GW.



Fonte: Autor, 2025.

Legenda: “A1”, “A2” e “A3” representam os resultados da análise de 3 amostras de CTM isoladas de cordões umbilicais distintos, provenientes de doadores geneticamente não relacionados.

A ausência de expressão significativa dos marcadores CD34, CD45, CD14/CD11b e CD79a/CD19, todos com níveis inferiores a 2%, indica a inexistência de características

associadas às populações hematopoéticas, linfocitárias e endoteliais, validando o perfil mesenquimal da população celular analisada. O potencial imunomodulador das CTM também é confirmado com a ausência do marcador HLA-DR, relacionado à ativação imunológica, realçando sua adequação para aplicações terapêuticas, especialmente em contextos que demandam propriedades imunossupressoras (MONTEIRO, NETO e CARLO, 2009; BYDLOWSKI et al., 2009; DEUS et al., 2012).

4.3.2 Diferenciação Celular: Adipócitos, Condrócitos e Osteoblastos

Neste ensaio, as três amostras distintas de CTM-GW foram induzidas à diferenciação de acordo com as recomendações do fabricante do reagente. Os resultados obtidos demonstraram, com sucesso, a evidência da identidade mesenquimal das células analisadas em adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

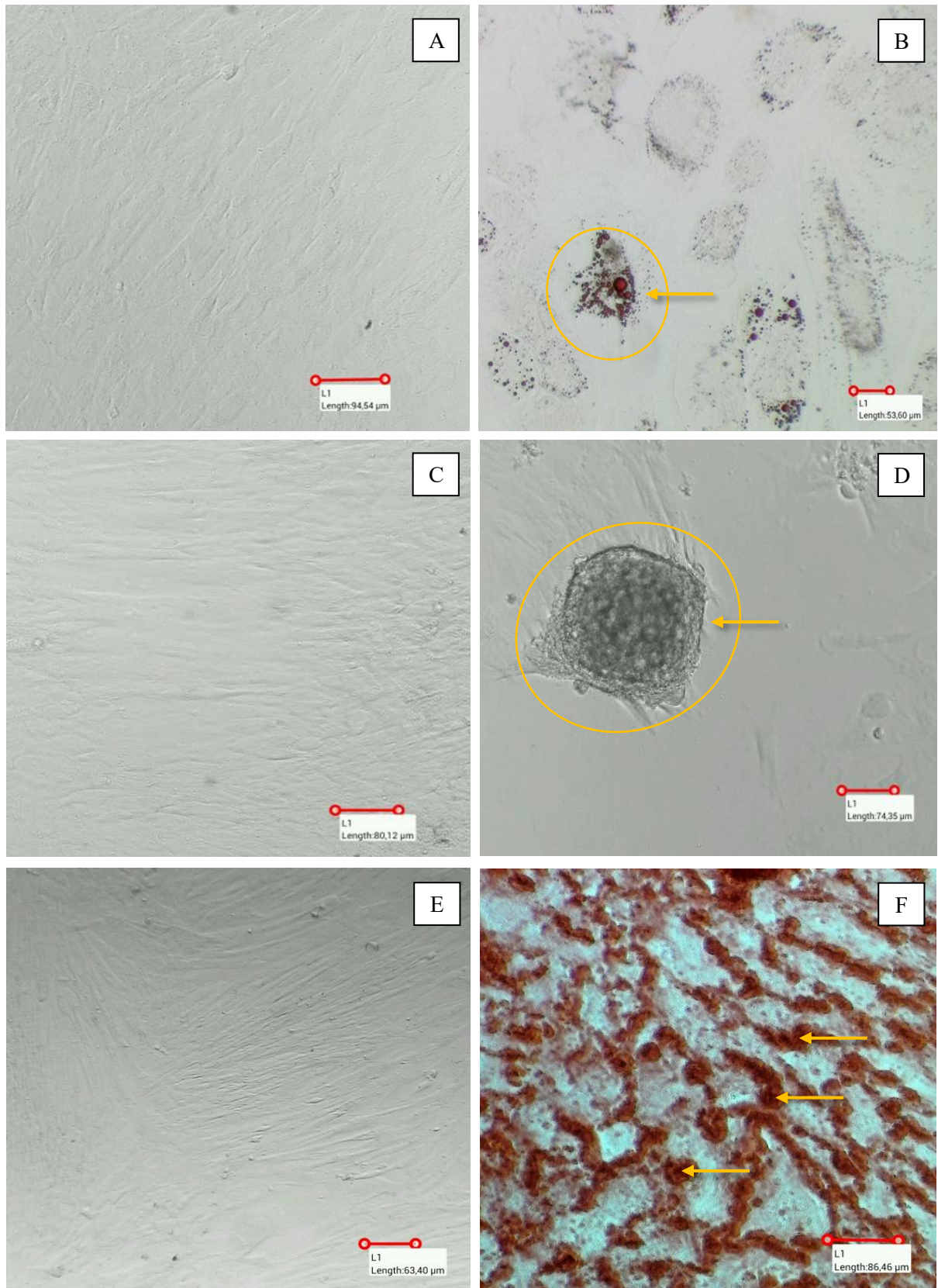
O período de incubação para a diferenciação adipogênica foi de 14 dias, como recomendado pelo fabricante. Contudo, antes deste prazo, foi possível visualizar a presença de estruturas intracelulares similares a vesículas lipídicas, características típicas de adipócitos. A coloração específica realizada confirmou a formação de lipídeos, uma vez que estas apresentavam aspecto birrefringente e coloração avermelhada, como visualizado na Figura 3B (DEUS et al., 2012).

Esses resultados são semelhantes aos descritos por Sobh (2014), que identificou a presença de vesículas lipídicas nas células já no sétimo dia de cultivo *in vitro*, com progressivo aumento da diferenciação ao longo do tempo. Por outro lado, Valente et al. (2020) relataram que a evidência de vacúolos de gordura nas células diferenciadas foi observada apenas a partir do 16º dia, destacando a variação temporal no processo.

A diferenciação condrogênica também seguiu o período de incubação de 14 dias, conforme as recomendações do fabricante. Apesar de a coloração não ter revelado a tonalidade azul esperada, fator que pode ser atribuído à intensidade ou condições próprias do processo, a análise da morfologia celular das matrizes cartilaginosas foi suficiente para confirmar a presença e a organização dos condrócitos no tecido analisado, permitindo sua identificação nítida, como visto na Figura 3D.

A consistência do padrão morfológico e o acúmulo de proteoglicanos no citoplasma e na matriz extracelular foram semelhantemente observado por Alves et al. (2016) após os 21 dias de cultivo em meio condrogênico.

Figura 3. Evidência da Diferenciação Adipogênica, Condrogênica e Osteogênica de CTM-GW, em 10×.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: As imagens ilustram a diferenciação trilinear de CTM-GW após o cultivo. A imagem “A” representa o controle sem indução adipogênica, enquanto “B” exibe vesículas lipídicas coradas em vermelho com *Oil Red*,

caracterizando a diferenciação adipogênica. A imagem “C” mostra o controle sem indução condrogênica, e “D” evidencia matriz cartilaginosa, indicando diferenciação condrogênica. Já “E” corresponde ao controle sem indução osteogênica, e “F” revela depósitos de cálcio na matriz extracelular corados em vermelho com Alizarina Vermelha, confirmando a diferenciação osteogênica.

A diferenciação osteogênica respeitou o período de 21 dias, conforme estabelecido pelo fabricante. Essa incubação das CTM-GW foi confirmada pela coloração específica, que detectou a mineralização nas células, vista na Figura 3F. A atividade metabólica realizada pelas células diferenciadas foi caracterizada pela presença da cor vermelha, indicativa do depósito de cálcio na matriz extracelular (DEUS et al., 2012).

A diferenciação bem-sucedida com o meio de indução osteogênico foi relatada por outros autores, como Giuliani et al. (1998) e Quiroz et al. (2008), que demonstraram resultados de nódulos mineralizados positivos para a coloração também a partir do 21º dia. No presente trabalho, os controles sem indução adipogênica, condrogênica e osteogênica mantiveram um fenótipo não diferenciado para adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

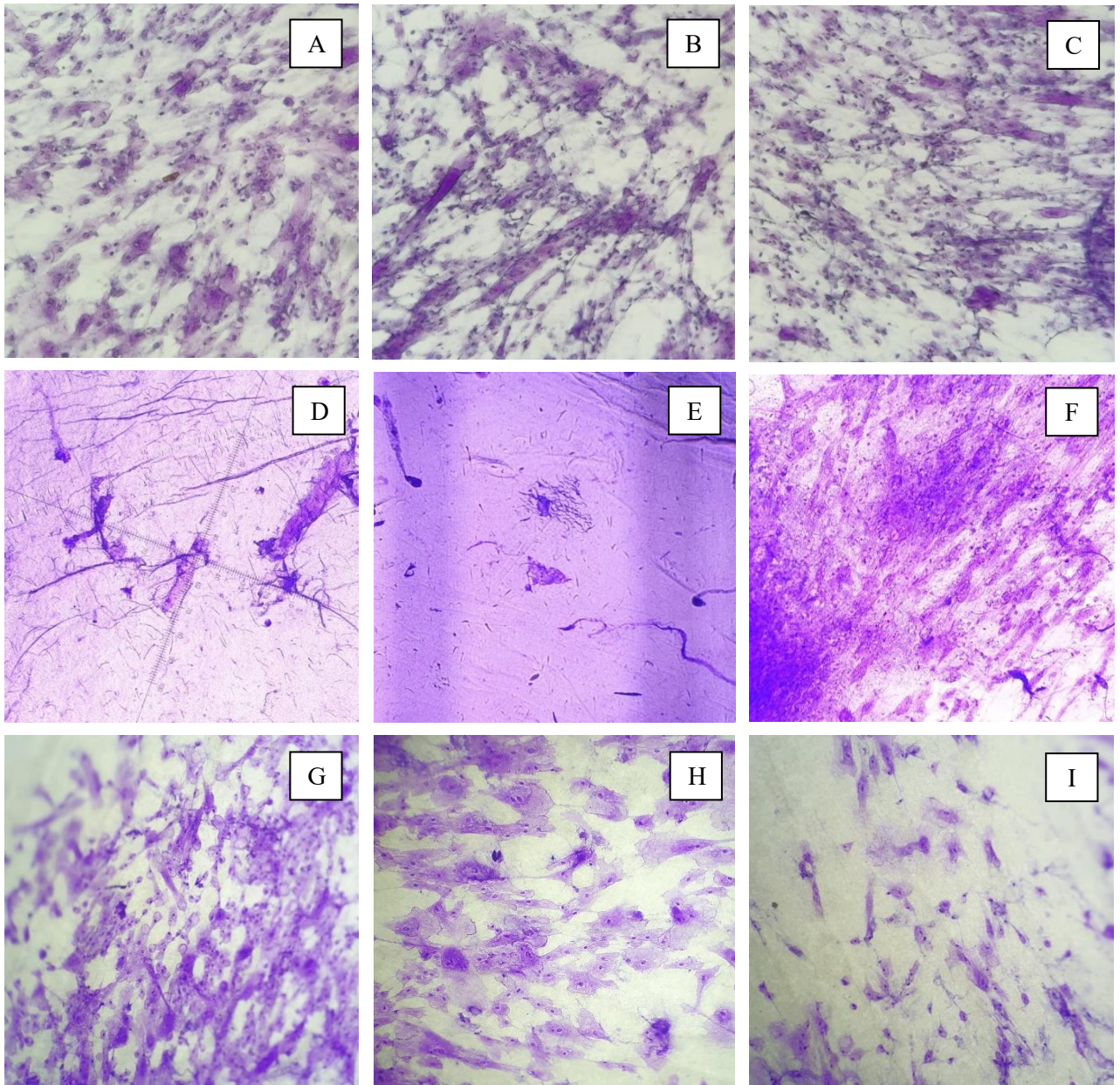
4.3.3 Avaliação da Adesão Celular (Cristal Violeta)

Segundo Feoktistova, Geserick e Leverkus (2016), o método de Coloração com Cristal Violeta é simples e eficaz para detectar a adesão das células, uma vez que o corante é capaz de se ligar às proteínas e ao DNA. Essa afirmação foi confirmada como verdadeira quando, por meio das análises microscópicas, revelou-se que as células estavam satisfatoriamente coradas e fixadas ao longo de toda a extensão das membranas, nas três densidade populacionais testadas. Por isso, para triagem de adesão e viabilidade celular deste estudo, esse ensaio mostrou-se rápido e versátil sob várias condições de estimulação.

Nos três controles analisados, com quantidades celulares crescentes de 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/poço, os resultados apresentados foram satisfatórios, com a presença evidente do crescimento consistente das células, visto nas respectivas densidades nas Figuras 4A, 4B e 4C. O controle com a maior concentração celular apresentou a maior taxa de expansão, indicando que o aumento da proliferação foi proporcional à concentração inicial de células.

Além dessa constatação, evidenciou-se preservação das estruturas celulares e a presença de células em atividades mitóticas tanto nas membranas de celulose bacteriana (MCB) quanto nas membranas de polipropileno (MP), demonstrando que ambas são atóxicas em relação às células. No entanto, com base na inspeção visual, a MP demonstrou melhor densidade celular quando comparada à MCB.

Figura 4. Imagens representativas de CTM-GW nas densidades de 7×10^3 (A, D e G), 1×10^4 (B, E e H) e 5×10^4 (C, F e I) células/poço, correspondentes aos grupos Controle (A – C), MCB (D – F) e MP (G – I), obtidas a $40\times$ de aumento.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: Observa-se adesão eficiente, confluência adequada e distribuição homogênea das CTM-GW nos controles, nas densidades de 7×10^3 (A), 1×10^4 (B) e 1×10^5 (C) células/poço. Nas mesmas densidades, as imagens “D”, “E” e “F” mostram células em contato com a MCB: nota-se adesão menos evidente nas menores densidades (D e E), enquanto a maior densidade (F) apresentou adesão mais pronunciada, com maior confluência e distribuição uniforme. As imagens “G”, “H” e “I” mostram células em contato com a MP: a adesão foi mais evidente na menor densidade (G), reduzindo-se progressivamente nas maiores (H e I), que apresentaram menor confluência e distribuição celular.

Na MCB, a melhor densidade populacional foi a de 1×10^5 células/poço, apresentando uma distribuição populacional mais concentrada e uniforme (Figura 4F) em comparação com as outras densidades, que não exibiram crescimento tão expressivo (Figuras 4D e 4E).

Já na MP, notou-se um crescimento celular inversamente proporcional à maior densidade populacional. Dessa maneira, os poços contendo 7×10^3 células exibiram melhor proliferação celular (Figura 4G), visto que apresentam uma maior quantidade de células por campo em comparação às demais (Figuras 4H e 4I). Entende-se que nas densidades mais altas, as células precisaram competir mais intensamente por espaço disponível e por recursos limitados como nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento. E, devido à elevada atividade celular, há um maior acúmulo de produtos metabólicos e resíduos. A combinação desses fatores induz estresse nas células limitando a sua capacidade de crescimento e desenvolvimento. Por isso, em menor quantidade populacional, os recursos são mais abundantes e as condições melhores para cada célula, promovendo uma maior expansão e proliferação celular.

Pelas imagens obtidas, identificou-se que o plaqueamento para CV na concentração de 7×10^3 células/poço para MP e 1×10^5 células/poço para MCB se destacaram como volumes ideais para a sobreposição das CTM-GW sobre os arcabouços.

4.3.4 Ensaio de Proliferação, Viabilidade e Citotoxicidade (*Alamar Blue*[®])

Para determinar a concentração celular ideal para os ensaios com *Alamar Blue*[®], realizaram-se dois ensaios: 1) definir o volume populacional adequado para cada poço, de forma a evitar que a atividade metabólica das células excedesse em fluorescência e extrapolasse o limite de mensuração do equipamento; 2) avaliar as três fontes genéticas distintas no mesmo volume populacional, a fim de se considerar a variabilidade entre amostras.

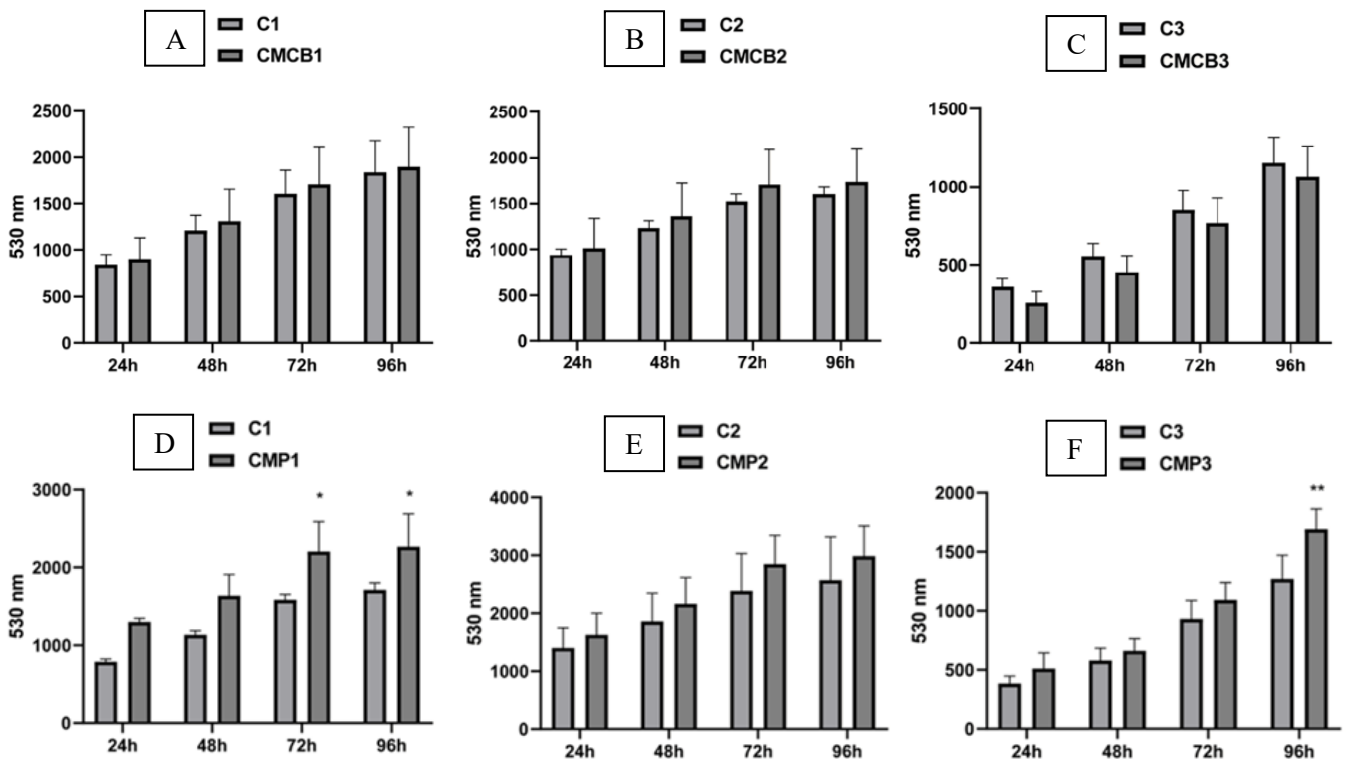
4.3.4.1 Definição Populacional

Para monitorar o processo de proliferação celular e a citotoxicidade das CTM-GW em contato com os arcabouços de celulose bacteriana (MCB) e polipropileno (MP), foram construídos três gráficos para cada condição, mapeando as diferentes concentrações celulares nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. Os resultados dos tratamentos com MCB e MP são apresentados adiante.

Nas Figuras 5A, 5B e 5C, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Isso propõe que, nas três populações de CTM-GW expostas à MCB, a proliferação observada não foi diferente do controle, podendo-se afirmar que houve crescimento efetivo. O experimento também permite avaliar citotoxicidade. Neste caso,

observando os gráficos “A e “B”, constatou-se que a MCB não causou efeitos prejudiciais significativos nas células, e não foram observados sinais de morte celular.

Figura 5. Proliferação Celular de CTM-GW nas densidades de 7×10^3 (A, D), 1×10^4 (B, E) e 5×10^4 (C, F) células/poço, em contato com MCB (A – C) e MP (D – F).



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: Na figura, “C1”, “C2” e “C3” indicam os controles nas quantidades de 7×10^3 , 1×10^4 e 5×10^4 células/poço, respectivamente. “CMCB1”, “CMCB2” e “CMCB3” referem-se aos poços contendo CTM-GW semeadas nas mesmas quantidades, em contato com a MCB no inserto, e “CMP1”, “CMP2” e “CMP3” àqueles em contato com a MP. As barras de erro representam o desvio padrão da média (\pm DP) de quatro repetições independentes. O símbolo “*” indica significância estatística.

Esse resultado pode ser atribuído a alguns motivos. Primeiramente, a MCB é um composto com propriedades inertes, o que garante que não haja interação prejudicial com as células. Além disso, demonstrou-se compatível com a matriz extracelular (MEC), sem liberação de substâncias tóxicas ou alterações adversas nas condições do meio.

As densidades celulares utilizadas nas condições testadas também podem ter sido benéficas ao garantir que a presença da MCB não causasse impacto nocivo, e o período de exposição breve foi suficiente para não permitir a manifestação de efeitos sutis. Nessas condições, as CTM-GW tiveram acesso adequado ao espaço e nutrientes, minimizando a influência negativa de fatores externos, como a presença do arcabouço, e contribuíram para a

constatação de que este não afetou negativamente a proliferação celular, nem causou citotoxicidade às células testadas. A presença de controles corroborou com essa conclusão, mostrando que a viabilidade celular nas amostras expostas à MCB foi equivalente à das amostras não tratadas.

No gráfico “C”, por outro lado, detectou-se um comportamento diferente quando utilizada uma concentração maior de células por poço. As amostras expostas à MCB exibiram valores de crescimento inferiores aos dos controles. Esses resultados sugerem que as células enfrentaram maior competição por nutrientes, fatores de crescimento ou oxigênio, causando possíveis efeitos adversos de confluência celular, que exacerbaram a sensibilidade das células à membrana. Além disso, o maior volume populacional próximo à MCB pode ter contribuído para alterações no microambiente. Esses resultados indicam que, em contextos de alta densidade celular, os resultados podem não ser igualmente satisfatórios, justificando uma investigação adicional.

O experimento com MP (Figuras 5D, 5E e 5F) apresentou resultados de significância estatística em três situações. Isso implica uma forte evidência de que o arcabouço resulta em efeito significativo naquelas densidades celulares, rejeitando a hipótese nula.

No gráfico “D”, houve mudança significativa no tratamento após o período de 72 e 96 horas de cultura, sugerindo que a MP não foi citotóxica para a concentração de 7×10^3 células/poço e acabou induzindo o crescimento acelerado dessas células em comparação às amostras controle. Entretanto, no gráfico “E”, não foram detectadas mudanças de relevância estatística, uma vez que tanto as amostras controle quanto as de tratamento apresentaram crescimento semelhante. Isso necessariamente não indica um resultado negativo, pois representa que o arcabouço testado não provocou morte celular.

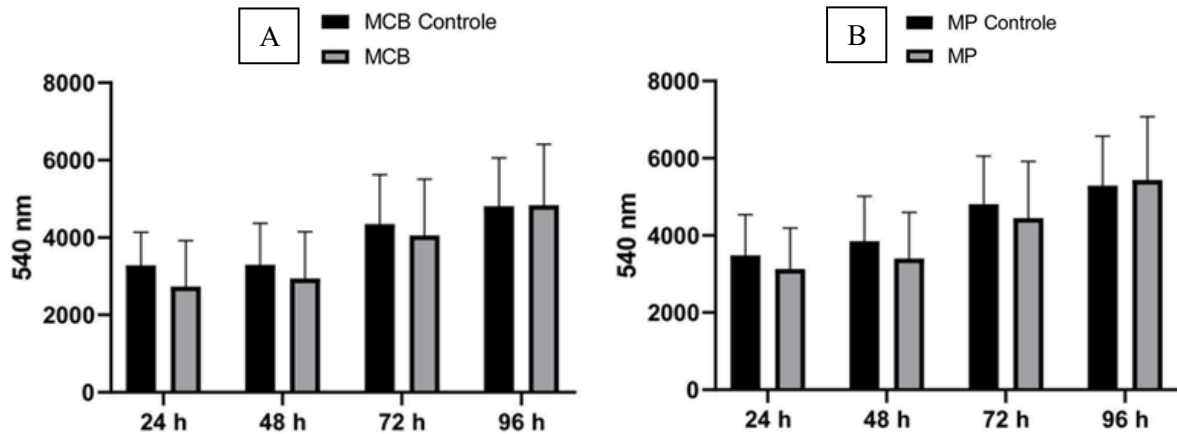
Por fim, nota-se no gráfico “F” diferença marcante no tratamento das células associadas ao arcabouço no tempo de 96 horas, representando a mais alta taxa de proliferação celular de todo o experimento. Isso pode estar relacionado à liberação de fatores pela MP que impactaram o crescimento ou a viabilidade celular. Com o tempo, acredita-se que o acúmulo e interação desses componentes com as células podem ter ampliado os efeitos do arcabouço, tornando as diferenças mais evidentes quando comparadas a períodos mais curtos de exposição.

4.3.4.2 Variabilidade Amostral

O segundo ensaio com o *Alamar Blue*[®] foi preparado com três amostras distintas para cada placa de leitura. Duas placas foram utilizadas, uma contendo a MCB e a outra a MP, como

arcabouço. Em cada placa havia: três poços de controle (células cultivadas sem o arcabouço), três poços contendo o branco (apenas o arcabouço) e três poços para cada uma das três amostras cultivadas na presença do arcabouço, totalizando nove poços experimentais por placa. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6.

Figura 6. Proliferação Celular de CTM-GW em 1×10^4 células/poço na placa de MCB (A) e MP (B).



Fonte: Foto do Autor, 2025.

Legenda: No Gráfico A, “MCB Controle” indica os controles contendo 1×10^4 células/poço, enquanto “MCB” refere-se aos poços contendo CTM-GW semeadas no mesmo volume, em contato com a MCB no inserto. No Gráfico B, “MP Controle” representa os controles contendo 1×10^4 células/poço, e “MP” refere-se aos poços contendo CTM-GW no mesmo volume, em contato com a MP no inserto. As barras de erro representam o desvio padrão da média (\pm SD) de quatro repetições independentes.

Nos gráficos, as barras pretas correspondem às amostras de controle, enquanto a barra cinza representa as amostras de interesse, que são as células em contato com o determinado arcabouço. Os valores de fluorescência foram analisados a partir das leituras nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas, para análise da viabilidade ao longo desse tempo.

As barras de erro, que representam o desvio padrão da média (\pm DP), são grandes e se sobrepõem, o que indica ausência de diferença estatística significativa entre os grupos analisados. Entretanto, em ambos os grupos, nota-se uma tendência de aumento no sinal metabólico ao longo do tempo, o que sugere que os arcabouços MCB e MP não apresentaram citotoxicidade relevante. Esses resultados apontam que a presença dos arcabouços não comprometeu a viabilidade celular, ainda que não tenha promovido, de forma significativa, o crescimento celular.

Observa-se, ainda, que durante os períodos analisados, os valores do grupo “MCB” e “MP” permaneceram muito semelhantes aos de seus respectivos controles. No intervalo de 96 horas, os valores mensurados na placa MCB atingiram aproximadamente 6.500 - 7.000 nm para

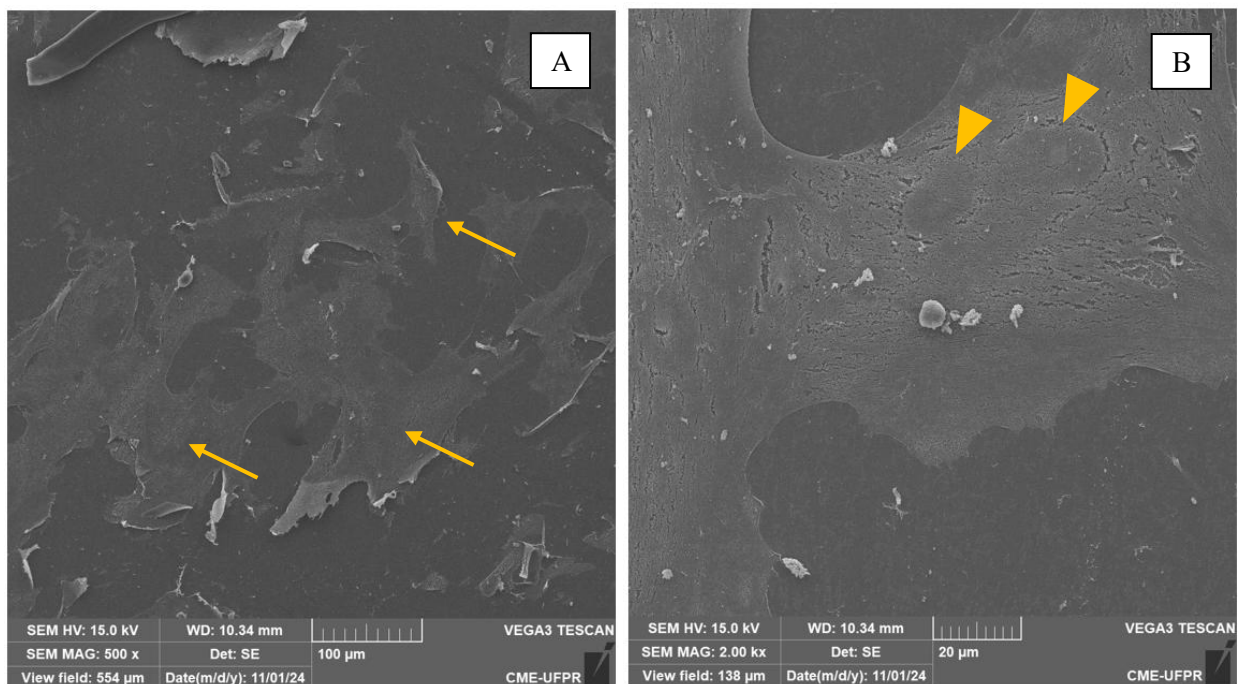
ambos os grupos, enquanto na MP os valores nesse mesmo momento foram ligeiramente superiores, alcançando cerca de 7.500 nm. Esse desempenho sugere que o metabolismo celular pode ter sido mais ativo em contato com a MP.

Dessa maneira, pode-se concluir que nenhum dos arcabouços apresentou citotoxicidade evidente, uma vez que as células foram capazes de desempenhar e manter suas funções. As duas opções, portanto, são adequadas para uso no cultivo celular como materiais para aplicações em terapias regenerativas.

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como complemento às análises, os resultados obtidos por MEV forneceram evidências adicionais sobre a integração entre as CTM-GW e as membranas MCB e MP, permitindo uma avaliação mais detalhada das estruturas trabalhadas no experimento. Na Figura 7, as CTM-GW estão demonstradas cultivadas na ausência de MCB e MP.

Figura 7. Estrutura das CTM-GW em Ausência de MCB e MP.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: A) Células espalhadas sobre a lamínula com fragmentos de membrana celular dispersos (Setas), em aumento de 500×. B) Destaca-se a presença de dois núcleos celulares de baixo contraste (Triângulos), em aumento de 2.000×.

Identificou-se estruturas alongadas que foram interpretadas como membranas de

natureza celular (Figura 7A), muito semelhantes à morfologia citoplasmática de CTM. E, apesar da fraca intensidade, a organização das estruturas membranosas e a morfologia dos núcleos (Figura 7B) indicam a presença de células preservadas. Essas características reforçam a identidade celular, evidenciando que essas mantiveram sua conformação típica mesmo na ausência de estímulos adicionais e corrobora a viabilidade e a representatividade do controle.

A presença dessas células nos poços denominados “Grupo Controle” demonstra o sucesso do experimento em estabelecer as condições adequadas para a sobrevivência e adesão das CTM. Logo, é suficiente para garantir a viabilidade das células em cultura, validando as condições disponibilizadas no experimento.

A seguir, as células semeadas sobre a MCB são evidenciadas apresentando membranas celulares bem preservadas, destacando-se como a estrutura delimitante principal. A Figura 8A demonstra uma célula com estrutura alongada e presença de prolongamento citoplasmático bem definido, exibindo a típica morfologia fibroblastoide, geralmente fusiforme, característica de células mesenquimais.

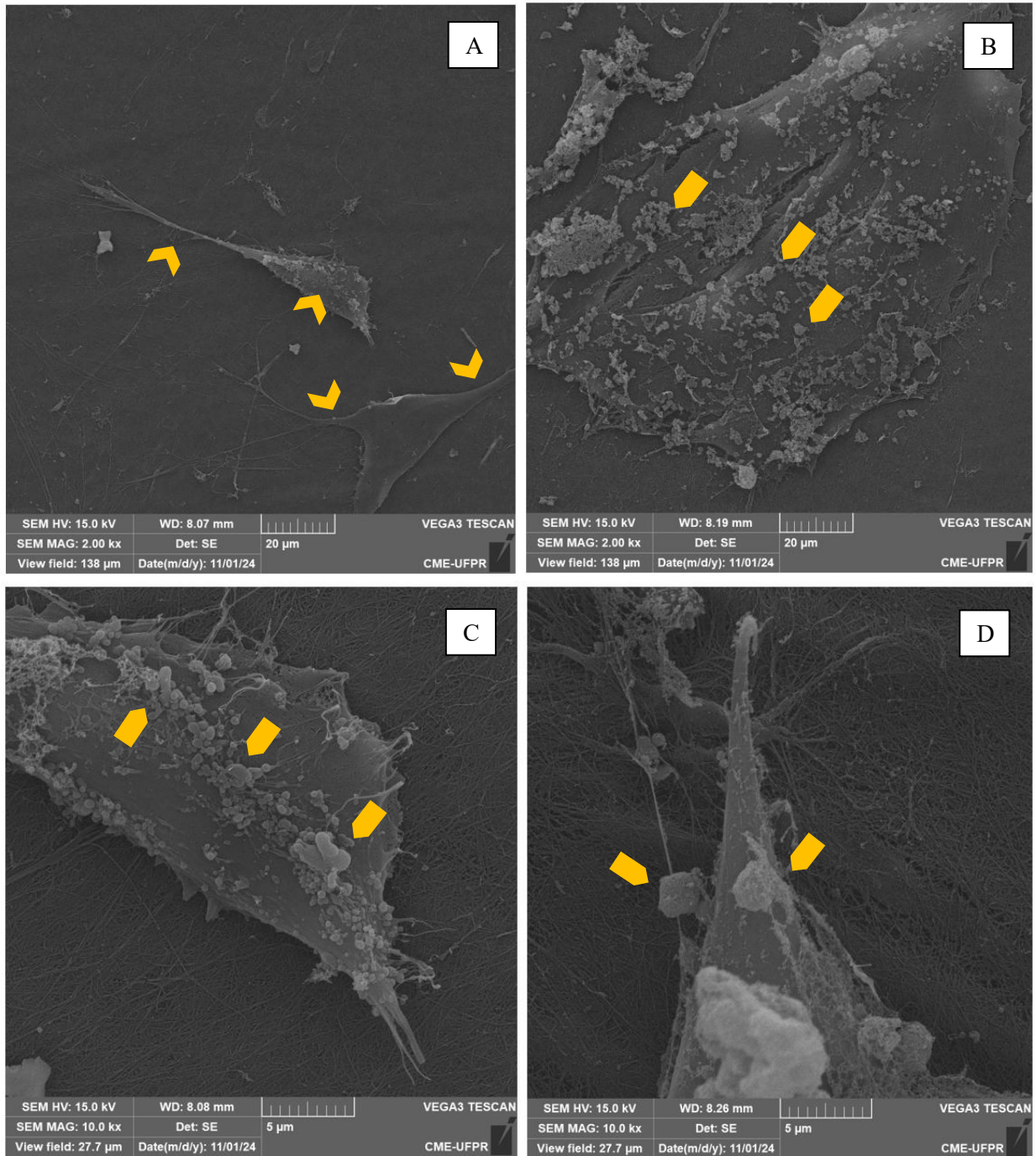
Na Figura 8B, as estruturas mais claras observadas ao redor da célula indicam elementos da MEC, os quais estão sendo ativamente exocitados pela célula por meio de vesículas, evidenciando atividade celular funcional. A exocitose envolve a liberação de substâncias fundamentais ao meio extracelular para a formação e manutenção da rede de componentes que sustentam as células e suas interações. No entanto, a caracterização específica para determinar a composição química ou funcional dessas estruturas não foi realizada, devido à necessidade de outras metodologias especializadas (LODISH et al., 2016).

Na Figura 8C, observa-se uma célula envolvida na produção significativa de matriz, evidenciada pela formação de múltiplas vesículas e prolongamentos citoplasmáticos distintos, que interagem com as fibras da MCB. A presença de vesículas exocitadas sugere um alto nível de atividade secretora a partir da liberação de proteínas estruturais como colágeno, fibronectina ou proteoglicanos, lipídeos ou outros fatores bioativos que desempenham papéis essenciais na modulação do microambiente extracelular, como sinalização intercelular e remodelação tecidual (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013).

A Figura 8D mostra a visualização de um prolongamento citoplasmático de CTM-GW mais evidente, o qual se estende e se integra às tramas da matriz da MCB, destacando uma interação aderente e funcional entre as duas estruturas. Esse contato possivelmente foi promovido por processos como adesão celular, comunicação intercelular e migração, com possível formação de filopódios e lamelipódios, demonstrando uma adaptação da célula à MCB.

Essas estruturas são essenciais para a mobilidade celular, facilitando o deslocamento para áreas específicas e a interação com o ambiente em processos regenerativos ou inflamatórios (ALBERTS et al., 2015; LODISH et al., 2016).

Figura 8. Evidências da Interação entre CTM-GW e MCB por MEV.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: A) Morfologia celular característica, com estrutura alongada e presença de prolongamento citoplasmático bem definido (Seta Arco), em 2.000 \times . B) Estruturas mais claras sobre a célula, semelhantes a componentes da MEC em processo ativo de exocitose, o que sugere atividade funcional (Monólito com Ponta), observadas em aumento de 2.000 \times . C) e D) CTM-GW exibindo exocitose de vesículas associadas a

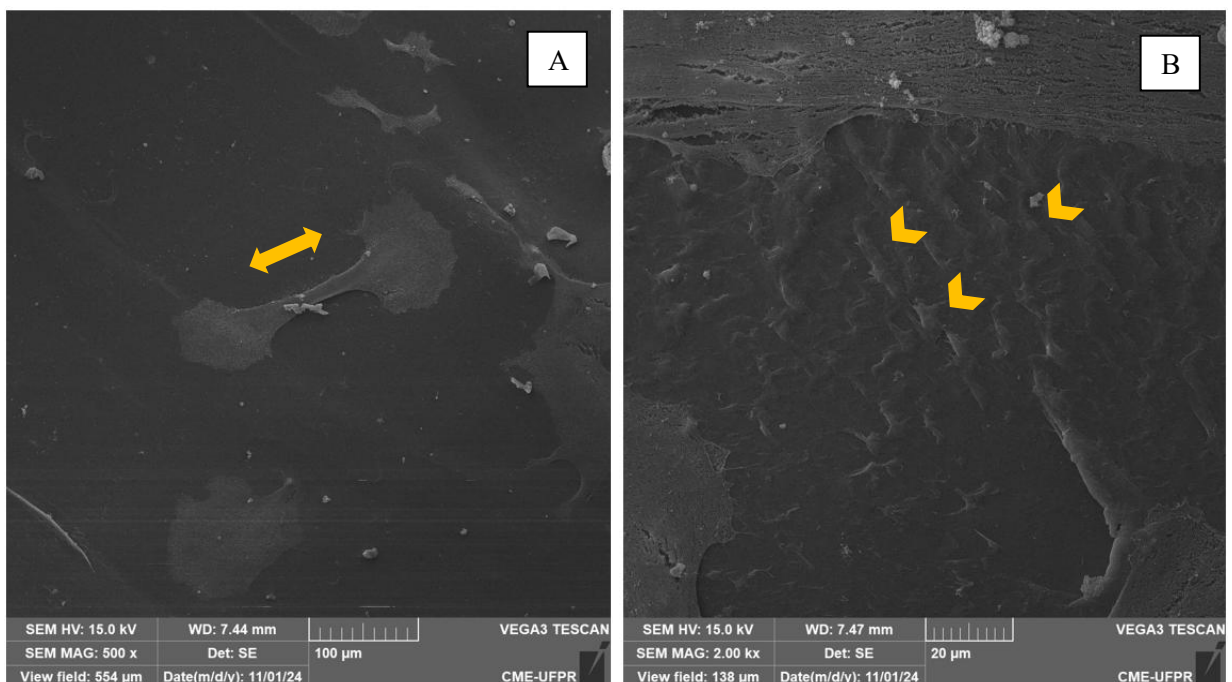
prolongamentos citoplasmáticos, demonstrando integração ativa entre a célula e a membrana, o que indica interações dinâmicas com o microambiente (Monólito com Ponta), em aumento de 10.000×.

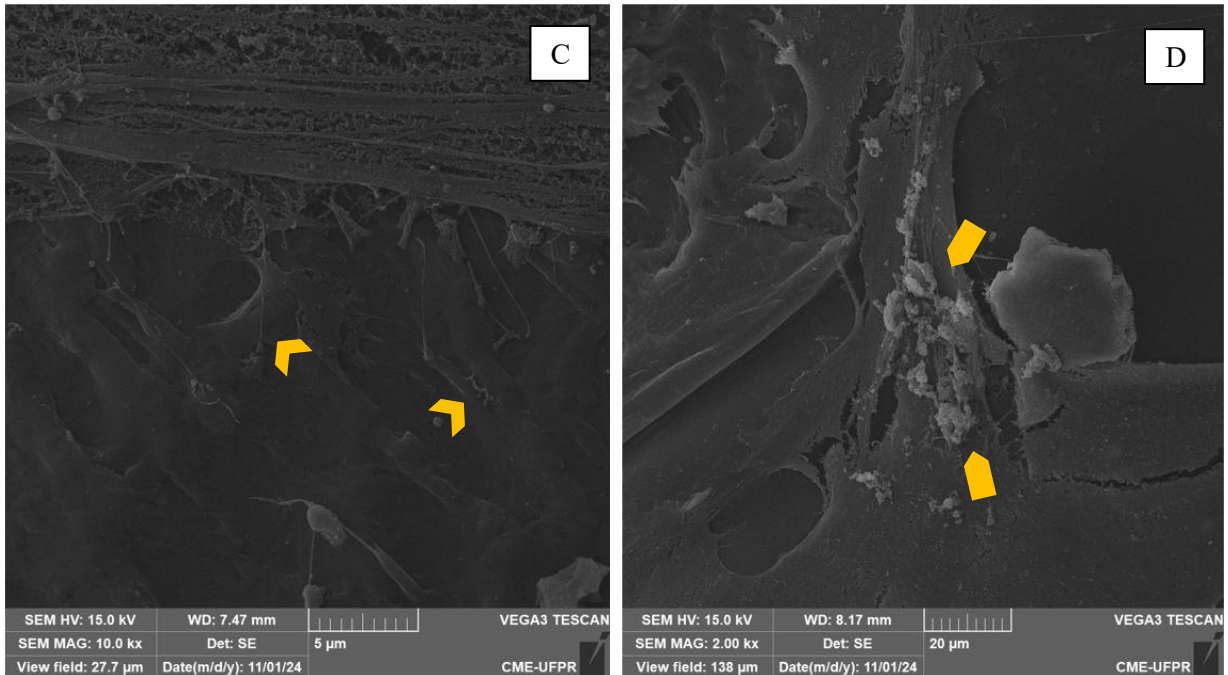
Os resultados obtidos com a MCB, atuando como suporte estrutural para as CTM-GW, demonstraram uma interação eficiente, indicando que o arcabouço proporciona um microambiente favorável à proliferação celular, de maneira que oferece ancoragem física estável, promovendo a adesão celular e condições adequadas para a replicação. E, como observado com a MCB, a MP foi capaz de mimetizar satisfatoriamente as condições necessárias para um crescimento celular robusto.

Na Figura 9A, observa-se um indicador positivo de biocompatibilidade e funcionalidade do arcabouço, evidenciado por CTM-GW sobrepostas à MP em processo de citocinese, demonstrando a conclusão bem-sucedida do ciclo celular.

Neste contexto, a membrana atuou como uma superfície de ancoragem para proteínas da MEC, promovendo a organização do citoesqueleto das células e possibilitando a separação eficiente dos citoplasmas durante a mitose. Isso sugere que a MP está associada a propriedades físico-químicas adequadas, que desempenham um papel essencial na manutenção dessas interações, como elasticidade suficiente para sustentar as tensões geradas pelas células em divisão e uma composição que promove a adsorção de proteínas e sinalização celular eficiente. Além disso, a presença de células em citocinese implica que a membrana não induz toxicidade significativa, algo que poderia interromper a proliferação das CTM-GW (ANSELME, 2000).

Figura 9. Evidências da Interação entre CTM-GW e MP por MEV.





Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: A) Divisão celular evidenciada por estruturas membranosas (Seta Bidirecional), observadas em aumento de 500×. B) CTM-GW dispersas ‘orientadas’ sobre a MP na região central (Seta em Arco), com tramas visíveis da MP na região próxima e acima. C) Observa-se integração entre CTM-GW e as tramas da MP (Seta em Arco). D) Evidência de CTM-GW sobreposta à MP, exocitando vesículas para a MEC (Monólito com Ponta)..

Com base nos resultados das Figuras 9B e 9C, reforçou-se a análise de que as CTM-GW realmente demonstram uma integração significativa com as tramas da membrana, o que foi evidenciado pela elevada confluência celular, caracterizada pela abundante presença de material citoplasmático sobre a MP. Outro aspecto particularmente interessante foi a constatação de células sobrepostas exocitando vesículas (Figura 9D), sugerindo comunicação celular ativa e, potencialmente, um estágio avançado de adesão e crescimento tridimensional.

Os comportamentos observados corroboram o potencial de cada membrana como arcabouço, devido à sua capacidade de reproduzir condições similares às de um microambiente fisiológico favorável, viabilizando aplicações em contextos clínicos e de pesquisa.

4.4 DISCUSSÃO

A estratégia deste estudo foi investigar a interação entre células-tronco mesenquimais oriundas da Geleia de Wharton (CTM-GW) e membranas biocompatíveis, de celulose bacteriana (MCB) e polipropileno (MP), como alternativa promissora para o desenvolvimento de uma nova abordagem de tratamento para feridas cutâneas, explorando seu potencial para futuras aplicações na medicina regenerativa.

As CTM-GW são uma fonte celular muito favorável para uso em terapias celulares, uma vez que não apresentam problemas de rejeição imunológica e questões éticas relacionadas à derivação e uso de CTE, incluindo as notáveis propriedades regenerativas, imunorregulatórias e a capacidade de diferenciação em células-alvo, promovendo uma cicatrização mais eficiente (LEE; AYOUB e AGRAWAL, 2016).

O uso dessas células combinado com arcabouços, além de contribuir com o reparo tecidual, também cria um microambiente ideal para a migração e proliferação celular, resultando em melhores desfechos no fechamento de lesões cutâneas. As evidências demonstradas pelos estudos analisados e os resultados deste trabalho reforçam a efetividade desse método, considerando que, a capacidade imunomoduladora e de diferenciação dessas células, aliada à biocompatibilidade e funcionalidade dos arcabouços avaliados, pode reduzir a dor, encurtar o tempo de tratamento e melhorar as condições fisiológicas do tecido regenerado.

Os arcabouços proporcionam uma área de superfície e suporte mecânico apropriados para sustentar funções celulares fundamentais, como adesão, proliferação e manutenção, contribuindo para uma satisfatória viabilidade celular ao fornecer condições análogas à MEC nativa (MENSAH et al., 2022; NICOARA et al., 2020).

A caracterização das CTM trabalhadas seguiu a orientações da Sociedade Internacional de Terapia Celular, ou SITC. Desta maneira, ao longo das expansões e manutenções celulares, constatou-se, por microscópica invertida, a presença de células de forma alongada, semelhantes aos fibroblastos, firmemente fixadas ao plástico das garrafas de cultivo. Esse primeiro registro cumpre o critério primário estabelecido pela organização.

Para comprovação do segundo critério de que a cultura é constituída realmente por CTM, proseguiu-se com a análise laboratorial do material amostral por meio do uso de marcadores de superfície específicos, realizada por meio da citometria de fluxo. O sucesso no isolamento das CTM-GW foi confirmado pela alta expressão dos marcadores CD73, CD90 e CD105, e pela baixa expressão dos marcadores hematopoéticos CD34, CD45, CD14/CD11b, CD79a/CD19 e HLA-DR, modulador da resposta imunológica (DOMINICI et al. 2006).

A pesquisa desenvolvida por Alves et al. (2016) obteve resultados semelhantes na caracterização de CTM extraídas a partir da medula óssea. O isolamento celular foi confirmado pela presença da expressão do marcador CD90, envolvido em funções de adesão celular e indicador de pluripotência, e pela ausência de expressão de CD34 e CD45, indicadores de células precursoras do sangue.

Em seguida, o terceiro critério de aceitação foi confirmado quando as CTM se diferenciaram de modo eficaz em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, após as culturas celulares serem submetidas à indução em três linhagens. Os resultados foram outra evidência de que as células isoladas são realmente provenientes da origem mesodérmica, uma vez que células-tronco hematopoéticas (CTH) não conseguem se diferenciar nessas linhagens (GUILLAMAT-PRATS, 2021). A combinação dessas caracterizações celulares reforça a caracterização fenotípica e a pureza das células obtidas a partir dos cordões umbilicais, assegurando sua classificação como células mesenquimais.

Esse resultados estão em consonância com os obtidos por autores como Sobh (2014), Valente et al. (2020), Alves et al. (2016), Giuliani et al. (1998) e Quiroz et al. (2008), os quais também observaram a formação bem-sucedida de adipócitos, condrócitos e osteócitos a partir de suas amostras. Esse marco sugere as CTM foram capazes de manter seu potencial de diferenciação em três linhagens celulares, confirmando sua eficácia e aplicabilidade em tratamentos que envolvem a regeneração de tecidos.

Os resultados obtidos pela coloração com CV também se apresentaram favoráveis, demonstrando que as CTM-GW não apenas se proliferaram com sucesso sobre a superfície dos arcabouços testados, mas também aderiram de forma eficiente, preservando a sua integridade estrutural. Esses achados indicam que a MCB e a MP proporcionaram um ambiente adequado para o crescimento celular, sem indícios de citotoxicidade. No entanto, deve-se considerar que as respostas proliferativas podem ser potencialmente comprometidas se ocorrerem simultaneamente às respostas de morte celular, uma vez que a capacidade das células de se multiplicar pode ser afetada negativamente quando a taxa de morte celular é elevada, e esse método não fornece informações detalhadas sobre os mecanismos específicos da morte celular (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016; HEYMOVSKI et al., 2021).

Esses processos estão interligados e podem ser influenciáveis por fatores variáveis, como o nível de estresse celular e o ambiente, o que pode alterar os resultados finais. Por isso, é essencial determinar a quantidade celular ideal de células para o experimento. Neste ensaio, utilizou-se diferentes quantidades de CTM-GW sobre os arcabouços para identificar qual seria a melhor configuração em termos de proliferação e adesão, visando assim uma avaliação mais precisa dos efeitos da intervenção experimental.

Observou-se que a MCB obteve o melhor desempenho com uma maior densidade populacional (1×10^5 células/poço), enquanto a MP desempenhou melhor em um menor volume (7×10^3 células/poço). Esse comportamento sugere que, dependendo das condições do

substrato, a densidade celular pode afetar a proliferação celular. Essa evidência vista com a MP parece se alinhar com o estudo de Venugopal et al. (2018), o qual demonstrou que, em substratos menos densos, um aumento na densidade celular levou a um aumento na proliferação celular. Contudo, em substratos mais rígidos, uma alta densidade celular gerou competição por recursos e sobrecarga celular, limitando o crescimento.

É fundamental que os arcações tridimensionais, como MCB e MP, ofereçam espaço e suporte adequados para a adesão das CTM-GW, além de garantir um ambiente que apresente condições adequadas, livre de substâncias tóxicas, promovendo assim a formação de novos tecidos. Segundo Wang et al. (2023), a presença de uma matriz apropriada é o pilar para uma regeneração tecidual bem-sucedida.

A análise dos dados a partir da coloração com *Alamar Blue*[®] foi igualmente satisfatória. A maior presença de resorufina, evidenciada pela coloração rósea, correlacionou-se diretamente com uma maior viabilidade celular nas placas de testes. Dessa forma, associou-se novamente que as membranas testadas não apresentaram citotoxicidade em relação às células, observada pela sobrevivência e proliferação celular.

Os resultados deste experimento evidenciaram estar alinhados com as observações de Qiu et al. (2016), cujo trabalho, realizado utilizando as propriedades da MCB e seu desempenho clínico, também demonstrou a não toxicidade da membrana, tornando-a muito propícia para comercialização como material para curativos de feridas, de forma que tange à viabilidade e à proliferação celular de maneira consistente, indicando a eficácia dos métodos utilizados.

Os autores, utilizando a MCB, também relataram a efetividade da membrana quando combinada à utilização da droga “*Vaccarin*”. Esta medicação é comumente utilizada para estimular a proliferação de células endoteliais, sendo bastante explorada em pesquisas sobre regeneração de tecidos e cicatrização de feridas. No estudo, os autores constataram que as feridas cobertas com MCB tratadas com determinado fármaco exibiram uma biocompatibilidade aprimorada e cicatrizaram mais rapidamente do que aquelas não cobertas com o fármaco. Isso resultou da presença de mais fibroblastos ativos e maior epitelização nas feridas tratadas, observada a partir dos exames histológicos, em comparação com as feridas manipuladas com outro tipo de tratamento.

O tratamento das células cultivadas com medicamentos de propriedades antibacterianas tem sido estudado não apenas para controlar infecções locais, mas também para estimular a resposta celular adequada no tecido lesado, a fim de intensificar a regulação do processo de cicatrização e promover uma regeneração tecidual mais eficaz. Segundo Guillamat-Prats

(2021), a inclusão desses compostos atrai as células imunológicas e desencadeia um aumento na produção da MEC. Além disso, o uso de fatores de crescimento, derivados de plaquetas (PDGF), de fibroblastos (FGF-2), de queratinócitos (KGF-1), de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de granulócitos (G-CSF) e o endotelial vascular (VEGF), objetiva melhorar a sinalização e coordenação do comportamento celular durante o processo de cicatrização e, dessa maneira, estimular a proliferação de CTM e a formação de novos vasos sanguíneos na remodelação do tecido.

No trabalho de Yücebas et al. (2016), a MP foi utilizada como um enxerto interposicional para a reparação de perfurações do septo nasal de coelhos. O objetivo consistiu em avaliar a biocompatibilidade do arcabouço e investigar a reação de corpo estranho, inclusas as análises da resposta inflamatória e da formação da cápsula de fibrose. Foi possível constatar, ao final do estudo, que a mucosa foi capaz de proliferar sobre o enxerto e cobrir as bordas do defeito, com uma taxa de sucesso de 75% no grupo teste em comparação com o grupo controle, evidenciando a eficácia deste arcabouço na cicatrização de lesões neste tipo de tecido.

Em Mousavi et al. (2023), criaram-se defeitos na calvária de ratos, objetivando avaliar a regeneração óssea com o uso de MP isolada e MP tratada com *Framework* de Imidazolate Zeolítico 8 (ZIF-8), uma substância capaz de induzir osteogênese devido às suas propriedades de biocompatibilidade e capacidade de liberar íons zinco (Zn^{2+}) e imidazóis de forma controlada. Os resultados obtidos foram satisfatórios, enfatizando a proliferação celular e a formação do novo tecido ósseo, em destaque para a membrana associada à estrutura ZIF-8.

As análises microscópicas por MEV complementam significativamente os dados deste estudo ao oferecer uma visão mais detalhada da integração morfológica entre célula e arcabouço. Durante o experimento conduzido, as CTM-GW observadas mantiveram suas características estruturais principais, como membranas íntegras e dimensões apropriadas, constatando-se impacto mínimo dos arcabouços na adesão, proliferação e viabilidade dessas células. Os achados revelam que ambas as membranas apresentam uma estrutura similar à matriz extracelular e, ao imitarem o microambiente natural em que as células se desenvolvem, proporcionam um suporte físico adequado para as CTM-GW se desenvolverem.

Esses resultados foram validados pelos achados de Oliveira et al. (2012), que relatam a presença das nanofibras dispersas na superfície da MCB como particularmente significativa para proporcionar um suporte físico adequado para as células, replicando as condições naturais em que normalmente se desenvolvem. Além disso, ressaltaram que a interação celular é facilitada pela estrutura tridimensional do arcabouço, promovendo a adesão e migração das

células, processos essenciais para a formação de tecidos. A enzima fosfatase alcalina foi usada como marcador para avaliar a atividade metabólica das CTM cultivadas sobre os arcabouços, apresentando resultados que indicaram viabilidade celular e processo de diferenciação tecidual. À vista disso, demonstrou-se que, além de servir como suporte estrutural, a MCB também é capaz de tolerar os processos fisiológicos das células cultivadas.

O modelo de preparo do leito da ferida publicado por Sibbald et al. (2011) identifica a inflamação prolongada como um fator central nos cuidados locais com a ferida, pois contribui para a dor e é um fator predominante na persistência de feridas crônicas como úlceras por pressão, pé diabético, venosas, entre outras. Deste modo, exige uma otimização clínica, pois representa um impacto substancial para as atividades diárias dos pacientes e para os sistemas de saúde em todo o mundo.

A intenção com os arcabouços testados é torná-los compatíveis com o uso adequado no hospedeiro, sem desencadear o aumento da resposta inflamatória local e sem comprometer a qualidade de reparo tecidual. Prevê-se igualmente que as CTM-GW inseridas nesse modelo de terapia avançada sejam entregues de forma eficaz às lesões cutâneas para que desempenhem suas propriedades imunomodulatórias e angiogênicas, especificamente para diminuir a inflamação, otimizar a preparação do leito da ferida e promover o seu fechamento a partir do aumento na taxa de migração dos fibroblastos dérmicos humanos e da elevação da expressão de moléculas da MEC, como colágeno tipo I e III, fibronectina e elastina (LEE, AYOUB e AGRAWAL, 2016; OHASHI et al. 2016).

O conjunto entre arcabouço e CTM-GW revela desempenhar um papel significativo no microambiente da ferida, promovendo ativamente o processo de cicatrização tecidual ao oferecer uma estratégia promissora para a entrega, crescimento e adaptação das células, que atuam sobre as feridas e asseguram o seu fechamento eficiente.

Essa combinação ressalta características positivas para este modelo inovador de terapia avançada no tratamento de feridas cutâneas crônicas, de forma que proporcionam um ambiente propício à regeneração tecidual. Isso corrobora com tratamentos mais rápidos e menos dolorosos, além de evidenciar o potencial dessas células para uso em terapias alogênicas, com benefícios significativos na redução de rejeições imunológicas. Além disso, podem vir a ser associadas ao uso concomitante de certas medicações, com o objetivo de intensificar ainda mais os benefícios oferecidos (PALANIAPPAN et al., 2023; PATEL e GOHIL, 2012).

Contudo, é necessário reconhecer que os resultados podem variar de acordo com as condições do cultivo celular e a variabilidade nas propriedades dos arcabouços. Dessa forma,

torna-se fundamental a realização de novos estudos que contemplem esses fatores e avaliem diferentes combinações, a fim de garantir a segurança e a eficácia dessa metodologia no contexto da terapia celular avançada. Ainda como limitações do presente trabalho, podem ser citados: o número reduzido de réplicas; a necessidade de testes de citogenética das células na passagem em questão (P4); a extrapolação para experimentos em organismos complexos, saindo dos testes *in vitro* para testes *in vivo*; e, na sequência, ensaios clínicos, conforme a legislação vigente.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo comprovou a eficácia na obtenção, isolamento, expansão e criopreservação das CTM-GW, obtidas a partir do cordão umbilical de gestantes saudáveis. A indução da diferenciação em trilhaagem confirmou a capacidade das CTM-GW de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, evidenciando seu potencial multipotente. Além disso, a expressão de marcadores moleculares compatíveis, verificada na caracterização fenotípica, reforça a identidade mesenquimal dessas células. Os achados ressaltam o potencial significativo dessas células para aplicações na medicina regenerativa, em virtude de sua elevada capacidade proliferativa, plasticidade e manutenção da viabilidade após a criopreservação.

Os resultados obtidos por meio da análise com Cristal Violeta demonstraram que as CTM-GW aderiram com sucesso sobre os arcabouços testados; sendo que, na análise com o *Alamar Blue*[®], observou-se a biocompatibilidade e a manutenção da funcionalidade de proliferação. Esses achados são encorajadores, pois indicam que os arcabouços MCB e MP devem proporcionar um microambiente favorável ao crescimento celular, favorecendo o desenvolvimento celular contínuo, aspecto essencial para a eficácia das aplicações terapêuticas propostas.

A análise morfológica das CTM-GW associadas aos arcabouços MCB e MP, realizada por microscopia de luz e eletrônica de varredura, permitiu uma visualização detalhada da interação celular, evidenciada pela formação de múltiplas vesículas e prolongamentos citoplasmáticos distintos, que interagem com as fibras na superfície, sugerindo uma comunicação celular ativa e um ambiente propício à regeneração tecidual.

As evidências encontradas estão em consonância com estudos anteriores que respaldam o uso de curativos biológicos no manejo e tratamento de lesões cutâneas persistentes. Os dados coletados validam o desempenho das CTM-GW aplicadas em modelos de terapia avançada,

evidenciando seu potencial para diminuir processos relacionados à dor e inflamação, favorecer o fechamento de lesões e enfatizam a importância dos arcabouços tridimensionais em oferecer suporte físico adequado para o crescimento e a organização das células.

Essa abordagem metodológica oferece perspectivas promissoras para futuras aplicações na engenharia de tecidos e terapias celulares. Contudo, faz-se necessário um entendimento mais profundo por meio de estudos adicionais que explorem diferentes estratégias experimentais, de modo a ampliar as investigações e fornecer evidências mais concretas sobre a interação biológica e a variabilidade das respostas individuais, a fim de garantir melhor compreensão dos mecanismos e, assim, assegurar aplicação segura aos pacientes.

4.6 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology Of The Cell*. 6. ed. Garland Science, 2015.
- ALVES, E. G. L. et al. Estudo Comparativo da Diferenciação Osteogênica das Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea e do Tecido Adiposo de Cães Adultos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 36, supl. 1, p. 21 – 32, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X201600130004.
- AMORIM, J. D. P. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. *Molecules*. v.27, n. 5580, 2022. DOI: 10.3390/molecules27175580.
- ANSELME, K. *Osteoblast Adhesion on Biomaterials*. *Biomaterials*. v. 21, n. 7, p. 667 – 681, 2000.
- ARRUDA, I. *Avaliação do Potencial de Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais Criopreservadas Obtidas de Gelatina de Wharton e Tecido Adiposo Canino e Cultivadas em Duas Concentrações de Soro Fetal Bovino*. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. São Paulo: Botucatu, 2018.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy. *J.Cell Mol. Med*. v. 8, n. 3, p. 301 – 316, 2004. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.
- BARBOSA, P. F. et al. Estudo Citofotométrico da Expressão dos Marcadores Tumorais Ki-67 e CD34 no Adenocarcinoma de Próstata. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro. v. 36, n. 6, p. 498 – 503, 2009. DOI: 10.1590/s0100-69912009000600007.
- BAUDEQUIN, T.; TRABIZIAN, M. Multilineage Constructs for Scaffold-Based Tissue Engineering: A Review of Tissue-Specific Challenges. *Adv. Healthcare Mater*. v. 7, p. 1 – 29, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201700734.
- BIRBRAIR, A. Stem Cell Microenvironments and Beyond. *Adv. Exp. Med. Biol*. v. 1041, p. 1 – 3, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-69194-7_1.
- BIRESSI, S.; FILARETO, A. RANDO, T. A. Stem Cell Therapy for Muscular Dystrophies. *J. Clin. Invest*. v. 130, n. 11, p. 5652 – 5664, 2020. DOI: 10.1172/JCI142031.
- BONNIER, F. et al. Cell Viability Assessment Using the Alamar Blue Assay: A Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models. *Toxicology in Vitro*. v. 29, p. 124 – 131, 2015.

- BROWN, C. et al. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* v. 13, n. 9, p. 1738 – 1755, 2019. DOI: 10.1002/term.2914.
- BYDŁOWSKI, S. P. et al. Características Biológicas das Células-Tronco Mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 31, n. 1, 2009. DOI: 10.1590/S1516-84842009005000038.
- CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* v. 20, n. 1, p. 51 – 58, 2007.
- CARVALHO, H. S. Células-Tronco e Terapias Regenerativas. *Revista Eletrônica Estácio Saúde.* v. 3, n. 2, 2014. ISSN1983-1617.
- CHAUDHARI, A. A. et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* v. 17, n. 12, p. 1 – 32, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121974.
- CHUNG, Y. G. et al. Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell.* v. 14, p. 777 – 780, 2014.
- COELHO, G. A. et al. Os Curativos de Nanocelulose de Pinus e Nanocelulose Bacteriana São Semelhantes no Tratamento da Queimadura de Segundo Grau? Estudo Experimental em Ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* v. 33, n. 2, 2020. DOI: 10.1590/0102-672020200002e1533.
- COHEN, J. Biomaterials in Orthopedic Surgery. *The American Journal of Surgery.* v. 114, p. 31 – 41, 1967.
- DAI, C.; SHIH, S.; KHACHEMOUNE, A. Skin Substitutes for Acute and Chronic Wound Healing: An Updated Review. *J. Dermatolog. Treat.* v. 31, n. 6, p. 639 – 648, 2020. DOI: 10.1080/09546634.2018.1530443.
- DALEY, J. M. et al. Modulation of Macrophage Phenotype by Soluble Product(s) Released from Neutrophils. *J. Immunol.* v. 174, p. 2265 – 2272, 2005.
- DAVIS, N. F. et al. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology. *Adv. Exp. Med. Biol.* In: Cell Biology and Translational Medicine. Heidelberg: Springer. v. 1107, p. 189 – 198, 2018. DOI: 10.1007/5584_2017_139.
- DEHKORDI, A. N. et al. Skin Tissue Engineering: Wound Healing Based on Stem-Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Res. Ther.* v. 10, n. 111, p. 1 – 22, 2019. DOI: 10.1186/s13287-019-1212-2.
- DELMONTE, O. M.; FLEISHER, T. A. Flow Cytometry: Surface Markers and Beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 143, n. 2, p. 528 – 537, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.08.011.
- DEUS, G. C. et al. Isolamento E Caracterização de Células-Tronco Mesenquimais de Filtros Reutilizáveis e Descartáveis De Medula Óssea. *Einstein.* v. 10, n. 3, p. 296 – 301, 2012.
- DOMINICI, M. et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy.* v. 8, n. 4, p. 315 – 317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- DULAK, J. et al. Adult Stem Cells: Hopes and Hypes of Regenerative Medicine. *Acta. Biochim. Pol.* v. 62, n. 3, p. 329 – 337, 2015. DOI: 10.18388/abp.2015_1023.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* v. 127, p. 514 – 525, 2007. DOI:10.1038/sj.jid.5700701.
- FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold. Spring Harb. Protoc.* v. 4, 2016. DOI: 10.1101/pdb.prot087379.
- FRIEDESTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The Development of Fibroblast Colonies In Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet.* v. 3, n.4, p. 393 – 403. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.
- GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *Analytical Biochemistry.* v. 1, n. 159, p. 109 – 113, 1986.

- GIULIANI, N. et al. Biphosphonates Stimulate Formation of Osteoblast Precursors and Mineralized Nodules in Murine and Human Bone Marrow Cultures in Vitro and Promote Early Osteoblastogenesis in Young and Aged Mice in Vivo. *Bone*. v. 22, p. 455 – 461, 1998. DOI: 10.1016/s8756-3282(98)00033-7.
- GUILLAMAT-PRATS, R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells*. v. 10, n. 7, p. 1729, 2021. DOI: 10.3390/cells10071729.
- GURTNER, G. C. et al. Wound Repair and Regeneration. *Nature*. v. 453, n. 7193, p. 314 – 321, 2008. DOI: 10.1038/nature07039.
- HENDIJANI, F. Explant Culture: An Advantageous Method for Isolation of Mesenchymal Stem Cells From Human Tissues. *Cell Proliferation*. v. 50, p. 1 – 14, 2017. DOI: 10.1111/cpr.12334.
- HERSKOVITZ, I. et al. Epidermal Skin Grafting. *Int. Wound. J.* v. 13, n. 3, p. 52 – 56, 2016. DOI: 10.1111/iwj.12631.
- HEYMOVSKI, J. L. et al. Basic Responses of Mesenchymal Stem Cells Exposed to Bovine Biomaterial and Platelet Rich Fibrine. *Research, Society and Development*. v. 10, n. 11, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19134.
- HICKS, M. R.; PYLE, A. D. The Emergence of the Stem Cell Niche. *Trends Cell Biol.* v. 33, n. 2, p. 112 – 123, 2023. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.003.
- HOANG, D. M. et al. Stem Cell-Based Therapy for Human Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. v. 7, n. 272, 2022. DOI: 10.1038/s41392-022-01134-4.
- ISA, I. L. M. et al. Intervertebral Disc Degeneration: Biomaterials and Tissue Engineering Strategies toward Precision Medicine. *Adv. Healthcare Materials*. v. 11, n. 13, p. 1 – 29, 2022. DOI: 10.1002/adhm.202102530.
- JO, H. et al. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, n. 5, p. 2410, 2021. DOI: 10.3390/ijms22052410.
- KLAR, A. S.; ZIMMICH, J.; BIEDERMANN, T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed. Res. Int.* v. 2017, p. 1 – 12, 2017. DOI: 10.1155/2017/9747010.
- KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*. v.85, n.1, p. 3 – 10, 2013. DOI: 10.1159/000345615.
- LEE, D. E.; AYOUB, N.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Novel Methods to Increase Cell Delivery and Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Research & Therapy*. v. 7, n. 37, 2016. DOI: 10.1186/s13287-016-0303-6.
- LEZMI, E.; BENVENISTY, N. The Tumorigenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*. v. 11, n. 8, p. 791 – 796, 2022. DOI: 10.1093/stcltm/szac039. 36
- LIU, S. et al. Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton’s Jelly of Human Umbilical Cord and for Fabrication of Non-Scaffold Tissue-Engineered Cartilage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 117, n. 2, p. 229 – 235, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.001.
- LODISH, H. et al. *Molecular Cell Biology*. 8. ed. W.H. Freeman and Company, 2016.
- MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and Biocompatibility: An Historical Overview. *J. Biomed. Mater. Res.* v. 108, p. 1617 – 1633, 2020. DOI: 10.1002/jbm.a.36930.
- MARTÍN-DEL-CAMPO, M.; ROSALES-IBAÑES, R.; ROJO, L. Biomaterials for Cleft Lip and Palate Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* v. 20, n. 2179, 2019. DOI:10.3390/ijms20092176.
- MEIRELLES, L.S. et al. Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues. *Journal of Cell Science*, v.119, p. 2204 – 2213, 2006. DOI:10.1242/jcs.02932.

- MENSAH, A. et al. Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery. *Bioengineering*. v. 9, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/bioengineering9010003.
- MITALIPOVA, M. et al. Human Embryonic Stem Cell Lines Derived from Discarded Embryos. *Stem Cells*. v. 21, p. 521 – 526, 2003.
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. Células-Tronco Mesenquimais. *Ciência Rural*. Santa Maria, 2009. ISSN 0103-8478.
- MOUSAVI, S. J. et al. In Vivo Evaluation of Bone Regeneration Using ZIF8-Modified Polypropylene Membrane in Rat Calvarium Defects. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 50, n. 10, p. 1390 – 1405, 2023. DOI: 10.1111/jcpe.13855.
- MÜELLER, P.; LEMCKE, H.; DAVID, R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol. Biochem*. v. 48, n. 6, p. 2607 – 2655, 2018. DOI: 10.1159/000492704.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Environmentally Responsive Therapeutics for Regenerative Medicine. *Exp. Mol. Med*. v. 45, n. 11, 2013. DOI: 10.1038/emm.2013.94.
- MUSHAHARY, D. et al. Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cytometry A*. v. 93, n. 1, p. 19 – 31, 2018. DOI: 10.1002/cyto.a.23242.
- NICOARA, A. I. et al. In Situ and Ex Situ Designed Hydroxyapatite: Bacterial Cellulose Materials with Biomedical Applications. *Materials*. v. 13, n. 21, p. 4793, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma13214793>.
- NESI, H.; OLIVEIRA, M. T.; MOLINA, G. O. Avaliação do Uso de Membranas na Infiltração de Tecido Conjuntivo em Alvéolos de Dentes Recém-Extraídos. *Rev. Bras. Odontol*. v. 70, n. 2, p. 136 – 141, 2013. ISSN 1984-3747.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*. v. 19, n. 3, p. 193 – 204, 2001.
- OHASHI, C. M. et al. Stem Cells from Adipose Tissue Improve the Time of Wound Healing in Rats. *Acta Cir Bras*. v. 31, n. 12, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-865020160120000007>.
- OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em Terapia Celular: Célula-Tronco. *Einstein*. São Paulo, 2004.
- PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng*. v. 2, p. 91 – 101, 2012.
- OLIVEIRA, C. R. et al. Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. *Journal of Tissue Science & Engineering*. v. 11, 2012. DOI: 10.4172/2157-7552.S11-005.
- PALANIAPPAN, U. et al. Combining Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly and Amniotic Biomaterial Scaffolds for Cell Delivery. *ACS Omega*. v. 8, p. 24.351 – 24.361, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c01689.
- PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technologies and Advanced Engineering*. v. 2, p. 91 – 101, 2012.
- PEREIRA, L. V. A Importância do Uso Das Células-Tronco para a Saúde Pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p. 7 – 14, 2008. DOI: 10.1590/S1413-81232008000100002.
- PIRES, A. L.; BIERHALZ, A. C. K. e MORAES, A. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Quim. Nova*. v. 38, n. 7, 957 – 971, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*. v. 16, n. 3, p. 225 – 238, 2015. DOI: 10.1016/j.stem.2015.02.015.

- QIU, Y. et al. Bacterial Cellulose and Bacterial Cellulose-Vaccarin Membranes for Wound Healing. *Materials Science and Engineering*. v. 59, p. 303 – 309, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2015.10.016.
- QUIROZ, F. G. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Evaluation of Their Osteogenic Potential. *Revista Engenharia Biomédica*. v. 2, n. 3, p. 48 – 55, 2008. ISSN 1909–9762.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel)*. v. 12, n. 9, p. 12.347 – 12.360, 2012. DOI: 10.3390/s120912347.
- RANJBARAN, H. et al. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran*. v. 56, n. 1, p. 28 – 33, 2018.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *Journal of Cell Biology*. v. 200, n. 4, p. 373 – 383, 2013.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res*. v. 49, p. 35 – 43, 2012. DOI: 10.1159/000339613. 37
- ROSSI, L. et al. Hematopoietic Stem Cell Characterization and Isolation. *Methods Mol. Biol*. v. 750, p. 47 – 59, 2011. DOI:10.1007/978-1-61779-145-1_3.
- SALEH, M.; KIAEI, S. Z. F.; KAVIANPOUR, M. Application of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Pulmonary Fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*. v. 13, n. 71, 2022. DOI: 10.1186/s13287-022-02746-x.
- SALOMÃO, M., SIQUEIRA, J. T. T. Uso de Barreira de Polipropileno Pós-Exodontia. Relato de Três Casos Clínicos. *Rev. Bras. Implant*. v. 12, n. 5, p. 12 – 15, 2009.
- SATHANANTHAN, A. H.; NOTTOLA, S. A. Digital Imaging of Stem Cells by Electron Microscopy. In: VEMURI, M. C. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. v. 407. Totowa, NJ: Human Press, 2007.
- SANTHANALAKSHMI, J.; BALAJI, S. *Colloids and Surfaces: A Physicochemical and Engineering Aspects*. v. 186, p. 173, 2001.
- SANTOS, C. C. V. *Avaliação do uso de membrana de polipropileno na preservação do volume alveolar após exodontias: estudo clínico randomizado prospectivo*. Dissertação (Mestrado em Odontologia na Área de Implantodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista -UNESP). São Paulo: Araçatuba, 2020.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity Test with Simplified Crystal Violet Staining Method Using Microtitre Plates and its Application to Injection Drugs. *Toxicology in Vitro*. v. 3, n. 4, p. 317 – 321, 1989. DOI: 10.1016/0887-2333(89)90039-8.
- SHARMA, P. et al. Tissue Engineering: Current Status & Futuristic Scope. *J. Med. Life*. v. 12, n. 3, p. 225 – 229, 2019. DOI: 10.25122/jml-2019-0032.
- SIBBALD, R. G. et al. Special Considerations in Wound Bed Preparation. *Advances in Skin & Wound Care*. v. 24, p. 415 – 436, 2011.
- SOBH, M. A. Adipogenesis of Sprague Dawely Rats Mesenchymal Stem Cells: a Morphological, Immunophenotyping and Gene Expression Follow-up Study. *Anatomy & Cell Biology*. v. 47, n. 2, p. 83 – 90, 2014. DOI: 10.5115/acb.2014.47.2.83.
- SOUZA, V. F. Células-Tronco: Uma Breve Revisão. *R. Ci. Méd. Biol.*, v. 2, n. 2, p. 251 – 256, 2003. DOI: 10.9771/cmbio.v2i2.4292.
- SUMAM, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. In: RATAJCZAK, M. Z. *Stem Cells: Therapeutic Applications*. 1. ed. Louisville: Springer, 2019. p. 1 – 22. DOI: 10.1007/978-3-030-31206-0.

- TAGHIZADEH, R. R. et al. Wharton's Jelly Stem Cells: Future Clinical Applications. *Placenta*. v. 32, p. 311 – 315, 2011. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.06.010.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. v. 126, n. 4, p. 663 – 676, 2006.
- TSIAPALIS, D.; O'DRISCOLL, L. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Cells*. v. 9, n. 991, 2020. DOI: 10.3390/cells9040991.
- VALENTE *et al.* Células-Tronco Mesenquimais de Origem Adiposa na Fase de Proliferação do Processo de Cicatrização de Queimaduras Frias. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 72, n. 2, p. 396 – 404, 2020. DOI: 10.1590/1678-4162-10855.
- VENUGOPAL, B.; MOGHA, P.; DHAWANA, J.; MAJUMDER, A. Cell Density Overrides the Effect of Substrate Stiffness on Human Mesenchymal Stem Cells Morphology and Proliferation. *Biomater. Sci.* v. 6, n. 6, p. 1252-1264, 2018. DOI: 10.1039/c7bm00853h.
- VIG, K. *et al.* Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* v. 18, n. 789, 2017. DOI:10.3390/ijms18040789.
- VISWANATHAN, S. et al. Mesenchymal Stem Versus Stromal Cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell Committee Position Statement on Nomenclature. *Cytotherapy*. v. 21, n. 10, p. 1019 – 1024, 2019. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
- WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial Cellulose Production, Properties and Applications with Different Culture Methods – A Review. *Carbohydr. Polym.* v. 1, n. 219, p. 63 – 76, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008.
- WEISS, M. L.; TROYER, D. L. Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell*. v. 2, n. 2, p. 155 – 162, 2006. DOI:10.1007/s12015-006-0022-y.
- WANG, K.; WEI, G. e LIU, D. CD19: A Biomarker for B Cell Development, Lymphoma Diagnosis and Therapy. *Exp Hematol Oncol*. v. 1, n. 36, 2012. DOI: 10.1186/2162-3619-1-36.
- WANG, X. Bacterial Cellulose Membrane Combined with BMSC Promotes Wound Healing by Activating. *Frontiers in Surgery*. v. 16, n. 9, 2023. DOI: 10.3389/fsurg.2022.1027067.
- WONG, J. Y. BRONZINO, J. D. Biomaterials. Editora: Taylor & Francis Group. New York, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780849378898>.
- YAGUISHITA, N. Avaliação da Cicatrização Induzida pela Membrana de Celulose Porosa Depois da Retirada Total da Pele em Dorso de Ratos. *J. Vasc. Bras.* v. 6, n. 1, 2007.
- YÜCEBAS, K. et al. Polypropylene Mesh for Nasal Septal Perforation Repair: An Experimental Study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. v. 274, p. 261 – 266, 2016. DOI: 10.1007/s00405-016-4237-5.
- ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem Cells: Past, Present, And Future. *Stem Cell Research & Therapy*. v. 10, n. 68, 2019. DOI:10.1186/s13287-019-1165-5.
- ZATS, M. Clonagem e Células-Tronco. *Estudos Avançados*. v. 18, n. 51, 2004.

5 CONCLUSÃO GERAL

Diante do reconhecido potencial das células-tronco mesenquimais da Geleia de Wharton (CTM-GW) na medicina regenerativa, decorrente de suas propriedades imunomoduladoras e multipotenciais, este estudo avaliou comparativamente diferentes arcabouços, a membrana de celulose bacteriana (MCB) e a membrana de polipropileno (MP), aplicados ao cultivo celular como potenciais suportes para CTM-GW. A investigação simultânea desses dois arcabouços, até então não explorada de maneira integrada na literatura, possibilitou a obtenção de evidências relevantes acerca de sua biocompatibilidade, potencial de adesão celular e influência sobre a proliferação, contribuindo para a compreensão de parâmetros que são cruciais no desenvolvimento de produtos de terapia avançada

Os resultados evidenciaram que ambos os arcabouços favoreceram a adesão e a proliferação das CTM-GW, sustentando o crescimento celular sem sinais de citotoxicidade significativa, o que confirma sua biocompatibilidade. Observou-se ainda um desempenho distinto conforme a densidade inicial de semeadura, sugerindo que as respostas celulares são moduladas pelas propriedades físico-químicas e estruturais de cada substrato, podendo também ser influenciadas pelas condições de cultivo.

Sob a perspectiva da biotecnologia, os resultados obtidos ampliam o entendimento sobre as interações entre CTM-GW e diferentes matrizes de suporte, contribuindo para o aprimoramento de estratégias de regeneração tecidual, bem como para o desenvolvimento de curativos avançados e dispositivos biomédicos voltados para o tratamento de feridas cutâneas complexas. Ao combinar rigor experimental, relevância clínica e inovação tecnológica, esta pesquisa oferece uma base sólida para os avanços na integração entre arcabouços e terapias celulares, com impactos promissores tanto no campo científico quanto em suas possíveis aplicações clínicas futuras.

6 REFERÊNCIAS GERAIS

ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 6. ed. Garland Science, 2015.

ALVES, E. G. L. et al. Estudo Comparativo da Diferenciação Osteogênica das Células-Tronco Mesenquimais da Medula Óssea e do Tecido Adiposo de Cães Adultos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 36, supl. 1, p. 21 – 32, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X201600130004.

AMORIM, J. D. P. Bacterial Cellulose as a Versatile Biomaterial for Wound Dressing Application. *Molecules*. v.27, n. 5580, 2022. DOI: 10.3390/molecules27175580.

ANSELME, K. *Osteoblast Adhesion on Biomaterials*. *Biomaterials*. v. 21, n. 7, p. 667 – 681, 2000.

ARRUDA, I. *Avaliação do Potencial de Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais Criopreservadas Obtidas de Gelatina de Wharton e Tecido Adiposo Canino e Cultivadas em Duas Concentrações de Soro Fetal Bovino*. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. São Paulo: Botucatu, 2018.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Application in Cell and Gene Therapy. *J. Cell Mol. Med.* v. 8, n. 3, p. 301 – 316, 2004. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.

BARBOSA, P. F. et al. Estudo Citofotométrico da Expressão dos Marcadores Tumorais Ki-67 e CD34 no Adenocarcinoma de Próstata. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, Rio de Janeiro. v. 36, n. 6, p. 498 – 503, 2009. DOI: 10.1590/s0100-69912009000600007.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characterization. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* v. 36, n. 4, p. 568 – 584, 2004. DOI: 10.1016/j.biocel.2003.11.001.

BAUDEQUIN, T.; TRABIZIAN, M. Multilineage Constructs for Scaffold-Based Tissue Engineering: A Review of Tissue-Specific Challenges. *Adv. Healthcare Mater.* v. 7, p. 1 – 29, 2018. DOI: 10.1002/adhm.201700734.

BIRBRAIR, A. Stem Cell Microenvironments and Beyond. *Adv. Exp. Med. Biol.* v. 1041, p. 1 – 3, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-69194-7_1.

BIRESSI, S.; FILARETO, A. RANDO, T. A. Stem Cell Therapy for Muscular Dystrophies. *J. Clin. Invest.* v. 130, n. 11, p. 5652 – 5664, 2020. DOI: 10.1172/JCI142031.

BONNIER, F. et al. Cell Viability Assessment Using the Alamar Blue Assay: A Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models. *Toxicology in Vitro.* v. 29, p. 124 – 131, 2015.

BROWN, C. et al. Mesenchymal Stem Cells: Cell Therapy and Regeneration Potential. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* v. 13, n. 9, p. 1738 – 1755, 2019. DOI: 10.1002/term.2914.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características Biológicas das Células-Tronco Mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 31, n. 1, 2009. DOI: 10.1590/S1516-84842009005000038.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de Feridas. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* v. 20, n. 1, p. 51 – 58, 2007.

CARVALHO, H. S. Células-Tronco e Terapias Regenerativas. *Revista Eletrônica Estácio Saúde.* v. 3, n. 2, 2014. ISSN1983-1617.

CAVALCANTI, A. L.; LIMA, A. L.; FERREIRA, L. M. Eficácia da Membrana de Celulose Bacteriana no Tratamento de Úlceras Venosas de Membros Inferiores: Estudo Randomizado e Controlado. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* v. 44, n. 1, p. 72 – 80, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-69912017001011>.

CHAUDHARI, A. A. et al. Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* v. 17, n. 12, p. 1 – 32, 2016. DOI: 10.3390/ijms17121974.

CHERNG, J. et al. Bacterial Cellulose as a Potential Bio-Scaffold for Effective Re-Epithelialization Therapy. *Pharmaceutics.* v. 13, n. 1592, 2021. DOI: 10.3390/pharmaceutics13101592.

CHUNG, Y. G. et al. Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell.* v. 14, p. 777 – 780, 2014.

COELHO, G. A. et al. Os Curativos de Nanocelulose de Pinus e Nanocelulose Bacteriana são Semelhantes no Tratamento da Queimadura de Segundo Grau? Estudo Experimental em Ratos. *ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.* v. 33, n. 2, 2020. DOI: 10.1590/0102-672020200002e1533.

COHEN, J. Biomaterials in Orthopedic Surgery. *The American Journal of Surgery.* v. 114, p. 31 – 41, 1967.

- DAI, C.; SHIH, S.; KHACHEMOUNE, A. Skin Substitutes for Acute and Chronic Wound Healing: An Updated Review. *J. Dermatolog. Treat.* v. 31, n. 6, p. 639 – 648, 2020. DOI: 10.1080/09546634.2018.1530443.
- DALEY, J. M. et al. Modulation of Macrophage Phenotype by Soluble Product(s) Released From Neutrophils. *J. Immunol.* v. 174, p. 2265 – 2272, 2005.
- DAVIS, N. F. et al. Biomaterials and Regenerative Medicine in Urology. *Adv. Exp. Med. Biol.* In: Cell Biology and Translational Medicine. Heidelberg: Springer. v. 1107, p. 189 – 198, 2018. DOI: 10.1007/5584_2017_139.
- DEHKORDI, A. N. et al. Skin Tissue Engineering: Wound Healing Based on Stem-Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Res. Ther.* v. 10, n. 111, p. 1 – 22, 2019. DOI: 10.1186/s13287-019-1212-2.
- DELMONTE, O. M.; FLEISHER, T. A. Flow Cytometry: Surface Markers And Beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* v. 143, n. 2, p. 528 – 537, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.08.011.
- DEUS, G. C. et al. Isolamento e Caracterização de Células-tronco Mesenquimais de Filtros Reutilizáveis e Descartáveis de Medula Óssea. *Einstein.* v. 10, n. 3, p. 296 – 301, 2012.
- DOMINICI, M. et al. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Cytotherapy.* v. 8, n. 4, p. 315 – 317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.
- DU, J.; KATTI, D.; THOMAS, V. Interactions Between Biomaterials and Biological Tissues and Cells, Part I. *JOM.* v. 74, n. 9, 2022. DOI: 10.1007/s11837-022-05420-y.
- DULAK, J. et al. Adult Stem Cells: Hopes and Hypes of Regenerative Medicine. *Acta. Biochim. Pol.* v. 62, n. 3, p. 329 – 337, 2015. DOI: 10.18388/abp.2015_1023.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* v. 127, p. 514 – 525, 2007. DOI:10.1038/sj.jid.5700701.
- FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold. Spring Harb. Protoc.* v. 4, 2016. DOI: 10.1101/pdb.prot087379.
- FERRARA, N. VEGF-A: A Critical Regulator of Blood Vessel Growth. *European Cytokine Network.* v. 20, n. 4, p. 158–163, 2009. DOI: 10.1684/ecn.2009.0170.
- FRIEDESTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Tissue Kinet.* v. 3, n.4, p. 393 – 403. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.
- GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of Cell Number in Monolayer Cultures. *Analytical Biochemistry.* v. 1, n. 159, p. 109 – 113, 1986.
- GIULIANI, N. et al. Biphosphonates Stimulate Formation of Osteoblast Precursors and Mineralized Nodules in Murine and Human Bone Marrow Cultures *in vitro* And Promote Early Osteoblastogenesis in Young and Aged Mice *in Vivo*. *Bone.* v. 22, p. 455 – 461, 1998. DOI: 10.1016/s8756-3282(98)00033-7.
- GUILLAMAT-PRATS, R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. *Cells.* v. 10, n. 7, p. 1729, 2021. DOI: 10.3390/cells10071729.
- GURTNER, G. C. et al. Wound Repair and Regeneration. *Nature.* v. 453, n. 7193, p. 314 – 321, 2008. DOI: 10.1038/nature07039.
- HAN, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells.* v. 8, n. 886, 2019. DOI: 10.3390/cells8080886.
- HENDIJANI, F. Explant Culture: An Advantageous Method for Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Human Tissues. *Cell Proliferation.* v. 50, p. 1 – 14, 2017. DOI: 10.1111/cpr.12334.

- HERSKOVITZ, I. et al. Epidermal Skin Grafting. *Int. Wound. J.* v. 13, n. 3, p. 52 – 56, 2016. DOI: 10.1111/iwj.12631.
- HEYMOVSKI, J. L. et al. Basic Responses of Mesenchymal Stem Cells Exposed to Bovine Biomaterial and Platelet Rich Fibrine. *Research, Society and Development.* v. 10, n. 11, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19134.
- HICKS, M. R.; PYLE, A. D. The Emergence of The Stem Cell Niche. *Trends Cell Biol.* v. 33, n. 2, p. 112 – 123, 2023. DOI: 10.1016/j.tcb.2022.07.003.
- HOANG, D. M. et al. Stem Cell-Based Therapy for Human Diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* v. 7, n. 272, 2022. DOI: 10.1038/s41392-022-01134-4.
- ISA, I. L. M. et al. Intervertebral Disc Degeneration: Biomaterials and Tissue Engineering Strategies toward Precision Medicine. *Adv. Healthcare Materials.* v. 11, n. 13, p. 1 – 29, 2022. DOI: 10.1002/adhm.202102530.
- JO, H. et al. Applications of Mesenchymal Stem Cells in Skin Regeneration and Rejuvenation. *Int. J. Mol. Sci.* v. 22, n. 5, p. 2410, 2021. DOI: 10.3390/ijms22052410.
- KANG, Y. Cell Biological Techniques and Cell-Biomaterial Interactions. *Cells.* v. 9, n. 2094, 2020. DOI: 10.3390/cells9092094.
- KERN, S. et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* v. 24, p. 1294 – 1301, 2006. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- KLAR, A. S.; ZIMOCZ, J.; BIEDERMANN, T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed. Res. Int.* v. 2017, p. 1 – 12, 2017. DOI: 10.1155/2017/9747010.
- KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration.* v.85, n.1, p. 3 – 10, 2013. DOI: 10.1159/000345615.
- LEE, D. E.; AYOUB, N.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal Stem Cells and Cutaneous Wound Healing: Novel Methods to Increase Cell Delivery and Therapeutic Efficacy. *Stem Cell Research & Therapy.* v. 7, n. 37, 2016. DOI: 10.1186/s13287-016-0303-6.
- LEZMI, E.; BENVENISTY, N. The Tumorigenic Potential of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine.* v. 11, n. 8, p. 791 – 796, 2022. DOI: 10.1093/stcltm/szac039. 36
- LIU, S. et al. Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of Human Umbilical Cord and For Fabrication of Non-Scaffold Tissue-Engineered Cartilage. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* v. 117, n. 2, p. 229 – 235, 2014. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.001.
- LODISH, H. et al. *Molecular Cell Biology.* 8. ed. W.H. Freeman and Company, 2016.
- MARIN, E.; BOSCHETTO, F.; PEZZOTTI, G. Biomaterials and Biocompatibility: An Historical Overview. *J. Biomed. Mater. Res.* v. 108, p. 1617 – 1633, 2020. DOI: 10.1002/jbm.a.36930.
- MARTÍN-DEL-CAMPO, M.; ROSALES-IBAÑES, R.; ROJO, L. Biomaterials for Cleft Lip and Palate Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* v. 20, n. 2179, 2019. DOI:10.3390/ijms20092176.
- MARTINO, S. Stem Cell-Biomaterial Interactions for Regenerative Medicine. *Biotechnology Advances.* v. 30, p. 338 – 351, 2012. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.015.
- MEIRELLES, L.S. et al. Mesenchymal Stem Cells Reside in Virtually All Post-Natal Organs and Tissues. *Journal of Cell Science,* v.119, p. 2204 – 2213, 2006. DOI:10.1242/jcs.02932.
- MENSAH, A. et al. Membrane Technological Pathways and Inherent Structure of Bacterial Cellulose Composites for Drug Delivery. *Bioengineering.* v. 9, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/bioengineering9010003.
- MITALIPOVA, M. et al. Human Embryonic Stem Cell Lines Derived from Discarded Embryos. *Stem Cells.* v. 21, p. 521 – 526, 2003.

- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; CARLO, R. J. Células-Tronco Mesenquimais. *Ciência Rural*. Santa Maria, 2009. ISSN 0103-8478.
- MOUSAVI, S. J. et al. In Vivo Evaluation of Bone Regeneration Using ZIF8-Modified Polypropylene Membrane in Rat Calvarium Defects. *Journal of Clinical Periodontology*. v. 50, n. 10, p. 1390 – 1405, 2023. DOI: 10.1111/jcpe.13855.
- MÜELLER, P.; LEMCKE, H.; DAVID, R. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cell Physiol. Biochem*. v. 48, n. 6, p. 2607 – 2655, 2018. DOI: 10.1159/000492704.
- MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Environmentally Responsive Therapeutics for Regenerative Medicine. *Exp. Mol. Med*. v. 45, n. 11, 2013. DOI: 10.1038/emm.2013.94.
- MUSHAHARY, D. et al. Isolation, Cultivation, and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells. *Cytometry A*. v. 93, n. 1, p. 19 – 31, 2018. DOI: 10.1002/cyto.a.23242.
- NICOARA, A. I. et al. In Situ and Ex Situ Designed Hydroxyapatite: Bacterial Cellulose Materials with Biomedical Applications. *Materials*. v. 13, n. 21, p. 4793, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ma13214793>.
- NESI, H.; OLIVEIRA, M. T.; MOLINA, G. O. Avaliação do Uso De Membranas na Infiltração de Tecido Conjuntivo Em Alvéolos De Dentes Recém-Extraídos. *Rev. Bras. Odontol*. v. 70, n. 2, p. 136 – 141, 2013. ISSN 1984-3747.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines. *Stem Cells*. v. 19, n. 3, p. 193 – 204, 2001.
- OHASHI, C. M. et al. Stem Cells from Adipose Tissue Improve the Time of Wound Healing in Rats. *Acta Cir Bras*. v. 31, n. 12, 2016. DOI: 10.1590/S0102-865020160120000007.
- OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em Terapia Celular: Célula-Tronco. *Einstein*. São Paulo, 2004.
- OLIVEIRA, C. R. et al. Bacterial Cellulose Membranes Constitute Biocompatible Biomaterials for Mesenchymal and Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Tissue Engineering. *Journal of Tissue Science & Engineering*. v. 11, 2012. DOI: 10.4172/2157-7552.S11-005.
- OSAGIE, D. T. et al. Cell-Based Therapies for Regenerative Medicine. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 60, p. 104 – 112, 2019. DOI: 10.1016/j.copbio.2019.06.007.
- PALANIAPPAN, U. et al. Combining Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton’s Jelly and Amniotic Biomaterial Scaffolds for Cell Delivery. *ACS Omega*. v. 8, p. 24.351 – 24.361, 2023. DOI: 10.1021/acsomega.3c01689.
- PATEL, N. R.; GOHIL, P. P. A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technologies and Advanced Engineering*. v. 2, p. 91 – 101, 2012.
- PEREIRA, L. V. A Importância do Uso das Células-Tronco para a Saúde Pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p. 7 – 14, 2008. DOI: 10.1590/S1413-81232008000100002.
- PIRES, A. L.; BIERHALZ, A. C. K. e MORAES, A. M. Biomaterials: Types, Applications, and Market. *Quim. Nova*. v. 38, n. 7, 957 – 971, 2015. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.
- PLAKS, V.; KONG, N.; WERB, Z. The Cancer Stem Cell Niche: How Essential is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells? *Cell Stem Cell*. v. 16, n. 3, p. 225 – 238, 2015. DOI: 10.1016/j.stem.2015.02.015.
- QIU, Y. et al. Bacterial Cellulose and Bacterial Cellulose-Vaccarin Membranes for Wound Healing. *Materials Science and Engineering*. v. 59, p. 303 – 309, 2016. DOI: 10.1016/j.msec.2015.10.016.
- QUIROZ, F. G. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Evaluation of Their Osteogenic Potential. *Revista Engenharia Biomédica*. v. 2, n. 3, p. 48 – 55, 2008. ISSN 1909-9762.

- RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health In Cell Viability Bioassays. *Sensors (Basel)*. v. 12, n. 9, p. 12.347 – 12.360, 2012. DOI: 10.3390/s120912347.
- RANJBARAN, H. et al. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran*. v. 56, n. 1, p. 28 – 33, 2018.
- RAPOSO, G.; STORVOGEL, W. Extracellular Vesicles: Exosomes, Microvesicles, and Friends. *Journal of Cell Biology*. v. 200, n. 4, p. 373 – 383, 2013.
- REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. *Eur. Surg. Res.* v. 49, p. 35 – 43, 2012. DOI: 10.1159/000339613. 37
- RODRIGUES, M.; GARCIA, M. S.; MURTA, C. S. Biomateriais e Engenharia Tecidual. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*. v. 35, n. 2, p. 125 – 137, 2019. DOI: 10.1590/1678-5150-RBEB-2017-0102.
- ROSSI, L. et al. Hematopoietic Stem Cell Characterization and Isolation. *Methods Mol. Biol.* v. 750, p. 47 – 59, 2011. DOI:10.1007/978-1-61779-145-1_3.
- SALEH, M.; KIAEI, S. Z. F.; KAVIANPOUR, M. Application of Wharton Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Patients with Pulmonary Fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*. v. 13, n. 71, 2022. DOI: 10.1186/s13287-022-02746-x.
- SALOMÃO, M., SIQUEIRA, J. T. T. Uso de Barreira de Polipropileno Pós-Exodontia. Relato de três casos clínicos. *Rev. Bras. Implant.* v. 12, n. 5, p. 12 – 15, 2009.
- SATHANANTHAN, A. H.; NOTTOLA, S. A. Digital Imaging of Stem Cells by Electron Microscopy. In: VEMURI, M. C. (Ed.). *Methods in Molecular Biology*. v. 407. Totowa, NJ: Human Press, 2007.
- SANTHANALAKSHMI, J.; BALAJI, S. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 186, p. 173, 2001.
- SANTOS, C. C. V. *Avaliação do uso de membrana de polipropileno na preservação do volume alveolar após exodontias: estudo clínico randomizado prospectivo*. Dissertação (Mestrado em Odontologia na Área de Implantodontia – Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista -UNESP). São Paulo: Araçatuba, 2020.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity Test with Simplified Crystal Violet Staining Method Using Microtitre Plates and Its Application to Injection Drugs. *Toxicology in Vitro*. v. 3, n. 4, p. 317 – 321, 1989. DOI: 10.1016/0887-2333(89)90039-8.
- SAWAI, A. et al. Enhancing Wound Healing with Dermal Regenerative Medicine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. v. 101, n. 11, p. 3197 – 3207, 2013. DOI: 10.1002/jbm.a.35051.
- SHARMA, P. et al. Tissue Engineering: Current Status & Futuristic Scope. *J. Med. Life*. v. 12, n. 3, p. 225 – 229, 2019. DOI: 10.25122/jml-2019-0032.
- SIBBALD, R. G. et al. Special Considerations in Wound Bed Preparation. *Advances in Skin & Wound Care*. v. 24, p. 415 – 436, 2011.
- SILVA, J. M. et al. Use of Bacterial Cellulose Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. v. 14, n. 2, p. 99 – 107, 2018. DOI: 10.1007/s13770-018-0137-3.
- SOBH, M. A. Adipogenesis of Sprague Dawely Rats Mesenchymal Stem Cells: a Morphological, Immunophenotyping and Gene Expression Follow-up Study. *Anatomy & Cell Biology*. v. 47, n. 2, p. 83 – 90, 2014. DOI: 10.5115/acb.2014.47.2.83.
- SOUZA, L. D. et al. The Role of Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *International Journal of Stem Cells*. v. 15, n. 1, p. 1 – 16, 2022. DOI: 10.15283/ijsc21131.

- SOUZA, V. F. Células-Tronco: Uma Breve Revisão. *R. Ci. Méd. Biol.*, v. 2, n. 2, p. 251 – 256, 2003. DOI: 10.9771/cmbio.v2i2.4292.
- SUMAM, S. et al. Potential Clinical Applications of Stem Cells in Regenerative Medicine. In: RATAJCZAK, M. Z. *Stem Cells: Therapeutic Applications*. 1. ed. Louisville: Springer, 2019. p. 1 – 22. DOI: 10.1007/978-3-030-31206-0.
- TAGHIZADEH, R. R. et al. Wharton’s Jelly Stem Cells: Future Clinical Applications. *Placenta*. v. 32, p. 311 – 315, 2011. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.06.010.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. v. 126, n. 4, p. 663 – 676, 2006.
- TARANTINO, S. S.; STEWART, J. R. Advanced Cell-Based Therapies for Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. v. 7, n. 1, 2019. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00107.
- TEIXEIRA, A. I. et al. Bacterial Cellulose in Regenerative Medicine: A Review. *Biomaterials*. v. 37, p. 116 – 128, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.008.
- TSIAPALIS, D.; O’DRISCOLL, L. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Cells*. v. 9, n. 991, 2020. DOI: 10.3390/cells9040991.
- VALENTE et al. Células-Tronco Mesenquimais de Origem Adiposa na Fase de Proliferação do Processo de Cicatrização de Queimaduras Frias. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 72, n. 2, p. 396 – 404, 2020. DOI: 10.1590/1678-4162-10855.
- VENUGOPAL, B.; MOGHA, P.; DHAWANA, J.; MAJUMDER, A. Cell Density Overrides the Effect of Substrate Stiffness on Human Mesenchymal Stem Cells Morphology and Proliferation. *Biomater. Sci.* v. 6, n. 6, p. 1252-1264, 2018. DOI: 10.1039/c7bm00853h.
- VIG, K. et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int. J. Mol. Sci.* v. 18, n. 789, 2017. DOI:10.3390/ijms18040789.
- VILLAR, R. C. et al. Bacterial Cellulose-Based Materials in Regenerative Medicine: A Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*. v. 15, n. 3, p. 216 – 229, 2020. DOI: 10.2174/1574888X156662001040820.
- VISWANATHAN, S. et al. Mesenchymal Stem Versus Stromal Cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell Committee Position Statement on Nomenclature. *Cytotherapy*. v. 21, n. 10, p. 1019 – 1024, 2019. DOI: 10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
- WANG, J.; TAVAKOLI, J.; TANG, Y. Bacterial Cellulose Production, Properties and Applications with Different Culture Methods – A Review. *Carbohydr. Polym.* v. 1, n. 219, p. 63 – 76, 2019. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.05.008.
- WEISS, M. L.; TROYER, D. L. Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell*. v. 2, n. 2, p. 155 – 162, 2006. DOI:10.1007/s12015-006-0022-y.
- WANG, M. et al. Stem Cell-Based Therapies for Regenerative Medicine. *Stem Cell Research & Therapy*. v. 11, n. 259, 2020. DOI: 10.1186/s13287-020-01828-0.
- WANG, K.; WEI, G. e LIU, D. CD19: A Biomarker for B Cell Development, Lymphoma Diagnosis and Therapy. *Exp Hematol Oncol*. v. 1, n. 36, 2012. DOI: 10.1186/2162-3619-1-36.
- WANG, X. Bacterial Cellulose Membrane Combined with BMSC Promotes Wound Healing by Activating. *Frontiers in Surgery*. v. 16, n. 9, 2023. DOI: 10.3389/fsurg.2022.1027067.
- WONG, J. K. U. et al. Cellular Modifications and Biomaterial Design to Improve Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Biomater Sci*. v. 11, n. 14, p. 4752-4773, 2023. DOI: 10.1039/d3bm00376k.

WONG, J. Y. BRONZINO, J. D. *Biomaterials*. Editora: Taylor & Francis Group. New York, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780849378898>.

YAGUISHITA, N. Avaliação da Cicatrização Induzida pela Membrana de Celulose Porosa Depois da Retirada Total da Pele em Dorso de Ratos. *J. Vasc. Bras.* v. 6, n. 1, 2007.

YÜCEBAS, K. et al. Polypropylene Mesh for Nasal Septal Perforation Repair: An Experimental Study. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* v. 274, p. 261 – 266, 2016. DOI: 10.1007/s00405-016-4237-5.

ZAKRZEWSKI, W. et al. Stem cells: Past, Present, and Future. *Stem Cell Research & Therapy.* v. 10, n. 68, 2019. DOI:10.1186/s13287-019-1165-5.

ZATS, M. Clonagem e Células-tronco. *Estudos Avançados.* v. 18, n. 51, 2004.

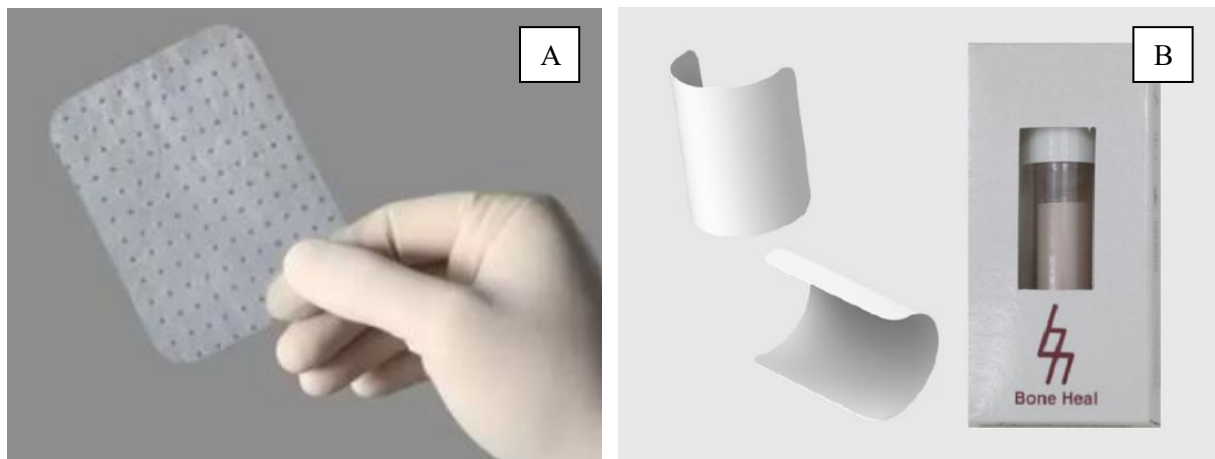
ZHU, Y. et al. Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Journal of Cellular Physiology.* v. 233, n. 5, p. 3036 – 3050, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26109.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Obtenção dos Arcabouços

A membrana de celulose bacteriana, comercialmente conhecida por Membracel[®] (Figura 1A), foi disponibilizada como bonificação pela empresa parceira Vuelo Pharma (Curitiba/PR), e a membrana sintética de polipropileno, comercialmente conhecida como BoneHeal[®] (Figura AB), foi disponibilizada também como bonificação pela empresa parceira BoneHeal Indústria e Comércio LTDA (São Paulo/SP).

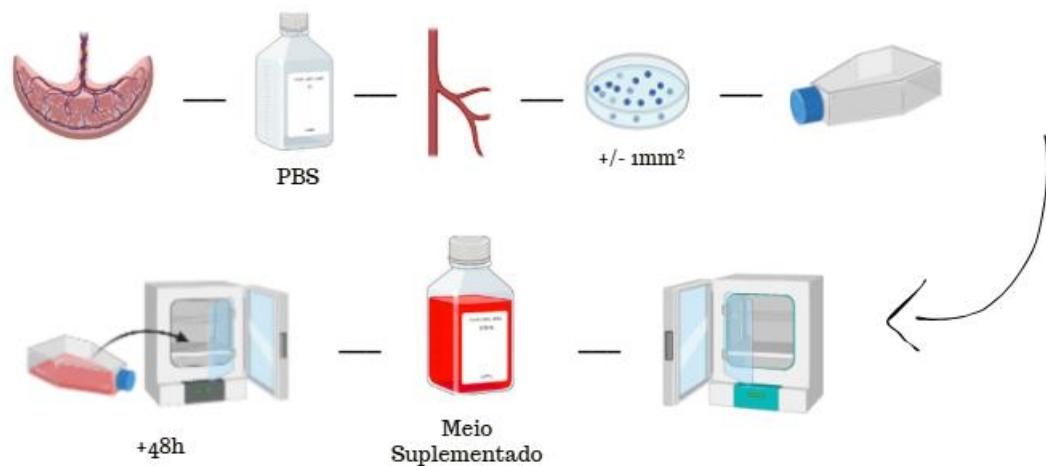
Figura 1. Visualização das Membranas de Celulose Bacteriana (A) e Polipropileno (B).



Fonte: Foto do Autor, 2025.

APÊNDICE B – Etapas da Técnica de Explante

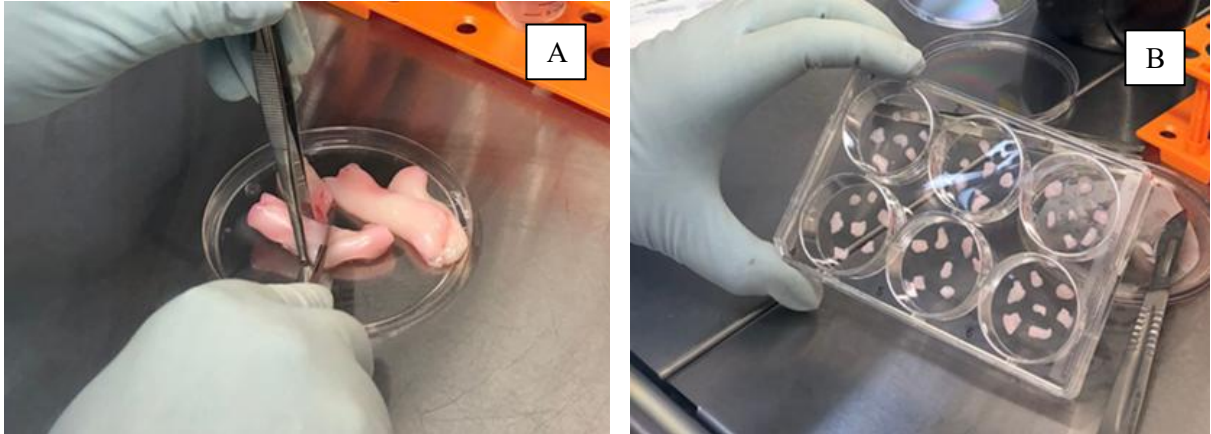
Figura 2. Etapas da Técnica de Explante.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

APÊNDICE C – Manipulação do Cordão Umbilical

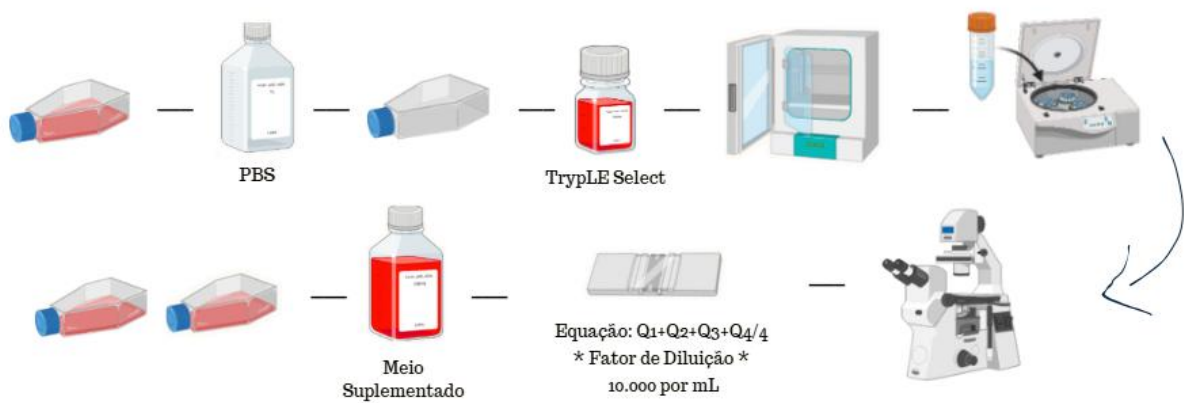
Figura 3. Dissecção (A) e Fragmentação (B) do Cordão Umbilical.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

APÊNDICE D – Etapas da Passagem Celular

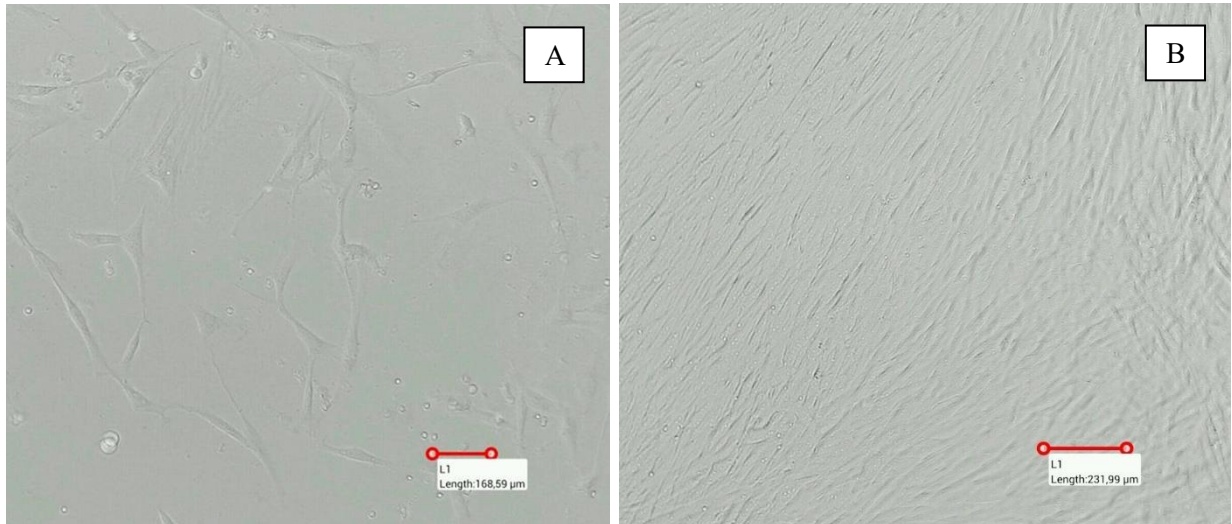
Figura 4. Etapas da Passagem Celular.



Fonte: Foto do Autor, 2025.

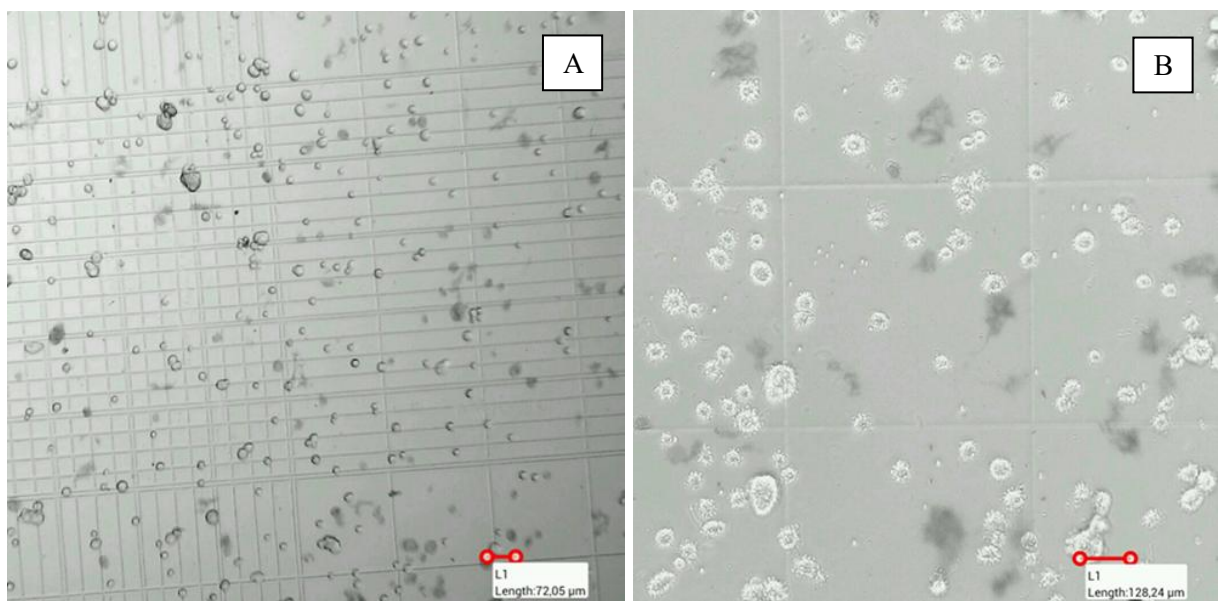
APÊNDICE E – *Contagem Celular*

Figura 5. Representação de Baixa (A, 10 dias) e Alta (B, 30 dias) Confluência das Células Isoladas do Cordão Umbilical.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Figura 6. Visualização das Células Isoladas na Câmara de Neubauer em aumento de 10× (A) e 40× (B).



Fonte: Foto do Autor, 2024.

APÊNDICE F – Caracterização Mesenquimal

Após a obtenção celular, se faz necessário confirmar o fenótipo dessas células. A seguir, o Quadro 1 apresenta a classificação dos marcadores de superfície com base na sua expressão esperada, distinguindo aqueles que devem ser expressos dos que não são habitualmente detectados. Enquanto o Quadro 2 descreve a função associada a cada marcador de superfície.

Quadro 1. Painel de Marcadores Imunofenotípicos de CTM.

Marcadores Expressos (+)	Marcadores Não Expressos (-)
CD73	CD34
CD90	CD45
CD105	CD14/CD11b
-	CD19/CD79a
-	HLA-DR

Observação: O marcador 7-AAD foi utilizado para quantificação da viabilidade celular.

Quadro 2. Descrição dos Marcados utilizados para Caracterização de CTM.

Marcador	Descrição
CD14/CD11b	Glicoproteínas expressas na superfície de monócitos, macrófagos e granulócitos e responsáveis pelo reconhecimento de patógenos, fagocitose e adesão celular durante a resposta imune inata ¹ .
CD19/CD79a	Glicoproteínas associadas à linhagem de células B, presentes no contexto de resposta imunológica ² .
CD34	Glicoproteína transmembranar, expressa em células hematopoéticas e endoteliais, responsável na formação de novos vasos ou angiogênese ³ .
CD45	Glicoproteína transmembranar, expressa em células hematopoéticas, exceto eritrócitos e plaquetas, denominada <i>Antígeno Leucocitário Comum</i> . Responsável em regular a ativação e maturação celular no sistema imunológico ¹ .
CD73	Enzima atuante na modulação das respostas imunes e na homeostase celular, catalisando a conversão de adenosina monofosfato (AMP) em adenosina, uma molécula com propriedades imunossupressoras ⁴ .
CD90	Proteína envolvida em processos de adesão celular e sinalização, como também na manutenção da pluripotência e diferenciação celular ⁵ .

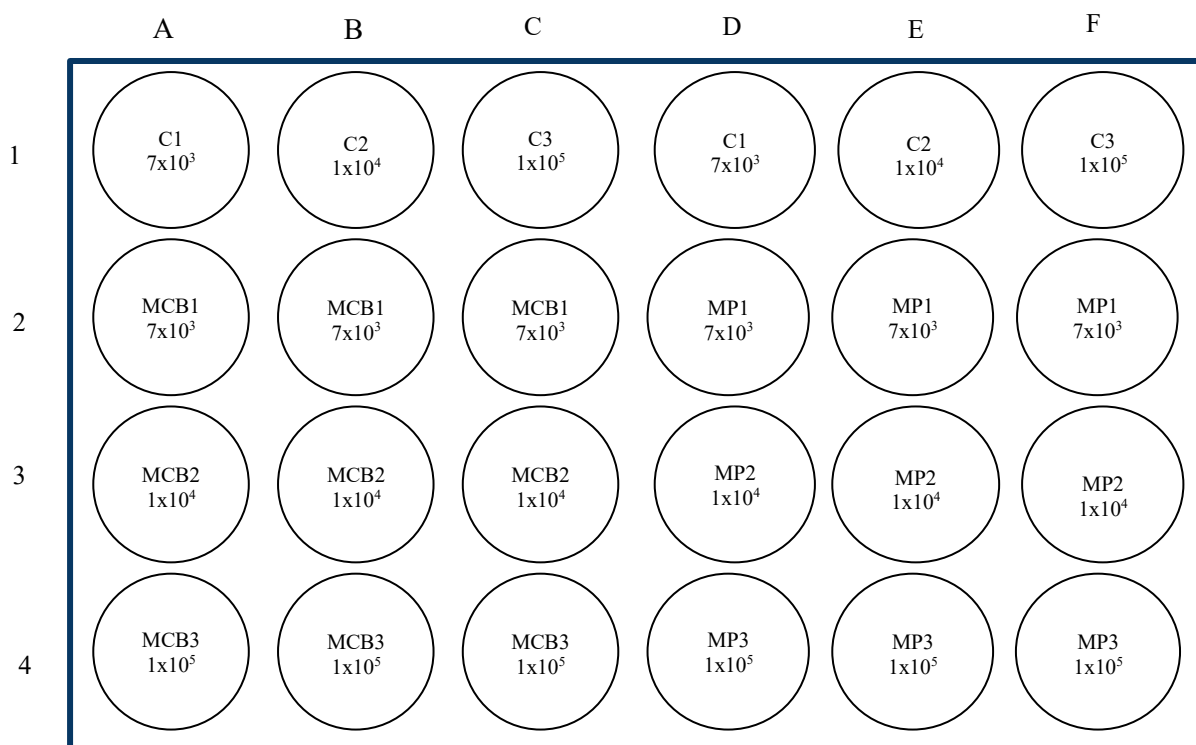
CD105	Glicoproteína associada à angiogênese e diferenciação celular ⁵ .
HLA-DR	Molécula de Histocompatibilidade Classe II associada à ativação imune ⁵ .

Fonte: MONTEIRO, NETO e CARLO, 2009¹; WANG, WEI e LIU, 2012²; BARBOSA et al., 2009³; BYDLOWSKI et al., 2009⁴ e DEUS et al., 2012⁵.

APÊNDICE G – Plaqueamento com Cristal Violeta

A seguir, há uma representação visual das placas de cultivo elaboradas durante os ensaios deste estudo. Para o plaqueamento do Cristal Violeta, as células foram quantificadas para atingir densidades de 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/cm². Os volumes correspondentes foram distribuídos na placa de cultivo, contemplando os controles e as triplicatas, em poços contendo fragmentos de aproximadamente 1 cm² de cada membrana testada (Figura 7).

Figura 7. Modelo de Plaqueamento das Células sobre Arcabouços para Coloração com CV.



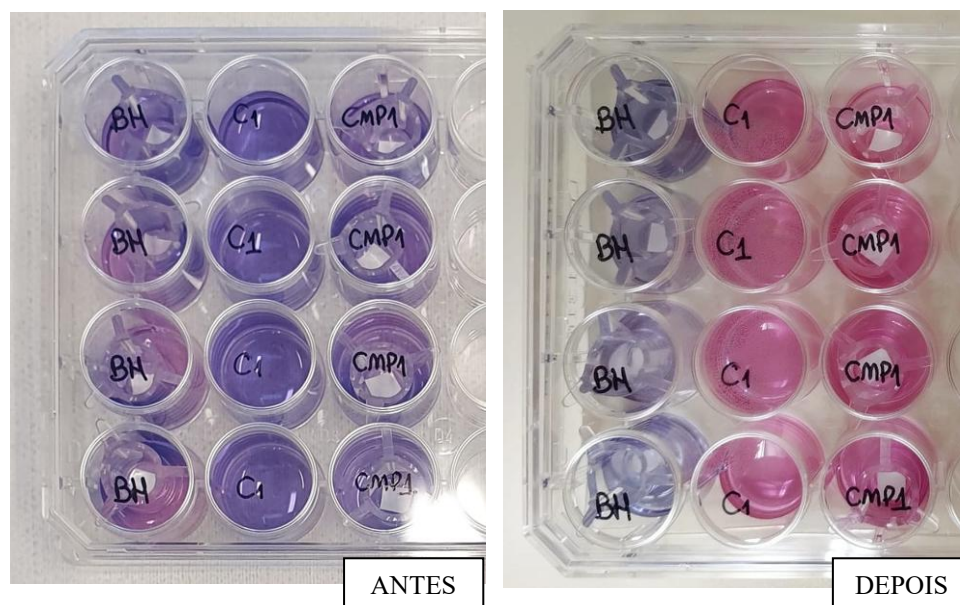
Fonte: Autor, 2024.

Legenda: A figura mostra que os Grupos “C1/C2 e C3 (Controles)” correspondem às CTM-GW plaqueadas nos volumes 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/poço, respectivamente; os Grupos “MCB1/MCB2 e MCB3”, às CTM-GW plaqueadas nos volumes 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/poço, correspondentemente, sobre MCB; e os Grupos “MP1, MP2 e MP3”, às CTM-GW plaqueadas nos volumes 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/poço, em ordem, sobre MP.

APÊNDICE H – Demonstração da Redução de Resazurina em Resorufina

No primeiro dia de plaqueamento, os poços onde foram adicionados o *Alamar Blue*[®], cujo composto é a resazurina, apresentavam uma coloração azulada e não fluorescente. Após a finalização do teste, visualizou-se que os poços contendo células passaram a apresentar uma coloração rósea, pois o reagente ali presente foi convertido gradualmente para resorufina, um composto rosa e altamente fluorescente (Figura 8).

Figura 8. Demonstração da Redução de Resazurina em Resorufina na Placa de MP.



Fonte: Foto do Autor, 2024.

Legenda: Na figura, “BH” indica o poço contendo o “Branco”, sem adição de células. Os poços identificados como “C1” referem-se aos controles contendo 7×10^3 células/poço, enquanto “CMP1” indica os poços com CTM-GW semeadas na mesma densidade, em contato com a MP no inserto.

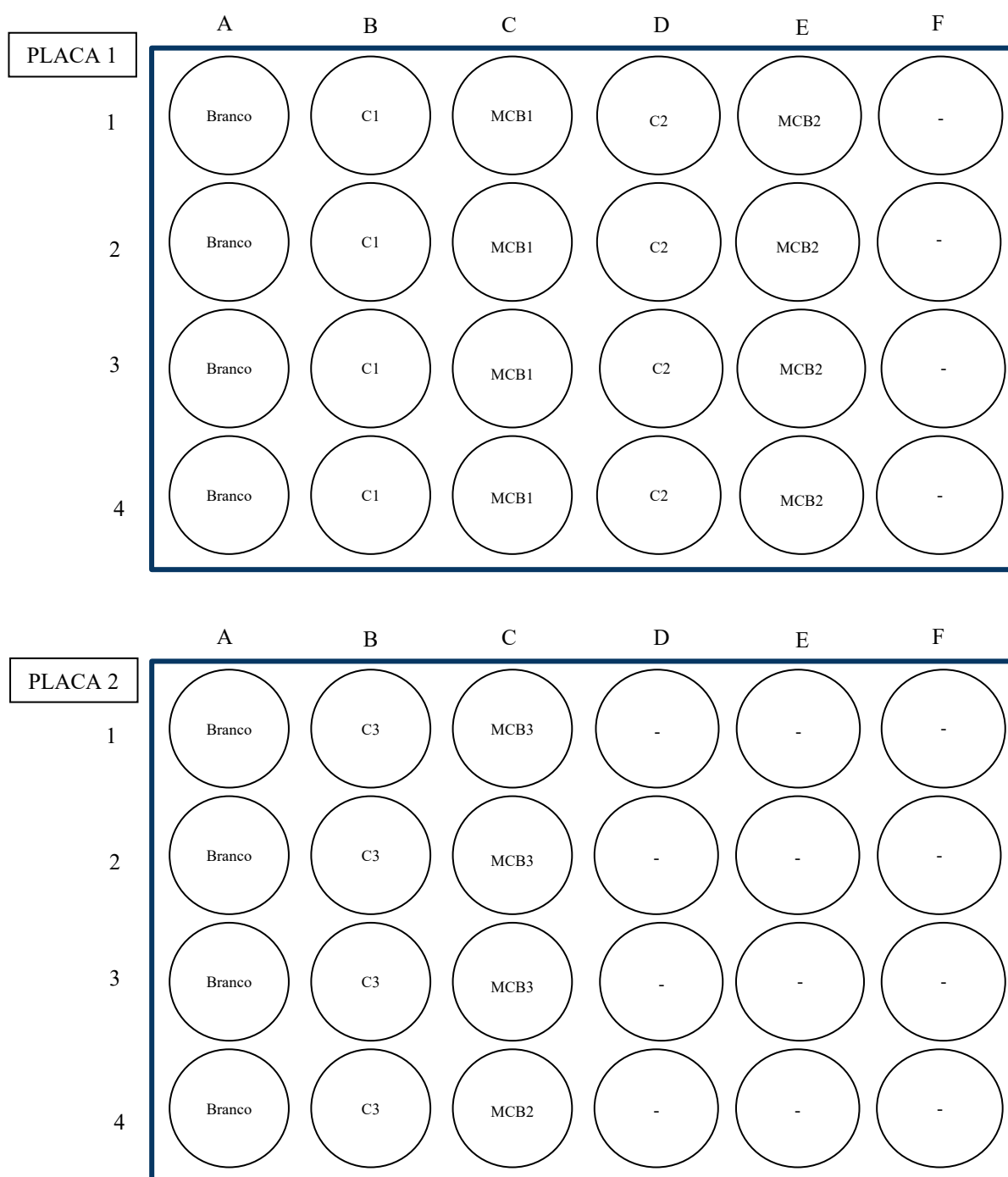
A intensidade da coloração rosa gerada é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis e funcionais, refletindo, assim, uma maior viabilidade celular. Esse aumento na conversão do corante foi observado nas placas de cultivo, resultado da elevada atividade metabólica das células (BONNIER et al., 2015; RISS et al., 2016).

A fluorescência obtida foi mensurada usando um fluorômetro de microplaca equipado com um filtro de excitação de 560 nm e um filtro de emissão de 590 nm. Os resultados foram compilados em tabelas e, em seguida, utilizados para a construção de gráficos, para melhor análise do efeito da interação entre os elementos e significância estatística de cada experimento.

APÊNDICE I – Plaqueamento com Alamar Blue®

Para o plaqueamento, as células foram quantificadas para alcançar densidades de 7×10^3 , 1×10^4 e 5×10^4 células/cm² (Figura 9).

Figura 9. Modelo de Plaqueamento das Células sobre Arcabouço de MCB para Coloração com Alamar Blue®.



Fonte: Autor, 2024.

Legenda: Na figura, o Grupo “Branco” é destinado apenas às MCBs; os Grupos “C1/C2 e C3” (Controles), às CTM-GW plaqueadas nos volumes 7×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 células/poço, respectivamente; e os Grupos

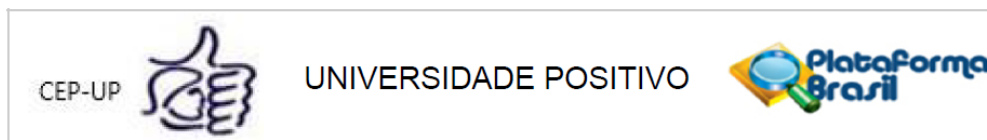
“MCB1/MCB2 e MCB3”, às CTM-GW plaqueadas nos mesmos volumes, em contato, pelo inserto, com a MCB.

Esses volumes foram distribuídos adequadamente entre as quadruplicatas de controles e nos poços com as membranas a serem avaliadas. O desenho do experimento ilustra o plaqueamento realizado para a MCB, porém o mesmo modelo experimental foi replicado para a MP, mudando-se apenas de nomenclatura.

Os poços “Branco”, que contém os arcabouços, foram utilizados para subtrair a fluorescência dos grupos em testes, a fim de garantir maior precisão nos resultados obtidos. Os poços "C1", “C2” e “C3” serviram como controle, contendo as células nas concentrações de 7×10^3 , 1×10^4 e 5×10^4 células/poço, respectivamente, e os poços "MP1", "MP2" e "MP3" destinados para as variações populacionais das CTM-GW semeadas para manterem contato com as MP pelos insertos de $3,0 \mu\text{m}$.

ANEXOS

1 PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS A BIOMATERIAIS

Pesquisador: JOÃO CÉSAR ZIELAK

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45671021.3.0000.0093

Instituição Proponente: CURITIBA BIOTECNOLOGIA LTDA - ME

Patrocinador Principal: CURITIBA BIOTECNOLOGIA LTDA - ME

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.891.662

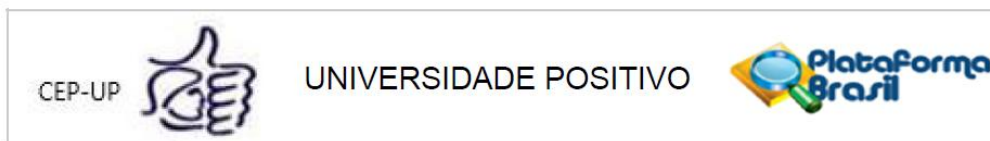
Apresentação do Projeto:

O objetivo do presente projeto será avaliar a ação biológica de biomateriais em células-tronco mesenquimais, incluindo as de origem odontológica. Dentre as etapas iniciais estão: coleta (momento de oportunidade, conforme Legislação), isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais por meio de imuno fenotipagem (citometria de fluxo). Uma vez caracterizadas, estas serão cultivadas na presença de biomaterial nos períodos de 1, 3, 5, 7, 14 e 21, 28 ou até 35 dias. A viabilidade, a proliferação, e acitotoxicidade celular serão avaliadas por Alamar Blue e MTT. Microscopia eletrônica de varredura será usada para avaliar a morfologia e ultra estrutura. Análise de moléculas será realizada em microscópio confocal por imunofluorescência: laminina, fibronectina, colágenos Tipo I e III. Metaloproteinases (MMPs) serão avaliadas por Western Blot e zimografia. Ensaio de Live-Dead será realizado para se avaliar a viabilidade celular em tempos prolongados de cultivo com biomaterial. Estudo in vivo também será contemplado neste projeto: sessenta animais divididos em 3 grupos (somente defeito em calota, defeito em calota e biomaterial e defeito em calota com biomaterial e células), em dois tempos de análise (4 e 8 semanas).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente projeto será avaliação da influência de biomateriais sobre células tronco mesenquimais.

Endereço: Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.280-300
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br



Continuação do Parecer: 4.891.662

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos, como minimizar os riscos e benefícios foram apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa visa avaliar a ação biológica de biomateriais em células-tronco mesenquimais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta a carta de anuência para realização da pesquisa. Apresenta o TCLE e TALE. Entretanto, há a necessidade de adequar o TALE e incluir um TCLE para os responsáveis dos menores que participarão da pesquisa.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise da resposta ao parecer 4.712.902

1) Não há descrição da amostra que será utilizada no projeto. Não há informação se as amostras serão provenientes de crianças, adolescentes ou adultos. Essa informação é fundamental para avaliação do CEP. Também não há a descrição da metodologia de coleta destas células. O campo "Metodologia Proposta" só inclui informações sobre o que será realizado com as células-tronco mesenquimais. Ele deve conter também a descrição da amostra e procedimentos de coleta e armazenamento desta amostra que será utilizada.

ANÁLISE: Atendido.

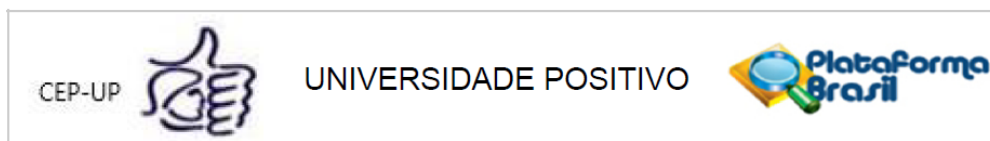
2) Fazer a adequação do Termo de assentimento livre e esclarecido. O termo deve ser direcionado ao menor ou incapaz e não ao responsável. O Termo de Assentimento Livre e Esclarecido deve ser um documento elaborado em linguagem acessível para os menores ou para os legalmente incapazes, por meio do qual, após os participantes da pesquisa serem devidamente esclarecidos, explicitarão sua anuência em participar da pesquisa, sem prejuízo do consentimento de seus responsáveis legais. Dessa forma, o Termo de Assentimento deverá ser um novo documento e deve ser confeccionado separadamente do TCLE. Os pais/responsáveis assinarão o TCLE, consentindo pelos menores de idade.

ANÁLISE: Atendido

Considerações Finais a critério do CEP:

Ressalta-se que cabe ao pesquisador responsável encaminhar os relatórios da pesquisa, por meio da Plataforma Brasil, via notificação do tipo "relatório" para que sejam devidamente apreciadas no CEP, conforme Resolução CNS nº 466/12, item XI.2.d e Resolução nº 510/16, art. 28 item V.

Endereço: Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.280-300
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br



Continuação do Parecer: 4.891.662

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1735981.pdf	05/07/2021 12:46:20		Aceito
Outros	Resposta_PARECER_1.pdf	05/07/2021 12:46:05	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menor_biomateriais_CEP.pdf	05/07/2021 12:45:50	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TA2_biomateriais_CEP.pdf	05/07/2021 12:22:29	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto2_biomateriais_biotech.pdf	05/07/2021 12:16:48	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Folha de Rosto	folharostobiomaterial.pdf	16/04/2021 10:49:23	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de Biorepositório / Biobanco	TDm_biomateriais_CEP.pdf	16/04/2021	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TD_biomateriais_CEP.pdf	16/04/2021 10:38:44	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biomateriais_CEP.pdf	16/04/2021 10:38:06	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_biotech.pdf	16/04/2021 10:37:41	JOÃO CÉSAR ZIELAK	Aceito

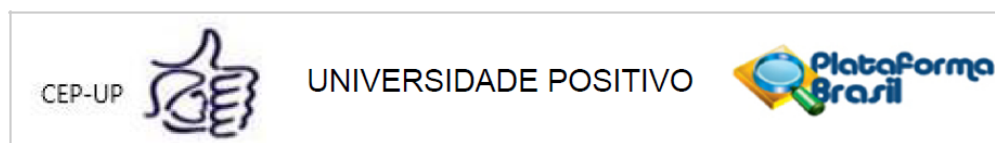
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Profº Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.280-300
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br



Continuação do Parecer: 4.891.662

CURITIBA, 07 de Agosto de 2021

Assinado por:
NEI RICARDO DE SOUZA

Endereço: Rua Profª Pedro Viriato Parigot de Souza nº 5300
Bairro: Campo Comprido **CEP:** 81.280-300
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3317-3260 **Fax:** (41)3317-3030 **E-mail:** cep@up.edu.br

2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA PESQUISA

Título da Pesquisa: Potencial de Proliferação e Viabilidade de Células-Tronco Mesenquimais Semeadas em Membrana Comercial de Celulose Bacteriana e Polipropileno.

Pesquisador Responsável: Luana Garcia.

Local de Realização da Pesquisa: Curityba Biotech (Centro de Processamento Celular/CPC) – Curitiba Biotecnologia LTDA.

Endereço: R. Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Bloco Marrom, Sala 111, Curitiba - PR, 81280-330.

Telefones: (41) 99235-6656 e (41) 99234-9202.

Responsável Legal do CPC: Dra. Moira Pedroso Leão.

A) INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

1. Apresentação da Pesquisa

Tratar feridas é um desafio significativo na rotina hospitalar. Devido às possíveis infecções e traumas, existe a dificuldade de cicatrização dessas lesões, com destaque para os casos em que manter o curativo protetor sobre a região lesionada é difícil. No mercado farmacêutico há uma quantidade mínima de opções inovadoras. O arcabouço é uma ferramenta que surge como solução terapêutica a fim de aumentar a previsibilidade e acelerar a cicatrização de tais ferimentos ao melhorar e renovar as funcionalidades celulares e teciduais quando integrado aos sistemas biológicos.

Entre os materiais mais utilizados para solucionar esses casos estão os enxertos autógenos (do mesmo indivíduo), alógeno (de outro indivíduo de mesma espécie), xenógenos (de outra espécie) e sintéticos feitos com materiais livres de origem animal. Dentre estes enxertos, apenas o enxerto autógeno é considerado completo, pois possui células acomodadas em um suporte além de proteínas que indicam a estas células o tipo de tecido que deve ser feito, tal como osso, pele ou cartilagem. A descoberta da presença de células-tronco do tipo mesenquimais no tecido do cordão umbilical (Geleia de Warthon), com capacidade de diferenciação em vários tipos de tecidos especializados, abre uma perspectiva de uso de material que normalmente se descarta, para uso em terapia celular autóloga ou alogênica. Neste estudo, imediatamente após o cordão umbilical ser cortado, um pedaço do tecido será acondicionado em um líquido contendo substâncias que mantêm as células vivas e saudáveis. A amostra do

tecido será encaminhada ao CPC - Curityba Biotech onde será realizado o isolamento, multiplicação, caracterização e diferenciação destas células isoladamente ou associadas a arcabouços (suportes) de celulose.

2. Objetivos da Pesquisa

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar a união das células-tronco mesenquimais provenientes do cordão umbilical semeadas em arcabouços de celulose.

O objetivo específico é comprovar a existência das células-tronco mesenquimais oriundas da Gelatina de Wharton presente nos cordões umbilicais doados por parturientes saudáveis e avaliar a estrutura da membrana de celulose quando associada as células-tronco mesenquimais.

3. Participação na Pesquisa

Os tecidos do cordão umbilical são descartados logo após o nascimento do bebê. Com a autorização da gestante, estes tecidos serão coletados no momento do parto e imediatamente encaminhados ao Centro de Processamento Celular – Curityba Biotech, onde será realizado o isolamento das células-tronco do tipo mesenquimais. A participação da doadora não trará qualquer tipo de prejuízo monetário, físico ou ético. A participante contará com o livre acesso as informações e esclarecimentos adicionais sobre este estudo.

4. Confidencialidade

Os dados pessoais e as informações adquiridas sobre as participantes doadoras no desenvolvimento deste estudo serão mantidos sobre sigilo confidencial.

5. Desconfortos

A coleta do tecido do cordão umbilical é realizada pelo médico obstetra durante a dequitação placentária, sem apresentar nenhum desconforto ou risco à mãe ou ao recém-nascido, sendo que este material biológico é, em geral, descartado.

6. Riscos Diretos

Em relação a presente pesquisa, não há risco significativo à paciente e ao recém-nato, eventuais intercorrências são oriundas do procedimento do parto em si, alheios ao desenvolvimento desta pesquisa.

7. Benefícios

A participante da pesquisa irá contar com acesso e assessoramento em relação às informações obtidas em decorrência da execução do presente estudo e será informada o mais prontamente possível quando da constatação de qualquer registro de anormalidade no material doado.

8. Critérios de Inclusão e Exclusão

Qualquer gestante saudável que queira contribuir com a pesquisa e que tenha realizado o acompanhamento de pré-natal cujo painel sorológico seja negativo.

9. Direito de Sair da Pesquisa e a Esclarecimentos Durante o Processo

Em qualquer momento, este consentimento pode ser retirado, sem precisar haver justificativa. Ao sair da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo para o participante ou responsável.

10. Ressarcimento ou Indenização

Não haverá nenhum tipo de remuneração, ressarcimento ou cobrança de quaisquer honorários pela participação da gestante nesta pesquisa. Como se trata do envio de um material de descarte, os riscos são mínimos ao paciente e, portanto, cumprindo-se os procedimentos previstos na metodologia deste projeto, não haverá o pagamento de qualquer indenização.

B) CONSENTIMENTO

Do sujeito de Pesquisa ou Responsável Legal:

1. Necessário anexar documentos que comprovem parentesco/tutela/curatela.

Eu declaro ter conhecimento das informações contidas neste documento e ter recebido respostas claras às minhas questões a propósito da minha autorização da participação de

(NOME DO PARTICIPANTE)

nesta pesquisa e, adicionalmente, declaro ter compreendido o objetivo, a natureza, os riscos e benefícios deste estudo.

Após reflexão em um tempo suficiente, eu decidi, livre e voluntariamente, liberar a doação do cordão umbilical, logo após o nascimento do meu bebê para utilização neste estudo e em outras pesquisas que possam ser necessárias a partir da execução deste, portanto, permito que as células fiquem armazenadas e sob os cuidados do CPC – Curityba Biotech pelo tempo que for necessário. Estou consciente que podemos deixar o projeto a qualquer momento, sem nenhum prejuízo. Estou ciente também que o material biológico doado pode não ser de interesse da pesquisa e, portanto, poderá ser descartado, NÃO estando disponível no caso de uma eventual necessidade futura.

Nome Completo: _____

RG: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Telefones (DDD): _____

Endereço: _____

CEP: _____ Cidade: _____ Estado: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

PESQUISADOR

Eu declaro ter apresentado o estudo, explicado seus objetivos, natureza, riscos e benefícios e ter respondido da melhor forma possível as questões formuladas. Também devo informar se:

Quero ser informado caso o material biológico doado seja utilizado em alguma outra pesquisa;

Não quero ser informado caso o material biológico doado seja utilizado em alguma outra pesquisa.

_____ Data: ____/____/____

Dr.^a Luana Garcia

O pesquisador responsável pode ser contatado para esclarecimento de quaisquer questões relativas ao estudo.

Dr.^a Luana Garcia

Endereço: R. Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Bloco Marrom, Sala 111, Curitiba - PR, 81280-330.

Telefones: (41) 99235-6656 e (42) 99922-5405.

E-mail: lluanagarcia@hotmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo – CEP - UP

Endereço: R. Prof. Pedro Viriato Parigot de Souza, 5300 - Bloco Amarelo, Sala 8, Curitiba - PR, 81280-330.

Telefone: (41) 3317-3260.

E-mail: cep@up.edu.br

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP

Endereço: CONEP SEPN 510 NORTE, BLOCO A, 3º Andar Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde. CEP: 70750-521 - Brasília-DF. Telefone: (61) 3315- 587.