

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



Cristiano Rodrigues

**Medicina regenerativa: potencial terapêutico
no tecido epitelial e ósseo**

UFCSPA

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

Porto Alegre

2018

Cristiano Rodrigues

Medicina regenerativa: potencial terapêutico no tecido epitelial e ósseo

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Porto Alegre

2018

Catálogo na Publicação

Rdrigues, Cristiano

Medicina regenerativa: potencial terapêutico no tecido epitelial e ósseo / Cristiano Rdrigues. -- 2018.

170 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Orientador(a): Márcia Rosângela Wink.

1. Biologia celular. 2. Regeneração. 3. Biomateriais.
I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus pais, Elvino e
Olívia, meus exemplos de caráter, dignidade,
racionalidade, honestidade e justiça.

AGRADECIMENTOS

Após 5 anos de trabalho, várias pessoas contribuíram para que essa tese tomasse forma, conteúdo e fosse concluída da melhor maneira possível. Assim, quero deixar aqui registrado a minha mais profunda gratidão a todos.

À Márcia Rosângela Wink, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Celular, pela confiança no meu trabalho, pela paciência e pelos ensinamentos e direcionamentos durante a minha caminhada científica.

À UFCSPA e ao seu Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela qualidade do ensino e pela sapiência da importância da pesquisa no desenvolvimento institucional, no que compreende os seus funcionários: gestores, professores e técnicos.

Ao Ministério da Educação brasileiro, o que engloba a CAPES e o CNPq, pelo apoio financeiro e por fomentar a pesquisa e a inovação tecnológica no âmbito nacional.

Aos grupos de discussão CAPES/PDSE, nas mídias sociais WhatsApp e Facebook, pelas inúmeras dúvidas respondidas.

Aos Professores Nance Nardi, Melissa Camassola, Silvio Buchner e Diego Mantovani pela inspiração contínua na execução da pesquisa de qualidade.

Aos Laboratórios de Patologia, Genética e Estresse Oxidativo da UFCSPA, no que compreende os seus funcionários. Um agradecimento especial à Teresinha pelo afeto.

Ao Laboratório de Bioengenharia e Biomateriais da Universidade Laval, pelo acolhimento, conhecimentos e por me permitir ter a visão de uma nova perspectiva da carreira de pesquisador.

Aos colegas de laboratório, pelas trocas de conhecimento, pelas mãos, braços e ombros amigos, que participaram de momentos decisivos para a execução deste trabalho. Dentre eles em especial à Elisa, Isabele, Liliana, Jéssica, Thaís, Carla, Giovana, Bruno, Miró, Lílian, Niedja, Renata, Flávia e às queridas Fernanda e Malgo.

Aos fundamentais Morgana, Cristina, Venâncio, Indiara, Dinara, Márcio, Paola, Larissa, Fernando, Cinara, Tiago, Potira, Nathalie, Samuel, Missie, Catarina, Jimmy e à doce Elisandra.

Ao Dominic, Jocelyn e Danielle Daigle, pelo acolhimento, carinho e amor imensuráveis.

À (os) Deus (es) definidos pelas mais de 4200 diferentes religiões que compreendem a humanidade, que apesar do uso histórico para o controle das massas, enriquecimento e para fomentar conflitos entre os povos, são importantes para o progresso dos países subdesenvolvidos.

“Hoje, ainda almejamos saber por que estamos aqui e de onde viemos. O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua”.

(Stephen Hawking)

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	13
INTRODUÇÃO.....	14
1. Medicina regenerativa.....	14
1.1. Curativos para a pele	14
1.2. Terapia celular.....	17
1.3. Sistema musculoesquelético.....	18
1.4. Materiais biocompatíveis	19
REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2. O processo regenerativo.....	23
2.1. Cicatrização da pele	24
2.2. Reparo ósseo	27
2.3. Células estromais mesenquimais.....	29
3. Biomateriais	33
3.1 Biovidro 45S5	34
HIPÓTESE DE TRABALHO	37
OBJETIVOS.....	38
2.1. Objetivo geral	38
2.2. Objetivos específicos	38
APRESENTAÇÃO.....	39
CAPITULO I.....	40
CAPÍTULO II.....	74
DISCUSSÃO.....	136
CONCLUSÃO.....	149
REFERÊNCIAS	150
ANEXOS	167

RESUMO

Atualmente, existe uma grande demanda médica por novas terapias que confirmem maior velocidade e qualidade na regeneração dos tecidos. A necessidade se torna ainda maior quando consideramos a crescente expectativa de vida da população humana. Células estromais mesenquimais são alvos promissores para novos tratamentos, visto o seu importante papel na homeostase. Nesse trabalho, duas hipóteses de terapia regenerativa foram abordadas: a investigação da influência das MSCs sobre células dérmicas; e a segunda, focada no reparo ósseo. Para a primeira, o efeito dos fatores produzidos pelas MSCs foi acessado através da confecção de um meio condicionado (MC-MSCs), o qual foi utilizado como tratamento em uma linhagem de queratinócitos humanos, as células HaCaT. Desta forma, as MSCs modificaram os padrões migratórios das células HaCaTs, sendo observável através da despolimerização dos filamentos de actina (F-actina) e das irregularidades nucleares. Pelo menos em parte, a modulação se deu pela sinalização do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), considerando que seu antagonista, o inibidor do receptor de TGF- β 1 (SB 431542), levou a uma redução na migração dos queratinócitos.

A segunda abordagem, apresenta a associação das MSCs à um material bioativo, o biovidro 45S5. Foi verificado a manutenção da viabilidade das células e o potencial de osteoindução da dissolução iônica deste biomaterial. Uma melhor acomodação do corpo celular foi detectada durante a adesão sobre a superfície. Assim como a reorganização do citoesqueleto de F-actina, as irregularidades nucleares também foram observadas, além do aumento dos depósitos de hidroxiapatita (HA) na superfície do vidro e ao redor das células. Quando utilizado como implante subcutâneo, não houve toxicidade aparente para órgãos, ou reações imunogênicas fortes, sendo acompanhado pela formação de uma densa cápsula ao redor do implante. Foi possível concluir que a investigação da ação dos fatores produzidos pelas MSCs é uma abordagem promissora para o melhor entendimento do seu papel na cicatrização da pele e para o desenvolvimento de novas terapias, assim como a associação destas com biomateriais com base em hidroxiapatita para o reparo do tecido ósseo. Nossos resultados indicam que as MSCs podem crescer a longo prazo no biovidro sugerindo que o 45S5 pode ser implementado em ensaios pré-clínicos para o transplante de MSCs.

Palavras-chaves: célula mesenquimal estromal adiposo-derivada humana, terapia celular, HaCaT, migração celular, biomaterial, medicina regenerativa, biovidro 45S5, bioatividade, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Currently, there is a great medical demand for new therapies that could confer both greater speed and quality for tissue regeneration. This need becomes even greater when we consider the increase in the human life expectancy. Mesenchymal stromal cells are promising targets for new treatments, given their fundamental role in the organ homeostasis. In this work, two hypotheses of regenerative therapy were addressed: the investigation of the MSCs influence on epidermal cells; and the second was focused on a bone repair strategy. For the first, the effect of the factors produced by MSCs was assessed through the preparation of a conditioned medium (MC-MSCs), which was used to treat a human keratinocyte cell line. The MSCs modified the migratory patterns of HaCaTs cells, observable through both the depolymerization of actin filamentous (F-actin) and the appearance of nuclei irregularities. At least in part, the modulation was caused by a signaling of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), whereas its antagonist, the TGF- β 1 receptor inhibitor (SB 431542), led to a reduction in the keratinocyte migration.

The second approach presents the association of the MSCs with a bioactive material, the bioglass 45S5. The maintenance of cell viability and the osteoinduction potential were verified, when the cells were submitted to the ionic dissolution of this biomaterial. An improved body accommodation was observed during cell adhesion on the 45S5 surface. Both the organization of the F-actin cytoskeleton and the presence of nuclear irregularities were also observed, in addition to an increase of hydroxyapatite (HA) deposits on the 45S5 surface and around the cells. When used as a subcutaneous implant, there was no apparent organ toxicity, nor strong immunogenic reactions, and it presented a dense capsule formation around the graft. We can conclude that the investigation about the factors produced by the MSCs is a promising approach to better understand its role in wound healing. This knowledge can be helpful for the development of new therapies, such as the association of these cells with hydroxyapatite-based biomaterials for tissue engineering of hard tissues. Our results indicate that MSCs may grow in the long term on 45S5, suggesting that this scaffold can be implemented in preclinical trials aiming MSC transplantation leading to further bone and tissue repair.

Key words: human adipose-derived mesenchymal stromal cell, cell therapy, HaCaT, cell migration, biomaterial, medicine regenerative, bioglass 45S5, bioactivity, biocompatibility.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

ATCC: do inglês, *American Type Culture Collection*

BMI: do inglês, *body mass index*

CD: do inglês, *cluster of differentiation*

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: do inglês, *Dulbecco's modified Eagle's medium*

ECM: do inglês, *extracellular matrix*

EGF: do inglês, *epidermal growth factor*

EMT: do inglês, *epithelial mesenchymal transition*

FACS: do inglês, *fluorescence-activated cell sorting*

F-actin: do inglês, *actin filaments*

F-actina: filamentos de actina

FBS: do inglês, *fetal bovine serum*

FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*

FGF-2: do inglês, *fibroblast growth factor*

FITC: do inglês, *fluorescein isothiocyanate*

HaCaT: linhagem imortal de queratinócitos da pele humana

HCl: ácido clorídrico

HEPES: do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HGF: do inglês, *hepatocyte growth factor*

IGF-1 do inglês Insulin-like growth factor

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IN: do inglês, *irregular nuclei*

ISCMHA: hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

KGF: do inglês, *keratinocyte growth factor*

MC-MSC: meio condicionado de MSCs

MEC: matriz extracelular

mg: miligrama

mL: mililitros

mm: milímetros

MSC-CM: do inglês, *mesenchymal stromal cells conditioned medium*

MSCs: do inglês, *mesenchymal stromal cells*

NaCl: cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

NII: do inglês, *nuclear irregularity index*

NMA: do inglês, *nuclear morphometric analysis*

NN: núcleo normal

PBS: do inglês, *phosphate-buffered saline*

PDGF: do inglês, *platelet-derived growth factor*

PE: do inglês, *phycoeritrin*

REC: do inglês, *research ethics committee*

SDF-1: do inglês, *stromal cell-derived factor-1*

SEM: do inglês, *scanning electron microscopy*

SFB: soro fetal bovino

TGA: do inglês, *thermogravimetric analysis*

TGF- β 1: do inglês, *transforming growth factor- β 1*

UV: ultravioleta

VEGF: do inglês, *vascular endothelial growth factor*

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Pele alógena processada e armazenada com glicerol.	15
Figura 2 - A evolução dos biomateriais.	20
Figura 3 - A pele de tilápia como curativo biológico.	22
Figura 4 – Prométhée, de Theodore Rombouts (1597–1637).	23
Figura 5 - Representação gráfica de uma biopsia da pele humana.	24
Figura 6 - Desenho representativo da cicatrização cutânea inicial.	25
Figura 7 - Representação gráfica da típica organização histológica do osso.	28
Figura 8 - Multipotência e marcadores imunofenotípicos das MSCs no cultivo <i>in vitro</i> .	30
Figura 9 - Ação do secretoma das MSCs.	31
Figura 10 - Características dos exossomos e das microvesículas.	32
Figura 11 - Representação das recentes projeções dos biomateriais.	34
Figura 12 - Professor Larry Hench.	35
Figura 13 - Reação de superfície do biovidro 45S5.	35
Figura 14 - Diagrama composicional de ligação tecidual do bioglass 45S5.	36
Figura 15 - Diferença epigenética entre MSCs e fibroblastos.	136
Figura 16 - Resumo gráfico do segundo capítulo.	148
 Tabela 1 - Fases da cicatrização da pele.	 26

INTRODUÇÃO

1. Medicina regenerativa

Foi durante um pequeno discurso na Itália, no ano de 1999, que o termo “medicina regenerativa” é dito ter sido utilizado pela primeira vez. Na ocasião, o biólogo estadunidense William Haseltine falava sobre o potencial de multipotência das células-tronco embrionárias, as quais começavam a integrar projetos que buscavam o reparo de tecidos humanos (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Essa expressão técnica, no entanto, já havia sido registrada em um artigo de 1992 sobre novas tecnologias hospitalares, de Leland Kaiser (KAISER, 1992). Hoje, entende-se que a medicina regenerativa pode envolver as terapias genética, celular e tecidual, bem como a engenharia de próteses biomecânicas em um intrincado campo interdisciplinar (BRUNT; WEISEL; LI, 2012; TWIGGER; SCHEEL, 2017). A nova medicina emprega genes humanos, proteínas, células e materiais para restaurar a função de tecidos que foram feridos por trauma, danificados pela doença ou desgastados pelo tempo, e nos revela uma perspectiva de curar doenças que até agora não puderam ser tratadas efetivamente, incluindo aquelas relacionadas ao envelhecimento (BRODY, 2016).

Muito mais antiga que o termo, a ideia de substituir ou reparar tecidos humanos pela aplicação de material autólogo, alogênico, xenogênico ou aloplástico data de milênios, sempre buscando compensar a nossa limitada capacidade regenerativa (HUEBSCH; MOONEY, 2009).

1.1. Curativos para a pele

O primeiro transplante de pele autólogo tem o seu registro datado de 3000 anos atrás (CHICK, 1988). O procedimento era usado para reconstruir narizes amputados por punição judicial ao adultério, na Índia (RATNER, 1998). Escrito no século VI, o clássico Susruta Samhita é considerado um dos primeiros livros de cirurgia da história da medicina e contempla os primeiros

registros de ambas as terapias teciduais, autóloga e alógena, muito similar ao modo em como elas são feitas hoje (ANG, 2005; KAGAN; ROBB; PLESSINGER, 2005).

Em 1940, o emprego dos enxertos dérmicos autólogos estava bem estabelecido na prática clínica (RATNER, 1998). No entanto, nem sempre os pacientes dispunham de condições clínicas ou regiões saudáveis para a retirada de pele. Nestes casos, os enxertos dérmicos alógenos precisaram ser considerados, e apesar da rejeição iminente, ainda são tidos como a melhor terapia para grandes perdas de pele por trauma ou doença, e principalmente no caso de queimaduras extensas (COWEN, 2017; SHERIDAN; MAHE; WALTERS, 1998).

A pele alógena (Figura 1) pode promover a re-epitelização, encurtar o tempo de cicatrização, aliviar a dor e proteger as estruturas internas, como os músculos, tendões, ossos e nervos (SHIMIZU; KISHI, 2012). Foi então que a década de 40 presenciou a organização e implementação dos primeiros bancos para o processamento, estocagem e disponibilização de pele alógena, os quais disputam entre si o vanguardismo (KAGAN; ROBB; PLESSINGER, 2005). No entanto, eram necessários mais estudos que pudessem aprimorar o processamento da pele, de forma que a rejeição fosse atenuada.

Figura 1 - Pele alógena processada e armazenada com glicerol.



Fonte: Jornal do sindicato médico do Rio Grande do Sul, 2016.

Durante a 2ª Guerra Mundial, o médico inglês Peter Medawar foi considerado um dos pioneiros no estudo da pele alógena, conferindo-lhe mais tarde o Prêmio Nobel de 1960 (RATNER, 1998). No entanto, o benefício imunológico da glicerolização, o qual potencializou significativamente a técnica, ficou claro somente em 1983 (ANG, 2005).

Assumindo a pele alógena como o melhor tratamento para queimaduras e lesões extensas de pele, o Brasil de 2005 presenciou a inauguração o Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem, sediado no Hospital Santa Casa de Misericórdia, o qual foi tido até o ano de 2012 como o único em funcionamento no país (SIMERS, 2016). Além de aprimorar o processamento da pele, este banco fomentou novas linhas de pesquisa em medicina regenerativa no Estado do Rio Grande do Sul, principalmente através da parceria com o Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). A portaria 101 que permitiu a retirada da pele de cadáveres surgiu em 2007, mas somente em 2009, o Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS) reconheceu legalmente o Banco de Pele gaúcho e também a pele alógena como um órgão para transplante (SILVEIRA et al., 2013).

Todavia, em 2012, Wandir Schiozer, um dos editores da Revista Brasileira de Queimaduras, escreveu que o primeiro banco de pele brasileiro foi criado em 1956, na Unidade de Queimaduras do HCFMUSP, em São Paulo. Segundo ele, a confusão referente ao vanguardismo no país aconteceu porque não existia legislação específica na época, bem como recursos para expansão e consolidação desses programas (SCHIOZER, 2012). Na verdade, o fato pode ser generalizado à criação de quase todos os bancos de tecidos. Hoje no Brasil, além do gaúcho, contamos com bancos de pele nos estados de Pernambuco, Rio de Janeiro, São Paulo e no Paraná (ANVISA, 2016). Mesmo assim, os cinco bancos não conseguem cumprir a demanda nacional de queimados e politraumatizados.

Os Estados Unidos da América (EUA) assumem a criação do primeiro banco de pele do mundo em 1949 e hoje contam com 60 bancos do tipo (KAGAN; ROBB; PLESSINGER, 2005; TOGNETTI et al., 2017). Na Europa, o abastecimento é feito principalmente pelo Banco de Pele Internacional, sediado na Holanda (SHIMIZU; KISHI, 2012). Todavia, a disponibilidade de material humano para reposição sempre foi e continua sendo escassa. Os parâmetros de qualidade que viabilizam os tecidos, como ausência de doenças contagiosas, aliam-se a baixa prática cultural do ato da doação e fazem com que a demanda por pele alógena nunca seja cumprida.

Tavis e seus colegas (1980) relataram o desenvolvimento de uma membrana biológica sintética para aplicação na lesão de pele. Ela era composta de nylon e revestida com silicone ligada à colágeno. No teste inicial, a chamada Biobrane® evitou tanto a perda de fluido evaporativo, como desenvolvimento de infecção. A sua estrutura filamentosa favoreceu a permeação inicial de fibrina e o subsequente crescimento de fibroblastos (TAVIS et al., 1980). A partir daí a pesquisa com curativos artificiais ganhou força. Atualmente, testa-se inúmeras associações de polímeros artificiais e naturais, além de diversos outros materiais e moléculas na intenção de criar uma bandagem capaz de proteger e melhorar a cicatrização dérmica (MACNEIL, 2008; VIG et al., 2017).

1.2. Terapia celular

Em 1907, enquanto os transplantes de órgãos ainda enfrentavam inúmeras barreiras imunológicas, o anatomista estadunidense Ross Granville Harrison publicou sobre uma técnica para a cultura *in vitro* de células nervosas de sapo (HARNDEN, 1977). Também considerado um dos precursores da terapia celular, o médico suíço Paul Niehans observou que células envelhecidas poderiam voltar a proliferar se estimuladas por tecido embrionário (NIEHANS, 1960). A partir da década de 20, ele assumiu que o rejuvenescimento poderia ser estimulado se o paciente fosse injetado com homogeneizados embrionários bovinos frescos. A sua terapia inovadora ficou tão famosa, que levou-o a receber em seu consultório algumas personalidades da época, como o Papa Pio XII, o rei da Arábia Saudita Ibn Saud e alguns astros de cinema, como Charles Chaplin (ROBYN et al., 2015).

Apesar das transfusões de sangue, auto-hemoterapia e aplicação de extratos teciduais datarem de muito antes, considera-se que a terapia celular foi melhor acessada em 1959, com as pesquisas de transplante de medula óssea por Edward Donnall Thomas (THOMAS et al., 1977; WU; IZPISUA BELMONTE, 2016). Na época, ele lecionava na Universidade de Washington e dirigia o Centro de Investigações em Câncer Fred Hutchinson (EUA). Logo em 1968, Thomas estabeleceu com sucesso os protocolos para o tratamento de leucemias e outras doenças sanguíneas, o que lhe rendeu o Nobel de Medicina de 1990 (THOMAS, 1990).

Desde então, uma infinidade de testes vêm sendo feitos através do transplante de células hematopoiéticas e mesenquimais (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIO; PETRAKOVA, 1966; LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016; NWABO KAMDJE et al., 2016). Essa nova abordagem levou a agência federal estadunidense FDA a regular, em 2011, o primeiro produto baseado em células-tronco, e hoje contabilizamos mais de 2500 ensaios clínicos registrados (BRODY, 2016).

1.3. Sistema musculoesquelético

Apesar do transplante alógeno de tecido muscular requerer alta imunossupressão, os procedimentos de reposição autóloga foram bem utilizados no último século e ainda são executados (PRYOR et al., 2009). Já o transplante ósseo demonstrou uma imunorreação acentuada e tão logo em 1940, a prática estava estabelecida como uma boa alternativa para rápida reposição e reabilitação do sistema de sustentação humano (DE BOER, 1988). No Brasil, o Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), em 1953, criou o Instituto de Ortopedia e Traumatologia, contemplando mais tarde, de forma pioneira no país, um Banco de Tecidos para a captação e conservação de ossos, cartilagens, tendões, fâscias e ligamentos para transplante. Apesar deste contexto histórico, o uso foi regulamentado pelo Ministério da Saúde somente em 1990 (ABTO, 2015).

Desde outubro de 2005 que o estado do Rio Grande do Sul conta com um Banco de Tecidos Musculoesqueléticos (BTME). Ele funciona no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), na cidade de Passo Fundo. O banco agregou à estrutura do hospital uma maior eficiência dos serviços de traumatologia, ortopedia e ortodontia, através do transplante ósseo. Hoje, os bancos de tecidos desta natureza adequam-se às inúmeras exigências do Sistema Nacional de Transplantes (SNT/MS) e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Documentos como a lei 9434, de 4 de fevereiro de 1997 e a portaria 2600, de 21 de outubro de 2009, regulamentam o procedimento técnico do SNT/MS para a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento humano.

Durante a 2ª Guerra Mundial, os transplantes alógenos ósseos foram melhor estudados, mas apesar da baixa imunorreação do hospedeiro, ela ainda existia e levava a falha do procedimento (PRYOR et al., 2009). Foi aí que este mesmo período observou a busca por materiais sintéticos

que pudessem ser aplicados na reposição óssea (JONES, 2013). Tão logo em 1969, Larry Leroy Hench inventou a primeira associação de sais que formaria um vidro bioativo, oferecendo pela primeira vez um material que pudesse conectar-se ao tecido do hospedeiro (HENCH, 2006). A partir desse momento, a ortopedia e a ortodontia começaram a experimentar materiais alternativos que não os metálicos, como os vidros, cerâmicas, hidroxiapatita, polietileno e o náilon (STANCIU; SANDULESCU; SAVU, 2007; TAN et al., 2013). Algumas associações são lembradas por apresentar alta reação de corpo estranho quando implantadas, mas a pesquisa por materiais inertes continua (DE BOER, 1988; VELNAR et al., 2016).

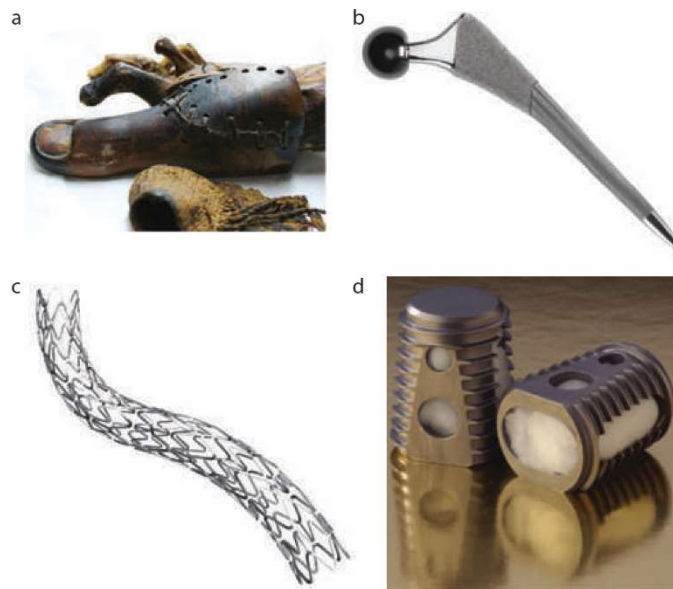
1.4. Materiais biocompatíveis

Os registros do Antigo Egito descrevem fios de sutura compostos de fibra vegetal, cabelo, lã e tendão, os quais foram descobertos em cadáveres com idade de até 3000 a.C. (HUEBSCH; MOONEY, 2009). Estudos em múmias revelaram um implante ortopédico de Fe datado de 630 a.C. e suportado no hospedeiro por uma resina orgânica antiga, semelhante ao nosso atual cimento ósseo (RATNER et al., 2004). Evidências apontam que a estrutura havia sido enxertada, ainda em vida, para o reestabelecimento da função motora e o alívio da dor, seguindo as recomendações do papiro de Edwin Smith, o mais antigo tratado de cirurgia traumática conhecido (PRYOR et al., 2009). Próteses confeccionadas a partir de madeira também foram encontradas, como a que substituiu um dedo do pé amputado de Tabaketenmut, a filha de um alto sacerdote egípcio que viveu entre 1.069 e 664 a.C. (HUEBSCH; MOONEY, 2009).

Na América, as escavações que encontraram um chefe de tribo Inca com o crânio reparado por uma placa de metal, remontam o período neolítico do Peru (DE BOER, 1988). A cranioplastia se mostrou comum em toda a geografia nos tempos seguintes, geralmente acompanhadas de enxertos de Pt ou Au, tentando uma forma de reparo mais rápida e resistente (PRYOR et al., 2009). Hoje, os biomateriais utilizados na reconstrução esquelética podem ser categorizados em cerâmicas e cimentos à base de fosfato de cálcio, polímeros sintéticos e, mais recentemente, materiais bioativos capazes de desencadear o remodelamento da região implantada, favorecendo a integração (DUCHEYNE et al., 2011; HUEBSCH; MOONEY, 2009; TAN et al., 2013).

Na Figura 2 podem ser conferidos uma (a) prótese de pé com idade de 1065–740 a.C. (Egito), uma (b) prótese Synergy® (Smith & Nephew, Inglaterra), (c) Taxus Express® stent (Boston Scientific Corporation, EUA), e um (d) enxerto ósseo Infuse®. Este último oferece uma associação de metais sobre uma esponja de colágeno tipo I, embebida em proteína morfogenética óssea humana recombinante-2 (Michelson and Medtronic, EUA).

Figura 2 - A evolução dos biomateriais.



Fonte: adaptado de HUEBSCH E MOONEY, 2009.

1.4.1. Xenotransplantes

Sabe-se que os biomateriais empregados na regeneração humana podem ter origem natural, sendo retirados de outros animais e processados (COOPER; EKSER; TECTOR, 2015; YAMAMOTO et al., 2018). Desde os primórdios que o homem utiliza de outras espécies para a nutrição e apoio para a sobrevivência. Os fios de sutura feitos de intestino, como o Catgut®, são utilizados desde o Egito Antigo até os dias de hoje (MUFLY; TIZZANO; WALTERS, 2011).

Na tentativa de solucionar uma falha óssea, o cirurgião Job Van Meekeren executou um bem-sucedido xenotransplante, inserindo um fragmento de crânio de cachorro no crânio de um soldado ferido, na Holanda de 1668. Mais tarde o paciente solicitou a retirada do implante, na

tentativa de reverter um processo de excomunhão. O que não foi mais possível, pois o mesmo já havia sido totalmente incorporado (ELSALANTY; GENECOV, 2009).

Na América de 1880, a pele de ovelha era usada como curativo dérmico (HAMILTON, 2012). Na França, em 1989, uma curiosa terapia foi criada pelo professor de fisiologia Brown-Sequard. Se tratava de um método de rejuvenescimento, baseado em injetar no paciente um extrato de testículos bovinos, o que foi bastante difundido em todo o mundo por até 20 anos (LEFRÈRE; BERCHE, 2010). Doravante, pacientes com rins comprometidos receberam substituição por órgãos oriundos de porco, cabra e macaco. Nenhum desses xenoenxertos funcionou por muitos dias, levando todos à morte eminente (COOPER; EKSER; TECTOR, 2015). Muito importante, as insulinas suína e bovina foram armas terapêuticas cruciais contra o diabetes tipo I até 1978, quando surgiu a tecnologia do DNA recombinante (LACONI, 2006).

Hoje em dia, a transferência de ilhotas pancreáticas suínas para o homem ainda é uma alternativa promissora (LIU et al., 2017). Modelos animais geneticamente modificados são criados visando reduzir o potencial antigênico dos órgãos, esperando uma melhor resposta do corpo ao xenoenxerto (BOTTINO, 2015). Ainda, estudam-se processos de descelularização de órgãos e tecidos, visando entregar aos cientistas uma matriz tridimensional para o repovoamento com células humanas de interesse (LEDERER, 2001).

A submucosa do intestino delgado (SIS, do inglês, *small intestine submucosa*) é uma matriz extracelular natural que tem sido utilizada há mais de 40 anos como curativo de pele, substituto vascular, malha de sustentação para hérnias, regeneração do disco intervertebral, entre outras aplicações (DE LA FUENTE et al., 2003; LIN et al., 2014). A SIS é colhida tipicamente de porcos e apresenta baixa imunogenicidade em humanos, com boas propriedades mecânicas (FAN et al., 2014). Após o processo de descelularização, a SIS se define por um arcabouço de colágeno e de outros proteoglicanos (FAN et al., 2014; ZHENG et al., 2005). Este andaime de matriz extracelular contempla propriedades físicas interessantes e pode favorecer a migração e a proliferação das células adjacentes do local enxertado (COBB et al., 1999).

Contraria à vontade das organizações de proteção animal, a busca pelo aprimoramento dos xenotransplantes continua, visto a escassez de tecidos e órgãos homólogos. No último ano, os pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (UFC), em parceria com o Instituto de Apoio ao Queimado (IAQ), inauguraram o primeiro Banco de Pele Animal do Brasil (YAMAMOTO et al., 2018). O grupo visa

disponibilizar a pele da tilápia (Figura 3), um dos peixes de água doce mais comuns no país, como bandagem natural para queimados e defende que já gerou vários dados promissores que sustentam o seu uso como curativo (ALVES et al., 2018).

Figura 3 – A pele de tilápia como curativo biológico.



Fonte: acervo de MACIEL, 2018 (UFC).

REFERENCIAL TEÓRICO

2. O processo regenerativo

Dentre os animais, o ser humano apresenta uma das menores capacidades de regeneração, quando comparado às estrelas-do-mar, peixes-zebra e às salamandras (MARTIN, 1997). Estas últimas, após sofrerem amputação, podem formar um blastema que constrói um novo coração ou um membro inteiro (TANAKA, 2003). Os órgãos do corpo humano têm a capacidade intrínseca de se regenerar, uma distintiva característica que pode variar entre eles em maior ou menor grau (MAO; MOONEY, 2015).

O fenômeno de reparo do fígado, após perda de massa, parece já ter sido observado pela narração mítica da literatura grega de 800-700 a.C., com o mito de Prometeu, o qual foi amplamente representado nas obras de diversos artistas, como a da Figura 4. (POWER; RASKO, 2008).

Figura 4 - Prométhée (Theodore Rombouts, 1597–1637).



Fonte: fotografia de LÉON, 1938. Acervo do Museu Real de Belas Artes da Bélgica <www.fine-arts-museum.be>.

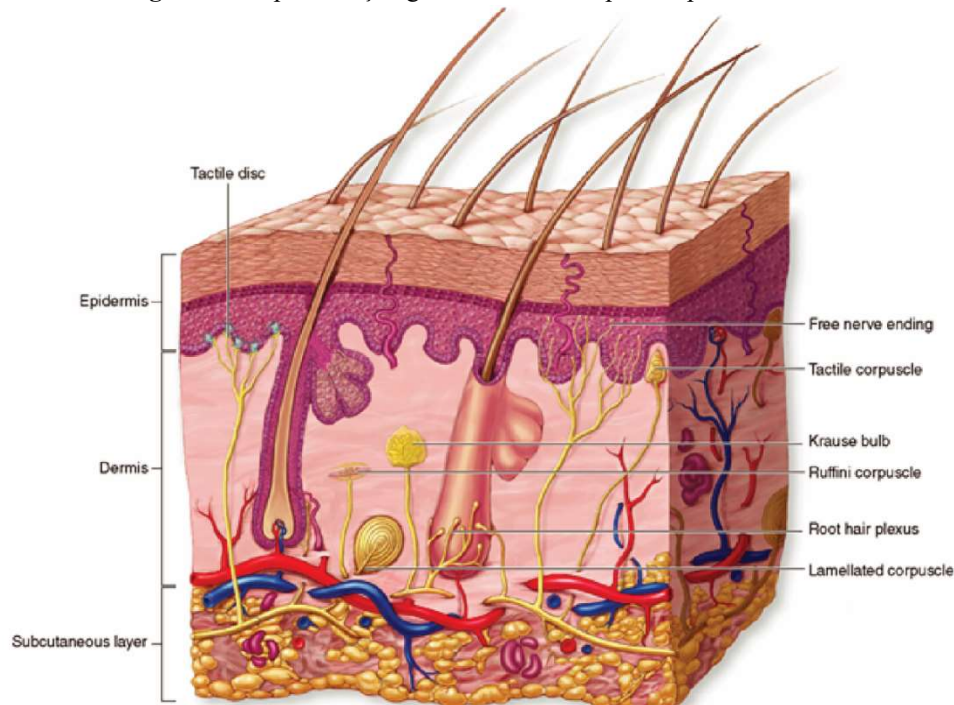
Hoje entende-se que este órgão, após a hepatectomia parcial, desencadeia uma série de eventos que procede a regeneração de forma ordenada, desde os primeiros 5 minutos até de 5 a 15 dias, para o completo restabelecimento (FAUSTO; CAMPBELL; RIEHLE, 2006). Eventualmente, a histologia do fígado torna-se indistinguível do original. O processo compreende o disparo mitótico dos hepatócitos remanescentes, incluindo células estreladas hepáticas (TSUJI, 2017).

A regeneração dos órgãos é um processo ainda não totalmente compreendido (KOTTON; MORRISEY, 2014; TSUJI, 2017). Quando os seus mecanismos subjacentes forem desvendados, teremos a oportunidade de experimentar terapias mais rápidas e eficazes do que as atuais.

2.1. Cicatrização da pele

A pele (Figura 5) é o maior órgão do corpo humano e consiste basicamente em duas camadas principais, sendo a epiderme estratificada e queratinizada conferindo-nos proteção; e outra camada espessa subjacente de tecido conjuntivo dérmico rico em colágeno, que fornece suporte e nutrição (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

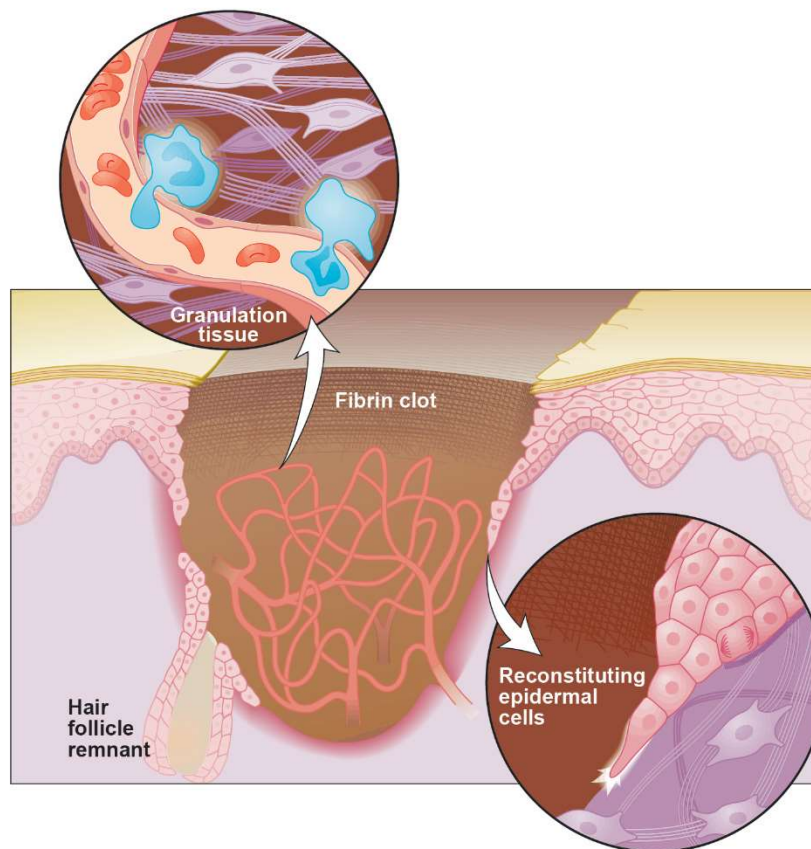
Figura 5 - Representação gráfica de uma biopsia da pele humana.



Fonte: adaptado de JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013.

Como a pele serve como barreira protetora contra o mundo externo, qualquer ruptura deve ser rapidamente reparada (GUO; DIPIETRO, 2010). Em caso de lesão, um curativo temporário é naturalmente realizado na forma de um coágulo (veja na Figura 6), enquanto as etapas de regeneração são iniciadas (SAFFERLING et al., 2013). Após a hemostasia, os monócitos invadem a região para fagocitar quaisquer organismos patogênicos e outros detritos de células ou matriz. Além disso, os macrófagos liberam uma bateria de fatores de crescimento e citocinas no local (MARTIN, 1997). Depois, a cobertura epidérmica é reconstituída a partir das bordas da ferida e das células estromais mesenquimais (MSCs) remanescentes nos folículos pilosos, membrana basal e ao redor dos vasos sanguíneos periféricos (MAXSON et al., 2012).

Figura 6 - Desenho representativo da cicatrização cutânea inicial.



Fonte: adaptado de (MARTIN, 1997).

A cicatrização da pele representa um processo complexo que integra diferentes tecidos e tipos celulares (MAXSON et al., 2012). Ainda com a presença das células inflamatórias, ocorre

um aumento da migração e da proliferação celular dos fibroblastos (GUO; DIPIETRO, 2010). Alguns deles sofrerão diferenciação em miofibroblastos, o que permite a contração das bordas da ferida com consequente redução da área aberta (MARTIN, 1997). Os queratinócitos proliferam e migram a partir do leito da ferida, na intenção de cobrir toda a extensão da lesão. Esse processo é facilitado pela produção de proteases específicas, como a colagenase que assume a função de degradar a matriz extracelular (RODERO; KHOSROTEHRANI, 2010). Então, as células começam a síntese e deposição de nova matriz extracelular (MEC), culminando em angiogênese, neovascularização e finalmente a remodelação do tecido cicatricial maduro (SAFFERLING et al., 2013).

Tabela 1 - Fases da cicatrização da pele.

Fase	Tempo	Células envolvidas	Função
1. Hemostase	Imediato	• plaquetas	• coagulação • liberação de fatores de crescimento
2. Inflamação	1 até 4 dias	• neutrófilos • macrófagos • monócitos	• fagocitose
3. Proliferação (granulação e contração)	2 até 21 dias	• macrófagos • pericitos • linfócitos • angiócitos • neurócitos • fibroblastos / MSCs • queratinócitos • epitelial	• preenchimento • reestabelecimento de função • fechamento
4. Remodelamento (maturação)	21 dias até 2 anos	• fibrócitos • fibroblastos / MSCs	• desenvolver resistência

Fonte: adaptado de (ORSTED et al., 2007).

Em seres saudáveis, a maioria das lesões de pele de pequena extensão cicatriza em uma ou duas semanas (SAFFERLING et al., 2013). Porém, em acometidos por diabetes mellitus, insuficiência renal, insuficiência vascular ou queimaduras extensas, esse processo é extremamente comprometido, resultando em complicações que podem inclusive antecipar a morte do indivíduo (P.V., 2013). Outra falha no processo de regeneração da pele é a cicatriz hipertrófica (GEORGEU; ROSS, 2002). Nesta, há uma deposição desorganizada de colágeno levando ao excesso de tecido, o que causa uma cicatriz aumentada (HAN; LIN; JIANG, 2017). Ainda mais pronunciado, o quelóide pode ser considerado um estágio mais avançado da cicatriz hipertrófica, comprometendo a função da região, além de causar uma estética indesejada (TU; LINEAWEAVER; ZHANG, 2017).

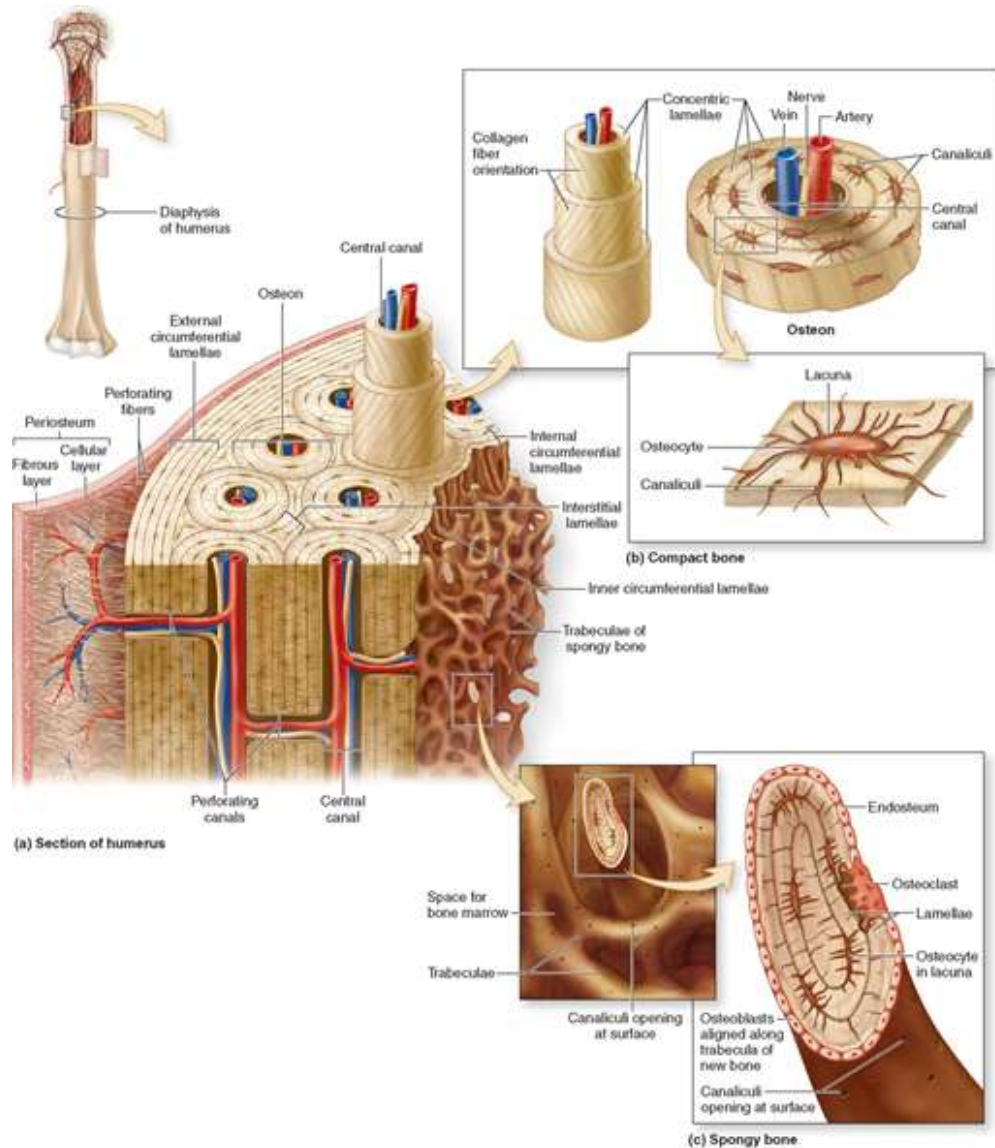
Por isso, uma série de novas estratégias têm sido tentadas, tais como a aplicação de fatores de crescimento, membranas sintéticas e biológicas como curativo (HU et al., 2016; TODA et al., 2007). Também, as terapias com células-tronco, ou a associação destas com biomateriais, na intenção de acelerar e ao mesmo tempo melhorar o processo de regeneração da pele (KLIMCZAK; KOZLOWSKA, 2016; MAXSON et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014b).

2.2. Reparo ósseo

Ao contrário da pele, os ossos podem curar-se sem formar uma cicatriz fibrosa (DOBLARÉ; GARCÍA; GÓMEZ, 2004). No entanto, da mesma forma, uma resposta inflamatória local é iniciada para disparar o processo regenerativo. Imediatamente após a lesão, um hematoma se forma permitindo a infiltração de células sanguíneas e consigo uma quantidade maior do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-11 e IL-18, permanecendo em níveis aumentados por até 72 h após o trauma (MARSELL; EINHORN, 2011). Depois da hemostasia, um tecido de granulação rico em fibrina começa a ganhar forma. Dentro dele, ocorre a formação endocondral, ou seja, se estabelece um calo cartilaginoso, o qual ajuda a estabilizar a fratura. Junto à proliferação dos condrócitos, uma quantidade aumentada das proteínas pró-colágeno e de proteoglicano, ambos do tipo II (EINHORN, 1998). Seguindo, ocorre a mineralização da matriz cartilaginosa, iniciada pela morte dos condrócitos, o que abrirá cavidades na matriz que logo após serão invadidas por capilares sanguíneos e por MSCs (YANG et al., 2007).

A Figura 7 mostra um esquema com as características básicas do tecido ósseo, apresentando os três principais tipos de células que o compõe: os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos em seus locais habituais.

Figura 7 - Representação gráfica da típica organização histológica do osso.



Fonte: adaptado de JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013.

Células precursoras podem se diferenciar em osteoblastos e produzir matriz óssea sobre os restos de cartilagem (GRANERO-MOLTÓ et al., 2009). Fatores como a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), BMP-7 e o receptor acoplado à proteína G (CXCR-4) ajudam a fazer o recrutamento das MSCs (MARSELL; EINHORN, 2011). O fator derivado de células estromais-1

(SDF-1) também é tido como um dos principais responsáveis pela atração de células indiferenciadas, sendo secretado principalmente pelas células que compõe o periósteo (KITAORI et al., 2009). Com a produção da matriz calcificada, os osteoblastos acabam se aprisionando, originando as lacunas e os canaliculos, denominando-se agora de osteócitos. Ao mesmo tempo, osteoclastos são gerados para que através da reabsorção óssea, possa ser formado o canal medular (MARSELL; EINHORN, 2011).

Para que a remodelação óssea seja bem-sucedida, uma oferta adequada de vascularização deve suprir o processo regenerativo proporcionando a nutrição momentânea e vitalícia de toda a região (DOBLARÉ; GARCÍA; GÓMEZ, 2004). Tão importante quanto, um aumento gradual na estabilidade mecânica local é esperado. Em caso de falha em algum destes processos, a união óssea pode não ocorrer e ainda ser acompanhada de tecido não funcional. Nos casos em que há boa vascularização, mas com instabilidade mecânica, a cicatrização geralmente avança para formar uma cartilagem, similar a uma pseudoartrose (GREEN; LUBAHN; EVANS, 2005).

2.3. Células estromais mesenquimais

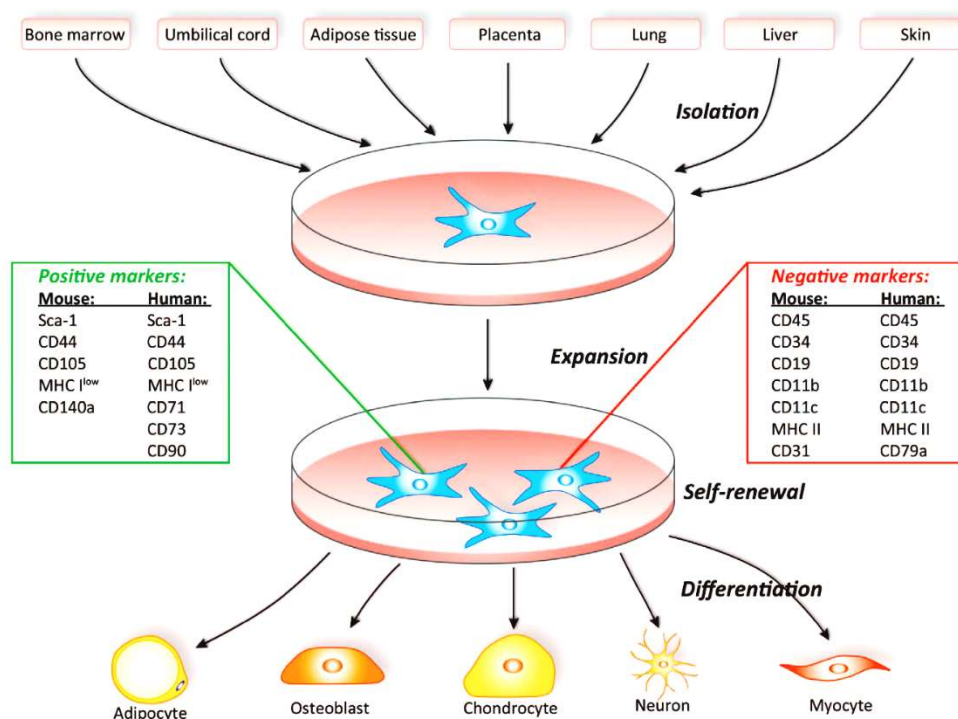
Como vimos anteriormente, as MSCs são consideradas uma das principais células atuantes na cicatrização da pele e no reparo ósseo. De fato, elas desenvolvem um papel fundamental na regeneração de todos os órgãos humanos (MAXSON et al., 2012).

Também conhecidas por células-tronco adultas, células-tronco mesenquimais, ou mais recentemente como células de sinalização medicinal, elas podem ser encontradas em praticamente todos os tecidos adultos de forma indiferenciada (CAPLAN et al., 2017; DA SILVA MEIRELLES et al., 2006). Na pele, as MSCs localizam-se principalmente nos folículos pilosos e na membrana basal; no tecido adiposo ao redor dos vasos sanguíneos; e nos ossos, na membrana periosteal (DA SILVA MEIRELLES et al., 2016; DOMINICI et al., 2006).

Atualmente, sabe-se que as MSCs também podem sofrer transdiferenciação para outros tipos de células ectodérmicas e endodérmicas, como em neurônios, células musculares e endoteliais, apresentando uma plasticidade ainda maior do que se pensava inicialmente (CRISAN et al., 2008; DOAN et al., 2014; TROPEL et al., 2006).

Dentre as aplicações das MSCs estão o teste de novas drogas, a modelagem de doenças pela terapia celular e a regeneração de lesões (ISER et al., 2016; KITAMBI; CHANDRASEKAR, 2011; RODRIGUES et al., 2014). As suas propriedades de auto-renovação as tornaram promissoras para a engenharia de tecidos pela facilidade de isolamento, manipulação e expansão das culturas em laboratório, e também pela possibilidade de guiar quimicamente a sua especialização, como mostra a Figura 8 (CHAGASTELLES et al., 2010; CHEN et al., 2016).

Figura 8 – Multipotência e marcadores imunofenotípicos das MSCs no cultivo *in vitro*.

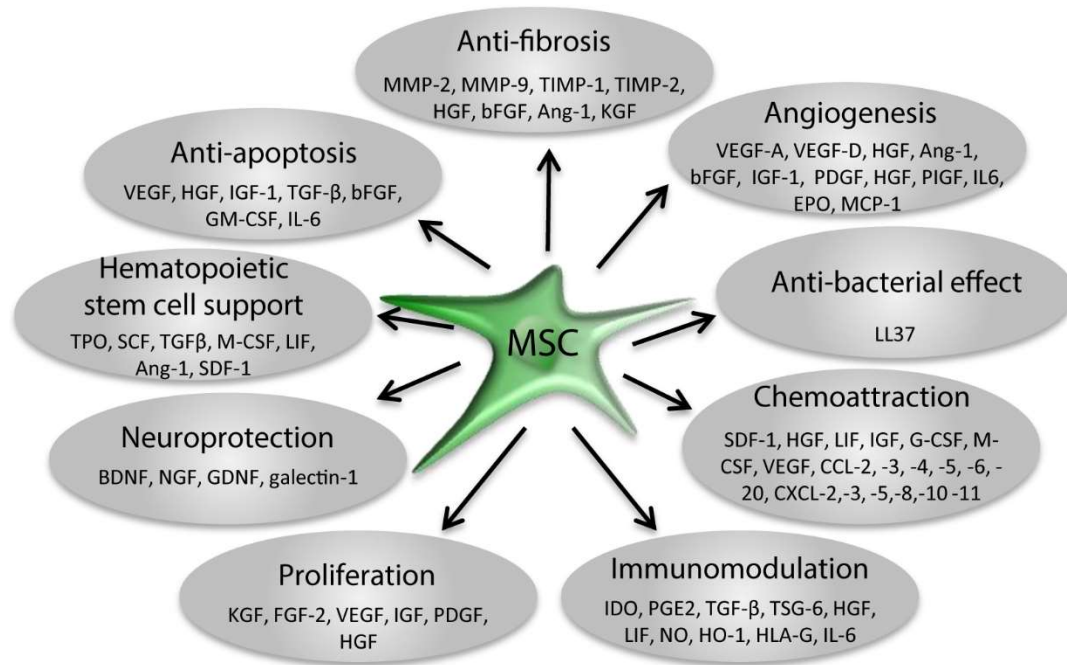


Fonte: adaptado de (CHEN et al., 2016).

Além disso, um amplo repertório de moléculas de interesse biológico é produzido e secretado pelas MSCs, conforme o esquema da Figura 9. Os fatores tróficos, como exemplo as citocinas e os fatores de crescimento, conferem às MSCs a habilidade de atuar nos processos de migração e atração celular (no inglês, *cell homing*), proliferação das células circundantes, imunomodulação, angiogênese, deposição de MEC e na total remodelação do tecido regenerado (KAPUR et al., 2013; P.V. et al., 2013).

Vários autores têm investigado e esclarecido que estas moléculas auxiliam diretamente na manutenção e reparo dos órgãos via ativação parácrina sobre as células adjacentes à lesão.

Figura 9 – Ação do secretoma das MSCs.

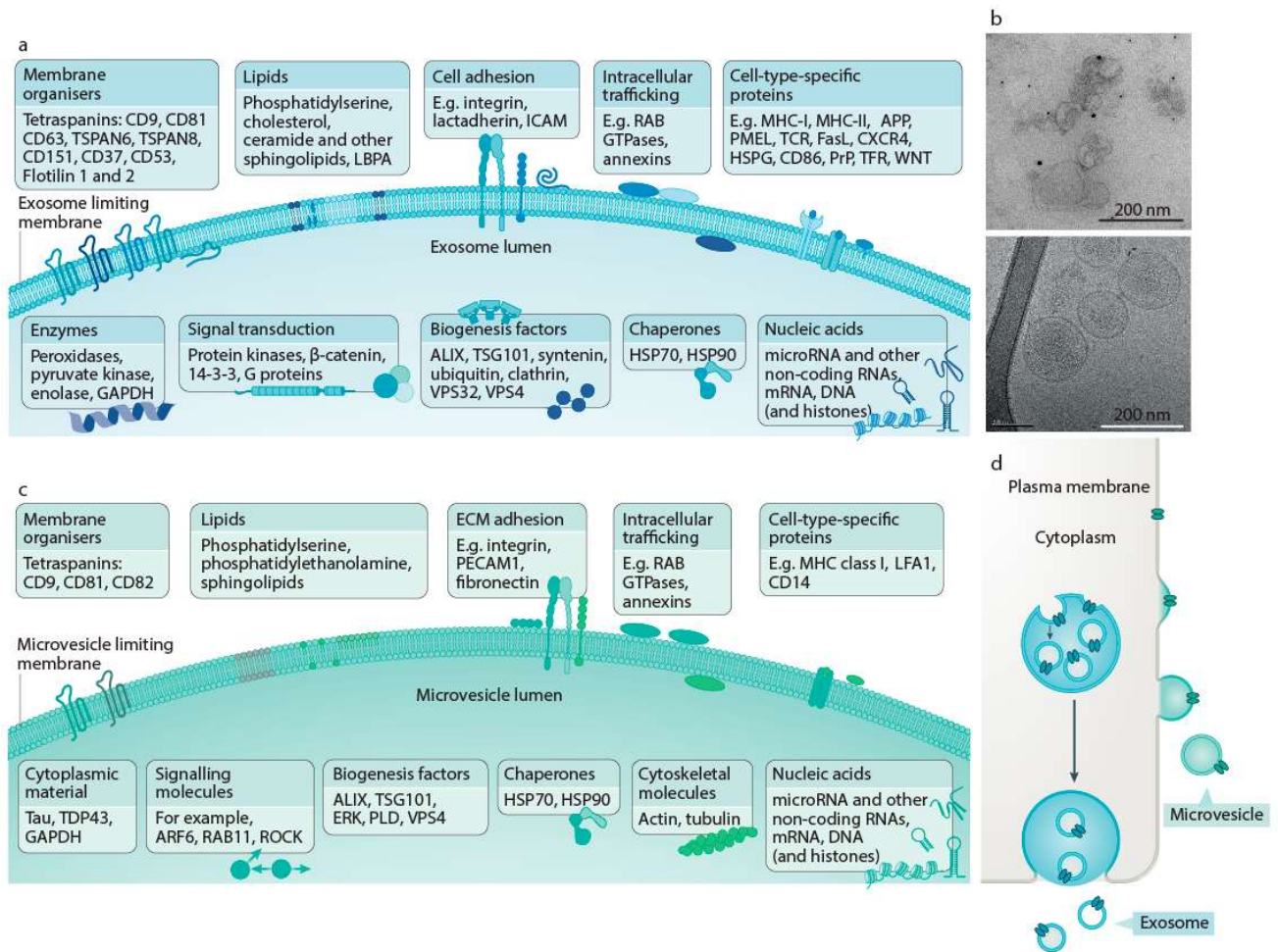


Fonte: adaptado de (MAUMUS; JORGENSEN; NOËL, 2013)

Hoje sabe-se que uma fração destes fatores bioativos são liberados na matriz extracelular protegido por vesículas lipídicas (MAUMUS; JORGENSEN; NOËL, 2013; ZHANG et al., 2018). Os exossomos e as microvesículas podem apresentar de 50 nm a 10 μ m de diâmetro, mediando a transdução de sinal entre as células após endocitose ou fusão de membrana (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Seu papel na cicatrização de feridas inclui um aumento na proporção de TGF- β 1 para TGF- β 3, bem como a liberação de outros componentes como os colágenos dos tipos I e III.

As principais diferenças, como a morfologia, modo de liberação e a variedade das moléculas que compõem os exossomos e as microvesículas podem ser conferidas na Figura 10.

Figura 10 – Características dos exossomos e das microvesículas.



Fonte: adaptado de (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

A capacidade de regulação imunológica das MSCs transplantadas no tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro é devida, pelo menos em parte, à ação de seus exossomos contendo TGF- β , IFN- γ , IDO e IL-10 (ZHANG et al., 2018). Todas essas características fazem com que as MSCs representem uma parcela muito importante na medicina regenerativa.

Graças ao progresso contínuo da medicina regenerativa, tem se criado projetos vislumbrando o crescimento de órgãos a partir das células precursoras do doente (MARTINO et al., 2012). Isso contornaria problemas de incompatibilidade genética e a rejeição. Em 2008, ocorreu o primeiro transplante de traqueia nestas condições, na Suécia (MACCHIARINI et al., 2008).

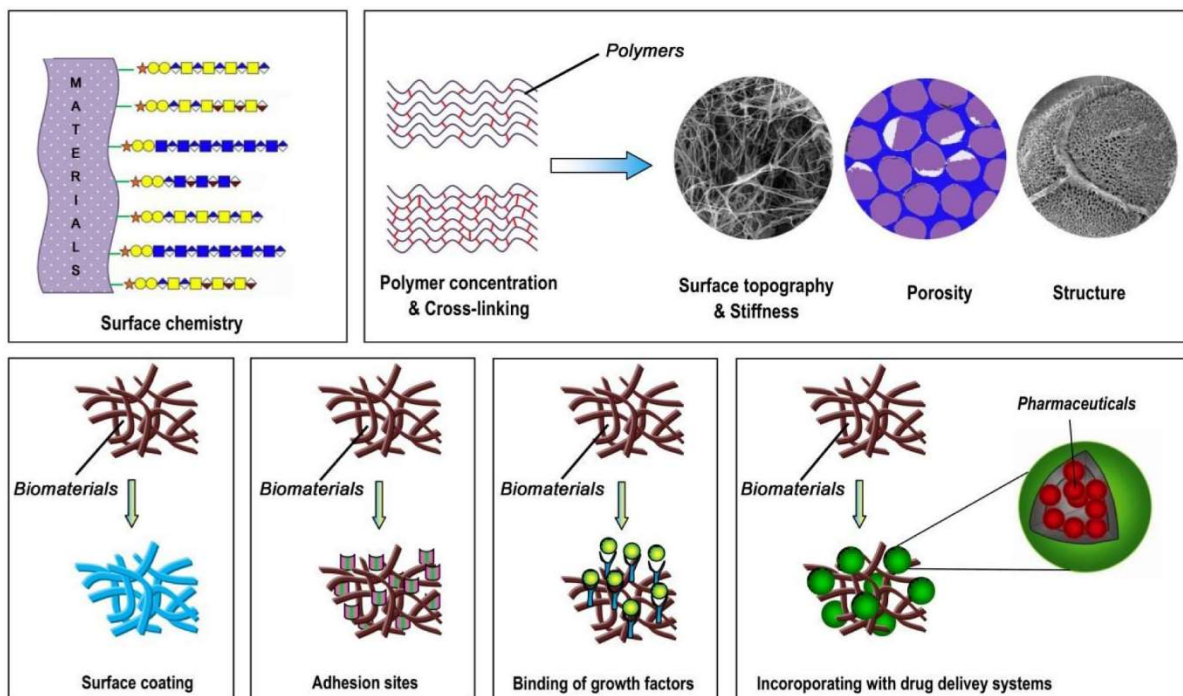
3. Biomateriais

Para que um transplante desta complexidade fosse possível, ocupou-se a traqueia de um doador morto, a qual foi descelularizada e repovoada com MSCs autólogas (MACCHIARINI et al., 2008). O médico italiano Paolo Macchiarini, responsável por essa pesquisa, foi então visto como um dos principais especialistas mundiais em transplantes de traqueia com células-tronco. Entretanto, alguns dos seus pacientes morreram após esses procedimentos. Além disso, recaem sobre ele suspeitas de falsificação de currículo e de registros de trabalho, o que provocou uma das piores crises que já viveu a elite científica responsável pelos prêmios Nobel (DOMÍNGUEZ, 2016).

Entretanto, desde então, a técnica vem sendo aprimorada e hoje conta com a produção prévia de uma matriz sintética como base para a replicação das células durante o período *in vitro* (ELLIOTT et al., 2017). Após uma semana, essa matriz já está suficientemente revestida de células e a peça é então transplantada para doente.

Na maioria dos processos de engenharia de tecidos, há a necessidade do suporte para o ancoramento e molde do tecido que se deseja (MAO; MOONEY, 2015). Um biomaterial é considerado qualquer substância que tenha sido projetada para interagir com sistemas biológicos com intenção de tratar, aumentar, reparar ou substituir uma função do corpo, ou com fins de diagnóstico (HUEBSCH; MOONEY, 2009). Apesar do contexto histórico milenar apresentado na introdução desta tese, os biomateriais são considerados uma ciência há apenas 50 anos, englobando elementos da medicina, biologia, química e engenharia de materiais (RATNER et al., 2004). A Figura 11 apresenta as configurações que atualmente vêm sendo exploradas.

Figura 11 – Representação das recentes projeções dos biomateriais.



Fonte: adaptado de (YU et al., 2016).

As células semeadas sobre o biomaterial podem ser estimuladas através de diferentes reações de superfície, seja o material de origem natural ou sintética (MARTINO et al., 2012). Nestes casos, diz-se que o material exerce certa bioatividade sobre as MSCs, ou sobre as células adjacentes do hospedeiro, quando enxertado. Um clássico exemplo desta bioatividade é o potencial de osteoindução do biovidro 45S5 (JONES, 2013), empregado no reparo ósseo.

3.1 Biovidro 45S5

O primeiro vidro bioativo foi inventado por Larry Leroy Hench (Figura 12) na Universidade da Flórida (EUA), em 1969 (HENCH et al., 1971). Na época, todos os materiais projetados para a composição de implantes, como os metais e polímeros - projetados para serem bioinertes - desencadeavam encapsulamento fibroso, ao invés de formar uma interface ou ligação estável com os tecidos (HENCH, 2006). Foi então que o professor Larry decidiu fazer um vidro degradável com 45% de SiO_2 , 24,5% de CaO , 24,5% de Na_2O e 6% de P_2O_5 , posteriormente denominando-o de biovidro 45S5 (MIGUEZ-PACHECO; GREENSPAN, 2015).

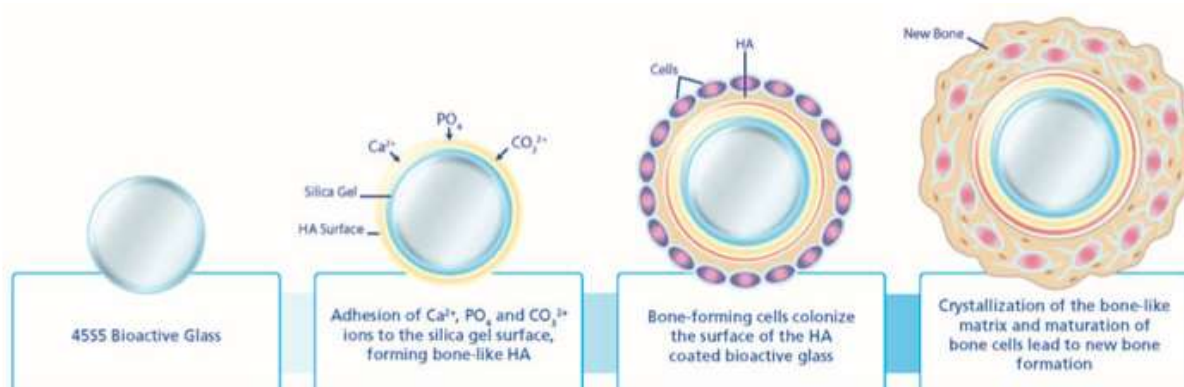
Figura 12 – Professor Larry Hench.



Fonte: arquivo de (IMPERIAL COLLEGE LONDON, 2015).

A bioatividade do biovidro 45S5 (Figura 13) se justifica pela capacidade de reagir quando em ambiente fisiológico, ocorrendo a deposição de uma nova camada de hidroxiapatita (HA), a qual recobre o implante e favorece a formação do novo tecido ósseo (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005).

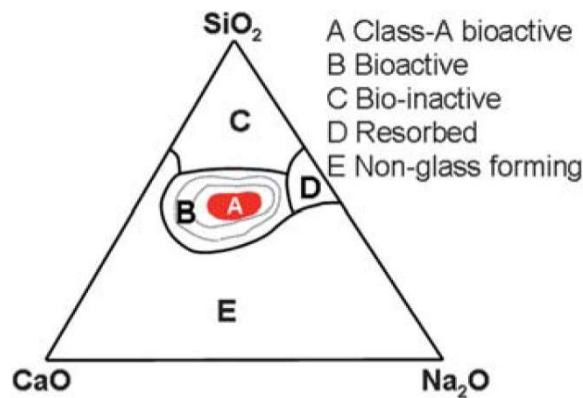
Figura 13 – Reação de superfície do biovidro 45S5.



Fonte: adaptado de (KARASU et al., 2017).

A Figura 14 exibe a dependência composicional do biovidro 45S5 para a ligação com os tecidos ocorra (região B). Nota-se que pequenas alterações na composição podem levar a propriedades muito diferentes, por isso apresentando versatilidade de ligação com os diferentes tecidos vivos. Quando a composição do material excede 52% de SiO_2 , o vidro liga-se ao osso, mas não aos tecidos moles, o que seria possível apenas na região A.

Figura 14 - Diagrama composicional de ligação tecidual do bioglass 45S5.



Fonte: retirado de (TILOCCA, 2010).

Quando em tecidos duros, o biovidro 45S5 pode ligar-se as fibrilas do colágeno produzido pelos osteoblastos formando uma interface quimicamente e estruturalmente muito similar à matriz inorgânica óssea (MOTEALLEH et al., 2017). A reação de superfície leva a uma rápida ligação, mas, devido à estrutura principalmente bidimensional da rede de vidro, as propriedades mecânicas são consideradas relativamente baixas (PLEWINSKI et al., 2013).

Estudos em modelos *in vivo* demonstram que o biovidro parece ser capaz de se integrar totalmente ao osso (TAN et al., 2013). Desde então, os materiais como a hidroxiapatita e outros Ca^{2+} fosfatados têm sido muito utilizados em compósitos e como recobrimento de próteses esqueléticas, tanto na ortodontia, quanto na ortopedia (GREENSPAN, 2016; MIGUEZ-PACHECO; GREENSPAN, 2015; MOTEALLEH et al., 2017).

HIPÓTESE DE TRABALHO

Mesmo antes de serem descobertas, as MSCs já tratavam condições clínicas humanas através da aplicação de tecido autólogo, heterólogo ou de xenoenxertos. Após estas células serem caracterizadas, a habilidade mais comentada era a sua multipotência, pois têm participação direta na reposição natural das células especializadas ao longo de toda a nossa vida. Mais recentemente, o potencial terapêutico das MSCs foi associado à produção e secreção de moléculas bioativas, fundamentais para a comunicação celular. Nos últimos anos, se observa muito esforço pela busca de novas terapias com base em células e biomateriais que possam levar a um processo melhorado de cura, tanto em lesões de pele como no reparo ósseo. No entanto, os tratamentos inovadores dispendem um alto custo em pesquisa e insumos laboratoriais, o que torna o produto final, na maioria das vezes, inacessível à maior parte da população mundial e também acaba perdendo a sua vantagem pela limitada eficiência. Enquanto isso, tecidos humanos descartados, como a gordura oriunda de procedimentos cirúrgicos, disponibilizam uma quantidade satisfatória de MSCs, as quais podem ser processadas e induzidas a fornecer moléculas bioativas com participação direta na regeneração.

Para o primeiro capítulo desta tese, nós hipotetizamos que um dos principais fatores presentes no processo de cicatrização da pele é o TGF- β 1, o qual é produzido pelas MSCs e tem ação direta sobre a migração dos queratinócitos.

Já para o segundo capítulo, se fez valer da ideia de que as MSCs são estimuladas pelo Biovidro 45S5 a diferenciarem-se em precursores ósseos. Este vidro bioativo é inerte e incapaz de gerar dano ao hospedeiro, além de apresentar a capacidade de se ligar, tanto em tecidos duros, como nos moles.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial das células estromais mesenquimais (MSCs) sobre a cicatrização de pele e como compósito de um material voltado ao reparo ósseo.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Isolar e caracterizar MSCs humanas oriundas de lipoaspirado ou abdominoplastia do serviço de cirurgia plástica da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA); e com elas, padronizar a obtenção do meio condicionado (MC).

2.2.2. Padronizar o tratamento de queratinócitos humanos com o MC de MSCs; e avaliar a proliferação, migração, morfologia nuclear e a modulação do citoesqueleto.

2.2.3. Associar as MSCs ao biovidro 45S5; e avaliar a bioatividade *in vitro* por microscopia de varredura, bem como a biocompatibilidade através da análise da viabilidade celular, citoesqueleto, irregularidades nucleares e potencial de osteoindução.

2.2.4. Avaliar a biocompatibilidade do biovidro 45S5 *in vivo*, na presença ou na ausência de MSCs, através de análises histológicas no tecido circundante, bem como dos órgãos distantes ao implante.

APRESENTAÇÃO

A partir daqui os resultados obtidos durante o doutorado serão apresentados em dois capítulos, ambos na forma de artigos científicos e nas normas solicitadas pelas revistas, nas quais eles foram submetidos.

O capítulo I compreende o artigo "*Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stromal cells can modulate cell migration and morphology of keratinocytes in vitro*", submetido e revisado, pretendido à publicação no periódico "Cell Proliferation" (fator de impacto 4,112), da companhia Wiley (EUA). O manuscrito encontra-se no editorial com status de *major revision*, por isso o capítulo começa pela carta redigida aos revisores, que foi enviada em 23 de maio de 2018, como resposta aos questionamentos recebidos.

Já o capítulo II apresenta o artigo "*Bioglass 45S5: structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo*", o qual foi submetido à revista "Biofabrication" (fator de impacto 5,240), da Institute of Physics Publishing (IOP Science, Reino Unido), no 1º de junho de 2018.

Seguindo os capítulos, será apresentada uma discussão, onde serão comentados os principais resultados obtidos e a conclusão, com as considerações finais pertinentes.

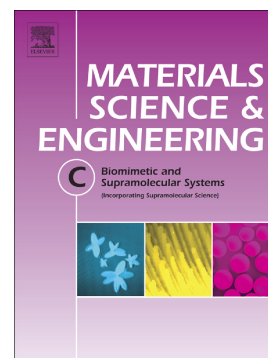
CAPITULO I

CAPÍTULO II

Accepted Manuscript

Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo

Cristiano Rodrigues, Liliana Ivet Sous Naasani, Carla Zanatelli, Thaís Casagrande Paim, Jéssica Gonçalves Azevedo, João Cardoso de Lima, Marilda da Cruz Fernandes, Silvio Buchner, Márcia Rosângela Wink



PII: S0928-4931(18)31657-6
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109781>
Article Number: 109781
Reference: MSC 109781
To appear in: *Materials Science & Engineering C*
Received date: 9 June 2018
Revised date: 12 May 2019
Accepted date: 20 May 2019

Please cite this article as: C. Rodrigues, L.I.S. Naasani, C. Zanatelli, et al., Bioglass 45S5: Structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells in vitro and in vivo, Materials Science & Engineering C, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109781>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Bioglass 45S5: structural characterization of short range order and analysis of biocompatibility with adipose-derived mesenchymal stromal cells *in vitro* and *in vivo*

Cristiano Rodrigues¹, Liliana Ivet Sous Naasani¹, Carla Zanatelli¹, Thaís Casagrande Paim¹, Jéssica Gonçalves Azevedo¹, João Cardoso de Lima², Marilda da Cruz Fernandes³, Silvio Buchner^{4, *}, and Márcia Rosângela Wink^{1, *}

* These authors shared senior authorship

¹*Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil*

³*Laboratório de Pesquisa em Patologia, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brasil*

⁴*Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brasil*

Corresponding author: Wink, MR

E-mails: mwink@ufcspa.edu.br; marciawink@yahoo.com.br

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – UFCSPA

245, Sarmiento Leite. Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170

Telephone: +55 (51) 3303.8762; fax: +55 (51) 3303.8810

Abstract

Bioactive glasses have potential applications in the field of regenerative medicine due to their bioactivity that permits interaction with both hard and soft tissues. In the same way, mesenchymal stromal cells (MSCs) have been experimentally tested as part of engineered constructs considering their self-renewal and multipotent capacities. However, to design an association, it is crucial to investigate the physical properties of bioglass 45S5, as well as its biocompatibility. Therefore, we investigated the structural short range order of the stoichiometric 45S5, by obtaining its total structure factors ($S(K)$) and total pair distribution function $G(r)$. The *in vitro* compatibility of human MSCs with 45S5 was verified by viability, morphometry and osteoinduction assays, F-actin staining and scanning electron (SEM) analysis. The compatibility outcome was verified through a subcutaneous implantation in a murine model by grafting the 45S5 as a scaffold for allogeneic MSCs. The cell-substrate modulation includes the maintenance of the MSC viability and osteoinduction potential after being exposed to the 45S5 extract. A low spreading during cell adhesion was detected. Both normal actin cytoskeleton organization and nuclei irregularities were observed, besides an increase of hydroxyapatite (HA) depositions around cells. Cells showed satisfactory compatibility patterns when growing over 45S5 for 7, 30 and 90 days. The implant did not show any apparent toxicity for organs, or strong immunogenic reactions, and it was accompanied by a dense capsule formation around the graft. Our results indicate that MSCs can grow in the long term on the 45S5 while maintaining their characteristics. This fact, together with a non-toxicity to animals means that the 45S5 can be implemented in pre-clinical trials aiming MSC's transplantation leading to further bone and tissue repair.

Keywords: bioglass 45S5; short range order; radial distribution functions; bioactivity; mesenchymal stromal cell; F-actin.

1 Introduction

Biomaterials for bone tissue engineering should not only be biocompatible, biodegradable, bioactive and mechanically competent, but also, they should modulate over target cells and their microenvironment promoting cell adhesion, viability, proliferation, differentiation and mineralization [1-6]. Other desirable characteristic is anti-bacterial function to avoid implant-related infections [7].

MSC are strong candidates in this field due to its ability to differentiate into specialized cells, naturally contributing to all processes of healing [8]. They can also restore the bone tissue by participating in the formation of bone callus in cases of fractures [9]. MSC subpopulations can be isolated and expanded in culture from various sites of adult tissues, including the bone marrow, skin, sclerocorneal limbus, amniotic membrane and the adipose tissue [8, 10]. These several sources make possible autologous cell transplantation, in cases which the patient conditions permit the waiting time for cell processing. An allogeneic transplantation is also an alternative considering the fact that MSCs secrete interleukins that leads to immune regulation [9].

Bioactive glasses discovered in 1967 are providing an alternative way to implant a material using its bioactivity [11]. The bioactivity of a graft has been defined as the potential to interact with adjacent living tissues [1]. The 45S5 is one of the first complete synthetic materials that can seamlessly bond to bones because its reactions could replace the inorganic matrix [12]. It is also discussed the 45S5 potential to connect with soft tissues, supporting the formation of an organic part of the bone, such as a periosteal membrane [13].

The macroscopic properties of the materials are dependent on its structure [12]. In particular, for amorphous materials, the structure is determined in a short range order [14, 15]. The investigation of the structure of biocompatible (amorphous) glasses is still limited. The short range order structure of these materials is restricted to studies focusing on molecular dynamics simulation [14-16].

There are evidences that degradable bioactive glasses and their compositional variants in biological settings could be clinically applied to regenerate bone and soft tissue defects [17]. However, there is a need of more pre-clinical studies investigating the influence of the bioactive glasses and their ionic dissolution products on hMSCs cell biology parameters. Therefore, considering the bioglass potential as scaffold, this study focused on determining the short-range order structure of 45S5 pristine glass from high-resolution experimental measurements of X-ray diffraction and investigating its compatibility with adipose-derived MSCs *in vitro* and *in vivo*, by assessing the cell viability, osteoinduction capability, cell adhesion and morphology, as well as a subcutaneous graft in a murine model. This study aims to contribute to the knowledge gathered on the biological interactions of MCSs and glass surfaces, to improve both its safety and effectiveness in new technological strategies to achieve constructs for tissue repair.

2 Materials and methods

2.1 45S5 synthesis and characterization

The produced 45S5 pristine glass samples were composed of 45 mol% SiO₂, 24.5 mol% CaO, 24.5 mol% Na₂O and 6 mol% P₂O₅, following the conventional procedure in the production of glasses. A 40-g batch was melted in a Pt crucible at 1450°C for 2 h in an electric furnace. The resulting melt

was poured on a steel plate, annealed below the glass transition temperature at 430°C for 1 h, and cooled down slowly until attaining the room temperature.

The short range order structure of the samples was analyzed using Synchrotron X-ray diffraction (XRD) using an energy $E = 20000$ eV ($\lambda = 0.6199$ Å) selected by a Si (111) monochromator and a Ge (111) analyzer at the diffracted beam. The energy and average current of the storage ring were 1.37 GeV and 120 mA, respectively. The $S(K)$ of 45S5 samples were derived from the XRD scattering patterns recorded. The $G(r)$ was obtained through Fourier transformation of the $S(K)$. According to Faber and Ziman, the $S(K)$ is obtained for an amorphous sample from the normalized scattered intensity on a per atom scale $I_a(K)$, as follows

$$S(K) = \frac{I_a(K) - [\langle f^2(K) \rangle - \langle f(K) \rangle^2]}{\langle f(k) \rangle^2} \quad (1)$$

$$S(K) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N W_{ij}(K) S_{ij}(K) \quad (2)$$

where $K = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\theta$ is the transferred momentum and $W_{ij}(K)$ are the weights of the partial structure factors, $S_{ij}(K)$ [18]. The $W_{ij}(K)$ are given by

$$W_{ij}(K) = W_{ji}(K) = \frac{c_i c_j f_i(K) f_j(K)}{\langle f(K) \rangle^2} \quad (3)$$

$$\langle f^2(K) \rangle = \sum_i c_i f_i^2(K) \quad (4)$$

and

$$\langle f(K) \rangle^2 = \left[\sum_i c_i f_i(K) \right]^2 \quad (5)$$

Here, c_i is the concentration of i -type atoms, $f_i(K, E) = f_0(K) + \dot{f}(E) + i\ddot{f}(E)$ is the atomic scattering factor, and both $\dot{f}(E)$ and $\ddot{f}(E)$ are the real and imaginary dispersion terms. The total pair distribution function $G(r)$ is related to the $S(K)$ through a Fourier transformation,

$$G(r) = 1 + \frac{1}{(2\pi^2\rho_0 r)} \int_0^\infty K [S(K) - 1] \sin(kr) dK \quad (6)$$

The $RDF(r)$ are calculated from the $G(r)$, as follows

$$RDF(r) = 4\pi\rho_0 r^2 G(r) \quad (7)$$

where ρ_0 is the atomic density in atoms/ $\text{\AA}^3$. From the maxima of the $G(r)$ or $RDF(r)$ functions, the interatomic distances can be evaluated.

The DTA measurements on the 45S5 samples were carried out using a DTA-50 thermal analyzer (Shimadzu, Kyoto, Japan) to determine the glass transition temperature (T_g) and the temperature of the onset of crystallization (T_c). The heating rate (ϕ) used in the present experiments was of $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

2.2 Adipose-derived hMSCs isolation and characterization

Adipose-derived hMSCs were extracted from the abdominal adipose tissue of a female healthy donor aged of 31 years with a normal body mass index (25). The patient consent was obtained before the liposuction and all protocols were approved by the Research Ethics Committee (REC-ISCMPA No. 882968) of the Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre Hospital, (Porto Alegre, RS, Brazil), according to ethical principles expressed in the Declaration of Helsinki.

At first, the fat tissues were transferred to a separatory funnel and were washed three times using phosphate-buffered saline (PBS) to remove the blood tissue. The fat fragments were then relocated to a collagenase solution Type I, 1 mg/mL, in Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) medium

(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and were incubated in a water bath (37°C) for 30 min which was vortexed each 10 min. Twice the volume of the DMEM with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) was added to inactivate the reaction. After centrifugation ($600 \times g$, 10 min), the cells were resuspended in an erythrocyte lysis solution (150 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 and 1 mM EDTA) diluted in ultrapure H_2O (v:v), while undergoing simultaneous mechanical shaking, before leaving them for 15 min at room temperature. A new centrifugation was performed and the cells were resuspended in a known volume of medium to quantify using the 0.4% trypan blue (Bio-Rad, Hercules, USA) exclusion method. 5.2×10^3 cells/ cm^2 were then seeded in 6-well plates and cultured at 37°C in a humidified incubator filled with 5% CO_2 . It was fed by DMEM culture medium, containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 1000 mg/L glucose, 3.7 g/L NaHCO_3 and 15 mM HEPES (Sigma). The medium was changed 48 h later, when adherent cells appeared, and it was repeated each 4 days, after being previously washed with PBS.

The hMSCs differentiation was performed, between the passages 4 to 9, at 2.2×10^5 cells/ cm^2 , in a specific medium (Gibco, Grand Island, USA) meant for both chondrogenic and adipogenic inductions. The cells were cultivated for 3 weeks and the medium was changed every 4 days. After this period, the cells were washed once with PBS and were fixed using a buffered solution containing 4% paraformaldehyde (Sigma) for 30 min at 2 to 8°C. For the chondrogenic assay, the cultures were stained with a 1% Alcian Blue prepared in 0.1 N HCL, for 30 min. The adipogenic differentiation was processed with a 3.4% Oil Red O solution in isopropyl alcohol, for 5 min. The photomicrographs were performed using a BX-50 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

In addition, the surface markers of the hMSCs were analyzed. The cells were dissociated with trypsin, centrifuged, and then incubated for 30 min at 4°C using either phycoerythrin (PE) or fluorescein isothiocyanate (FITC), which are conjugated antibodies specific to the human CD14,

CD34, CD44, CD45, and CD105 proteins (Invitrogen, Waltham, USA). Analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer equipped with a 488-nm argon laser, using the BD CellQuest software (Becton-Dickinson, San Diego, USA). At least 10 000 events were collected.

2.3 *In vitro* biocompatibility

2.3.1 *Cell viability*

The MTT tetrazolium assay is well used to evaluate metabolic function and cellular health [19]. It was here utilized to assess the toxicology of degradation products of 45S5. For this propose, an extract media was obtained by immersing the bioglass composites in complete cell culture media (DMEM plus supplements, as already described), at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere. The ratio between medium volume and the specimen weight was of 1 mL by 0.2 g, as preconized by EN ISO 10993:12 [20]. After 24 h of incubation, the extract media was collected and designated as the 100% extract. Concomitantly, hMSCs were seeded into a 96-well plate with a density of 3×10^3 cells/well and cultured for 24 h to attain cell adhesion. The cells were washed once with PBS and covered with 1%, 10%, and 100% extract solutions, being the lowest concentrations diluted with the standard culture medium. The plate was incubated for 24 and 72 h, under appropriate atmosphere. Posteriori, the cells were washed twice with PBS, and then MTT (Sigma) solution (0.5 mg/mL in standard medium) was added remaining for 4 h (37°C and 5% CO₂). After this, the medium was carefully removed and the formazan crystals were dissolved in dimethyl sulfoxide. The absorbance was read at 570 nm using a spectrophotometer SpectraMax Microplate Reader (Molecular Devices, San Jose, USA). Results are expressed accepting the absorbance of the negative control as 100% viability.

2.3.2 *Osteoinduction potential*

hMSC osteogenesis was verified *in vitro* after 20 days of culture in either osteogenesis differentiation medium (Gibco), 45S5 extract (as prepared above), or standard culture (DMEM 10% FBS) conditions. For this, 5×10^3 cells/cm² were seeded and received media changes each 4 days. After the total period, the cultures were fixed and stained with 2% Alizarin Red S in H₂O (pH 4.2), for 2-3 min. Both the induced cultures and the controls were randomly photographed by optical microscopy (BX-50, Olympus) at $\times 200$ magnification. The quantitative analysis of the mineralized culture area (dye impregnation) was performed using the threshold tool of ImageJ software (NIH, Bethesda, USA). For the cytoskeleton assessment, the samples received a permeabilization buffer composed of 0.1% Triton-X100 in PBS, at 2-8°C, for 15 min. The filamentous actin (F-actin) was marked using Phalloidin-FITC fluorescein isothiocyanate (Invitrogen, Carlsbad, USA) for 40 min, at 2-8°C, in a light-free environment. Fluorescence micrographs ($\times 200$ magnification) were captured using a BX-50 microscope coupled with a 460-490 nm band-pass excitation filter.

2.3.3 Cell-scaffold evaluation

45S5 colonized by MSC populations was observed through optical phase-contrast, fluorescence and SEM microscopies. The surface elemental character was determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) after 48 h of hMSC culturing. For both observations, 6×10^3 hMSCs/cm² were seeded on 45S5 samples and remained immersed in cell culture media in a controlled atmosphere.

For SEM measurements, after 48 h of culture, the samples were washed with PBS and fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in PBS for 96 h, at 4-8°C. Then, the samples were washed with PBS for 12 h, at same temperature. Next, they were incubated with 1% OsO₄ in PBS for 20 min at room temperature, and were then washed three times with PBS. In the sequence, successive dehydration was obtained by presenting the samples to ascending concentrations of ethyl alcohol (50, 60, 70, 80, 90, and 100%) for 10 min each, adding 20 min for the last two percentages. A critical point dryer

was used for the last drying step of samples. 45S5 samples with hMSCs were mounted onto aluminum stubs and coated with gold. The samples were kept in the desiccator until their reading by SEM. The imaging was conducted using a scanning electron microscope (Carl Zeiss EVO, Oberkochen, Germany).

The fluorescence microscopy was used to assess the F-actin cytoskeleton, as previously described, but this time either after 7, 30 or 90 days growing murine MSCs (mMSC) on 45S5 samples. During these periods, the cells received new media each 4 days.

2.3.4 Cell spreading

The surface area of the hMSCs was measured during cell adhesion on 45S5 at the times of 30, 60, 90 min, 24 and 48 h after being seeded. Glass coverslips were used as a control to compare 45S5 with a known adhesion model. Briefly, 6×10^3 hMSCs/cm² were seeded on 45S5 samples and maintained under incubation for the proposed times. The cell body was demarcated via F-actin staining method, as previously described. The visible cell surface area was measured using the ImageJ software after imputing the required spatial calibrations. Through the knowledge of two diameters values of each unitary cell body, we considered

$$A = \frac{\pi D^2}{4} \quad (8)$$

Where the visible area (A) and diameter (D) were related.

2.3.5 Cell nuclei morphometry

The hMSCs populating 45S5 scaffolds had their nuclei investigated by nuclear morphometric analyses (NMA) [21]. Firstly, hMSCs were seeded at a density of 6×10^3 /cm² on both the 45S5

samples and the glass coverslips. After 48 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde (v/v) in PBS for 10 min at room temperature. Cell nuclei were marked with 300 nM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 30 min, at 2-8°C, in a darkling environment. The images of the DAPI-labeled nuclei were captured using an Olympus BX-50 device equipped with a 372-nm band-pass excitation filter. The quantification of nuclei types was performed using the Image Pro Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Data were initially mounted as a plot of Area versus Nuclear Irregularity Index (NII), and after that, the graphs were generated with the percentages of nuclei. All samples were compared with the control (hMSCs on glass coverslips).

2.4 *In vivo* biocompatibility

2.4.1 *Subcutaneous implantation in mice*

To investigate any foreign body reaction, possible toxicity, and the bond potential of 45S5 with soft tissues, an animal model with subcutaneous application of 45S5 discs, including pieces covered by allogenic MSCs, was followed. The animal experiments complied with the international guidelines for the care and use of laboratory animals [22]. Institutionally, the project was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA-UFSCPA upshot No. 510/17).

A total of 21 BALB/c mice from 2 to 6 months old were distributed into 3 groups according to each procedure: the sham group, those that received 45S5 graphs, or those with 45S5 implants populated by mMSCs. The 45S5 discs presented an average of 6 mm in diameter, 1 mm in height and a dry weight of 86 mg. Half of the grafts received a culture of 2×10^4 mMSCs placed 48 h before the implantation. For this, another two mice were the donors of adipose tissues, which were processed in the same mode as described above with hMSCs, as already published by our group [23]. For the surgical intervention, the animals were anesthetized via an intraperitoneal (IP) injection with an

association of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. Their reflexes were controlled throughout all the time of sedation. On a heated table, the dorsal region was cleaned with a shaving cream (Reckitt Benckiser, England, UK) following a prior disinfection using 1% alcohol-iodine. Employing a scalpel, the skin received a 1 cm longitudinal incision to permit the graph implantation into the subcutaneous space. The Sham group received the same surgical procedure. However, for this group, no graft was added. The access was sutured using a nylon thread (No.3). Additionally, an injection IP of 12.5 mg/Kg Tramadol was administered and was repeated once more 24 h after surgery. The animals could recover on a warming pad before being placed in an environment at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, with 12 h light and dark photoperiods. The food and H_2O were provided *ad libitum*. The stitches were removed 7 days after the surgery.

2.4.2 Immunohistochemistry analysis

To evaluate the impact of 45S5 graph implants in mice, the tissue around the 45S5 and organs were histologically analyzed. Immediately after euthanasia, the biopsies were collected, washed once with PBS, and weighed before remaining in a 4% formaldehyde buffered solution for 2 days. For the further procedures, samples of the tissues were included in paraffin, then sectioned into slices of 4 μm , and finally deparaffinized on microscopy slides. Tissue samples were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to identify cell nuclei and to quantify inflammatory cell densities. For this, the slides were washed with H_2O for 10 min, and the samples were firstly stained with hematoxylin for 5 seconds (s), and then washed with H_2O for 15 min. Following that, they were stained with eosin in 95% ethanol for 5 s, and finally put in 100% ethanol for 3 s. Histological parameters such the presence of inflammatory infiltration or fibrosis and morphological changes were evaluated by optical microscopy (BX-53 device, Olympus).

2.5 Degradation rate

Both *in vivo* and *in vitro* trackings of the 45S5 samples morphometry were performed to define its biodegradation rate. Previously, the graphs colonized by mMSCs were seeded at a density of 6×10^3 cells/cm². Pending 7, 30 or 90 days, the samples subsisted in physiological environments until explanted from the animals or pulled out from immersion in culture medium. Dry 45S5 discs were assessed using a digital scale and a pachymeter to identify changes in volume and weight.

2.6 Statistics

Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA and it is shown as mean value $\pm$ standard deviation. The statistical significance of values between results was evaluated using Tukey's multiple comparisons or Student's test. Differences were considered significant when the *p* value was 0.05 or less. Both software Origin 8.5 (Northampton, USA) and GraphPad Prism 6 (La Jolla, USA) were used.

3 Results

3.1 45S5 characterization

The DTA curve of the 45S5 following a heating rate of 10°C/min is shown in the Fig. 1A. The typical *T_g* region is identified at about 540°C, while *T_c* is at 763°C.

The atomic structure of amorphous and crystalline alloys containing *N* chemical elements is described by $N(N+1)/2$ pair correlation functions $G_{ij}(r)$ that are related to the total structure factor $S(K)$ through a Fourier transformation. Thus, to obtain the $N(N+1)/2$ $G_{ij}(r)$ functions are necessary

$N(N+1)/2$ independent $S(K)$ factors. For the 45S5, fifteen $G_{ij}(r)$ functions are necessary to describe its structure, being a hard task. Even using synchrotron radiation, for several reasons, such as atomic number of the elements involved elements, etc., only one $S(K)$ factor was obtained.

Fig. 1B shows the recorded XRD scattering pattern of 45S5 glass. In this figure is also shown the XRD pattern of the crystalline $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ phase given in the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD, Karlsruhe, German), code 36399 [24]. Fig. 1C and 1E show the $G(r)$ and $RDF(r)$ functions obtained by Fourier transformation of $S(K)$ of the 45S5 glass, respectively. In Fig. 1C is also shown the $G(r)$ function of the crystalline $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ phase, which will be discussed later. According to Eq. (x), the $S(K)$ factor is a weighted sum of the $S_{ij}(K)$ factors. The weighted $W_{ij}(K)$ (see Eq. 3) for the 45S5 glass were calculated, and the most important contributions to $S(K)$ are coming from the partial $S_{\text{Ca-O}}(K)$ (17.2%), $S_{\text{Si-O}}(K)$ (14.5%), $S_{\text{O-O}}(K)$ (14.6%), $S_{\text{Na-O}}(K)$ (13.3%), $S_{\text{Ca-Si}}(K)$ (8.6%), and $S_{\text{Ca-Na}}(K)$ (7.9%) factors. At $K = 3 \text{ \AA}^{-1}$, the values of the weights are given between parentheses. The properties of glass materials are strongly dependent of their CSRO (first neighbors and interatomic distances). However, for the 45S5 glass the determination of CSRO is a very hard task because are necessary to obtain fifteen partial $S_{ij}(K)$, as was previously shown. Trying to overcome this difficulty, the resemblance between the structures of 45S5 glass and $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal will be considered (see Fig. 1B and 1C).

Recently, we developed an approach combining both the Rietveld method (RM) and pairs distribution function (PDF) analysis [14, 25]. It is well described in Ref. [15], and therefore, will not be repeated here. It requires only the knowledge of the crystalline structure. It was applied to the $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal. Considering the structural data given in the ICSD - code 36399, all the partial $S_{ij}(K)$ factors and weights $W_{ij}(K)$ were calculated up to $K_{\text{max}} = 30 \text{ \AA}^{-1}$, with a step $\Delta K = 0.025 \text{ \AA}^{-1}$. Again, the $S_{ij}(K)$ factors will not be shown, only the total $G(R)$ and partial $G_{ij}(R)$ functions. Fig. 1C

shows the total $G(R)$ function of 45S5 glass (red curve) and the total $G(R)$ function obtained for the $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal (green curve). From this figure, one can see several similarities between them, mainly after $R > \approx 3 \text{ \AA}$.

Fig. 1D shows the total $G(R)$ function of 45S5 glass and the partial $G_{ij}(R)$ functions obtained for the $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal. The first coordination shell of 45S5 glass ends at $R \approx 2.7 \text{ \AA}$. We will assume that all the partial $G_{ij}(R)$ functions of $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal having the first coordination shell up to $R \approx 2.7 \text{ \AA}$ can contribute to the first coordination shell of 45S5 glass, mainly the partial $G_{\text{Ca-O}}(R)$ (17.2%), $G_{\text{Si-O}}(R)$ (14.5%), $G_{\text{O-O}}(R)$ (14.6%), $G_{\text{Na-O}}(R)$ (13.3%), $G_{\text{Ca-Si}}(R)$ (8.6%), and $G_{\text{Ca-Na}}(R)$ (7.9%) functions, as identified previously. They are shown in Fig. 1D. The average coordination numbers and interatomic distances for the first neighbors in the $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$ crystal are $N_{\text{Ca-O}} = 6$ at $R = 2.35 \text{ \AA}$, $N_{\text{O-O}} = 3.2$ at $R = 1.90 \text{ \AA}$, $N_{\text{Si-O}} = 4$ at $R = 1.60 \text{ \AA}$, $N_{\text{Na-O}} = 4$ at $R = 2.60 \text{ \AA}$, $N_{\text{Ca-Si}} = 2$ at $R = 2.0 \text{ \AA}$, and $N_{\text{Ca-Na}} = 1.0$ at $R = 3.40 \text{ \AA}$.

Fig. 1E shows the first coordination shell (first neighbors) of 45S5 glass. Considering the average coordination numbers and interatomic distances found in the crystal and listed previously, the first coordination shell on $RDF(r)$ of 45S5 glass was deconvoluted. To do this, Gaussian functions were assumed and the K -dependence was explicitly taking into account by Fourier transforming the Gaussian distributions to the K -space, multiplying by $W_{ij}(K)$, and back Fourier transforming over the same K -range used to calculate the experimental $RDF_{ij}(R)$ function. The best fit was reached for the coordination numbers and interatomic distances listed in Fig. 1E. The pair Si-Si for typical silicate glass (SiO_2) is found in $3.0 \text{ \AA}$ [16]. Already in the lithium disilicate glass, this mean interatomic distance is found in $3.12 \text{ \AA}$ [15]. The next layers of coordination were computed for many interatomic distances. Divers pairs contribute to the formation of peaks.

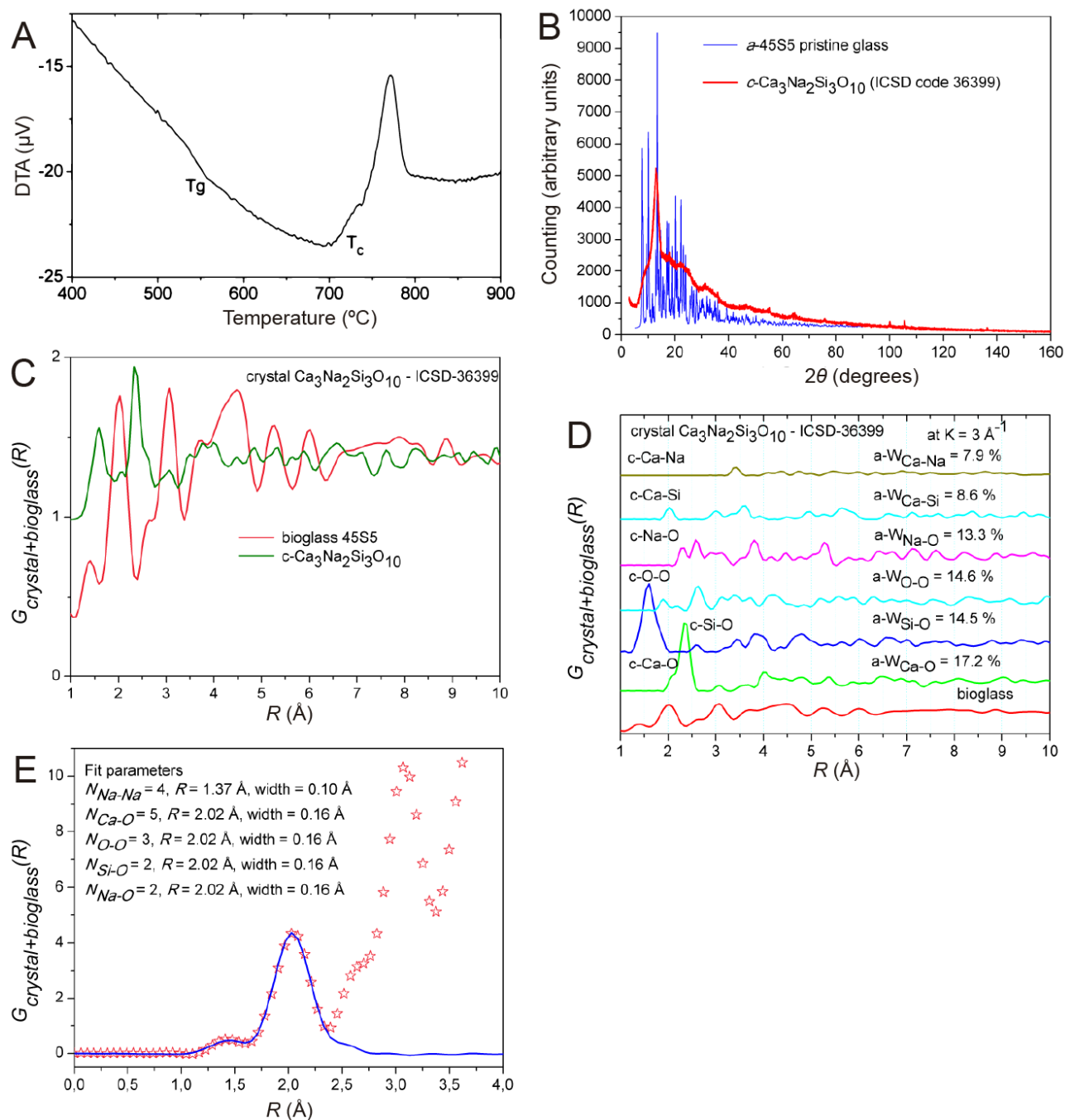
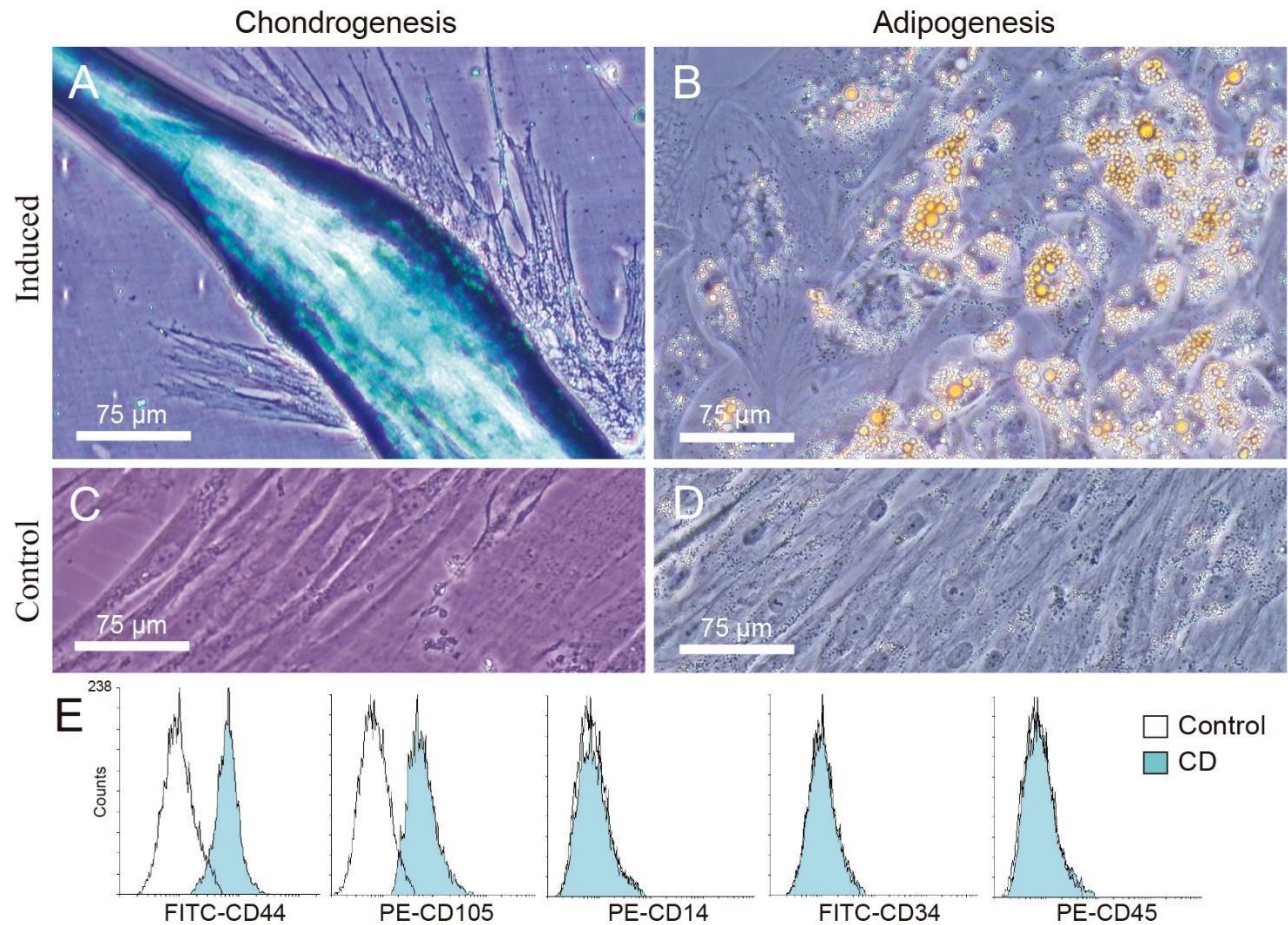


Figure 1. 45S5 physical characterization. (A) Graphic shows DTA curve for the 45S5 pristine glass for a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The T_g is identified at about 540 $^{\circ}\text{C}$ and T_c is showed at 763 $^{\circ}\text{C}$. (B) XRD scattering pattern of the 45S5 pristine glass sample and comparison with crystal $\text{Ca}_3\text{Na}_2\text{Si}_3\text{O}_{10}$

(ICSD database, code 36399). (C and D) The $G(r)$ and $RDF(r)$ functions for the 45S5 pristine glass sample and its comparison with the crystal values. (E) Deconvolution of first peaks of $RDF(R)$.

3.2 Cell behavior

Two days after being extracted from adipose tissue, hMSCs exhibited an elongated fusiform morphology (fibroblast-like), self-renewal potential, and plastic adherence, as can be observed in the established culture of the viability assay control (Fig. 2A). Their multipotency was demonstrated by incubating the cells in media capable of promoting their bidifferentiation (see Supplementary Data). This was demonstrated by Alcian blue staining which indicated a synthesis of proteoglycans by the chondrocytes (Supplemental Fig. 1A). The hMSCs also differentiated into adipocytes, as evidenced by the presence of intracellular lipid droplets (Supplemental Fig. 1B). The analysis of the phenotype, by flow cytometry, showed that these cells expressed CD44 and CD105 proteins, and were negative for the hematopoietic markers CD14, CD34, and CD45 (Supplemental Fig. 1E). The immunophenotype profile and differentiation potential obtained are consistent with recent guidelines for the characterization of hMSCs [26]. After confirming their identity, we expanded the MSC cultures to use them in the next experiments.



Supplemental Figure 1. Morphological features and characterization of human adipose-derived MSCs. The cells had a spindle-shape, such as a fibroblast morphology, and demonstrated plastic adherent properties in culture. Cells underwent differentiation in (A) chondrocytes stained by Alcian blue; (C) negative control, which received only the standard culture medium at the same time as those induced; (B) adipocytes showing some lipid vesicles stained by Oil red; and (D) corresponding negative control. (E) Cell count histograms show that these cells were homogeneously positive for mesenchymal markers: CD44, and CD105; but negative for hematopoietic markers: CD14, CD34, and CD45.

3.2.1 Indirect cytotoxicity

Observed by phase-contrast microscopy, the hMSCs did not show significant changes neither in the morphology, nor in the cell monolayer confluence, after being exposed to 45S5 dissolutions (Fig. 2A). In addition, the hMSCs cultures exposed to 45S5 extracts presented a similar viability when compared with the negative control (DMEM 10% FBS), as can be seen in Fig. 2B. No cytotoxicity was observed at 24 and 72 h. However, when comparing the viability of the cells treated with concentrations of 1% stratum with those treated with 100%, there was a statistical difference ($p<0.05$) in 72 h, showing a dose-dependent response to 45S5 degradation products for this parameter.

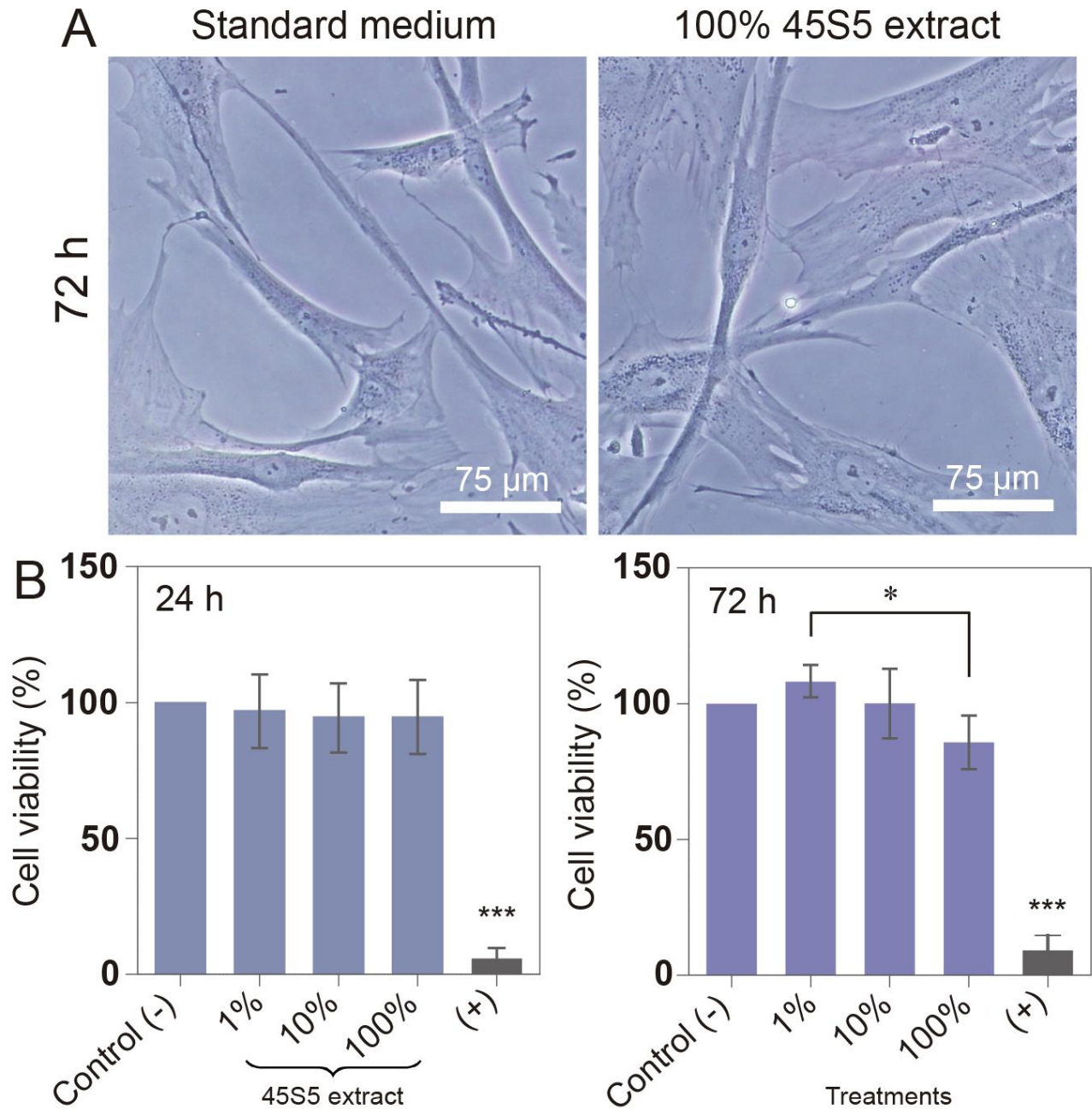


Figure 2. Indirect cytotoxicity of the 45S5 scaffolds. (A) The MSCs showed no alteration in their shape after their treatment with bioglass dissolutions when compared to control cultures for 72 h. The graphics (B) demonstrate the maintenance of fibroblast viability with no statistical difference when compared to the negative control in 24 and 72 h. At this later time, the 1% extract concentration revealed a difference $*(p<0.05)$ of cell viability in contrast to the 100% 45S5 extract.

Cell culture with standard supplemented culture medium was used as a negative control, and a culture with 1% (v/v) Triton X-100 in PBS served as a positive control of toxicity.

3.2.2 Osteogenic performance

After osteogenic induction, MSCs differentiated in osteoblastic cells as evidenced by Ca^{2+} nodules (red) in Fig. 3A. 45S5 extract could differentiate an area of $46.9 \pm 31.1\%$ of hMSCs monolayer after 20 days of culture, assuming the standard osteogenic medium as a 100% of differentiation (Fig. 3B). Cultures under DMEM 10% FBS presented a background of $11.8 \pm 6.4\%$. F-actin cytoskeleton (green) reorganization leads to more peripheral bundles, making the cell body more spherical. However, typical hMSCs with a homogenous distribution of F-actin and fibroblast-like shape were still observed across both cultures that undertaken induction (Fig. 3C).

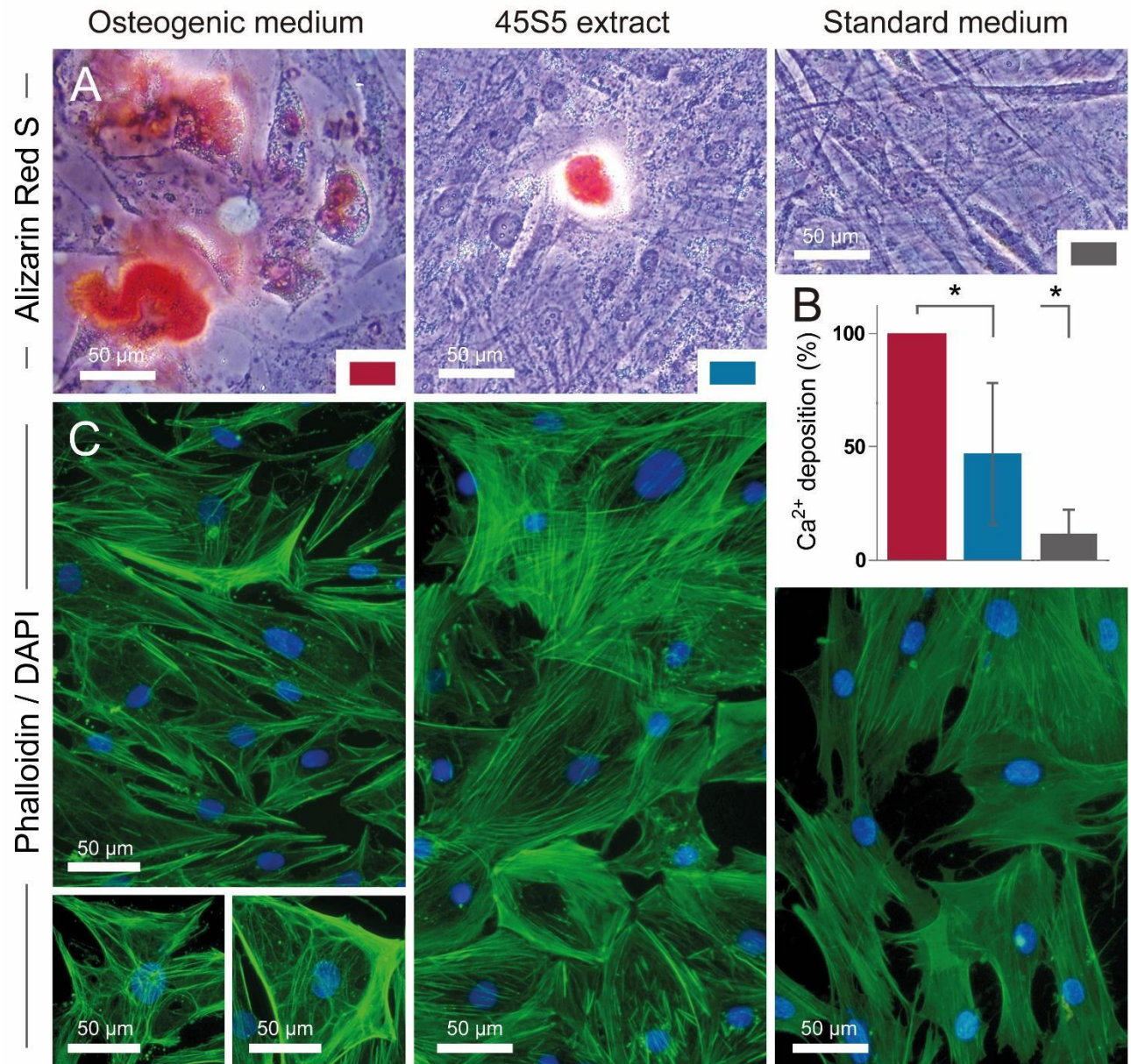


Figure 3. Osteoinduction on hMSCs. (A) Alizarin red staining revealed calcified nodule formations after 20 days of treatment with the osteogenic differentiation (control), the 45S5 extract (in standard medium for 24h, ratio 0.2 g/mL), and with the standard culture (DMEM 10% FBS) media. (B) Graph shows that 45S5 dissolution can induce $46.9 \pm 31\%$ of the culture (% area of control) to produce a Ca^{2+} matrix. (C) Fluorescence micrographs of both treatments reveal the actin cytoskeleton reorganization. hMSCs could change their phenotype to near spherical morphology,

presenting few thick F-actin bundles located at the periphery. Some cells were still presenting fibroblast-like shapes similar to undifferentiated MSCs, with parallel filament bundles extending across the entire cell body.

3.3 Cell-scaffold patterns

Subsequently cultured in contact, both cell and material patterns were evaluated by optical light, fluorescent and SEM microscopies. The 45S5 showed to be well tolerated by the hMSCs as a substrate, causing little or no modulation in their cell architecture.

The hMSCs presented cytoplasmic anchoring extensions along the material without signs of cellular alterations. SEM images (Fig. 4) shows 45S5 substrates populated by hMSCs for 48 h. Cells appeared to interact well with the surface, and a considerable deposition of calcium phosphate was observable. A juxtaposed cellular growth can be seen in the Fig. 4B. The EDS analysis of the elemental composition of the cauliflower-like structures deposited on 45S5 after 48 h of cell culture, showed the presence of 24.61% Ca, 16.42% P, 7.49% C, 49.18% O and 2.30% Na. The mMSC colonies demonstrated a tight adherence for up to 3 months while maintaining their elongated fibroblastic morphology.

In addition, it is possible to observe in the Fig. 4 the presence of cracks. We observed that they are only in the bioglass surface, considering that samples on which cells were grown for three months *in vitro* were slightly submitted to SiC abrasive paper (to #1200) and polished with CeO₂ slurry, the cracks disappeared (data not shown). These cracks are probably caused by the bioactivity, when the bioglass stayed in contact with physiological means.

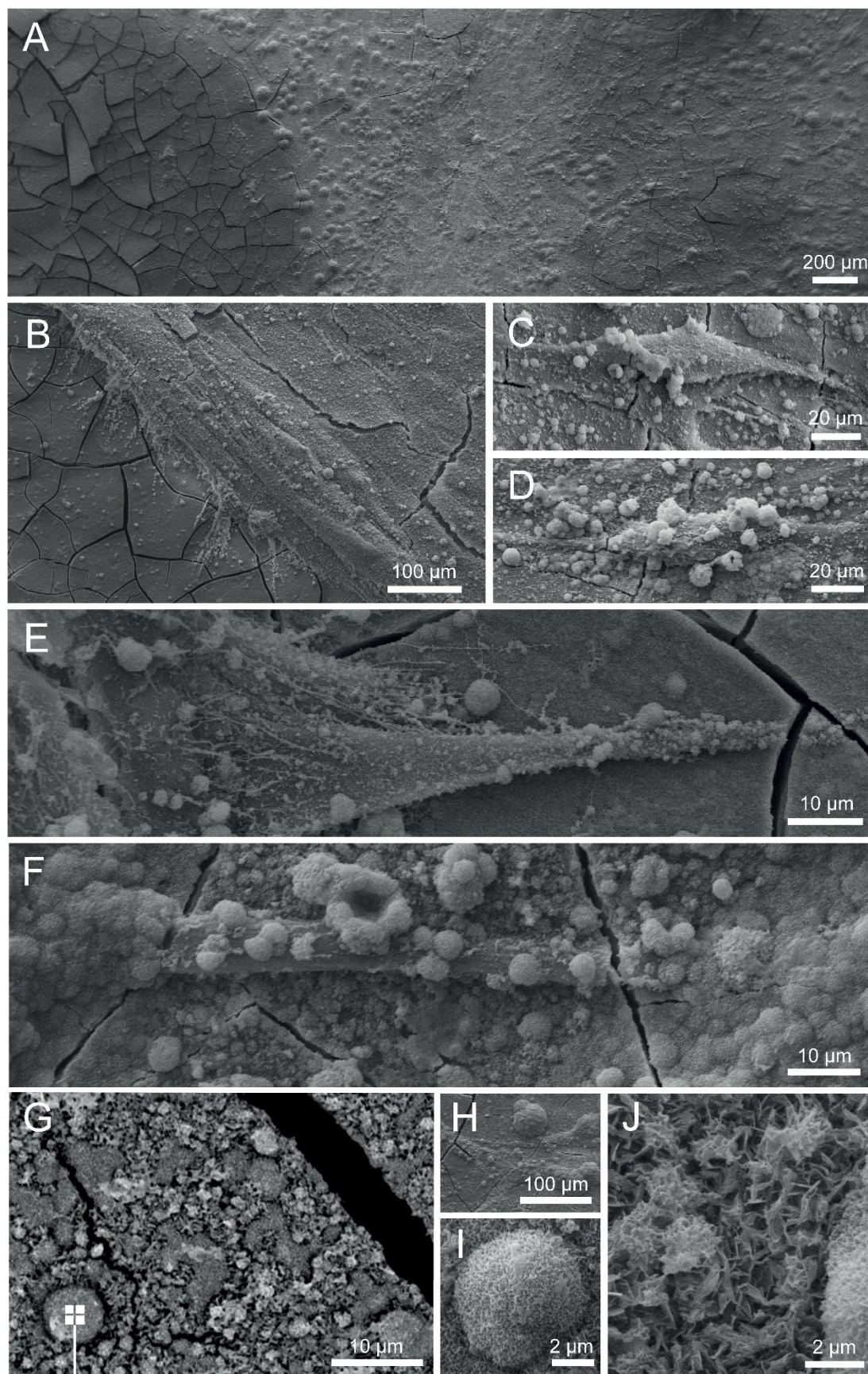


Figure 4. Scans of electron microscopy (SEM) examination. The images present the 45S5 substrate populated by a (A) low density of MSCs after 48 h of *in vitro* culture. Cells seem to have interacted well despite the presence of a high bioactivity on the material surface. (B) A juxtaposed cellular growth was also observed. MSCs could maintain their fibroblast-like shape even when covered by depositions of spherical features (C- F). The energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) shows the elemental character of the cauliflowers formations (G-J), composed mainly of HA (hydroxyapatite) crystallites.

Fluorescence images (Fig. 5) demonstrate cells with a homogeneous distributions of stress fibers, as delineated by the F-actin. In spite of this characteristic, the cell morphology seems quite similar to standard cultures over plastic or glass cover slip surfaces. Interestingly, the cell-cultured 45S5 showed improved mechanical stability ($p<0.001$), after 30 days remaining *in vitro*, when compared to the 45S5 alone. Both are seen in the graphic along with their weight loss indices (Fig. 5E).

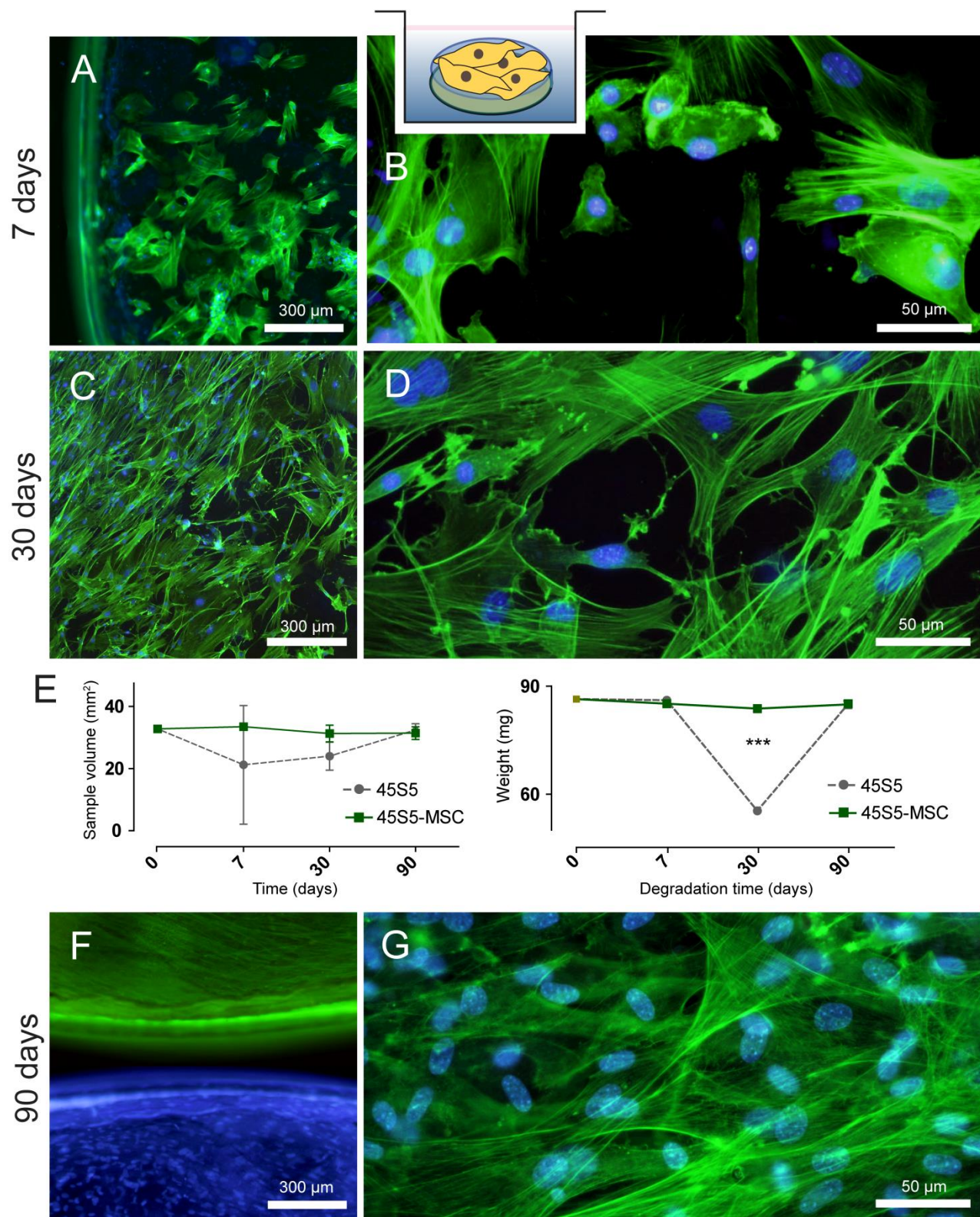


Figure 5. Cell-scaffold modulation. Fluorescence micrographs show both the F-actin cytoskeleton (green) and nuclei (blue) of the MSCs. After 7 days of culture (A-B), cells presented dorsal and ventral stress fibers all along their cell body, anchoring consistently their focal adhesions. This was also observed after 30 days (C-D) of culture in a 37°C-incubator with 5% CO₂. Growing on 45S5 dense scaffolds, the MSCs could maintain their fibroblastic morphology for up to 90 days (F-G) without presenting significant morphological changes. The cell monolayer could cover all sample at this later time, showing high confluence. The degradation rate of the material was monitored by gravimetric analysis for up to 3 months. The graphs (E) show the change in volume of the scaffold under in vitro conditions, colonized or not by MSCs. The uncolonized 45S5 significantly ($***p<0.001$) lost its weight in 30 days, compared to a more linear weight loss when it was sown by cells.

3.3.1 Cell spreading

The spreading rate of hMSCs was determined after initial surface contact, through the observation of the cell F-actin cytoskeleton. The area engaged by the cell body during its adhesion on 45S5 was significantly smaller when compared to that of cells seeded by a traditional method under glass (cover slips). The hMSCs exhibited a more homogenous size and a significant decrease ($p<0.01$ or $p<0.001$) of their visible cell surface during all times of adhesion, as shown in graphics attached (Fig. 6A). No difference was observed in the F-actin organization between these experimental groups.

3.3.2 Nuclear Morphometric Analysis (NMA)

We also analyzed the cell nucleus morphology as a complementary parameter to characterize hMSCs on 45S5. The scaffold was able to increase ($p<0.001$) the number of irregular nuclei to $18.6 \pm 0.3\%$ at 48 h of colonization, while the standard culture on glass coverslips exhibited $5.6 \pm 1.3\%$

of irregular nuclei at that same time (Fig. 6B). No significant amounts of large and small nuclei were found on both samples.

ACCEPTED MANUSCRIPT

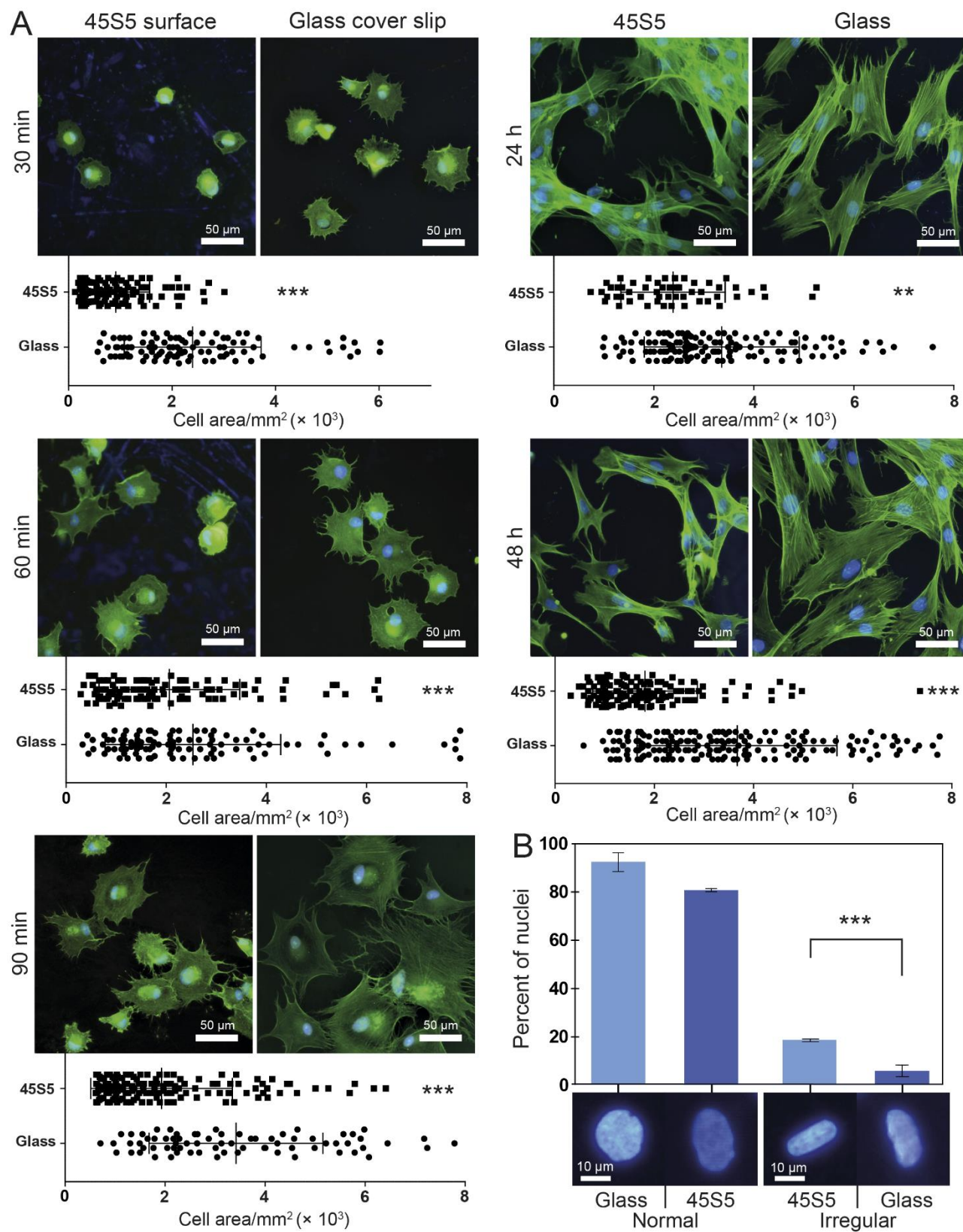


Figure 6. MSC spreading during adhesion on 45S5 scaffold and nuclei morphometry. (A) The conformity of the MSC F-actin cytoskeleton was observed from 30 min up to 48 h, starting from the sowing of the cells on 45S5 samples. The total visible area (μm^2) of the cells was compared to those attached on glass coverslips (B). MSCs demonstrated a larger body shape when on coverslips, with significant differences ($**p<0.01$ or $***p<0.001$) at all times of adhesion. (B) Nucleus morphometric analysis (NMA). MSCs placed on 45S5 substrate exhibited an increase ($p<0.001$) of irregular nuclei at that same time, when the values are compared with standard culture on coverslips. Small (apoptotic) and large (senescent) nuclei were not observed, an indicative of cell maintenance of viability.

3.4 Biocompatibility analysis of subcutaneous grafting on mice

Grafts implanted for 7, 30 or 90 days showed no signs of systemic or local toxicity. The incised and sutured skin of the sham group demonstrated similar wound healing patterns than those of the grafted animals. No suppuration or change in animal behavior was identified during the experimental timeline. At 7 days, the grafts showed little adherence to the mouse skin. Under fluorescence microscopy, the 45S5 discs presented a high presence of cells with lymphocyte-like shape (Fig. 7A), giant cells (Fig. 7C), and some fibroblastic cells (Fig. 7B) integrated the formation of a semi-transparent membrane that had begun surrounding the implant (Fig. 7D). This membrane became more evident over time. After 1 month, a moderate or light inflammatory reaction was observed signaling a continuous attempt at remodeling the graft (Fig. 7E). At this period, a capsule covered the entire graft (Fig. 7F and I) and presented what appears to be a network of vessels, after the staining process of the F-actin (Fig. 7G and H). The 3-month implants were encased in a thicker capsule that showed a defined cell layer around them and substantial vascularization (Fig. 7J-M).

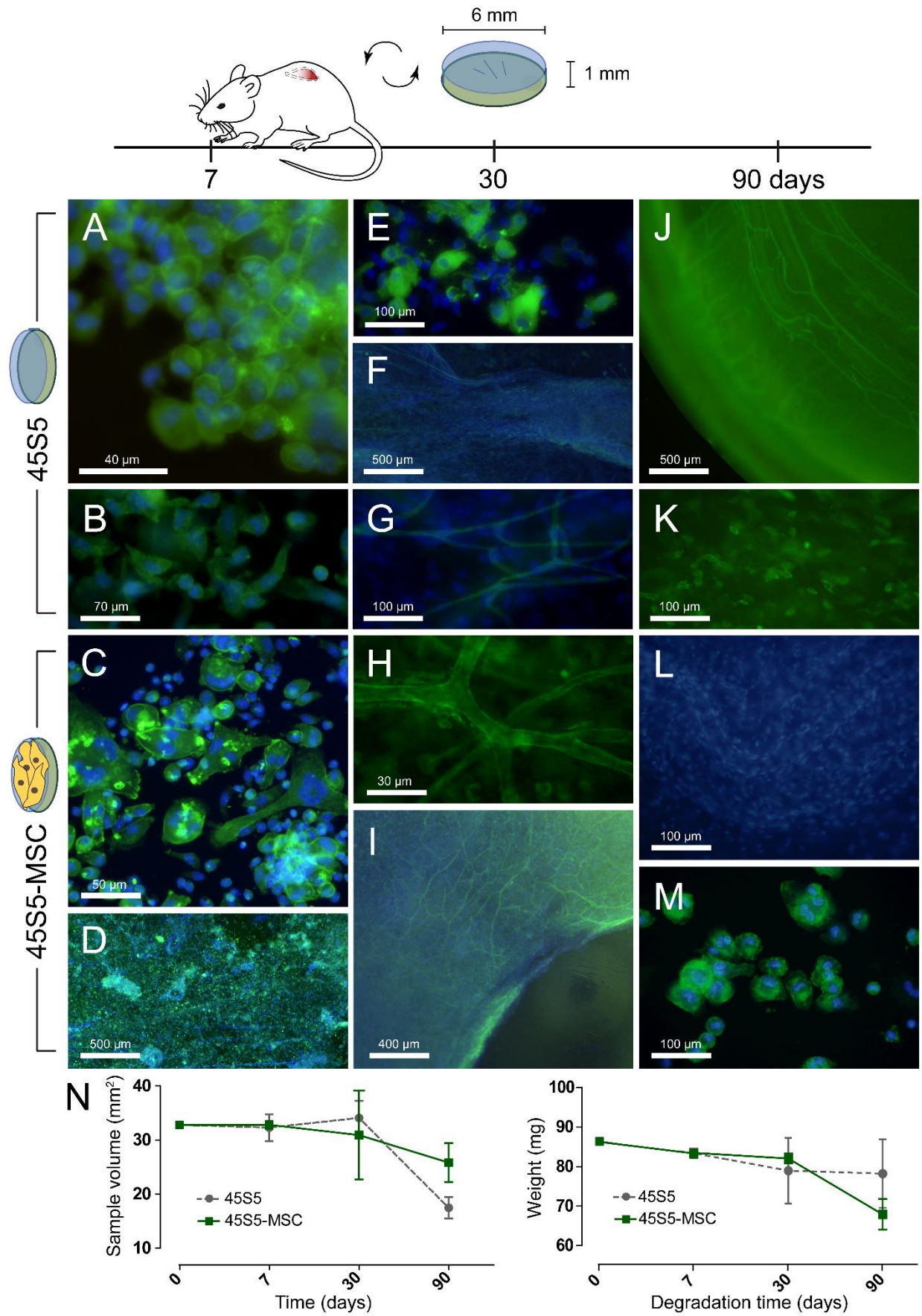


Figure 7. Explanted 45S5 grafts analyses. 45S5 scaffolds were placed, with and without mMSCs, in the subcutaneous space of mice. They were removed after 7, 30 or 90 days. (A-M) The images show the F-actin cytoskeleton (green) and nuclei (blue). After one week, the F-actin labeling presented a high presence of inflammatory cells and some fibroblastic cells, amidst the formation of the cellular matrix on 45S5 discs. After 1 month, a moderate inflammatory reaction was observed under a well-defined capsule that had begun surrounding the graft. Under fluorescence microscopy, it was possible to demark a network of vessels feeding the membrane. The 3-month implants were encased in a consistent capsule highly vascularized. (N) Representative graphics showing both the volume and weight of the 45S5 samples, defining the degradation rate at the three experimental points. No difference was detected between the graphs with MSCs previously attached and those without.

In addition, no differences were detected when comparing the capsule formation around graphs with mMSCs and those without cells (Fig. 8).

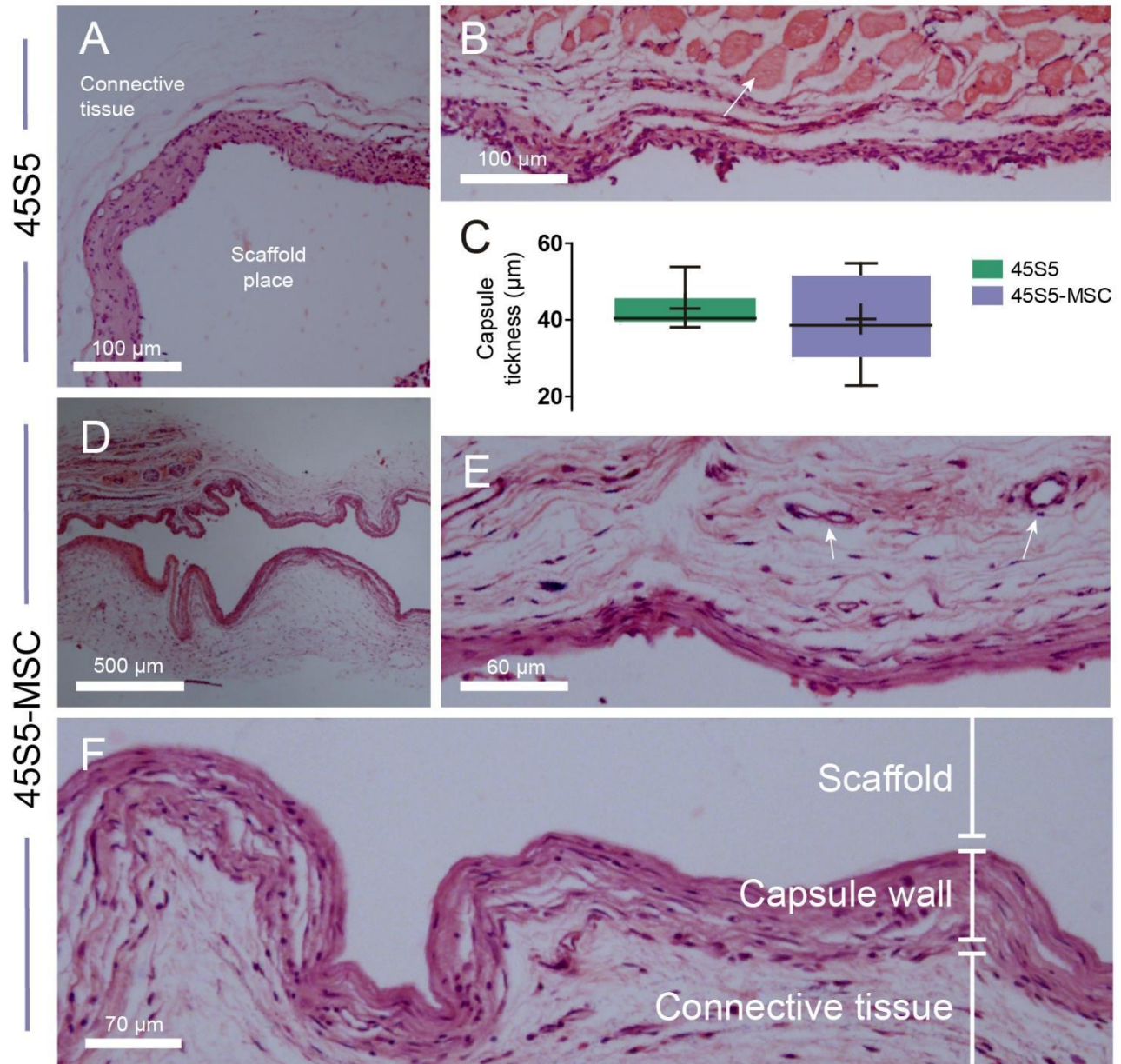


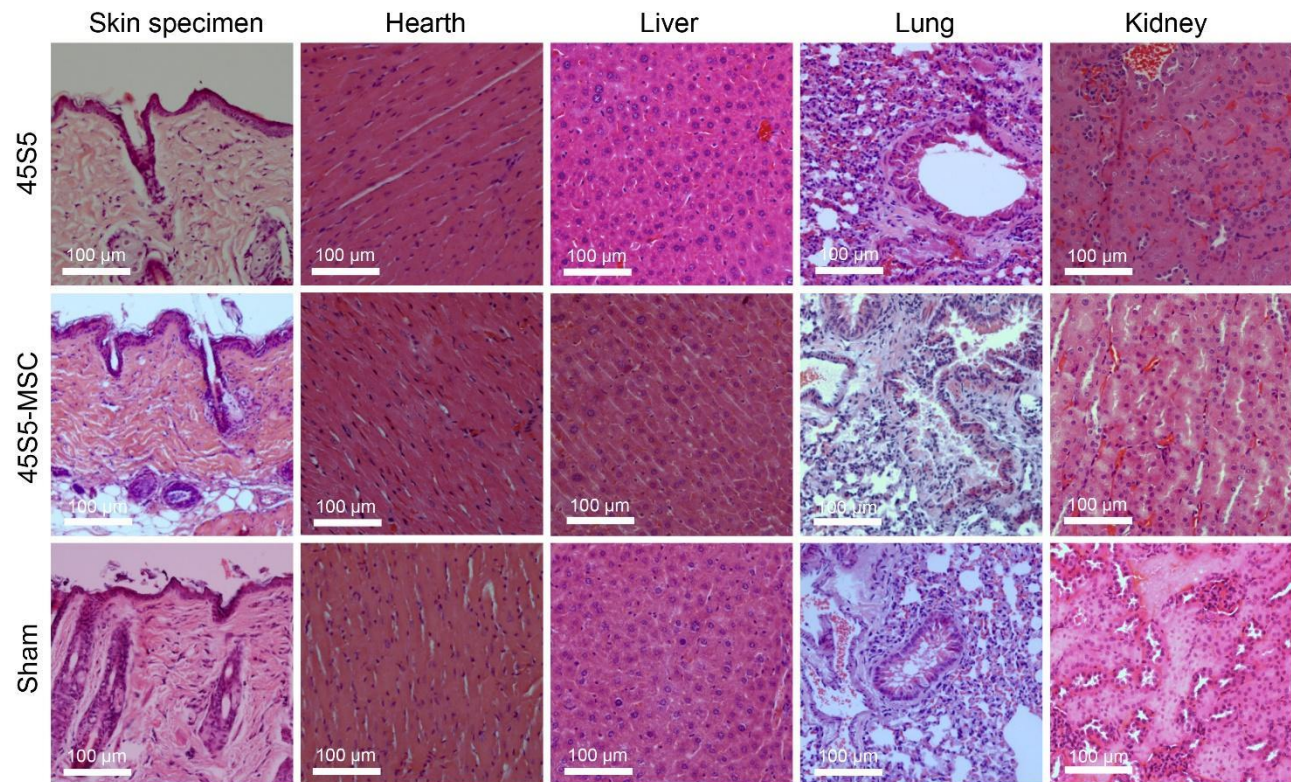
Figure 8. Histological patterns of the graft cover. The 3-months 45S5 explants exhibited a well-formed membrane. (A) H&E labeling micrographs show a defined layer of fibroblastic cells assembled into a compact matrix, forming a capsule. (B) A proximity with the skeletal muscular layer (white arrows point to the panniculus carnosus, the last layer of mouse hypodermis) was observed in some points. In the others (D, E and F), a tick connective tissue was formed, probably to feed (white arrows show blood vessels) and anchor the first compact layer, between the graft and the

subcutaneous space. (C) No difference was observed in the capsule thickness between 45S5 samples implanted with cells and those without, as shown by the graphic.

No alterations were discovered in the organs of the animals that accommodated the graft for 3 months, in comparison with Sham group, as evaluated by both gravimetric (listed in Table 1) and histological analysis (Supplemental Fig. 2).

Table 1. Animal histological parameters after a 90-day graft implantation.

Study groups	No.	Total weight (g)	Liver (g)	Kidney (mg)	Lung (mg)	Hearth (mg)	Capsule (μm)
Sham	2	29 ± 1.4	1.503 ± 0.1	245.8 ± 25.8	72.95 ± 14.9	163.8 ± 3.1	-
45S5- MSC	4	31.5 ± 2.6	1.408 ± 0.3	274.05 ± 34	79.5 ± 9.6	192.1 ± 19.7	39.86 ± 11.50
45S5	2	33.5 ± 0.7	1.560 ± 0.08	310.35 ± 25.8	96.35 ± 26.3	179.8 ± 13.2	38.15 ± 3.6
The morphometry between the experimental groups did not show any statistical difference among them.							



Supplemental Figure 2. Histopathology of murine biopsied organs. Tissues were harvested from the mouse skin, heart, liver, lung and kidney. Together, H&E staining and optical microscopy did not reveal any alterations in the major organs of grafted animals, in comparison with those of the Sham group.

4 Discussion

Bioactive glasses have not yet reached their full potential in regenerative therapies. Meanwhile, MSCs are being heavily targeted to compose biomaterials due their undifferentiated character, and their ability to produce a secretome capable to modulate adjacent tissues [2, 27, 28]. In this paper, we investigated new physical aspects of the current state of the art of Larry Hench's 45S5 bioglass, considering it as a gold standard from bioactive materials [29, 30]. Their modulation was assessed in physiological environments with adipose-derived MSCs, as they are great candidates for

concomitant use in tissue engineering designs. In addition, a structural investigation was performed on the glass to obtain their local structure in an attempt to understand the mechanisms that interact with the tissue or its degradation.

When we exposed the samples of 45S5 to x-ray diffraction, they demonstrated an amorphous nature, as expected. The elementary transition temperatures were also determined through DTA assay. The identification of glass transition and crystallization temperatures allowed us to control and optimize the mechanical, thermal and optical properties of the 45S5 by concentrating the crystals formed in the glass matrix [31, 32]. However, the physical properties of amorphous glasses are strongly dependent on the arrangement of their first neighbors. The determination of their local atomic structures is a difficult task that can be overcome by the combination of different diffraction and spectroscopic techniques, as simulation and modeling [33]. In the case of 45S5, Tilocca *et al.* summarized in a review paper the contributions of authors working on molecular dynamics simulations (MD), regarding the structure of bioactive glasses. The authors concluded that important correlations had already been identified between bulk structural features and the glass performance in biological applications [34]. In this sense, the physical determination by crystallography methods represents an important contribution to the knowledge related to the arrangement of material's local atoms. A sought-after feature of material grafts is that they can support the region until the regeneration occurs. From there, a gradual degradation in the tissue replacement rhythm is expected [35].

Since MSCs exist in all postnatal tissues, we chose those residing in the adipose-tissue, as it is a more accessible source than the others and requires an extraction less intrusive from the patient [8, 9]. Although these cells of different organs have similar regenerative capacities, it is reported that adipose-derived MSCs preserve their anti-inflammatory potential even when collected from an

osteoporotic organism, unlike bone-marrow derived MSCs [36]. Furthermore, the fat tissue provides a higher number of MSCs after isolation, enabling a faster cultivation and expansion [28].

The toxicity of biodegradable scaffolds is mainly attributed to the release of their degradation products, able to stimulate or inhibit metabolic activities in the cells [37-39]. As the first step of the biocompatibility evaluation, the hMSCs were exposed to 45S5 to check for any cytotoxicity. For that, the 45S5 conditioned the cell culture medium for 24 h, forming an extract which was applied on hMSCs. During the extract confection, neither the presence of bacterial contamination nor any visible modification in the medium color was observed. The hMSCs submitted to the 45S5 extract did not undergo any significant change in their viability at 24 and 72 h of exposition. According to ISO 10993-5, a reduction in cell viability by more than 30% is worrisome and considered a cytotoxic effect [20].

Although several studies are reporting that 45S5 can increase quickly the pH of its environment, we observed a tiny increase in pH of our extract after 24 h of immersion (data not shown) [12, 40, 41]. The increase in pH values is associated to the fast release of Na^+ and Ca^{2+} ions through their exchange with H^+ or H_3O^+ ions when bioactive glasses are placed in physiological environments [42]. After 72 h, the hMSCs demonstrated a higher viability ($p < 0.05$) when receiving 1% of the dissolution, compared to those receiving 100%. Some groups are suggesting that MSCs growth can be stimulated by 45S5 [1, 29]. Nonetheless, works reported that high Ca^{2+} concentrations above 10 mmol are cytotoxic to osteoblasts, but those below 8 mmol can promote cell proliferation [4]. This shows us that a dose-response curve analysis may be important to define the equilibrium of the environment in which the bioglass is grafted.

Here, hMSCs culturing in 45S5 extract presented only half calcified matrix area, in comparison with a standard medium for osteogenesis. In addition to Ca^{2+} production, some changes can be observed

still in terms of a dynamic reorganization of the F-actin cytoskeletal network. The F-actin can be disrupted and subjected to repolymerization during MSCs differentiation. Under osteogenesis, cells could modulate their parallel thin filaments into disordered, forming more robust and thick fibers. Surprisingly, this change did not occur when cells were growing with a direct contact on 45S5 surface.

Cell-scaffold visualization by optical microscopy becomes quite difficult, due to a semi-transparency caused by the depositions. On the contrary, fluorescence and SEM microscopies were a great alternative to assess its patterns. The SEM images reiterated the good compatibility of the hMSCs. After 48 h, an amorphous calcium phosphate layer was formed on the 45S5 surface. A crystallization of HA was more apparent at the sown areas. A cauliflower was characterized by EDS showing the typical elements of HA crystals [43]. HA is the main component of the inorganic bone matrix, and it is naturally formed through 45S5 bioactivity [44]. Feng P *et al.* developed three phase scaffolds for bone reconstruction thought blending the biodegradable poly(L-lactide) (PLLA) with the undegradable Polyetheretherketone, which presents an excellent mechanical strength, plus the bioceramic β -tricalcium phosphate (β -TCP) powders. In this case, the degradation of PLLA exhibited a lot of caverns formed on the membrane. The wrapped β -TCP exposed from the membrane and the exchange ions with the physiological environment resulting in a layer of apatite deposited on the scaffold surface, and the scaffolds displayed good bioactivity [5]. However, the interactions between precursor cells, such as MSCs, with the high activity of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ -based surfaces need further investigation to achieve technological implants.

The actin network plays an important role in the determination of the mechanical properties of cells, defining their tight adherence and migration [45, 46]. The mMSCs cytoskeleton was monitored for up to 3 months *in vitro*, remaining stable on the 45S5. Here, they presented typical elongated cell

shapes and maintained an undifferentiated conjuncture throughout all period attached on 45S5 surface. Their dorsal and ventral stress fibers remained typical of unspecialized cells [47], in contrast to the osteoinduction assay performed with hMSCs for 20 days [48].

Initially, when seeded on 45S5 samples, hMSCs adhered by practically the same mode as those seeded on glass coverslips. During adhesion, cells presented a smaller visible area of their shape compared to the control, and showed lower rates of spreading from 30 min to 48 h of follow-up. The rugged 45S5 topography may be responsible for this difference. Despite 45S5 having no pores, the cells can find a depth of growth that is not possible on standard cover slips. The cell attachment occurs during a series of chemical reactions on the surface, inherent to 45S5 bioactivity, leading to variabilities in focal adhesions features of the MSCs [49].

Morphological differences were still found at a nuclear level. The NMA assay showed a significant increase of irregular nuclei in the hMSCs seeded on the 45S5, after 48 h. It was probably caused by the rocky topography, showing a high deposition of HA crystals at this period [50]. The increased number of irregular nuclei in a cell population is well related to an active migratory movement [51].

To assess an *in vivo* response to the 45S5-MSC composition, it was grafted subcutaneously in a murine model. Macroscopic examination of the explants after 30 days revealed a fragile and vascularized membrane surrounding it. 90-day grafts still presented a cylinder-like shape, but it was covered by dense capsule measuring about 55 μm of thickness. There was a compact layer of both fibroblastic cells and cellular matrix connected to the host by a connective tissue that was highly vascularized. It is related that the dissolution of the 45S5 can provide a better vascularization of the surrounded area, improving the healing conditions [13, 30]. Following the biopsy, the capsule showed much more adhesiveness to the subcutaneous space than to the material.

In short, despite that the 45S5 bioactivity has recently been appreciated to extend interactions with soft tissues, we observed an inflammatory foreign body response leading to the deposition of a well-formed capsule. The fact that the body responds to prosthetic devices with a capsular contracture is still a complication for implants [35]. The 45S5 help softening the tissue reaction around grafts, while the MSCs can regulate their environment with a high immunoregulatory response. But, in our experimental context, a previous colonization with allogeneous MSCs did not help either decrease the formation of the capsule, or presented significant difference in any parameter *in vivo*. On the other side, the subcutaneous model did not present any disturbance, which is an essential indicative of safety to allow its clinical.

Biodegradable devices are commonly degraded into products that can be eliminated from the body or utilized metabolically [52]. One of the determinant factors for successful bioengineering is to achieve appropriate cell compatibility while the graft is degraded to allow a functional tissue replacement [53]. Under gravimetric analysis, the 45S5 samples demonstrated an improved weight loss *in vitro* after 30 days, in comparison to when it is covered by mMSCs. These phenomena could be attributed to a collagen coating, secreted by MSCs on the 45S5 surface [54]. It is well hypothesized that the cell attachment, followed by extracellular matrix deposition, may play an important role in both degradation and mechanical strengths of the scaffolds [55]. An inorganic layer formation is well expected in the present bioactive glass–ceramic material, but its interface with structural proteins could deliver a new environment more favorable for a series of cell processes, such migration and chemical communication [56]. Furthermore, the low degradation rate of some of its materials makes it preferable for orthopedic features [57, 58]. Despite its current medical applications, the mechanisms responsible for the osteogenesis and vascularization of bioactive glasses have yet to be fully understood.

5 Conclusion

Although glass have been used in the field of bone reconstruction, there are still critical points to be understood about their bioactivity. In the present work, we physically characterized 45S5 before its exposition to hMSCs, and followed with biocompatibility analysis *in vitro* and *in vivo*. We demonstrated that 45S5 dissolutions besides causing a level of osteoinduction, may be safe to MSCs, although in a dose-dependent way. The visualization of the F-actin was crucial to understand the cell anchoring in the 45S5 substrate and its suitable integration. Unpredictably, MSCs could grow attached on 45S5 up for 90 days, still exhibiting cytoskeleton patterns as well as undifferentiated cells. When grafted subcutaneously, the foreign body reaction only occurred around the implanted scaffold samples, leading to a capsule formation. Around this compacted membrane, a high vascularization was found inside the connective tissue. Despite the local reactive tissue, the remaining compatibility results can assure the safety of its use for MSCs transplantation. However, both mechanical and biological properties must be improved so that they can result in a functional transplantable tissue.

Founding

Cristiano Rodrigues, Jéssica Gonçalves Azevedo, Liliana Ivet Sous Naasani and Thaís Casagrande Paim are recipients of fellowships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Carla Zanatelli is recipient of a Technological Initiation fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Márcia Rosângela Wink is recipient of a research productivity fellowship from the Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work was supported by CAPES-PROCAD (158819); FAPERGS/MS/CNPq/SESRS n. 03/2017 – PPSUS (17/2551-0001) and CNPq MS-SCTIE-Decit/CNPq nº 12/2018 (441575/2018-8). This work has been partially supported by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) [XRD1-17775].

Acknowledgements

The authors would like to thank Giuliano Rizzotto Guimarães, Terezinha Stein, Dr. Rosalva Thereza Meurer (Laboratório de Pesquisa em Patologia, UFCSPA), and MSc. Raquel Wigg Cunha (Centro de Microscopia e Microanálise, UFRGS) for an excellent technical support. The authors also gratefully acknowledge both veterinary physicians MSc. Joana Fisch and Dr. Fernanda Bastos de Mello for their assistance in the UFCSPA animal facility.

Disclosure of interest: The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- [1] I.A. Silver, M. Erecinska. Interactions of Osteoblastic and Other Cells with Bioactive Glasses and Silica In Vitro and In Vivo. *Mat Sci Eng tech*, 34 (2003) 1069-1075. doi: 10.1002/mawe.200300710.
- [2] C. Rodrigues, A.M. de Assis, D.J. Moura, G. Halmenschlager, J. Saffi, L.L. Xavier, C. Fernandes Mda, M.R. Wink. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. *PLoS One*, 9 (2014) e96241. doi: 10.1371/journal.pone.0096241.

- [3] V. Sansone, D. Pagani, M. Melato. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review. *Clin Cases Miner Bone Metab*, 10 (2013) 34-40. doi: 10.11138/ccmbm/2013.10.1.034.
- [4] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, J. Tanaka. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials*, 26 (2005) 4847-4855. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.01.006.
- [5] P. Feng, P. Wu, C. Gao, Y. Yang, W. Guo, W. Yang, C. Shuai. A multimaterial scaffold with tunable properties: toward bone tissue repair. *Adv Sci (Weinh)*, 5 (2018) 1700817. doi: 10.1002/advs.201700817.
- [6] M. Kouhi, M. Fathi, M.P. Prabhakaran, M. Shamanian, S. Ramakrishna. Poly L Lysine-modified PHBV based nanofibrous scaffolds for bone cell mineralization and osteogenic differentiation. *Appl Surf Sci*, 457 (2018) 616-625. doi: 10.1016/j.apsusc.2018.06.239.
- [7] W.G. C. Shuai, P. Wu, W. Yang, S. Hu, Y. Xia, P. Feng. A graphene oxide-Ag co-dispersing nanosystem: dual synergistic effects on antibacterial activities and mechanical properties of polymer scaffolds. *Chem Eng J* 347 (2018) 322-333. doi: 10.1016/j.cej.2018.04.092.
- [8] L. da Silva Meirelles, P.C. Chagastelles, N.B. Nardi. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119 (2006) 2204-2213. doi: 10.1242/jcs.02932.
- [9] S. Maxson, E.A. Lopez, D. Yoo, A. Danilkovitch-Miagkova, M.A. Leroux. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*, 1 (2012) 142-149. doi: 10.5966/sctm.2011-0018.
- [10] L.I.S. Naasani, C. Rodrigues, R.P. de Campos, L.R. Beckenkamp, I.C. Iser, A.P.S. Bertoni, M.R. Wink. Extracellular Nucleotide Hydrolysis in Dermal and Limbal Mesenchymal Stem Cells: A Source of Adenosine Production. *J. Cell. Biochem*, 118 (2017) 2430–2442. doi:10.1002/jcb.25909.
- [11] L.L. Hench. The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*, 17 (2006) 967-978. doi: 10.1007/s10856-006-0432-z.
- [12] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27 (2006) 2414-2425. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.025.
- [13] V. Miguez-Pacheco, D. Greenspan, L.L. Hench, A.R. Boccaccini. Bioactive glasses in soft tissue repair. *Am Ceram Soc Bull*, 94 (2015) 27-31.

- [14] J.C. de Lima, Z.V. Borges, C.M. Poffo, S.M. Souza, D.M. Trichês, R.S. de Biasi. Approach combining the Rietveld method and pairs distribution function analysis to study crystalline materials under high-pressure and/or temperature: Application to rhombohedral Bi₂Te₃ phase. arXiv e-prints. (2018).
- [15] S. Buchner, A. Pereira, J. de Lima, N. Balzaretti. X-ray study of lithium disilicate glass: High pressure densification and polyamorphism. *J Non-Cryst Solids* (2014). doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2014.01.003.
- [16] Y. Shimada, M. Okuno, Y. Syono, M. Kikuchi, K. Fukuoka, N. Ishizawa. An X-ray diffraction study of shock-wave-densified SiO₂ glasses. *Phys and Chem Min*, 29 (2002) 233-239. doi: 10.1007/s00269-001-0235-1.
- [17] V. Miguez-Pacheco, L.L. Hench, A.R. Boccaccini. Bioactive glasses beyond bone and teeth: emerging applications in contact with soft tissues. *Acta Biomater*, 13 (2015) 1-15. doi: 10.1016/j.actbio.2014.11.004.
- [18] T.E. Faber, J.M. Ziman. A theory of the electrical properties of liquid metals. *J. Exp. Theor. Phys*, 11 (1965) 153-173. doi: 10.1080/14786436508211931.
- [19] M. Stoddart. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. Meth Mol Biol, (2011). doi: 10.1007/978-1-61779-108-6.
- [20] ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization of Standardization, pp. 34 (2009). doi: 10.5594/J09750.
- [21] E.C. Filippi-Chiela, M.M. Oliveira, B. Jurkovski, S.M. Callegari-Jacques, V.D. da Silva, G. Lenz. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. *PLoS One*, 7 (2012) e42522. doi: 10.1371/journal.pone.0042522.
- [22] *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*: 8th Ed.in, National Academies Press (US) (2011). doi: 10.2307/1525495.
- [23] I.C. Iser, P.A. Bracco, C.E. Goncalves, R.F. Zanin, N.B. Nardi, G. Lenz, A.M. Battastini, M.R. Wink. Mesenchymal stem cells from different murine tissues have differential capacity to metabolize extracellular nucleotides. *J Cell Biochem*, 115 (2014) 1673-1682. doi: 10.1002/jcb.24830.
- [24] J.T. Mague. *Gmelin Handbook of Inorganic Chemistry, Organometallics*, (1984). doi: 10.1021/om00084a900.
- [25] H.M. Rietveld. A profile refinement method for nuclear and magnetic structures. *J. Appl. Cryst.*, (1969) 65-71. doi: 10.1107/S0021889869006558.

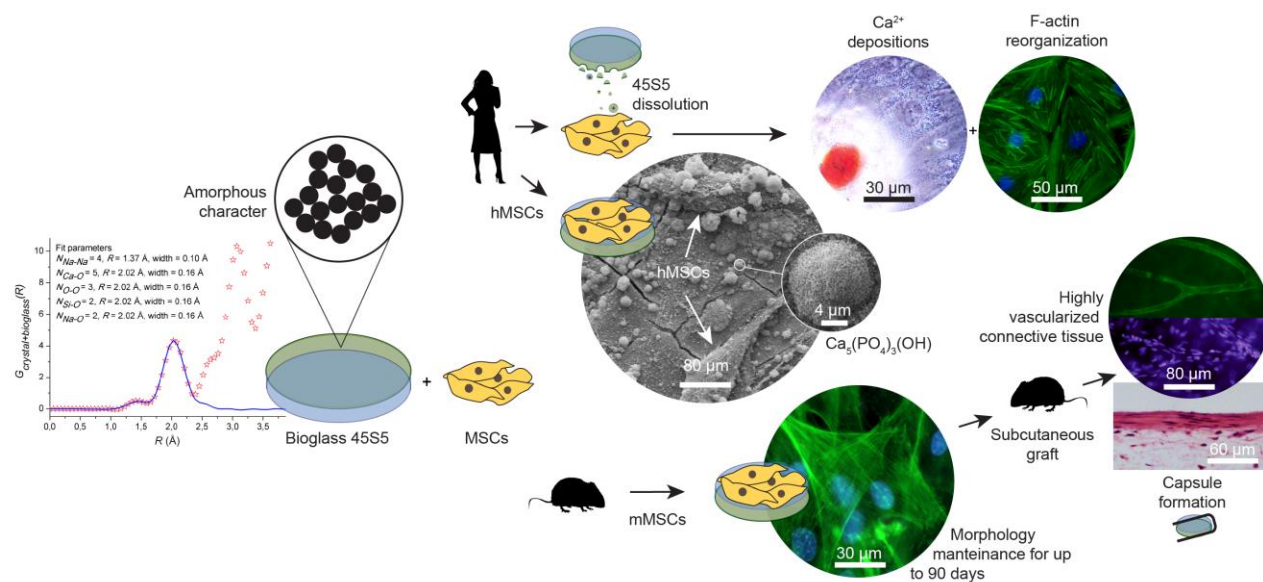
- [26] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (2006) 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- [27] S. Martino, F. D'Angelo, I. Armentano, J.M. Kenny, A. Orlacchio. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnol Adv*, 30 (2012) 338-351. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.015.
- [28] N. Kalinina, D. Kharlampieva, M. Loguinova, I. Butenko, O. Pobeguts, A. Efimenko, L. Ageeva, G. Sharonov, D. Ischenko, D. Alekseev, O. Grigorieva, V. Sysoeva, K. Rubina, V. Lazarev, V. Govorun. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*, 6 (2015) 221. doi: 10.1186/s13287-015-0209-8.
- [29] F. Westhauser, C. Weis, M. Prokscha, L.A. Bittrich, W. Li, K. Xiao, U. Kneser, H.U. Kauczor, G. Schmidmaier, A.R. Boccaccini, A. Moghaddam. Three-dimensional polymer coated 45S5-type bioactive glass scaffolds seeded with human mesenchymal stem cells show bone formation in vivo. *J Mater Sci Mater Med*, 27 (2016) 119. doi: 10.1007/s10856-016-5732-3.
- [30] M. Handel, T.R. Hammer, P. Noeaid, A.R. Boccaccini, D. Hoefer. 45S5-Bioglass((R))-based 3D-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the CAM angiogenesis assay. *Tissue Eng Part A*, 19 (2013) 2703-2712. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0707.
- [31] H. Lian, Z. Meng. Fabrication, characterization and osteoblast responses of poly (octanediol citrate)/bioglass nanofiber composites. *Mater Sci Eng C*, 84 (2018) 123-129. doi: 10.1016/j.msec.2017.11.042.
- [32] N. Cui, J. Qian, J. Wang, C. Ji, W. Xu, H. Wang. Preparation, physicochemical properties and biocompatibility of PBLG/PLGA/bioglass composite scaffolds. *Mater Sci Eng C*, 71 (2017) 118-124. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.085.
- [33] J. de Lima, T.O. Almeida, A.R. Jerônimo, S.M. Souza, C. Campos, T.A. Grandi. Reverse Monte Carlo simulations of an amorphous Cr₂₅Nb₇₅ alloy produced by mechanical alloying. *J Non-cryst Solids* (2006). doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2005.11.020.
- [34] A. Tilocca. Structure Models of Bioactive Glasses from Molecular Dynamics Simulations. *Proc. Royal Soc. A* (2009). doi: 10.1098/rspa.2008.0462.
- [35] T. Velnar, G. Bunc, R. Klobucar, L. Gradisnik. Biomaterials and host versus graft response: a short review. *Bosn J Basic Med Sci*, 16 (2016) 82-90. doi: 10.17305/bjbms.2016.525.

- [36] C.X. Zheng, B.D. Sui, N. Liu, C.H. Hu, T. He, X.Y. Zhang, P. Zhao, J. Chen, K. Xuan, Y. Jin. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic Cytoth Sci Rep, 8 (2018) 5215. doi: 10.1038/s41598-018-23098-8.
- [37] L. Tan, X. Yu, P. Wan, K. Yang. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. J Mat Sci & Tech, 29 (2013) 503-513. doi: 10.1016/j.jmst.2013.03.002.
- [38] M. Khorami, S. Hesarakhi, A. Behnamghader, H. Nazarian, S. Shahrabi. In vitro bioactivity and biocompatibility of lithium substituted 45S5 bioglass. Mat Sci Eng C, (2011). doi: 10.1016/j.msec.2011.07.011.
- [39] X. Yang, X. Liu, Y. Li, Q. Huang, W. He, R. Zhang, Q. Feng, D. Benayahu. The negative effect of silica nanoparticles on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 81 (2017) 341-348. doi: 10.1016/j.msec.2017.07.042.
- [40] M. Cerruti, D. Greenspan, K. Powers. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass 45S5. Biomaterials, 26 (2005) 1665-1674. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.009.
- [41] L. Bingel, D. Groh, N. Karpukhina, D.S. Brauer. Influence of dissolution medium pH on ion release and apatite formation of Bioglass® 45S5. Mat Lett, 143 (2015) 279-282. doi: 10.1016/j.matlet.2014.12.124.
- [42] J.R. Jones, P. Sepulveda, L.L. Hench. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. J Biomed Mater Res, 58 (2001) 720-726.
- [43] G. Stanciu, I. Sandulescu, B. Savu, S. Stanciu, K. Paraskevopoulos, X. Chatzistavrou, E. Kontonasaki, P. Koidis. Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface. J Biomed Pharm Eng (2007), 34-39.
- [44] A. Motealleh, S. Eqtesadi, A. Pajares, P. Miranda, D. Salamon, K. Castkova. Case study: Reinforcement of 45S5 bioglass robocast scaffolds by HA/PCL nanocomposite coatings. J Mech Behav Biomed Mater, 75 (2017) 114-118. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.07.012.
- [45] T.J. Mitchison, L.P. Cramer. Actin-based cell motility and cell locomotion. Cell, 84 (1996) 371-379. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81281-7.
- [46] J. Stricker, T. Falzone, M.L. Gardel. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. J Biomech, 43 (2010) 9-14. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.003.
- [47] G. Yourek, M.A. Hussain, J.J. Mao. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. ASAIO J, 53 (2007) 219-228. doi: 10.1097/MAT.0b013e31802deb2d.

- [48] P.S. Mathieu, E.G. Lobo. Cytoskeletal and focal adhesion influences on mesenchymal stem cell shape, mechanical properties, and differentiation down osteogenic, adipogenic, and chondrogenic pathways. *Tissue Eng Part B Rev*, 18 (2012) 436-444. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0014.
- [49] M.A. Wozniak, K. Modzelewska, L. Kwong, P.J. Keely. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta*, 1692 (2004) 103-119. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.04.007.
- [50] E. Rezabeigi, P.M. Wood-Adams, R.A. Drew. Synthesis of 45S5 Bioglass(R) via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process. *Mater Sci Eng C*, 40 (2014) 248-252. doi: 10.1016/j.msec.2014.03.042.
- [51] I.C. Iser, S.M. Ceschini, G.R. Onzi, A.P. Bertoni, G. Lenz, M.R. Wink. Conditioned Medium from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Promotes Epithelial-to-Mesenchymal-Like Transition (EMT-Like) in Glioma Cells In vitro. *Mol Neurobiol*, 53 (2016) 7184-7199. doi: 10.1007/s12035-015-9585-4.
- [52] M. Plewinski, K. Schickle, M. Lindner, A. Kirsten, M. Weber, H. Fischer. The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation. *Dent Mater*, 29 (2013) 1256-1264. doi: 10.1016/j.dental.2013.09.016.
- [53] N. Huebsch, D.J. Mooney. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. *Nature*, 462 (2009) 426-432. doi: 10.1038/nature08601.
- [54] H. Tsuno, T. Yoshida, M. Nogami, C. Koike, M. Okabe, Z. Noto, N. Arai, M. Noguchi, T. Nikaido. Application of human amniotic mesenchymal cells as an allogeneic transplantation cell source in bone regenerative therapy. *Mat Sci Eng C*, (2012). doi: 10.1016/j.msec.2012.07.021.
- [55] Q.Z. Chen, A. Efthymiou, V. Salih, A.R. Boccaccini. Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds: study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro. *J Biomed Mater Res A*, 84 (2008) 1049-1060. doi: 10.1002/jbm.a.31512.
- [56] B.B. Shotorbani, E. Alizadeh, R. Salehi, A. Barzegar. Adhesion of mesenchymal stem cells to biomimetic polymers: A review. *Mater Sci Eng C*, 71 (2017) 1192-1200. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.013.
- [57] S. Kuttappan, A. Anitha, M.G. Minsha, P.M. Menon, T.B. Sivanarayanan, L.S. Vijayachandran, M.B. Nair. BMP2 expressing genetically engineered mesenchymal stem cells on composite fibrous scaffolds for enhanced bone regeneration in segmental defects. *Mater Sci Eng C*, 85 (2018) 239-248. doi: 10.1016/j.msec.2018.01.001.

[58] Q. Zhu, X. Li, Z. Fan, Y. Xu, H. Niu, C. Li, Y. Dang, Z. Huang, Y. Wang, J. Guan. Biomimetic polyurethane/TiO₂ nanocomposite scaffolds capable of promoting biomineralization and mesenchymal stem cell proliferation. Mater Sci Eng C, 85 (2018) 79-87. doi: 10.1016/j.msec.2017.12.008.

ACCEPTED MANUSCRIPT



Graphical abstract

Highlights

- Short range order of 45S5 structure was determined by synchrotron X-ray diffraction;
- 45S5 dissolution products were safe to MSCs, although in a dose-dependent way;
- 45S5 dissolutions caused a level of osteoinduction in human adipose-derived MSCs;
- MSCs could grow on 45S5 surface up to 90 days in culture without cell damage;
- The 45S5 degradation in the subcutaneous space of mice did not damage organs.

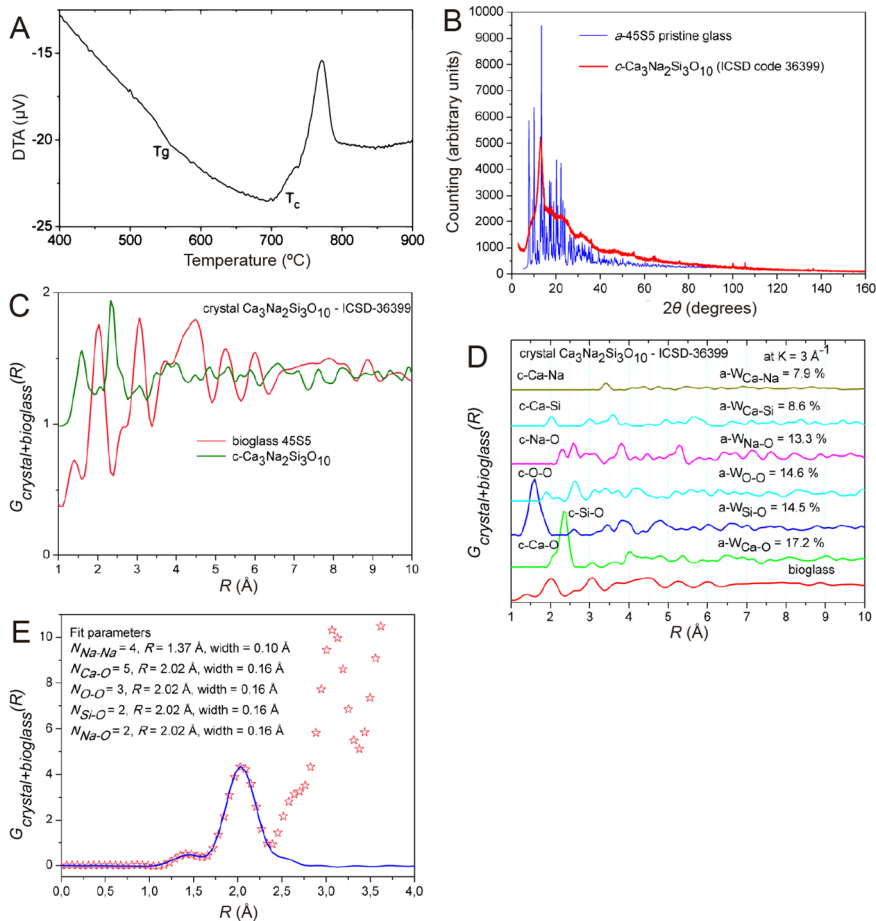


Figure 1

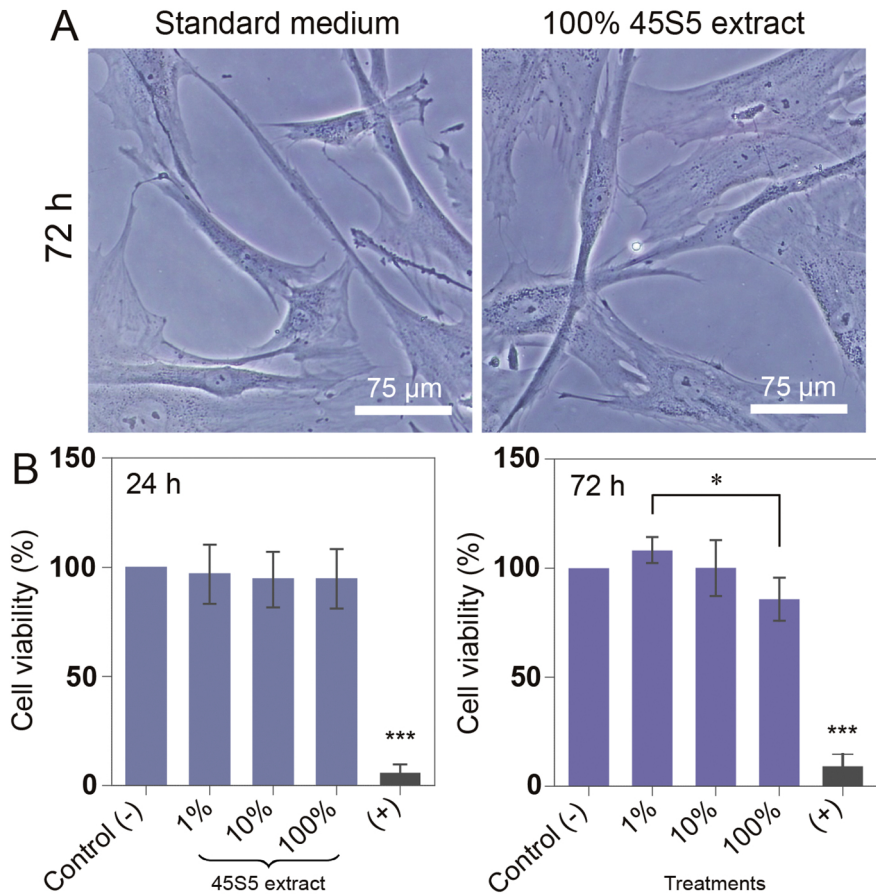


Figure 2

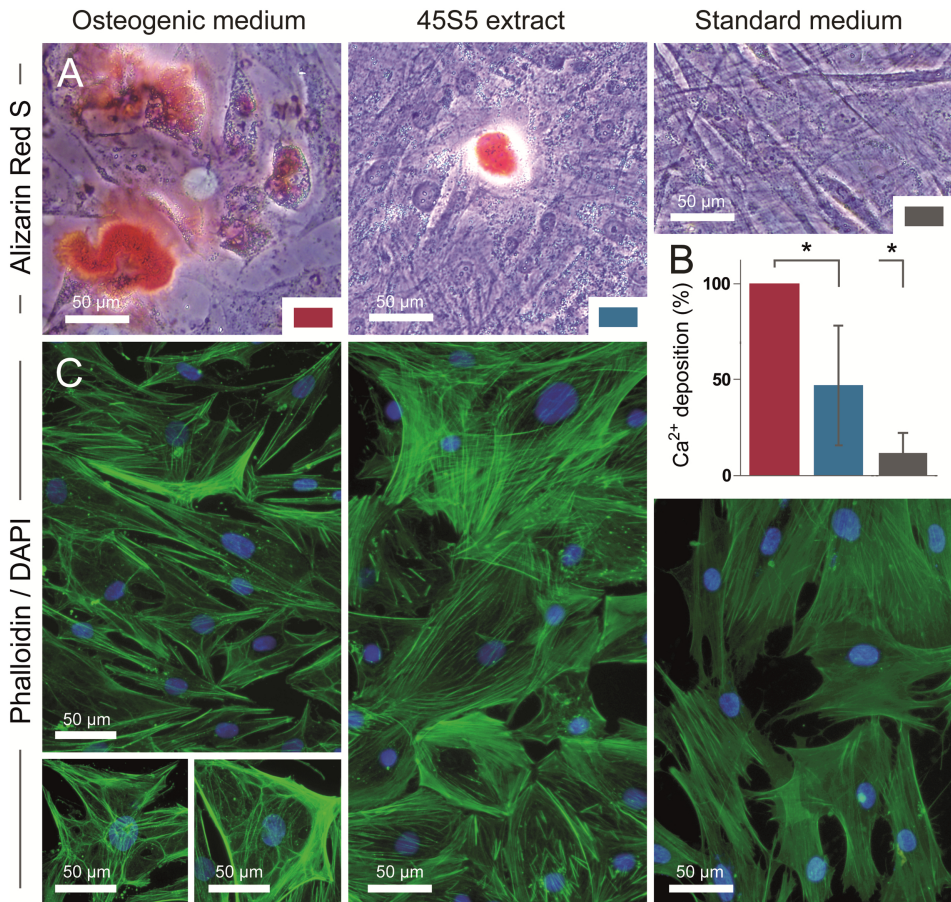


Figure 3

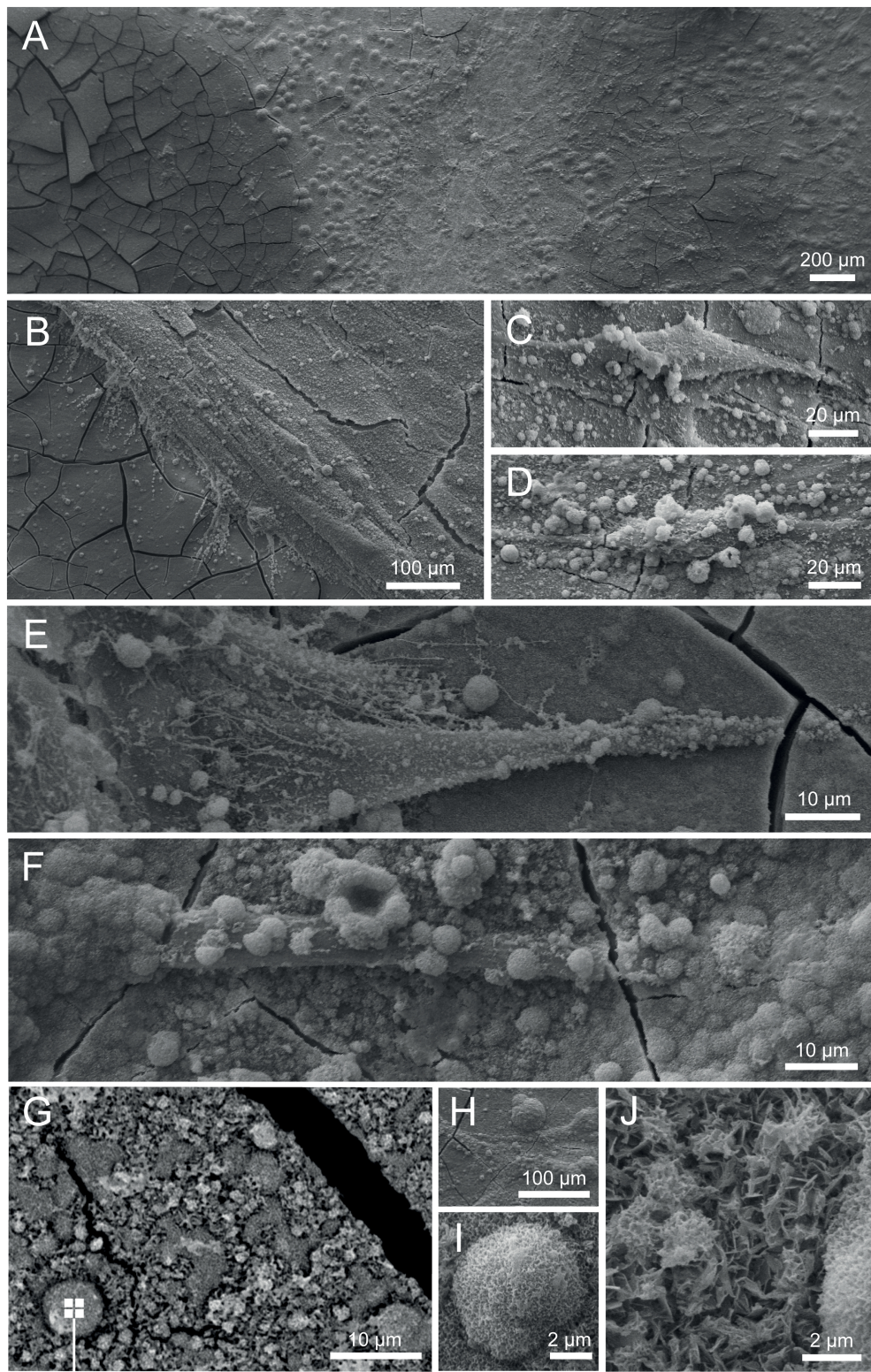
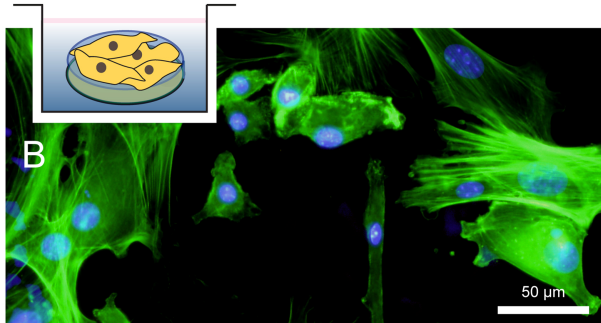
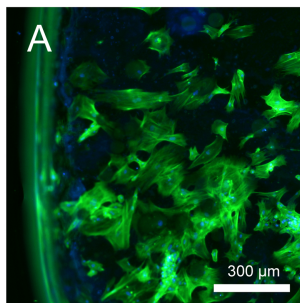
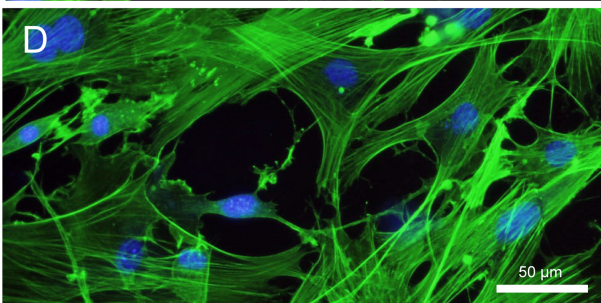
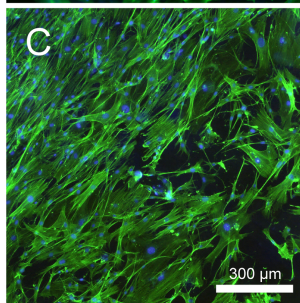
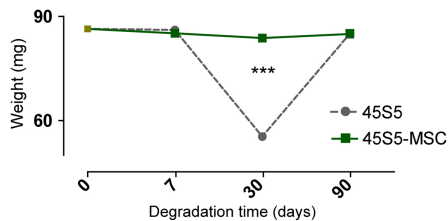
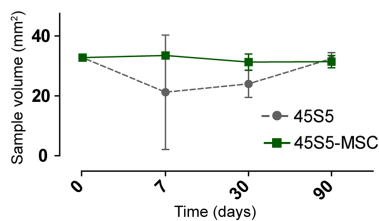


Figure 4

7 days



30 days

**E**

90 days

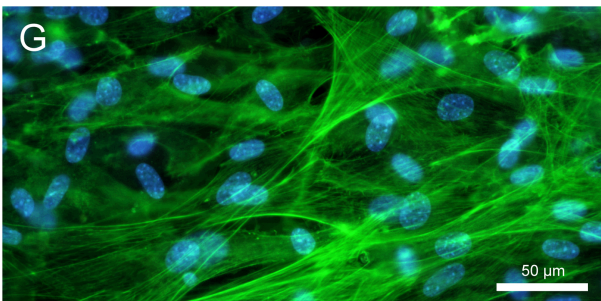
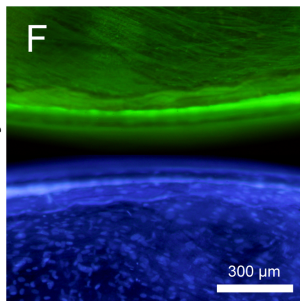


Figure 5

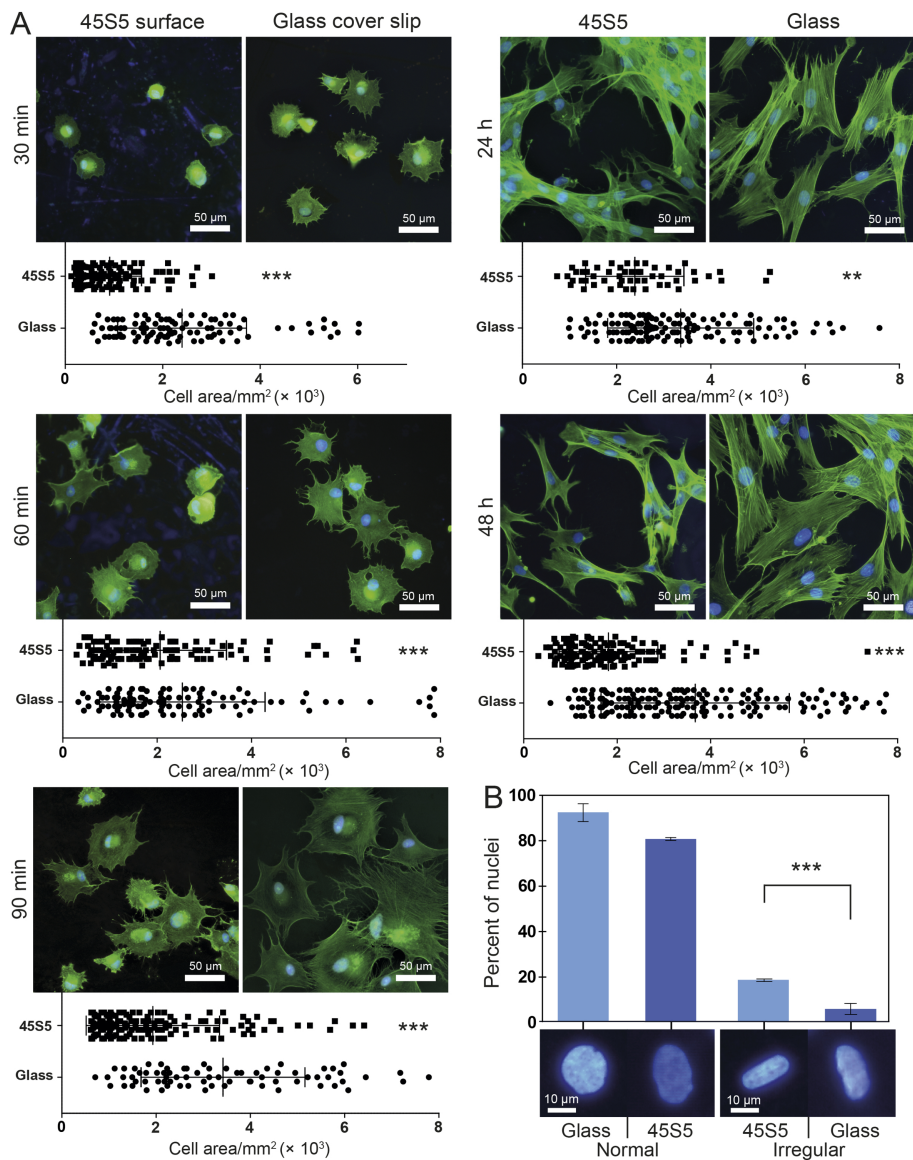


Figure 6

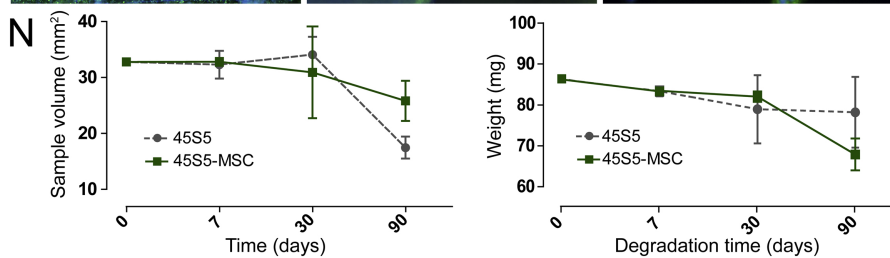
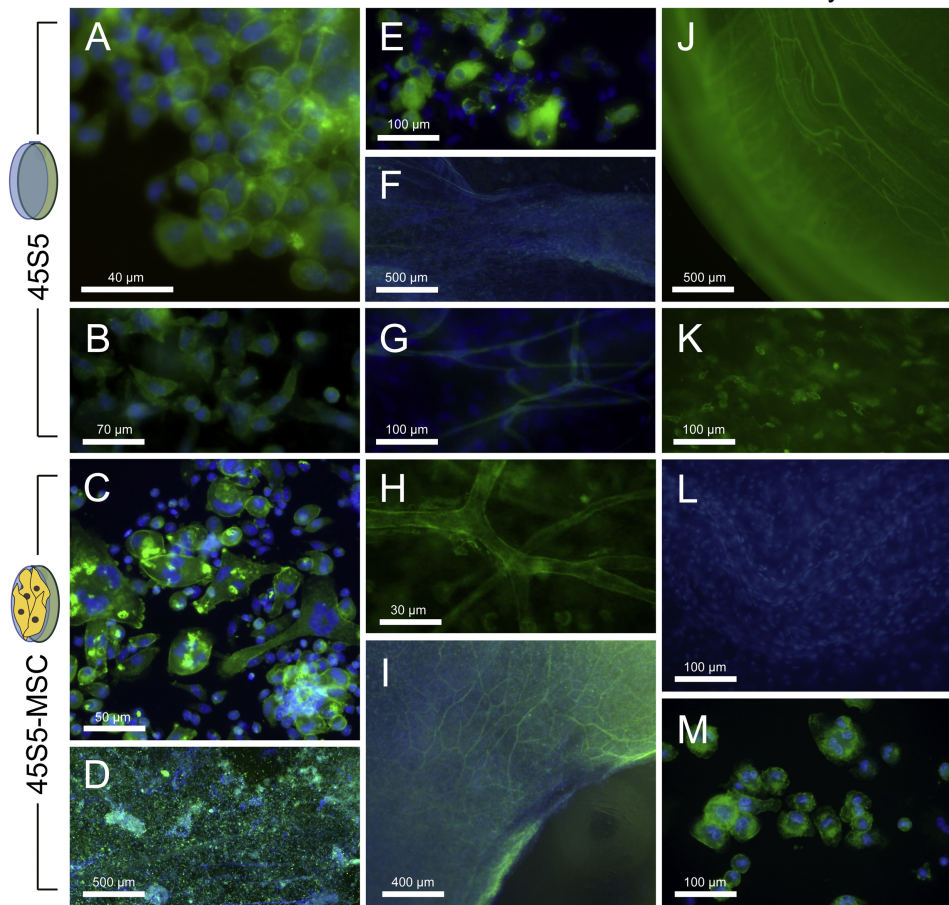
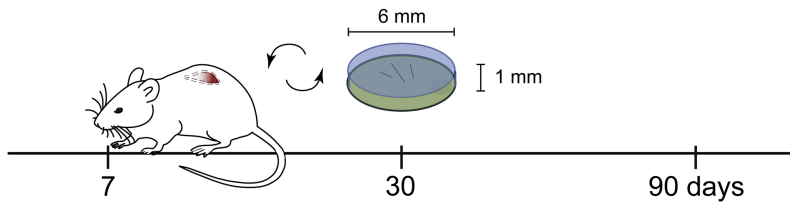
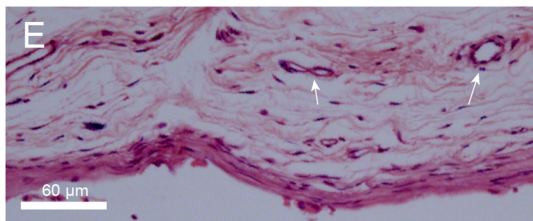
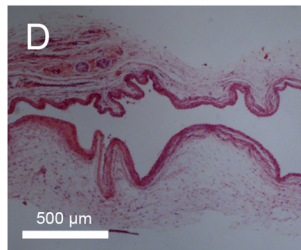
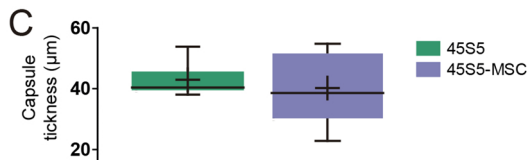
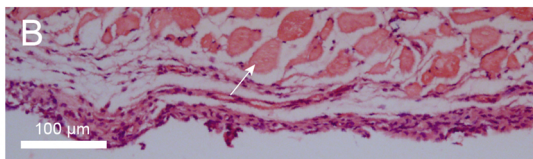
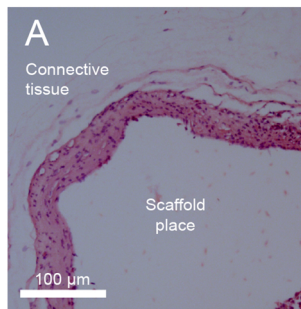


Figure 7

45S5



45S5-MSC

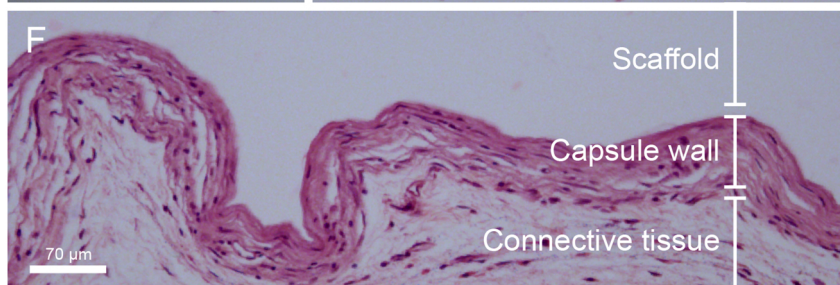
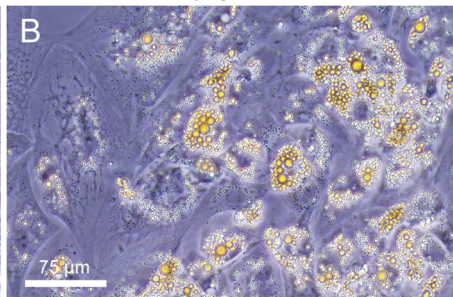
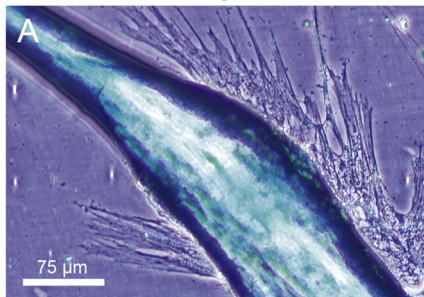


Figure 8

Chondrogenesis

Adipogenesis

Induced



Control

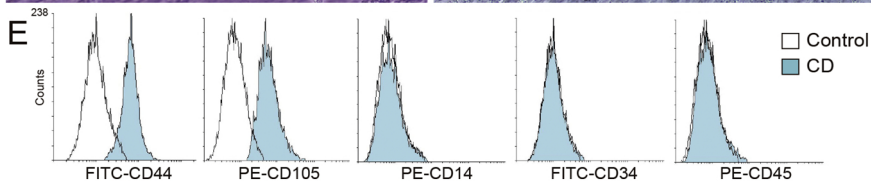
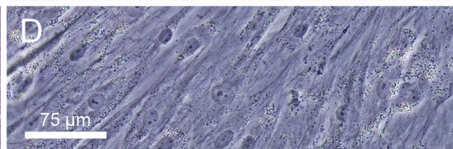
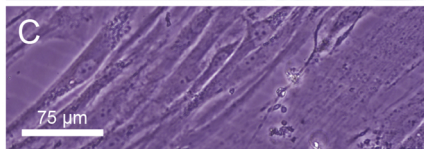


Figure 9

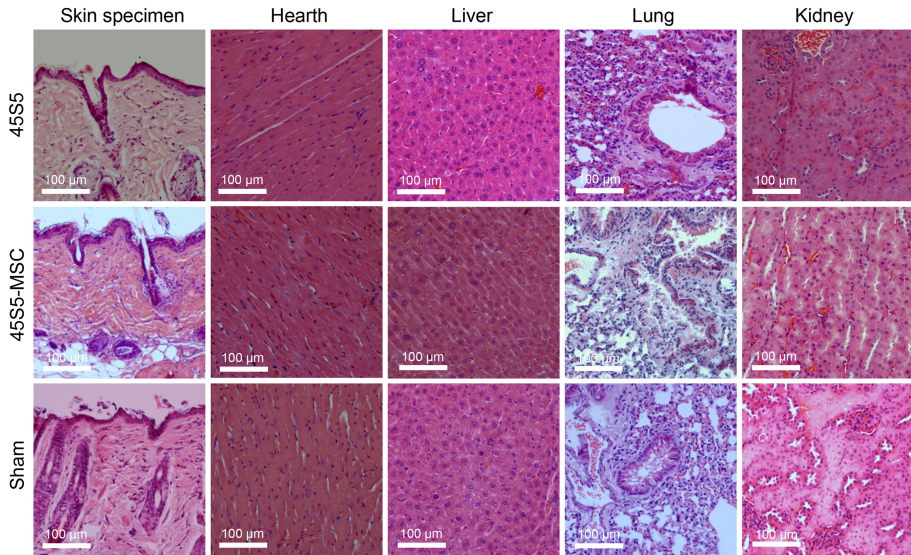


Figure 10

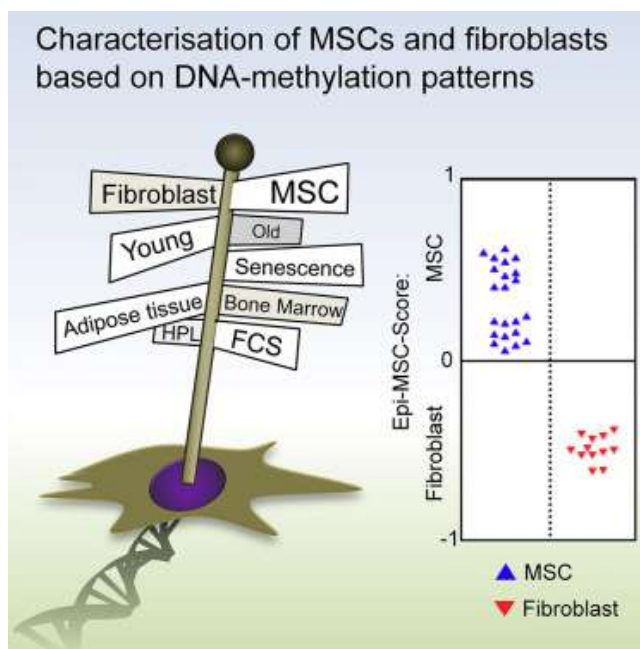
DISCUSSÃO

Nesta tese, nós apresentamos e discutiremos duas abordagens envolvendo as MSCs. Na primeira delas, a influência do MC-MSC na modulação de queratinócitos humanos foi investigada. O estudo destes parâmetros, como a alteração da morfologia e do comportamento celular, é de grande interesse devido ao papel destes processos na embriogênese e na regeneração dos tecidos e órgãos adultos (FRIEDL; GILMOUR, 2009; THIERY et al., 2009).

No segundo capítulo, as MSCs foram associadas ao biovidro 45S5 gerando um biomaterial de terceira geração, desta vez focado no reparo ósseo. Neste, foram averiguadas as alterações fenotípicas celulares e também diferenças mecânicas do biomaterial, na intenção de elucidar a sua compatibilidade, osteoindução, ligação com tecidos do hospedeiro e biodegradação.

Friedenstein e seus colaboradores (1968) apresentaram de forma pioneira, evidências de que células semelhantes à fibroblastos poderiam se aderir ao plástico, após serem isoladas da medula óssea, caracterizando assim uma cultura *in vitro* de MSCs (FRIEDENSTEIN et al., 1968). Atualmente, sabe-se que as MSCs são imunofenotipicamente idênticas aos fibroblastos, mas diferenças epigenéticas são consideradas, conforme mostra a Figura 15 (DENU et al., 2016).

Figura 15 – Diferença epigenética entre MSCs e fibroblastos.



Fonte: retirado de (DE ALMEIDA et al., 2016).

Apesar da controvérsia que cerca essa diferença, é de comum consenso que estas células são responsáveis pela homeostase tecidual ao longo de toda a nossa vida (MAXSON et al., 2012). As capacidades de diferenciação em células especializadas e de produzir moléculas importantes para o processo de regeneração, as coloca em evidência para terapias baseadas em células para diversas condições clínicas (KAPUR; KATZ, 2013; ONZI et al., 2016; P.V., 2013).

Quando novas abordagens direcionadas à cicatrização de feridas cutâneas são colocadas à prova, as principais células utilizadas para a triagem e investigação pré-clínica são os fibroblastos e os queratinócitos (PASTAR et al., 2014). Células HaCaT têm sido utilizadas mundialmente, há 30 anos, para este fim (BOUKAMP et al., 1988). Assim que transplantadas em camundongos nude, as HaCaT não apresentaram potencial tumorigênico e responderam aos mecanismos de controle do ambiente da ferida, assim como as demais células envolvidas no processo (SCHOOP; MIRANCEA; FUSENIG, 1999). Elas foram capazes de se diferenciar, seguindo o processo de estratificação para geração dos extratos mais densos da pele, culminando num equivalente epidérmico por métodos de cultura *in vitro* tridimensionais (BOELSMA; VERHOEVEN; PONEC, 1999; BREITKREUTZ et al., 1998). Células HaCaT podem sofrer indução para diferenciação em células epiteliais maduras após estímulo com maiores concentrações de Ca^{2+} (BIKLE; XIE; TU, 2012). Em conjunto, esses resultados fazem desta linhagem um modelo bem aceito para o estudo da fisiologia do queratinócito em testes dermatológicos preliminares (SPÖRL et al., 2011).

Entretanto, sabe-se que células HaCaT exibem características genéticas distintas dos queratinócitos primários, como uma célula tumorigênica benigna. Por isso, elas já apresentaram diferenças limitantes para o estudo da psoríase ou de processos relacionados às proteínas do envelope cornificado (SEO et al., 2012; SOBOLEVA et al., 2014). Mesmo assim, o baixo preço dos reagentes para o cultivo, sem a necessidade de fatores de crescimento específicos, aliados a capacidade de proliferar indefinidamente, fazem das HaCaT um modelo ainda utilizado por muitos grupos de pesquisa, apesar do acúmulo de possíveis mutações genéticas ao longo das passagens infinitas (MIRANDA et al., 2015; RUIZ-CANADA et al., 2018). No nosso caso, a facilidade do cultivo com meio de cultura padrão permitiu a confecção do meio condicionado de MSCs (MC-MSCs), que pôde ser ofertado às HaCaT, sem a necessidade de reposição de fatores, os quais poderiam mascarar o efeito das moléculas presentes no tratamento.

O sobrenadante de culturas de MSCs, denominado MC-MSCs, tem sido bem utilizado para isolar e investigar as moléculas produzidas por estas células, quando oferecido à outras culturas de

células de interesse (HORN et al., 2009). Hoje, sabe-se que as MSCs podem apresentar diferenças na quantidade e na variedade de proteínas que compõe o seu secretoma (KALININA et al., 2015). As moléculas variam quanto a origem de isolamento da célula, quanto na configuração da cultura, como em bidimensionais, tridimensionais, ou se crescendo sobre diferentes biomateriais (CHANG et al., 2013; KAPUR; KATZ, 2013). Da mesma forma, a idade do doador, o tempo de cultura - configurado pelas passagens - e o meio de nutrição oferecido às células, podem desencadear a produção e a secreção de proteínas em uma configuração diferente. Por exemplo, MSCs aderidas e crescendo sobre uma membrana SIS, secretaram uma maior quantidade de fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF), um fator importante para a neovascularização. Quando cultivadas sob atmosfera de hipóxia, as MSCs podem nutrir o seu sobrenadante com uma quantidade aumentada de interleucina 10 (IL-10), uma molécula anti-inflamatória fortemente associada a redução da cicatriz hipertrófica (DU et al., 2016; XU et al., 2015).

Aqui, nós optamos por confeccionar o MC-MSCs utilizando um cultivo em semi-confluência e com privação de fatores, ou seja, livre de soro fetal bovino (SFB). Nós entendemos que devido à variedade desconhecida de moléculas no SFB, teríamos mais fidedignidade nos ensaios trabalhando com um MC-MSCs enriquecido apenas com os nutrientes básicos, mais os fatores produzidos pelas MSCs (WESSMAN; LEVINGS, 1999). No entanto, assim como a diferença de confluência da cultura, a privação de fatores também pode levar a uma diferença importante no secretoma produzido (RATH et al., 2016). Adam Oskowitz *et al.* (2011) condicionou, durante três dias, o sobrenadante de MSCs oriundas da medula óssea humana sob privação de SFB e percebeu um aumento na regulação gênica para a produção de moléculas angiogênicas, entre outras essenciais para a sobrevivência celular, como o VEGF- α , angiopoietina, IGF-1 e HGF. Neste caso, a privação de fatores a longo prazo levou à mudança de morfologia para uma semelhante à endotelial (OSKOWITZ et al., 2011).

Os eventos moleculares e celulares que ocorrem durante a regeneração da pele dependem diretamente dos fatores de crescimento e das citocinas presentes no sítio, como exemplo as quimiocinas (HU et al., 2016). Logo após a lesão, as MSCs são ativadas e atraídas por tropismo para o local injuriado (MAXSON et al., 2012). Ali, elas desempenham um papel crucial para modular o microambiente, afetando a proliferação, migração, diferenciação e a recuperação funcional das células residentes, além de regular a inflamação, o que permite o sucesso de todos os processos que levam ao restauro local (GUO; DIPIETRO, 2010; MAXSON et al., 2012).

O fator de crescimento epidérmico (EGF), junto ao fator de crescimento de queratinócitos (KGF), IGF-1 e ao VEGF- α estão entre as macromoléculas relatadas como atuantes na cicatrização da pele (GUO; DIPIETRO, 2010). Tão importante quanto a presença das MSCs, a migração direcionada dos queratinócitos se dá a partir do leito da ferida, levando ao reestabelecimento da proteção essencial conferida pelas células estratificadas (SAFFERLING et al., 2013).

No primeiro capítulo desta tese, ao usar o MSC-CM como tratamento, foi possível verificar um aumento na migração de queratinócitos humanos, acompanhando mudanças significativas na morfologia celular, tão logo em 24 e 48 h. No ensaio *scratch wound assay*, no qual fizemos uma lesão na monocamada confluyente de células HaCaT, o risco fechou significativamente mais rápido na presença do MC-MSC. Quando os queratinócitos foram co-cultivados sobre as populações de MSCs, utilizando o sistema de transwell, eles foram atraídos para a cultura das células precursoras, localizadas no compartimento inferior, praticamente no mesmo nível do que quando utilizamos o TGF- β 1 isolado como quimioatrativo.

É sabido que no processo de reparo da pele, os queratinócitos podem perder o seu caráter epitelial, adquirindo um fenótipo mesenquimal por meio de um processo de transdiferenciação chamado de transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial mesenchymal transition*) (GUO; DIPIETRO, 2010; KALLURI, 2009). Após sofrer EMT, os queratinócitos tornam-se menos aderentes e com maior capacidade migratória, o que ajuda no equilíbrio do tecido de granulação, restaurando mais rapidamente a barreira perdida (KALLURI, 2009). É importante ressaltar que o principal fator descrito como responsável pela alteração da morfologia das células epiteliais é o fator de crescimento de transformação- β (TGF- β) (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Neste trabalho, o efeito do TGF- β 1 no MC-MSC pode ser parcialmente bloqueado pelo tratamento concomitante com inibidor do receptor de TGF- β 1 (SB 431542), mesmo na presença física das MSCs durante o co-cultivo. Isto aponta que, apesar da diversidade de fatores que atuam no comportamento dos queratinócitos durante a regeneração, o TGF β -1 parece ser crucial para ativar o processo de migração destas células. Entretanto, quando o inibidor SB 431542 foi testado em diferentes células tumorais para inibir a migração e a progressão do tumor, constatou-se que nem todas as células são afetadas por esse fator de crescimento (HALDER; BEAUCHAMP; DATTA, 2005).

Por outro lado, outros grupos de pesquisa demonstraram o efeito migratório causado pelo MC-MSC sobre os queratinócitos, também fazendo uso de um modelo *in vitro*. Walter et al. (2010)

percebeu um fechamento significativo de uma monocamada de HaCaT riscada, após 27 h de tratamento, mas utilizando MC-MSCs derivado da medula óssea. Eles atribuíram esse resultado aos vários fatores secretados pelas MSCs, todos relacionados à promoção da cicatrização de feridas, como o TGF- β 1, IL-6 e a IL-8. Mais recentemente, Ruiz-Cañada *et al.* (2017) testou a liberação do TGF- β 1 presente naturalmente na membrana amniótica humana sobre células HaCaT, estas com e sem nocaute para o receptor de TGF- β 1. Eles descobriram que as HaCaT precisam de pelo menos um mínimo estímulo nos seus receptores de TGF- β , para que possam desempenhar o seu ótimo desempenho de migração.

Nos últimos anos, o processo de EMT foi e continua sendo estabelecido por um número exponencialmente crescente de relatos (ISER *et al.*, 2017; KALLURI, 2009; ZHAO *et al.*, 2018). Resumidamente, o TGF- β pode regular a transcrição de genes-alvo, resultando tanto na repressão da expressão gênica de marcadores epiteliais, quanto na ativação de genes mesenquimais (ZEISBERG; NEILSON, 2009). As alterações no fenótipo celular, induzidas pela EMT, permitem o escape de células epiteliais da arquitetura bem organizada da lâmina basal, favorecendo a migração através da expressão de enzimas digestivas que atuam na MEC (RUIZ-CANADA *et al.*, 2018).

Além da baixa expressão das proteínas relacionadas à adesão, dentro da célula se inicia a reorganização do citoesqueleto de actina, preparando-a para migração. Para tal, é iniciada a despolimerização da F-actina, tanto dos seus microfilamentos, quanto dos filamentos intermediários (BOLAND *et al.*, 1996). Aqui, nós mostramos que o movimento e a reformatação das fibras de estresse em queratinócitos HaCaT podem ser modulados pelo MC-MSC. Quando as células foram cultivadas com o seu meio nutritivo padrão (DMEM 10% SFB), as fibras de actina, em sua maioria, permaneciam localizadas na periferia da célula, dando suporte às junções célula-célula ou célula-matriz, sinalizando o seu caráter epitelial (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Após o tratamento com o MC-MSC, observou-se uma diminuição das fibras periféricas de suporte e um aumento das fibras de estresse em todo o corpo da célula. A ruptura das fibras de actina também foi evidente quando as células receberam apenas o TGF- β 1, mas não quando tiveram seus receptores bloqueados para esse fator.

A movimentação da F-actina é essencial para a protrusão da célula durante a migração, pois as forças de tração, geradas pelas fibras de estresse e pelas proteínas motoras da miosina, facilitam a contratilidade (DOMINGUEZ; HOLMES, 2011; STRICKER; FALZONE; GARDEL, 2010). O

TGF- β 1 leva a uma desorganização da actina local, induzindo assim, uma dissolução nas junções aderentes (XU; LAMOUILLE; DERYNCK, 2009). Este movimento da F-actina causado pelo MC-*MSC*, e pelo fator comercial TGF- β 1, o qual foi utilizado como controle, foi observado já nas primeiras 24 h e mostrou reorganização adicional após 48 h, sendo, portanto, associado à translocação celular durante o processo de migração. Mais especificamente, os filamentos de actina localizados na região cortical se rearranjam para gerar estruturas associadas à motilidade (filopodia ou lamelipodia), quando as células HaCaT foram estimuladas pelo MC-*MSC* de células adiposo-derivadas humanas. Quando as HaCaT tiveram o seu receptor TGF- β 1 bloqueado, ou quando receberam privação de FBS, elas também sofreram alterações morfológicas, quando comparadas ao cultivo padrão. Isso nos mostrou que a privação de fatores pode levar a modificações ainda não bem conhecidas, mas provavelmente relacionadas a senescência celular (NISHIO; INOUE, 2005).

Ainda sobre alterações morfológicas celulares, nossos dados mostraram irregularidades no núcleo dos queratinócitos após 48 h recebendo o MC-*MSC*. Núcleos irregulares são definidos como núcleos atípicos; e com aspecto alongado e hipercromático (FILIPPI-CHIELA et al., 2012; FRIEDL; WOLF; LAMMERDING, 2011). Sabe-se que o processo de EMT causa um acúmulo de algumas proteínas no núcleo da célula, como a β -catenina e o SMAD2 e 3 (KALLURI, 2009). Também vale considerar que o movimento de translocação para a migração causa um alongamento do corpo celular, com consequente compressão local do núcleo, o que pode levar a sua deformação, já que é a maior organela celular (FRIEDL; WOLF; LAMMERDING, 2011).

Além da sinalização do TGF- β 1 na cicatrização, certamente há uma sinalização cruzada envolvendo muitos outros fatores liberados pelas *MSCs* (GUO; DIPIETRO, 2010). Essa complexidade é evidente no trabalho de Kalinina *et al.* (2015), onde se mostrou que as *MSCs* do tecido adiposo podem produzir e liberar em seu meio extracelular mais de 600 proteínas, muitas delas com atividade biológica catalogada (P.V., 2013). Dentre elas, o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (KALININA et al., 2015).

Como exposto no referencial teórico, as *MSCs* podem secretar exossomos contendo as mais diferentes moléculas bioativas (KAPUR; KATZ, 2013). A capacidade de regulação imunológica das *MSCs*, quando transplantadas para tratar a doença do enxerto contra o hospedeiro, é devida, pelo menos em parte, à ação das microvesículas secretadas contendo TGF- β , IFN- γ , IDO e a IL-10 (ZHANG et al., 2018). O modo de sinalização por vesículas foi estudado em células de câncer de

pulmão expostas ao MC-MSc derivadas de cordão umbilical. Neste, o processo de EMT foi associado com a regulação de mRNA nas células atingindo a expressão de proteínas relacionadas ao processo, um efeito causado pelos exossomos (ZHAO et al., 2018).

Aqui, nós ajudamos a reiterar que o TGF- β 1 secretado pelas MSCs derivadas de tecido adiposo humano pode ser um dos agentes mais importantes na modulação dos queratinócitos humanos durante o reparo da pele. Reconhecendo o importante papel do secretoma das MSCs durante a cicatrização, é essencial o melhor entendimento do efeito para estabelecer maior eficácia e segurança nas futuras terapias baseadas em células (LEE; AYOUB; AGRAWAL, 2016).

A terapia celular pode ser executada por meio da infusão direta de células, através da aplicação dos seus produtos, e também com o auxílio de materiais carreadores. Esses, além de melhor acomodá-las numa configuração mais tridimensional, podem apresentar certa bioatividade, tanto nas células, quanto na região onde elas serão transplantadas, o que favorece e direciona o tratamento (OUYANG et al., 2016; RATNER et al., 2004). Isso faz com que as MSCs sejam cada vez mais investigadas para comporem biomateriais de interesse para a medicina regenerativa (GRANERO-MOLTÓ et al., 2009).

No segundo capítulo deste trabalho, nós investigamos alguns aspectos físicos do material criado pelo professor Larry, o biovidro 45S5, considerando-o como um padrão ouro para o estudo de materiais que apresentam bioatividade (GREENSPAN, 2016). A modulação causada pelo biovidro 45S5 sobre as MSCs foi avaliada em dois ambientes fisiológicos, *in vitro* e *in vivo*.

Como as MSCs existem em quase todos os tecidos pós-natais, nós escolhemos o tecido adiposo por ser uma fonte mais acessível, se comparado à medula óssea, por exemplo; requerendo uma extração menos agressiva para o paciente (FRASER et al., 2006). Embora as MSCs de diferentes órgãos tenham capacidades regenerativas semelhantes, é relatado que as MSCs adiposo-derivadas preservam o seu potencial anti-inflamatório, mesmo quando coletadas de um organismo osteoporótico, ao contrário das MSCs derivadas da medula óssea (ZHENG et al., 2018). Além disso, o tecido adiposo fornece um número maior de MSCs após o isolamento, permitindo o cultivo e a expansão das culturas de forma mais rápida (RATH et al., 2016; STRIOGA et al., 2012).

A investigação física no material foi realizada tentando compreender, na sua estrutura, os mecanismos que levam à bioatividade e a capacidade de interagir com o tecido do hospedeiro. Uma característica muito procurada nos novos enxertos é que eles possam suportar a região injuriada até que a regeneração ocorra (MAO; MOONEY, 2015). A partir daí, se espera uma degradação gradual

no ritmo da reposição tecidual (HSU; LI; FUCHS, 2014). Quando expusemos as amostras de 45S5 à difração de raios-x, elas demonstraram a sua natureza amorfa, como esperado (CHEN; THOMPSON; BOCCACCINI, 2006). As temperaturas elementares de transição foram determinadas através da análise térmica diferencial (DTA). A identificação destas temperaturas de transição vítrea e de cristalização poderão permitir o controle e a otimização das propriedades mecânicas, térmicas e ópticas do vidro, através do controle da reorganização e da concentração dos cristais formados na matriz, durante o processo de manufatura (BUCHNER et al., 2014).

Sabe-se que as propriedades físicas dos vidros amorfos são diretamente dependentes da disposição dos seus átomos (KOCH et al., 1983). A determinação estrutural atômica é uma tarefa difícil, mas pode ser superada pela combinação de diferentes técnicas de difração e espectroscopia, aliados à simulação e a modelagem molecular (SHIMADA Y, OKUNO M, SYONO Y, KIKUCHI M, FUKUOKA K, 2002). No caso do 45S5, Tilocca e colaboradores (2009) resumiram contribuições de alguns pesquisadores que trabalharam em simulações da dinâmica molecular dos vidros bioativos. Os autores concluíram que certas correlações estruturais já foram identificadas, permitindo alterar o desempenho do biovidro para diferentes aplicações biológicas (TILOCCA, 2009). Nesse sentido, a determinação física por métodos de cristalografia representa uma contribuição importante para o conhecimento relacionado ao arranjo dos átomos locais do material.

A toxicidade dos materiais bioabsorvíveis é atribuída principalmente à liberação dos seus produtos de degradação, capazes de estimular ou inibir atividades metabólicas nas células circundantes (TAN et al., 2013). Como primeiro passo para avaliação da biocompatibilidade, as MSCs humanas (hMSCs) foram expostas indiretamente ao 45S5, na intenção de verificar qualquer toxicidade. Para tanto, o 45S5 condicionou um meio de cultura para MSCs durante 24 h, formando um extrato. Durante a confecção, não foi observada a presença de contaminação bacteriana, nem qualquer modificação visível na coloração indicativa de pH do meio de cultura (vermelho fenol). As hMSCs, submetidas ao extrato de 45S5, não sofreram nenhuma alteração significativa na sua viabilidade, após 24 e 72 h de exposição. De acordo com protocolos estabelecidos, apenas uma redução na viabilidade celular em mais de 30% é preocupante e considerada um efeito citotóxico (ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2009).

Embora vários estudos relatem que o 45S5 pode aumentar rapidamente o pH do meio em que se encontra, observou-se um discreto aumento no pH do extrato, após 24 h de imersão do material (dados não mostrados) (CERRUTI; GREENSPAN; POWERS, 2005). Sabe-se que o

aumento nos valores do pH está associado à rápida liberação dos íons Na^+ e Ca^{2+} para o meio, com a consecutiva troca pelos íons H^+ ou H_3O^+ (JONES; SEPULVEDA; HENCH, 2001). A única alteração constatada foi em 72 h, quando as hMSCs demonstraram uma maior viabilidade quando receberam uma diluição contendo 1% da dissolução iônica do 45S5, em comparação com aquelas células que receberam o extrato bruto. Alguns grupos sugerem que o crescimento das MSCs pode ser estimulado pelo 45S5 (WESTHAUSER et al., 2016). No entanto, trabalhos já relataram que altas concentrações de Ca^{2+} (acima de 10 mmol), pode ter efeito tóxico sobre osteoblastos, mas dizem também que soluções com menos de 8 mmol podem promover a proliferação celular (MAENO et al., 2005). Isso nos mostra que uma análise na curva dose-resposta pode ser importante para definir a quantidade de biovidro a ser enxertado.

Apesar de existirem diferentes mecanismos para a formação óssea (osteogênese, osteoindução e osteocondução), nem todos os biomateriais utilizados para próteses esqueléticas apresentam as três propriedades (TAN et al., 2013). Entretanto, é desejado que o enxerto disponha de pelo menos uma delas (PRYOR et al., 2009). Se apresentar osteogênese, o material deverá ser capaz de formar tecido ósseo por si só, sem depender das células do receptor (JONES, 2013). Isso será possível apenas se ele já conter células vivas, como no caso do transplante de osso autógeno, considerado o único biomaterial com esse potencial disponível até então para a terapia e, por consequência, considerado o padrão-ouro para a reposição óssea (ELSALANTY; GENECOV, 2009).

A osteoindução de um material se define pela capacidade de induzir as MSCs locais a se diferenciarem em células precursoras ósseas (WESTHAUSER et al., 2016). Esta propriedade vem sendo relacionada à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) presentes nos ossos de origem natural, como os tecidos xenogênicos e alogênicos (GRANERO-MOLTÓ et al., 2009). Os enxertos ósseos alógenos, teoricamente, são osteoindutores (DE BOER, 1988). Entretanto, sabe-se que durante o processamento destes materiais, as proteínas podem ser desnaturadas, o que levaria a perda dessa capacidade (DOBLARÉ; GARCÍA; GÓMEZ, 2004). O 45S5 está associado à promoção da osteogênese pela sua osteoindução (CHEN; THOMPSON; BOCCACCINI, 2006). Aqui, as culturas de hMSCs recebendo o extrato de 45S5 apresentaram, tão logo em 20 dias, uma área significativa de matriz calcificada, em comparação com um meio padrão para o cultivo. Além da produção dos depósitos de Ca^{2+} , algumas mudanças em termos de uma reorganização dinâmica foram observadas. A F-actina pode ser despolimerizada e reorganizada durante a diferenciação das

MSCs (GARDEL et al., 2010). Sob processo de osteogênese, estas células modulam os seus filamentos finos paralelos para uma configuração desordenada, formando fibras mais robustas e espessas (STRICKER; FALZONE; GARDEL, 2010). Surpreendentemente, essa mudança não ocorreu quando cultivamos MSCs de camundongo em contato direto na superfície do 45S5.

A visualização das células aderidas sobre o 45S5 torna-se bastante difícil por microscopia óptica, devido a semi-transparência causada principalmente pelos depósitos de fosfato de Ca^{2+} . No entanto, tanto a microscopia de fluorescência como a eletrônica de varredura (MEV), se mostraram ótimas alternativas para avaliar os padrões morfológicos das MSCs, nessas condições. As imagens do MEV reiteraram a boa compatibilidade das hMSCs com o 45S5. Após 48 h, formou-se uma expressiva camada de HA na superfície do vidro, sendo que a cristalização do fosfato de Ca^{2+} foi mais aparente nas áreas onde havia uma maior densidade de células. Uma das estruturas formadas foi caracterizada por espectroscopia de dispersão de energia por raios-x (EDS), mostrando os elementos típicos dos cristais de HA (STANCIU; SANDULESCU; SAVU, 2007). A HA é um dos principais componentes da matriz inorgânica óssea e nesse caso, foi naturalmente formada através da bioatividade do 45S5 (MOTEALEH et al., 2017). No entanto, as interações de células precursoras com a alta atividade das superfícies baseadas em $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, precisam de mais investigações para se obter implantes compósitos ainda mais eficazes.

Sabe-se que a rede de actina desempenha um papel importante nas propriedades mecânicas das células, definindo principalmente os processos de adesão e de motilidade, cruciais para o processo de migração (MITCHISON; CRAMER, 1996). O citoesqueleto de MSCs adiposo-derivadas de camundongo (mMSCs) foi monitorado por até 3 meses após o cultivo *in vitro* de forma direta sobre o 45S5, permanecendo sem diferença na organização da F-actina. Nestas condições, as hMSCs apresentaram corpos celulares alongados, típicos de fibroblastos, e parece que mantiveram a sua conjuntura indiferenciada durante todo o período, crescendo sobre a superfície do 45S5 (YOUREK; HUSSAIN; MAO, 2007). As suas fibras de estresse dorsal e ventral permaneceram típicas de células não especializadas, em contraste com o ensaio de osteoindução realizado com hMSCs por 20 dias (MATHIEU; LOBOA, 2012).

Inicialmente, logo que semeadas nos discos de 45S5, as hMSCs aderiram praticamente do mesmo modo que aquelas semeadas em lamínulas de vidro. Durante a adesão, as células apresentaram uma menor visibilidade da sua área, quando comparadas ao controle, e apresentaram menores taxas de espalhamento do corpo celular de 30 min até 48 h. A topografia acidentada do

45S5 pode ser responsável por essa diferença (STANCIU; SANDULESCU; SAVU, 2007). Apesar de as amostras de 45S5 utilizadas não apresentarem poros, as células puderam encontrar, na sua superfície, uma profundidade de crescimento que não é possível em lamínulas padrão. Vale lembrar que, neste caso, a adesão ocorre durante uma série de reações químicas de superfície, inerentes à bioatividade 45S5, o que também auxilia na variabilidade das características focais das MSCs (WOZNIAK et al., 2004).

As diferenças morfológicas também foram encontradas no núcleo. O ensaio NMA (do inglês, *nuclear morphometric analysis*), mostrou um aumento significativo de núcleos irregulares nas hMSCs semeadas no 45S5, após 48 h. Mais uma vez, a deposição de cristais de HA pode ter correlação com essa alteração (GLASS, 2008).

Para avaliar a resposta *in vivo* da composição 45S5-MSC, amostras foram enxertadas subcutaneamente em um modelo murino. O exame macroscópico dos explantes após 30 dias revelou uma membrana frágil e vascularizada ao seu redor, que começou a ser percebida logo após 7 dias. Os enxertos de 90 dias ainda apresentavam a sua forma cilíndrica inicial (discos), mas desta vez cobertos por uma densa cápsula medindo cerca de 55 µm de espessura. Após a biópsia, a cápsula mostrou muito mais adesividade ao espaço subcutâneo do que ao material. Nela, havia uma camada compacta de células fibroblásticas, acompanhada de MEC conectada ao hospedeiro por um tecido conjuntivo altamente vascularizado. É relatado que a dissolução do 45S5 pode proporcionar melhorar a vascularização da área circundante, implementando a qualidade da cicatrização (CHANG et al., 2013). No entanto, a presença desta cápsula de isolamento, faz-nos questionar a habilidade do 45S5 em ligar-se também aos tecidos moles do hospedeiro.

A resposta do corpo humano que leva à contratura capsular protética ainda é uma complicação indesejada para os implantes, causando em muitos casos a falha do dispositivo, com a inerente necessidade de remoção (DIEGIDIO et al., 2014; STOCK; WOLF, 1986). Wilson e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a ligação do 45S5 com tecidos frouxos, quando implantado no espaço subcutâneo de ratos. Segundo ele, a cápsula formada acompanhava uma forte ligação de fibras colágenas ao material, o que configuraria a ligação (WILSON et al., 1981). Entretanto, isso não se reproduziu no nosso modelo *in vivo*. Nós observamos uma resposta inflamatória, que apesar de pequena, parece ter culminado na formação de uma definida cápsula de isolamento, sem ligação ao material (BURKHARDT, 2005). Apesar do fato de que a implantação no espaço subcutâneo de animais seja um modelo bem aceito para a avaliação de

biocompatibilidade de materiais, a formação de um tecido de isolamento começará logo após a tentativa frustrada dos macrófagos em fagocitar o corpo estranho (GOMIDE et al., 2012; RAHAMAN et al., 2011). É sabido que enxertos compostos por Teflon poliuretano, silicone, polietileno, polimetilmetacrilato e metacrilato de poli-hidroxietilo, estão entre os biomateriais que desencadeiam uma reação de corpo estranho que leva formação da cápsula de isolamento, quando implantados no espaço subcutâneo (RATNER, 2002). Precisamos considerar que, uma peça bioativa com deposição de HA, pode não ser o material ideal para acomodar-se nesse espaço. Porém, quando o 45S5 é implantado no tecido ósseo, o mesmo pode ser totalmente integrado (MIGUEZ-PACHECO; GREENSPAN, 2015; RAHAMAN et al., 2011; RATH et al., 2016; WILSON et al., 1981).

Mesmo assim, o 45S5 é tido como um composto que ajuda a suavizar a reação do tecido ao redor dos enxertos, enquanto as MSCs são utilizadas para modular o ambiente do implante, devido à sua capacidade imunorreguladora (MIGUEZ-PACHECO; GREENSPAN, 2015; RATH et al., 2016). Entretanto, no nosso contexto experimental, uma colonização prévia com MSCs alógenas não ajudou a diminuir a formação da cápsula, nem apresentou qualquer outra diferença significativa nos parâmetros *in vivo* avaliados. Por outro lado, o modelo subcutâneo não apresentou nenhum distúrbio de toxicidade, um indicativo essencial para permitir a segurança no uso clínico (VELNAR et al., 2016).

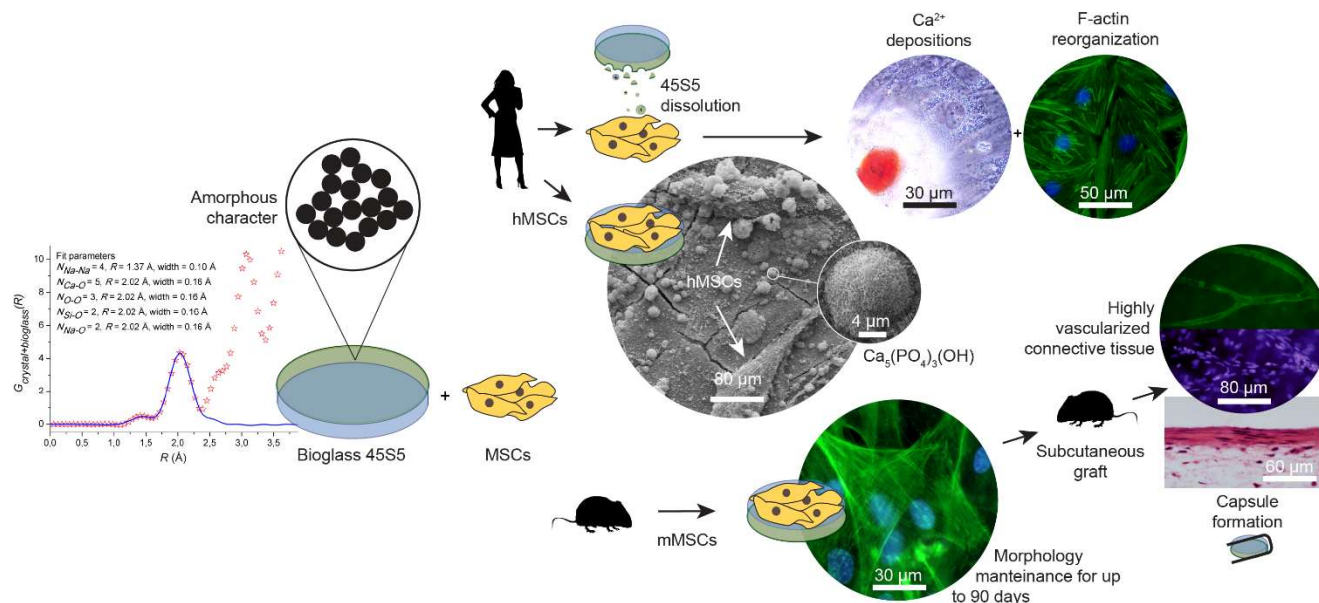
Dispositivos biodegradáveis são comumente digeridos em produtos menores que podem ser eliminados do corpo ou utilizados metabolicamente (TAN et al., 2013). Um dos fatores determinantes para o sucesso da bioengenharia é alcançar a compatibilidade celular adequada do material, de forma que durante a degradação, ocorra a substituição do material pelo novo tecido (GLASS, 2008). Sob análise gravimétrica, as amostras 45S5 demonstraram uma perda de peso maior quando *in vitro*, após 30 dias, em comparação com quando a amostra foi coberta por mMSCs. Estes fenômenos podem ser atribuídos a um possível revestimento de colágeno, produzido e secretado pelas MSCs na superfície do 45S5 (BOSETTI; CANNAS, 2005; ENGLER et al., 2006). Há a hipótese de que a ligação celular, seguida de deposição de MEC, pode desempenhar um papel importante, tanto na degradação, quanto na resistência mecânica dos *scaffolds* (ALVES et al., 2018; CHEN et al., 2008).

A formação de uma camada inorgânica já é bem esperada em implantes baseados no 45S5, mas uma interface com proteínas estruturais secretadas pelas MSCs e fibroblastos, como é dito

ocorrer, poderia fornecer um ambiente mais favorável para uma série de processos celulares, tais como migração, comunicação química e deposição de matriz, culminando na formação de uma membrana periosteal funcional (MIGUEZ-PACHECO; GREENSPAN, 2015).

Apesar do seu histórico de uso na prática clínica, os mecanismos responsáveis pela osteoindução e vascularização melhorada, causada pelos vidros bioativos, ainda não foram totalmente compreendidos. A Figura 16 apresenta um apanhado geral da investigação realizada sobre o Biovidro 45S5, junto às MSCs humanas e de camundongo.

Figura 16 – Resumo gráfico do segundo capítulo.



CONCLUSÃO

As investigações que compõe a primeira parte desta tese, nos permitem concluir que o fator de crescimento TGF- β 1 tem ação sobre a dinâmica dos queratinócitos humanos. Apesar do comum consenso de que existem inúmeras outras moléculas participando desta modulação, como a IL-6, parece que é necessário o mínimo de sinalização por meio do TGF- β 1 para que a migração e mudança de morfologia ocorra. No entanto, devido à complexidade da regeneração cutânea, intensificar a migração nem sempre pode ter um efeito benéfico, visto que o processo deve ser orquestrado de forma harmônica em todas as fases da cicatrização. Além do TGF- β , todos os demais fatores presentes no MC-MS, conhecidos ou não, têm papel na homeostasia do tecido de granulação.

Após a associação das MSCs com biovidro 45S5, vimos que ainda há muitos pontos críticos a serem compreendidos sobre a bioatividade que o material exerce sobre as células progenitoras. Nós demonstramos que, as dissoluções do 45S5, além de causar um nível de osteoindução, também podem ser seguras para as MSCs, embora de maneira dose-dependente. A visualização da F-actina foi crucial para entender a ancoragem celular no substrato, a sua integração e comportamento da dinâmica celular. De maneira imprevisível, as MSCs puderam se manter sobre o biovidro por até 90 dias, ainda exibindo padrões de citoesqueleto de células indiferenciadas. Isso mostra o potencial deste material para culturas de longo termo, em que se deseja formar um constructo mais complexo *in vitro* antes do implante.

Apesar de não encontrarmos indícios de toxicidade no modelo *in vivo*, houve moderada reação de corpo estranho, culminando na formação de uma pseudo-cápsula, o que é indesejado na maioria dos modelos de próteses ortopédicas. O fato mostra que as descrições de bioatividade que asseguravam a ligação do biovidro 45S5 com tecidos moles podem ser refutadas. Por isso, conclui-se que, tanto as propriedades mecânicas quanto as biológicas devem ser melhoradas para que os vidros biocompatíveis possam alcançar um novo patamar na medicina regenerativa. Em contrapartida, as nossas análises reiteram a segurança deste material para o uso humano.

REFERÊNCIAS

ABTO. Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2005-2015). **Registro Brasileiro de Transplantes-Veículo Oficial da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 88, 2015. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2015/rbt201508052015-lib.pdf%5Cn15>>

ALVES, Ana Paula Negreiros Nunes et al. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell and Tissue Banking**, [s. l.], p. 1–10, 2018.

ANG, Gina C. **History of skin transplantation Clinics in Dermatology**, 2005.

ANVISA. **Relatório de Avaliação dos Dados de Produção dos Bancos de Tecidos**, 2016.

BIKLE, Daniel D.; XIE, Zhongjian; TU, Chia-Ling. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. **Expert Review of Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 461–472, 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eem.12.34>>

BOELSMA, E.; VERHOEVEN, M. C. H.; PONEC, M. Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT). **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 112, n. 4, p. 489–498, 1999.

BOLAND, S. et al. TGF beta 1 promotes actin cytoskeleton reorganization and migratory phenotype in epithelial tracheal cells in primary culture. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 109 (Pt 9, p. 2207–19, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8886972>>

BOSETTI, Michela; CANNAS, Mario. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 3873–3879, 2005.

BOTTINO, Rita. Use of genetically-engineered pig donors in islet transplantation. **World Journal of Transplantation**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 243, 2015. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/2220-3230/full/v5/i4/243.htm>>

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human

keratinocyte cell line. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 106, n. 3, p. 761–771, 1988.

BREITKREUTZ, D. et al. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. **Eur.J.Cell Biol.**, [s. l.], v. 75, n. 0171–9335 SB–IM, p. 273–286, 1998.

BRODY, Herb. Regenerative medicine. **Nature**, [s. l.], v. 540, n. 7632, p. S49, 2016.

BRUNT, Keith R.; WEISEL, Richard D.; LI, Ren-Ke. Stem cells and regenerative medicine — future perspectives. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 327–335, 2012. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y2012-007>>

BUCHNER, Silvio et al. X-ray study of lithium disilicate glass: High pressure densification and polymorphism. **Journal of Non-Crystalline Solids**, [s. l.], v. 387, p. 112–116, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.01.003>>

BURKHARDT, B. R. **Treatment of capsule surrounding breast implants: DiscussionPlastic and Reconstructive Surgery**, 2005.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 2017.

CERRUTI, Marta; GREENSPAN, David; POWERS, Kevin. Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 14, p. 1665–1674, 2005.

CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer; CAMASSOLA, Melissa. Biology and applications of mesenchymal stem cells. **Science Progress**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 113–127, 2010.

CHANG, Ching-Ping et al. Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury. **Clinical science (London, England : 1979)**, [s. l.], v. 124, n. 3, p. 165–76, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22876972>>

CHEN, Q. et al. **Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts?Cell Death and Differentiation**, 2016.

CHEN, Q. Z. et al. Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds: Study of cell proliferation and scaffold degradation in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 1049–1060, 2008.

CHEN, Qizhi Z.; THOMPSON, Ian D.; BOCCACCINI, Aldo R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 2414–2425, 2006.

CHICK, L. R. **Brief history and biology of skin grafting** **Annals of Plastic Surgery**, 1988.

COBB, M. a et al. Porcine small intestinal submucosa as a dural substitute. **Surgical neurology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 99–104, 1999.

COOPER, David K. C.; EKSER, Burcin; TECTOR, A. Joseph. A brief history of clinical xenotransplantation. **International journal of surgery (London, England)**, [s. l.], v. 23, n. Pt B, p. 205–10, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919115003337>>

COWEN, Edward W. Cutaneous graft-versus-host disease. In: **Clinical and Basic Immunodermatology: Second Edition**. [s.l: s.n.]. p. 665–683.

CRISAN, Mihaela et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 301–13, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18786417>>

DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 119, n. 11, p. 2204–2213, 2006. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02932>>

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo et al. Mesenchymal stem cells and their relationship to pericytes. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 21, p. 130–156, 2016.

DE ALMEIDA, Danilo Candido et al. Epigenetic Classification of Human Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 168–175, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.01.003>>

DE BOER, H. H. **The history of bone grafts**. **Clinical orthopaedics and related research**, 1988.

DE LA FUENTE, Sebastian G. et al. Evaluation of porcine-derived small intestine submucosa as a biodegradable graft for gastrointestinal healing. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 96–101, 2003.

DENU, Ryan A. et al. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells are Phenotypically Indistinguishable. **Acta haematologica**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 85–97, 2016. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4988914/>>

DIEGIDIO, Paul et al. **Biomedical implant capsule formation lessons learned and the road ahead** *Annals of Plastic Surgery*, 2014.

DOAN, Chinh Chung et al. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. **Iranian Biomedical Journal**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 67–75, 2014.

DOBLARÉ, M.; GARCÍA, J. M.; GÓMEZ, M. J. Modelling bone tissue fracture and healing: A review. **Engineering Fracture Mechanics**, [s. l.], v. 71, n. 13–14, p. 1809–1840, 2004.

DOMINGUEZ, Roberto; HOLMES, Kenneth C. Actin Structure and Function. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 169–186, 2011. Disponível em:

<<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-042910-155359>>

DOMÍNGUEZ, Nuño. Escândalo médico atinge o Comitê do Nobel. **El País**. 2016. Disponível em https://brasil.elpais.com/brasil/2016/02/17/ciencia/1455734235_012560.html

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DU, Lili et al. Conditioned medium from hypoxia-stimulated placenta-derived mesenchymal stem cells alters the biological properties of fibroblasts in scar formation via IL-10 and STAT3/ERK signaling pathways. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 6846–6856, 2016.

DUCHEYNE, Paul et al. **Comprehensive biomaterials**. [s.l: s.n.]. v. 1

EINHORN, Thomas A. The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, [s. l.], v. 355S, p. S7–S21, 1998. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003086-199810001-00003>>

ELLIOTT, Martin J. et al. Tracheal replacement therapy with a stem cell-seeded graft: Lessons from compassionate use application of a GMP-compliant tissue-engineered medicine. **Stem Cells Translational Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 1458–1464, 2017.

ELSALANTY, Mohammed E.; GENECOV, David G. Bone grafts in craniofacial surgery.

Cranio-maxillofacial trauma & reconstruction, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 125–34, 2009. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110806>%5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3052656>>

ENGLER, Adam J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 677–689, 2006.

FAN, Mei Rong et al. Tissue engineered esophagus scaffold constructed with porcine small intestinal submucosa and synthetic polymers. **Biomedical Materials (Bristol)**, [s. l.], v. 9, n. 1, 2014.

FAUSTO, Nelson; CAMPBELL, Jean S.; RIEHLE, Kimberly J. **Liver regeneration** **Hepatology**, 2006.

FILIPPI-CHIELA, Eduardo C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 8, 2012.

FRASER, John K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 150–154, 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 230–247, 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>>

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, England, v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.

FRIEDL, Peter; GILMOUR, Darren. **Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer** **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2009.

FRIEDL, Peter; WOLF, Katarina; LAMMERDING, Jan. **Nuclear mechanics during cell migration** **Current Opinion in Cell Biology**, 2011.

GARDEL, Margaret L. et al. Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 315–333, 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.011209.122036>>

GEORGEU, Garrick A.; ROSS, David. Wounds and Scars. **Medicine**, [s. l.], p. 139–141, 2002.

GLASS, Bioactive. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. **Glass**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 1–27, 2008. Disponível em:

<http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/abstracts/q_chen.pdf>

GOMIDE, Viviane S. et al. In vitro and in vivo osteogenic potential of bioactive glass - PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells. **Biomedical Materials**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2012.

GRANERO-MOLTÓ, Froilán et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem Cells**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1887–1898, 2009.

GREEN, Edward; LUBAHN, John D.; EVANS, Jason. Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. **Journal of surgical orthopaedic advances**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 64–72, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115430>>

GREENSPAN, David C. Glass and Medicine: The Larry Hench Story. **International Journal of Applied Glass Science**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 134–138, 2016.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **J Dent Res**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 219–229, 2010.

HALDER, Sunil K.; BEAUCHAMP, R. Daniel; DATTA, Pran K. A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 509–521, 2005.

HAMILTON, David. **A history of organ transplantation: Ancient legends to modern practice**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84905518325&partnerID=tZOtx3y1>>

HAN, Tong; LIN, De Feng; JIANG, Hua. Wound natural healing in treatment of tumor-like hypertrophic scar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 474–477, 2017.

HARDEN, D. G. Cell Biology and Cell Culture Methods---A Review. In: **The Cultured Cell and Inherited Metabolic Disease: Monograph Based Upon Proceedings of the Fourteenth Symposium of The Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism**. [s.l: s.n.]. p. 3–15.

HENCH, L. L. et al. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 117–141, 1971.

HENCH, Larry L. The story of Bioglass®. In: JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE 2006, **Anais...** [s.l: s.n.]

HORN, Ana Paula et al. Conditioned medium from mesenchymal stem cells induces cell death in organotypic cultures of rat hippocampus and aggravates lesion in a model of oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Research**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 35–41, 2009.

HSU, Ya-Chieh; LI, Lishi; FUCHS, Elaine. Transit-Amplifying Cells Orchestrate Stem Cell Activity and Tissue Regeneration. **Cell**, [s. l.], v. 157, n. 4, p. 935–949, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414004164>>

HU, Li et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, 2016.

HUEBSCH, Nathaniel; MOONEY, David J. **Inspiration and application in the evolution of biomaterials** Nature, 2009.

IMPERIAL COLLEGE LONDON. **Post Project Review**. 2015. Disponível em: <<http://www3.imperial.ac.uk/estatesprojects/projectprocedures/processes/ea/2.10/2.10.05>>.

ISER, Isabele C. et al. Conditioned Medium from Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) Promotes Epithelial-to-Mesenchymal-Like Transition (EMT-Like) in Glioma Cells In vitro. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 7184–7199, 2016.

ISER, Isabele C. et al. **The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation** Medicinal Research Reviews, 2017.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). ISO 10993-5:2009: Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Communication**, [s. l.], 2009.

JONES, JR. Review of bioactive glass—from Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 4457–4486, 2013.

JONES, Julian R.; SEPULVEDA, Pilar; HENCH, Larry L. Dose-dependent behavior of bioactive glass dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 720–726, 2001.

JUNQUEIRA; CARNEIRO. **Histologia Básica - Junqueira 12ªed parte 1**. [s.l: s.n.]. v. 53

KAGAN, Richard J.; ROBB, Edward C.; PLESSINGER, Ronald T. **Human skin banking***Clinics in Laboratory Medicine*, 2005.

KAISER, LR. The future of multihospital systems. **Topics in health care financing**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 32–45, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1631884>>

KALININA, Natalia et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. **Stem Cell Research and Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, 2015.

KALLURI, Raghu. **EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells***Journal of Clinical Investigation*, 2009.

KAPUR, Sahil K.; KATZ, Adam J. **Review of the adipose derived stem cell secretome***Biochimie*, 2013.

KARASU, Bekir et al. **Bioactive Glasses**. [s.l: s.n.]. v. 4

KITAMBI, Satish Srinivas; CHANDRASEKAR, Gayathri. **Stem cells: A model for screening, discovery and development of drugs***Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2011.

KITAORI, Toshiyuki et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. **Arthritis and Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 813–823, 2009.

KLIMCZAK, Aleksandra; KOZLOWSKA, Urszula. **Mesenchymal stromal cells and tissue-specific progenitor cells: Their role in tissue homeostasis***Stem Cells International*, 2016.

KOCH, C. C. et al. Preparation of “amorphous” Ni60Nb40 by mechanical alloying. **Applied Physics Letters**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 1017–1019, 1983. Disponível em: <<http://link.aip.org/link/?APL/43/1017/1&Agg=doi>>

KOTTON, Darrell N.; MORRISEY, Edward E. **Lung regeneration: Mechanisms, applications and emerging stem cell populations***Nature Medicine*, 2014.

LACONI, E. The past, present and future of xeno-derived liver cells. **Current Opinion in Organ Transplantation**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 654–658, 2006. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L44786463%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1097/MOT.0b013e328010ab47>>

LEDERER, Susan E. Xeno: The Promise of Transplanting Animal Organs into Humans (review).

Perspectives in Biology and Medicine, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 454–456, 2001.

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**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 37, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26960535>>

LEFRÈRE, J. J.; BERCHE, P. La thérapeutique du docteur Brown-Séquard. **Annales d'Endocrinologie**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 69–75, 2010.

LIN, Hsueh-Kung et al. Understanding Roles of Porcine Small Intestinal Submucosa in Urinary Bladder Regeneration: Identification of Variable Regenerative Characteristics of Small Intestinal Submucosa. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 73–83, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2013.0126>>

LIU, Zhengzhao et al. Pig-to-Primate Islet Xenotransplantation: Past, Present, and Future. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 925–947, 2017. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.3727/096368917X694859>>

MACCHIARINI, Paolo et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. **The Lancet**, [s. l.], v. 372, n. 9655, p. 2023–2030, 2008.

MACNEIL, Sheila. **Biomaterials for tissue engineering of skin** **Materials Today**, 2008.

MAENO, Shinichi et al. **The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture** **Biomaterials**, 2005.

MAO, Angelo S.; MOONEY, David J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 47, p. 14452–9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598661>>
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4664309>>

MARSELL, Richard; EINHORN, Thomas A. **The biology of fracture healing** **Injury**, 2011.

MARTIN, Paul. Wound healing - Aiming for perfect skin regeneration. **Science**, [s. l.], v. 276, n. 5309, p. 75–81, 1997.

MARTINO, Sabata et al. **Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine** **Biotechnology**

Advances, 2012.

MATHIEU, Pattie S.; LOBOA, Elizabeth G. Cytoskeletal and Focal Adhesion Influences on Mesenchymal Stem Cell Shape, Mechanical Properties, and Differentiation Down Osteogenic, Adipogenic, and Chondrogenic Pathways. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 436–444, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2012.0014>>

MAUMUS, Marie; JORGENSEN, Christian; NOËL, Danièle. **Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes** *Biochimie*, 2013.

MAXSON, Scott et al. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **STEM CELLS Translational Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 142–149, 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.5966/sctm.2011-0018>>

MIGUEZ-PACHECO, Valentina; GREENSPAN, David. Bioactive glasses in soft tissue repair. **American Ceramic Society Bulletin**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 27–31, 2015. Disponível em: <http://ceramics.org/wp-content/uploads/2009/06/Aug_Feature.pdf>

MIRANDA, Joana P. et al. The human umbilical cord tissue-derived MSC population UCX[®] promotes early motogenic effects on keratinocytes and fibroblasts and G-CSF-mediated mobilization of BM-MSCS when transplanted in vivo. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 865–877, 2015.

MITCHISON, T. J.; CRAMER, L. P. **Actin-based cell motility and cell locomotion** *Cell*, 1996.

MOTEALLEH, Azadeh et al. Case study: Reinforcement of 45S5 bioglass robocast scaffolds by HA/PCL nanocomposite coatings. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**, Netherlands, v. 75, p. 114–118, 2017.

MUFFLY, Tyler M.; TIZZANO, Anthony P.; WALTERS, Mark D. **The history and evolution of sutures in pelvic surgery** *Journal of the Royal Society of Medicine*, 2011.

NIEHANS, Paul. **Introduction to Cellular Therapy**. New York: Pageant Books, 1960.

NISHIO, Koji; INOUE, Akira. Senescence-associated alterations of cytoskeleton: Extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. **Histochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 263–273, 2005.

NWABO KAMDJE, A. H. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cell Trafficking and Homing. In:

Mesenchymal Stromal Cells as Tumor Stromal Modulators. [s.l: s.n.]. p. 169–191.

ONZI, Giovana Ravizzoni et al. Analysis of the safety of mesenchymal stromal cells secretome for glioblastoma treatment. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 828–837, 2016.

ORSTED, H. L. et al. Best practice recommendations for the prevention, diagnosis, and treatment of diabetic foot ulcers: update 2006. **Adv Skin Wound Care**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 651–655, 2007.

Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18091117>

OSKOWITZ, Adam et al. Serum-deprived human multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are highly angiogenic. **Stem Cell Research**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 215–225, 2011.

OUYANG, Liliang et al. Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. **Biofabrication**, [s. l.], v. 8, n. 3, 2016.

P.V., Peplow. **A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration** Cytokine, 2013. Disponível em:

<<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013217284>>

PASTAR, Irena et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/wound.2013.0473>>

PLEWINSKI, Manja et al. The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation. **Dental Materials**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 1256–1264, 2013.

POWER, Carl; RASKO, John E. J. **Whither Prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration** Annals of Internal Medicine, 2008.

PRYOR, Landon et al. Review of Bone Substitutes. **Craniomaxillofacial Trauma and Reconstruction**, [s. l.], v. 2, n. 03, p. 151–160, 2009. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1224777>>

RAHAMAN, Mohamed N. et al. **Bioactive glass in tissue engineering** Acta Biomaterialia, 2011.

RATH, Subha N. et al. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. E497–E509, 2016.

RATNER, Buddy D. Reducing capsular thickness and enhancing angiogenesis around implant drug release systems. In: JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE 2002, **Anais...** [s.l: s.n.]

RATNER, Buddy D. et al. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine**. [s.l: s.n.].

RATNER, D. **Skin grafting: From here to there** *Dermatologic Clinics*, 1998.

ROBYN, Misha P. et al. Q Fever Outbreak Among Travelers to Germany Who Received Live Cell Therapy — United States and Canada, 2014. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 64, n. 38, p. 1071–1073, 2015. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6438a3.htm>>

RODERO, Mathieu P.; KHOSROTEHRANI, Kiarash. **Skin wound healing modulation by macrophages** *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2010.

RODRIGUES, C. et al. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2014. a.

RODRIGUES, Cristiano et al. New therapy of skin repair combining adipose-derived mesenchymal stem cells with sodium carboxymethylcellulose scaffold in a pre-clinical rat model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2014. b.

RUIZ-CANADA, Catalina et al. Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor-beta signalling. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, England, v. 12, n. 3, p. 808–820, 2018.

SAFFERLING, Kai et al. Wound healing revised: A novel reepithelialization mechanism revealed by in vitro and in silico models. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 203, n. 4, p. 691–709, 2013.

SAMPOGNA, Gianluca; GURAYA, Salman Yousuf; FORGIONE, Antonello. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 101–107, 2015. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213879X1500053X>>

SCHIOZER, Wandir. Banco de pele no Brasil. **Revista Brasileira de Queimaduras**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 53–55, 2012.

SCHOOP, Veronika M.; MIRANCEA, Nicolae; FUSENIG, Norbert E. Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 112, n. 3, p. 343–353, 1999.

SEO, Min Duk et al. HaCa T keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. **Biomolecules and Therapeutics**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 171–176, 2012.

SHERIDAN, R. L.; MAHE, J.; WALTERS, P. Autologous skin banking. **Burns**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 46–48, 1998.

SHIMADA Y, OKUNO M, SYONO Y, KIKUCHI M, FUKUOKA K, Ishizawa N. An X-ray diffraction study of shock-wave-densified SiO₂ glasses. **Phys Chem Min**, [s. l.], n. 29, p. 233, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00269-001-0235-1#citeas>>

SHIMIZU, Ruka; KISHI, Kazuo. Skin Graft. **Plastic Surgery International**, [s. l.], v. 2012, p. 1–5, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/psi/2012/563493/>>

SILVEIRA, Daniel Pinheiro da Machado et al. Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [s. l.], v. 28, p. 6, 2013.

SIMERS. **Banco de Pele: saiba o que fazer para ser um doador** Porto Alegre Sindicato Médico do Rio Grande do Sul, , 2016. Disponível em: <<http://www.simers.org.br/2016/04/banco-de-pele-saiba-o-que-fazer-para-ser-um-doador/>>

SOBOLEVA, A. G. et al. Genetically predetermined limitation in HaCaT cells that affects their ability to serve as an experimental model of psoriasis. **Russian Journal of Genetics**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. 1081–1089, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1022795414100123>>

SOUS NAASANI, L. I. et al. Comparison of Human Denuded Amniotic Membrane and Porcine Small Intestine Submucosa as Scaffolds for Limbal Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s. l.], 2018.

SPÖRL, Florian et al. A circadian clock in HaCaT keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 338–348, 2011.

STANCIU, Ga; SANDULESCU, I.; SAVU, B. Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface. **Journal of Biomedical &**, [s. l.], v. 1, p. 34–39, 2007. Disponível em: <[http://www3.ntu.edu.sg/bmerc/contents/JBPE/J001/JBPE_1\(1\);_34-39.pdf](http://www3.ntu.edu.sg/bmerc/contents/JBPE/J001/JBPE_1(1);_34-39.pdf)>

STOCK, W.; WOLF, K. [Capsule fibrosis in silicone implants]. **Langenbecks Archiv für Chirurgie**, [s. l.], v. 369, p. 303–8, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3807541>>

STRICKER, Jonathan; FALZONE, Tobias; GARDEL, Margaret L. Mechanics of the F-actin cytoskeleton. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 9–14, 2010.

STRIOGA, Marius et al. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 2724–2752, 2012. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2011.0722>>

TAN, Lili et al. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. **Journal of Materials Science and Technology**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 503–513, 2013.

TANAKA, Elly M. **Regeneration: If they can do it, why can't we?** Cell, 2003.

TAVIS, M. J. et al. A new composite skin prosthesis. **Burns**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 123–130, 1980.

THIERY, Jean Paul et al. **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease** Cell, 2009.

THOMAS, E. D. et al. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. **Blood**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 511–33, 1977. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751>>

THOMAS, E. DONNALL. Bone Marrow Transplantation - Past , Present and Future. **Nobel Lecture**, [s. l.], n. 5, 1990. Disponível em: <<http://www.fhcrc.org/content/dam/public/Treatment-Suport/Long-Term-Follow-Up/thomas-nobel-lecture.pdf>>

TILOCCA, A. Structural models of bioactive glasses from molecular dynamics simulations. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, [s. l.], v. 465, n. 2104, p. 1003–1027, 2009. Disponível em: <<http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.2008.0462>>

TILOCCA, Antonio. Models of structure, dynamics and reactivity of bioglasses: a review. **Journal of Materials Chemistry**, [s. l.], v. 20, n. 33, p. 6848, 2010. Disponível em:

<<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0jm01081b>>

TODA, Ayaka et al. The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 215–228, 2007. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jphs/CR0070034?from=CrossRef>>

TOGNETTI, Linda et al. Current insights into skin banking : storage , preservation and clinical importance of skin allografts. **Journal of Biorepository Science for Applied Medicine**, [s. l.], v. 5, p. 41–56, 2017.

TROPEL, Philippe et al. Functional Neuronal Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2868–2876, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2005-0636>>

TSUJI, Takashi. **Organ regeneration based on developmental biology**. [s.l: s.n.].

TU, Yiji; LINEAWEAVER, William Charles; ZHANG, Feng. TGF- β 1 -509C/T polymorphism and susceptibility to keloid disease: a systematic review and meta-analysis. **Scars, Burns & Healing**, [s. l.], v. 3, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/2059513117709943>>

TWIGGER, Alecia-Jane; SCHEEL, Christina H. Advances in stem cells and regenerative medicine: single-cell dynamics, new models and translational perspectives. **Development**, [s. l.], v. 144, n. 17, p. 3007–3011, 2017. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/lookup/doi/10.1242/dev.153569>>

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. **Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018.

VELNAR, Tomaz et al. **Biomaterials and host versus graft response: A short review** *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2016.

VIG, Komal et al. **Advances in skin regeneration using tissue engineering** *International Journal of Molecular Sciences*, 2017.

WESSMAN, S. J.; LEVINGS, R. L. Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. **Dev Biol Stand**, [s. l.], v. 99, p. 3–8, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10404869>

WESTHAUSER, Fabian et al. Three-dimensional polymer coated 45S5-type bioactive glass scaffolds seeded with human mesenchymal stem cells show bone formation in vivo. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 7, 2016.

WILSON, June et al. Toxicology and biocompatibility of bioglasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 805–817, 1981.

WOZNIAK, Michele A. et al. Focal adhesion regulation of cell behavior. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1692, n. 2, p. 103–119, 2004.

WU, Jun; IZPISUA BELMONTE, Juan Carlos. **Stem Cells: A Renaissance in Human Biology ResearchCell**, 2016.

XU, Jian; LAMOUILLE, Samy; DERYNCK, Rik. **TGF-B-induced epithelial to mesenchymal transitionCell Research**, 2009.

XU, Lihua et al. Hypoxia-induced secretion of IL-10 from adipose-derived mesenchymal stem cell promotes growth and cancer stem cell properties of Burkitt lymphoma. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [s. l.], 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26695151>>

YAMAMOTO, Takayuki et al. Skin xenotransplantation: Historical review and clinical potential. **Burns**, [s. l.], 2018.

YANG, Xu et al. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. **Bone**, [s. l.], v. 41, n. 6, p. 928–936, 2007.

YOUREK, Gregory; HUSSAIN, Mohammad a; MAO, Jeremy J. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. **ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs : 1992)**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 219–28, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4035052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

YU, Yang et al. Directing immunomodulation using biomaterials for endogenous regeneration. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 569–584, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TB02199E>>

ZEISBERG, Michael; NEILSON, Eric G. **Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitionsJournal**

of Clinical Investigation, 2009.

ZHANG, Qingyi et al. Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF- β and IFN- γ promote Treg differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], 2018. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.26436>>

ZHAO, Xiaoyin et al. Knockdown of TGF-beta1 expression in human umbilical cord mesenchymal stem cells reverses their exosome-mediated EMT promoting effect on lung cancer cells. **Cancer letters**, Ireland, v. 428, p. 34–44, 2018.

ZHENG, Chen-Xi et al. Adipose mesenchymal stem cells from osteoporotic donors preserve functionality and modulate systemic inflammatory microenvironment in osteoporotic cytottherapy. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 5215, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23098-8>>

ZHENG, Ming Hao et al. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: Possible implications in human implantation. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 61–67, 2005.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 209/17

2) DATA DO PARECER: 18/08/2017

3) TÍTULO DO PROJETO:

Avaliação da bioatividade e biocompatibilidade do biovidro com células estromais mesenquimais

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Rosângela Wink

5) RESUMO DO PROJETO:

Biomateriais são utilizados na reparação da função de tecidos, órgãos ou membros do corpo humano. Atualmente, materiais são testados não buscando apenas a resistência física, mas também a bioatividade com a células do hospedeiro. Assim, esse estudo tem o objetivo de avaliar a segurança e o potencial do biovitro como um novo biomaterial in vitro e in vivo. Para os estudos in vitro, serão isoladas células estromais mesenquimais (MSCs) de tecido adiposo de camundongos BALB/C com idade entre 2 e 4 meses. As células serão cultivadas com o biovitro e os parâmetros morfológicos, citotóxicos e de atividade celular analisados. Para os estudos in vivo, serão realizados implantes dorsais de biovitro no dorso de camundongos BALB/c, serão montados grupos que receberão o biovitro povoado com células-tronco; somente biovitro e controles. Os animais serão sacrificados e a resposta analisada no período de 1, 3 e 6 meses de permanência do implante.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Avaliar in vitro e in vivo a toxicidade, compatibilidade e atividade do biovitro povoado de células estromais mesenquimais alógenas derivadas de tecido adiposo

7) FINALIDADE DO PROJETO:

☐

Ensino

☒

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título

☒

Adequado

☐

Comentários



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Introdução

☒ Adequada ☐ Comentários

Objetivos

☒ Adequados ☐ Comentários

Relevância e Justificativa

☒ Adequados ☐ Comentários

Materiais e Métodos

☒ Adequados ☐ Comentários

Cronograma para execução da pesquisa

☒ Adequado ☐ Comentários

Orçamento e fonte financiadora

☒ Adequados ☐ Comentários

Referências Bibliográficas

☒ Adequadas ☐ Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

☒ Sim ☐ Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B ☒ C ☐ D ☒ E ☐

Justifique:

Nos procedimentos com animais será realizada cirurgia para introdução do implante de biovitro no dorso dos camundongos.

Espécie: Mus musculus

Número Amostral: 148

Redução Amostral:

☐ Sim ☐ Não

Justifique:

Substituição de Metodologia:

☒ Sim ☐ Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Aprimoramento da Metodologia:

☐

Sim

☒

Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais:

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais:

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável):

☒

Adequada

☐

Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório):

Outra instituição. Qual?

UFCSPA Laboratório de Biologia Celular



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
	Camundongo	M/F	196

12) RECOMENDAÇÃO: As pendências deverão ser respondidas em uma carta, indicando as páginas do projeto que foram alteradas (nova versão), assinadas pelo pesquisador responsável.

☒ Aprovado

☐ Com Pendência

☐ Não aprovado

Data de início 01/09/17 Data de Término 30/12/21

Comentários gerais sobre o projeto:

Todas as situações do projeto anterior que não estavam em conformidade com a normatização do CONCEA, foram atendidas.