

Universidade Federal Do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Arcabouço combinado com células-tronco mesenquimais para uso  
na engenharia de tecidos: estudo *in vivo***

**Nicole Andréa Corbellini Henckes**

Porto Alegre, 2021

Universidade Federal Do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**Arcabouço combinado com células-tronco mesenquimais para uso  
na engenharia de tecidos: estudo *in vivo***

**Nicole Andréa Corbellini Henckes**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Elizabeth Obino Cirne-Lima

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Henckes, Nicole Andréa Corbellini  
Arcabouço combinado com células-tronco mesenquimais  
para uso na engenharia de tecidos: estudo in vivo /  
Nicole Andréa Corbellini Henckes. -- 2021.  
97 f.  
Orientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. arcabouços. 2. células-tronco mesenquimais. 3.  
biocompatibilidade. 4. reconstrução tecidos. I.  
Cirne-Lima, Elizabeth Obino, orient. II. Título.

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

*“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.”*

## AGRADECIMENTOS

Idealizar e produzir uma tese de doutorado exige-nos curiosidade, dedicação, disciplina e concentração. Feliz aquele que caminha por estes trilhos e sabe que, do princípio ao fim, precisará do apoio de algumas pessoas. E, são a elas que, neste momento, agradeço com algumas palavras de carinho.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Cirne Lima, por todo suporte, recomendações e cordialidade que foram essenciais para meu crescimento. Foste, novamente, o expoente máximo, abriu-me horizontes, ensinou-me, e transmitiu experiências para que eu conseguisse alcançar os saberes.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular; aos colaboradores do Laboratório de Cerâmicas Avançadas da UFRGS; à Dr<sup>a</sup>. Fernanda dos Santos de Oliveira, que coparticipou desta minha sonhada formação; e à minha família, meu pai, minha irmã, meu marido e a Tia Lu por todo apoio emocional.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	18
LISTA DE FIGURAS .....	21
LISTA DE TABELAS .....	22
RESUMO .....	23
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO .....	27
REVISÃO DA LITERATURA .....	30
1. Estratégias para localizar e selecionar as informações .....	30
2. Mapa conceitual .....	31
3. Engenharia de tecidos .....	32
4. Terapia celular .....	35
4.1 Células-tronco mesenquimais .....	36
4.1.1 Características biológicas das células-tronco mesenquimais.....	39
4.1.2 Diferenciação das MSC .....	46
4.1.3 Células-tronco mesenquimais adipo-derivadas.....	51
4.1.4 Cultura celular .....	53
5. Arcabouço.....	56
5.1 Interações arcabouço-hospedeiro .....	59
5.2 Biocompatibilidade .....	62
5.3 Biomateriais como suporte e entrega de células-tronco.....	64
5.4 Técnica de fabricação dos arcabouços .....	67
5.4.1 <i>Electrospinning</i> .....	67

6. Inovação em biomateriais .....	69
7. Aplicação clínica .....	70
7.1 Curativo cirúrgico .....	71
7.2 Reconstruções vaginais .....	75
JUSTIFICATIVA.....	79
HIPÓTESES .....	81
OBJETIVOS.....	82
Principal .....	82
Secundários .....	82
REFERÊNCIAS .....	83
ARTIGO 1 .....	107
ARTIGO 2 .....	136
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	164
PERSPECTIVAS .....	165

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADSC	célula tronco adipo-derivada, do inglês <i>adipose-derived stem cell</i> )
ALP	fosfatase alcalina, do inglês <i>alkaline phosphatase</i>
bFGF	fator de crescimento de fibroblasto básico, do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>
C/EBP $\gamma$	intensificador de ligação com a proteína, do inglês <i>CAAT/enhancer-binding protein <math>\gamma</math></i>
Camp	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, do inglês <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
C $^{\circ}$	graus celsius
CO $_2$	dióxido de carbono
DMEM	Meio Eagle Dulbecco Modificado, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EPOX	epoxidado
EV	vesícula extracelular, do inglês <i>extracellular vesicle</i>
GM-CSF	fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos, do inglês <i>granulocyte macrophage colony-stimulation factor</i>
HGF	fator de crescimento de hepatócito, do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>
HLA	antígeno leucocitário humano, do inglês <i>human leukocyte antigen</i>



HLA-G5	antígeno leucocitário humano G5, do inglês <i>human leukocyte antigen-G5</i>
IDO	indoleamina 2, 3-dioxigenase, do inglês <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
IFN-γ	interferon gama, do inglês <i>interferon gamma</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, do inglês <i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-6	interleucina 6, do inglês <i>interleukin 6</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
LIF	fator inibidor de leucemia, do inglês <i>leukaemia inhibitory factor</i>
MCP	proteína quimiotática de monócitos, do inglês <i>monocyte chemoattract protein</i>
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1, do inglês <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEC	matriz extracelular
MHC	complexo principal de histocompatibilidade, do inglês <i>major histocompatibility complex</i>
MSC	célula-tronco mesenquimal, do inglês <i>mesenchymal stem cell</i>
NK	exterminadora natural, do inglês <i>natural killer</i>
PGE	prostaglandina 2, do inglês <i>prostaglandin 2</i>
PI	poliisopreno, do inglês <i>poly(isoprene)</i>
PLGA	poli(ácido lático-co-ácido glicólico), do inglês <i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>

PPAR $\gamma$	receptor ativado por proliferador de peroxissoma tipo gama, do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
SCF	fator de célula-tronco, do inglês <i>stem cell factor</i>
TGF-beta	fator de transformação do crescimento beta, do inglês <i>transforming growth factor beta</i>
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor alpha</i>
US\$	dólar
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial, do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marco na engenharia de tecidos .....	33
Figura 2. Estratégias empregadas na Medicina Regenerativa .....	34
Figura 3. Características particulares das MSC .....	37
Figura 4. Etapas do processo de isolamento e obtenção de ADSC.....	52
Figura 5. Etapas para produção/desenvolvimento de um biomaterial.....	58
Figura 6. Interação arcabouço-hospedeiro.....	60
Figura 7. <i>Electrospinning</i> .....	67
Figura 8. Etapas de geração e desenvolvimento de ideias .....	70
Figura 9. Estágios envolvidos no processo de reparo de tecido .....	74
Figura 10. Proposta de reconstrução vaginal.....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas. ....	30
Tabela 2. Mediadores envolvidos na função biológica das células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa. ....	38
Tabela 3. Classes de VEGF envolvida em específicas funções.....	46
Tabela 4. Efeitos e fatores químicos na cultura celular para induzir o processo de diferenciação.....	48
Tabela 5. Proteínas de superfície celular identificadas em células-tronco adipoderivadas.....	53
Tabela 6. Propriedades envolvidas com a interação arcabouço-hospedeiro. ....	60
Tabela 7. Polímeros sintéticos abordados na engenharia de tecidos. ....	65
Tabela 8. Parâmetros que influenciam a morfologia das fibras.....	68
Tabela 9. Biomateriais empregados atualmente na cirurgia plástica. ....	72

## RESUMO

**Introdução:** O desenvolvimento de novos biomateriais, combinados com componentes biológicos para aplicação na reconstrução de tecidos, requer um vasto entendimento sobre a biocompatibilidade e funcionalidade em modelo *in vivo*. Ao compreender e avaliar estas respostas biológicas, a combinação de biomateriais e terapia celular pode se tornar uma importante e valiosa ferramenta terapêutica para uso na medicina regenerativa.

**Objetivos:** Avaliar a eficácia, integração e biocompatibilidade do biomaterial poli(ácido lático-co-ácido glicólico)/poliisopreno epoxidado (PLGA/PIepox) combinado com células-tronco mesenquimais adipo-derivadas (ADSC) em modelo *in vivo*.

**Métodos:** ADSC foram obtidas de ratos Wistar e cultivadas no biomaterial PLGA/PIepox por 48 horas. A combinação de PLGA/PIepox+ADSC foi implantada no dorso subcutâneo de ratos Wistar. Cada animal recebeu 2 implantes iguais. Os animais foram divididos em 2 grupos de 9 ratos – para comparação em 7 e 14 dias pós-implante - e cada grupo foi dividido em 3 subgrupos – grupo que recebeu PLGA/PIepox+ADSC, grupo que recebeu PLGA/PIepox e grupo sham. A análise histológica por H&E foi realizada para avaliar a integração e inflamação. A imunohistoquímica permitiu avaliar a expressão de citoqueratina (AE1/AE3); verificar a densidade microvascular (CD31) e a proliferação celular (Ki67). Por final, a análise por picosirius permitiu avaliar o depósito de colágeno nos grupos pós-implante.

**Resultados:** Aos 7 dias, os animais que receberam PLGA/PIepox+ADSC demonstraram redução dos níveis de inflamação em comparação com PLGA/PIepox, bem como integração adequada do tecido, alta densidade de

microvasos e maior proliferação celular quando comparado ao grupo sham. A expressão da citoqueratina no grupo que recebeu PLGA/PIepox+ADSC revelou a manutenção do epitélio e a redução na expressão do colágeno apontando para uma possível redução na formação de cicatriz. Aos 14 dias pós-implantação, o grupo que recebeu PLGA/PIepox+ADSC mostrou níveis semelhantes de coloração de CD31, Ki67 e AE1/AE3 em comparação com o grupo que recebeu PLGA/PIepox e sham.

**Conclusão:** Demonstramos que o arcabouço PLGA/PIepox é capaz de fornecer um sistema de entrega eficaz para ADSC no tecido hospedeiro e, esta combinação, foi capaz de aumentar a funcionalidade do tecido e demonstrar uma adequada biocompatibilidade fornecendo uma nova ferramenta terapêutica para o reparo de tecidos.

**Palavras-chave:** arcabouços; células-tronco mesenquimais; biocompatibilidade; reconstrução tecidos.

## ABSTRACT

**Introduction:** The development of new biomaterials, combined with biological components for application in tissue reconstruction, requires a high understanding of biocompatibility and functionality in *in vivo* model. Combining cell therapy with tissue engineering, one of the most important steps is cell organization, which is conducted by cell migration and proliferation to bring functionality to the neotissue. Thus, the combination of biomaterials and cell therapy can become an important therapeutic tool in regenerative medicine.

**Objectives:** To evaluate and prove the efficacy, integration and biocompatibility of the poly (lactic acid-co-glycolic acid)/Poly(isoprene) epoxidized (PLGA/PIepox) biomaterial combined with adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC) in *in vivo* model.

**Methods:** ADSC were obtained from Wistar rats and seeded on PLGA/PIepox for 48 hours. The combination of PLGA/PIepox+ADSC was implanted by dorsal subcutaneous. Each animal received 2 equal implants. The animals were divided into 2 groups of 9 rats - for comparison at 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> post-implantation - each group was divided into 3 subgroups - group that received PLGA/PIepox+ADSC, group that received PLGA/PIepox and sham group. Histological analysis by H&E was performed to verify integration and inflammation level. Immunohistochemistry staining was performed to evaluate the cytokeratin expression (AE1/AE3), microvascular density (CD31) and cell proliferation (Ki67). Finally, picrosirius analysis allowed to evaluate the collagen deposition in the groups post-implantation.

**Results:** At 7<sup>th</sup> day, animals that received PLGA/PlepoX+ADSC demonstrated reduced levels of inflammation compared to PLGA/PlepoX, as well as adequate tissue integration, high microvessel density and greater cell proliferation when compared to sham group. Cytokeratin expression in the group PLGA/PlepoX+ADSC revealed a maintenance of the epithelium and a reduction in collagen expression resulted in a possible reduction in scar formation. At 14<sup>th</sup> day post-implantation, the PLGA/PlepoX+ADSC group presented similar levels of staining for CD31, Ki67 and AE1/AE3 compared to the PLGA/PlepoX and sham group.

**Conclusion:** We demonstrated that the PLGA/PlepoX scaffold can provide an effective delivery system for ADSC in host tissue and this combination was able to increase tissue functionality and bring a suitable biocompatibility for a new therapeutic approach in tissue repair.

**Keywords:** scaffolds; mesenchymal stem cells; biocompatibility; tissue reconstruction.



## INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, observam-se progressos no desenvolvimento de tecnologias inovadoras e opções de tratamentos envolvendo a saúde pública. Dentre as diferentes alternativas, o desenvolvimento de substitutos biológicos, o qual envolve engenharia de tecidos e, sinonimamente, a medicina regenerativa, surge como uma abordagem terapêutica potencial para atender às necessidades futuras (HAN et al., 2020; UDE et al., 2018). Atualmente, os custos relacionados com engenharia de tecidos têm representado cerca de 8% dos gastos gerais com saúde e estima-se que os investimentos já tenham ultrapassado US\$ 240 milhões por ano (PLACE et al., 2009; LYSAGHT et al., 2008).

A promessa terapêutica, envolvendo a medicina regenerativa, baseia-se no potencial e na capacidade de regenerar e substituir órgãos e tecidos lesados. Esta abordagem foi, inicialmente, descrita diante de três principais estratégias i) uso de células; ii) uso de fatores de crescimento; iii) combinação destes com biomateriais. Desde então, a engenharia de tecidos tem evoluído significativamente em cada um de seus pilares - células, moléculas de sinalização e biomateriais (CARVALHO et al., 2013; DZOBO et al., 2018).

Embora muitos esforços têm buscado por melhores abordagens diante destas estratégias, existem, ainda, muitos desafios na tentativa de aprimorar esta promessa terapêutica. Atualmente, os desafios envolvem a falta de uma fonte de células que sejam imunofuncionais e biocompatíveis, bem como biomateriais com propriedades mecânicas, químicas e biológicas adequadas para que possam responder de forma positiva às demandas do receptor (KHADEMHOSEINI et al., 2016).

Nesta perspectiva, as células-tronco mesenquimais (MSC) tem sido um dos principais tipos celulares utilizados na engenharia de tecidos. A células-tronco mesenquimal, devido ao seu principal efeito de imunomodulação, liberado de forma parácrina, é o tipo celular mais promissor e mais utilizado na abordagem científica experimental e clínica, e se destaca como potencial alternativa terapêutica com aplicação na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, de forma a contribuir positivamente no reparo de tecidos e órgãos (TSIAPALIS et al., 2020). A partir deste potencial terapêutico, pesquisadores têm se empenhado em apresentar, cada vez mais, melhores resultados à prática clínica, o que tem refletido diretamente em novas oportunidades de tratamento às pacientes afetadas por doenças congênitas ou adquiridas (COSSU et al., 2018).

Diante destas perspectivas, a estratégia combinada de biomateriais, que apresentam propriedades bioquímica e biofísica adequadas para servir como uma superfície bio-adesiva para cultura de células, e células-tronco mesenquimais, são as principais ferramentas empregadas nas estratégias de reparo e reestruturação de tecidos (XU et al., 2019). Independentemente do tipo de biomaterial, em termos de composição, todos estes devem, indispensavelmente, dar suporte para a proliferação, manutenção, e diferenciação das células cultivadas sobre sua superfície, e, finalmente, devem ser projetados com formato e estrutura adequada para serem implantados na região de interesse dos pacientes, a fim de fornecer e/ou recuperar a biofuncionalidade do tecido ou órgão lesado (KEANE et al., 2014).

Uma vez que abordada a combinação de células e biomateriais na medicina regenerativa, a realização de etapas de cultura de células em sistemas *in vitro* adequados são necessários, para que as células possam aderir, proliferar e

diferenciarem-se integradas ao biomaterial, para que na sequencia sejam transplantados. Após o implante do biomaterial combinado com as células, em alguns casos, dependendo da composição do biomaterial, ocorre a degradação deste; porém, as células continuam ativas, expressando e secretando moléculas, como as de matriz extracelular (MEC), e oferecendo suporte para a restauração da lesão (DAN et al., 2020).

A partir do desenvolvimento do biomaterial PLGA/PlépoX (GUERRA et al., 2018; CARRASAI et al., 2021), registrado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), sob o número BR102018016252-7 (2018), realizou-se o estudo *in vitro*, por nosso grupo (HENCKES et al., 2019), visando comparar a possibilidade de associação do biomaterial PLGA/PlépoX e outros biomateriais com células-tronco mesenquimais adipo-derivadas (ADSC). O estudo *in vitro* mostrou que o PLGA/PlépoX era o biomaterial que melhor interagiu com as ADSC e que este exercia um efeito positivo, de forma a oferecer condições e suporte para a multiplicação e interação destas com o biomaterial (HENCKES et al., 2019). Os dados mencionados acima, obtidos com os estudos *in vitro*, sugeriam que a combinação de PLGA/PlépoX com células ADSC pareciam ser altamente promissoras para uso na medicina regenerativa. Assim, esta etapa da pesquisa teve como objetivo avaliar o uso da combinação de PLGA/PlépoX+ADSC em modelo *in vivo*, a fim de avaliar sua biocompatibilidade e a influência destes sobre os processos de regeneração de tecidos e reestabelecimento das características funcionais de tecidos.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

A revisão da literatura centrou-se nas seguintes palavras-chave: i) tissue engineering; ii) mesenchymal stem cells adipose-derived; iii) tissue reconstruction. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, SCIELO e LILACS.

Em relação ao termo “tissue engineering” foram encontrados 150281 artigos no PubMed, 433 artigos no LILACS, e 245 artigos no SCIELO; já em relação ao termo “mesenchymal stem cells adipose-derived” foram encontrados 73049 artigos no PubMed, 59 no SCIELO, 239 no LILACS. Já o termo “tissue reconstruction” foram encontrados 160737 artigos no PubMed, 446 no SCIELO, e 1001 no LILACS.

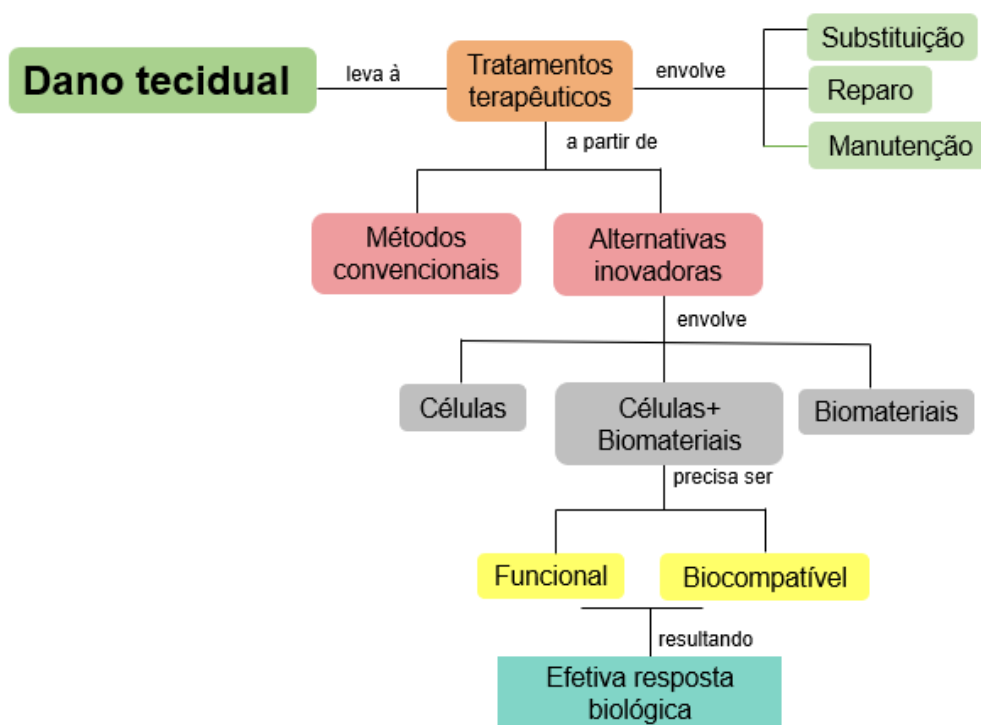
Cruzando as palavras-chave “tissue engineering AND mesenchymal stem cells adipose-derived” foram encontrados 7 artigos no PubMed, 28 no LILACS, e 0 no SCIELO; e ao cruzar os termos “tissue reconstruction AND mesenchymal stem cells adipose-derived” foi encontrado 1 artigo no PubMed, 0 no LILACS, e 0 no SCIELO. A Tabela 1 resume a estratégia de busca das referências relacionada às bases que fundamentam o objetivo do estudo.

Tabela 1. Estratégia de busca de referências bibliográficas.

<b>PALAVRAS-CHAVE</b>	<b>PubMed</b>	<b>SCIELO</b>	<b>LILACS</b>
“tissue engineering”	150281	245	433
“mesenchymal stem cells adipose-derived”	73049	59	239

"tissue reconstruction"	160737	446	1001
"tissue engineering and mesenchymal stem cells adipose-derived"	7	0	28
"tissue reconstruction and mesenchymal stem cells adipose-derived"	1	0	0

## 2. Mapa conceitual



A ocorrência do dano tecidual, em alguns casos, requer a adição de algum tratamento específico para que ocorra a recuperação total do tecido. Para tanto, existem algumas alternativas propostas como opções de tratamentos que incluem métodos convencionais até métodos inovadores com alto potencial terapêutico. Esta última, é baseada no uso de células-tronco que, alternativamente, pode ser

combinada com biomateriais. Nestas circunstâncias, PLGA/PlépoX apresenta-se como potencial terapêutico na combinação com células-tronco mesenquimais para utilização na medicina regenerativa.

### **3. Engenharia de tecidos**

Em busca por alternativas para melhorar, manter ou reestruturar a funcionalidade da estrutura biológica (LANGER & VACANTI, 1993) de órgãos e tecidos patologicamente alterados, a engenharia de tecidos vem se destacando devido ao seu promissor papel, a qual combina a engenharia com princípios biológicos no desenvolvimento de estruturas artificiais que simulem e assemelham ao tecido/órgão nativo (ZAMBON et al., 2020; FATHI-ACHACHELOUEI et al., 2019).

Desde as últimas décadas, a engenharia de tecidos tornou-se uma das principais ferramentas empregadas na medicina regenerativa, empregada como uma ferramenta fundamental às necessidades médicas atualmente não atendida e, devido a isso, essa abordagem vem sendo estudada e transformada com as tecnologias que estão surgindo (BAMBOLE et al., 2016; FURTH et al., 2014). Inicialmente, a abordagem envolvendo a engenharia de tecidos era baseada em criar tecidos substitutos em modelo *in vitro* para posterior implante em modelo *in vivo* (ELLIS, 2013).

Com o passar dos anos, em meados da década de 90, houve uma evolução nesta abordagem que passou a incluir diferentes estratégias para reconstruir tecidos para serem implantados em modelo *in vivo*, e, estas estratégias, envolveram arcabouços que serviriam de suporte e entrega das células no tecido hospedeiro

com a finalidade de regenerar o tecido. Isto foi um marco no surgimento da era da medicina regenerativa, e, a partir destes avanços, as pesquisas envolvendo a restauração das funções biológicas tornaram-se emergentes (Figura 1) (BADYLAK et al., 2010).

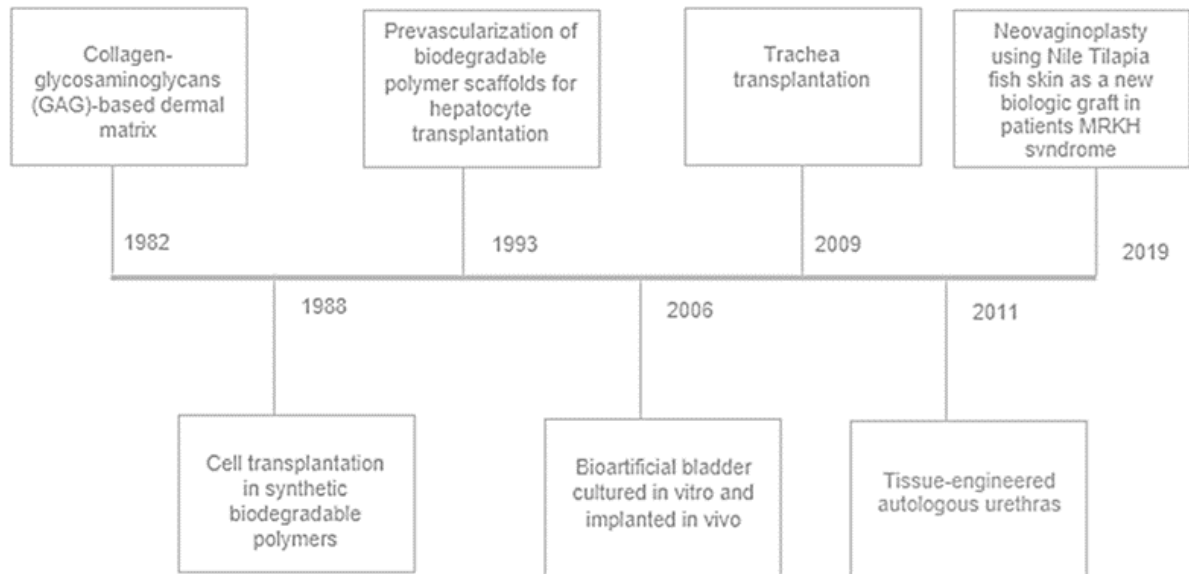


Figura 1. Marco na engenharia de tecidos. Fonte: autor.

Além destes avanços, outras abordagens foram sendo investigadas e envolveram técnicas como implantação de células diretamente no tecido lesado; utilização de arcabouços sem células, os quais dependem da capacidade natural do corpo para regenerar e, posteriormente, arcabouços carregados com células serviriam de suporte e entrega de células especificamente no local lesado (Figura 2) (PINA et al., 2019; KOH et al., 2004).

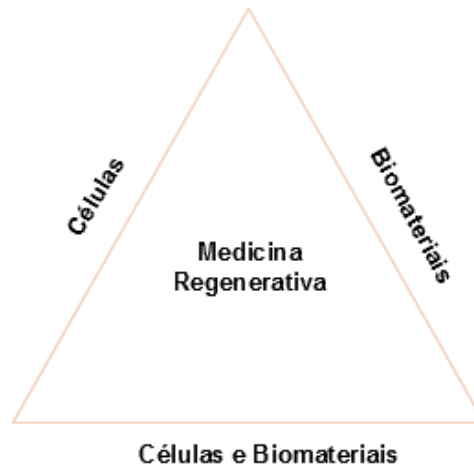


Figura 2. Estratégias empregadas na Medicina Regenerativa. Fonte: autor.

Uma vez que estes conceitos e abordagens têm sido aplicados na prática experimental, as estratégias requerem a avaliação de muitos aspectos que envolvem uma fonte celular adequada (alogênicas ou autólogas), a qual tem sido levantada como componente principal, e um arcabouço com características específicas desejáveis para apoiar a cultura, proliferação, migração e diferenciação de células (GHOSH et al., 2016; SIERRA-SÁNCHEZ et al., 2021). O potencial uso das células-tronco na engenharia de tecidos é destacado devido as vantagens em termos éticos e econômicos (CADDEO et al., 2017). A partir destas características, de maneira geral, a engenharia de tecidos tem sido cada vez mais compreendida e melhorada para elucidar os mecanismos de regeneração de tecidos. E, nestas condições, a melhoria constante frente às tecnologias inovadoras, que se concentram principalmente em novos métodos de produção de arcabouços que combinam células-tronco resultando em um alto rendimento, tem cada vez mais impactado o futuro da engenharia de tecidos (BERTHIAUME et al., 2011).



#### **4. Terapia celular**

A terapia baseada em células tem provocado um grande impacto por fornecer novas alternativas terapêuticas para doenças que, anteriormente, eram consideradas não-tratáveis e, até mesmo, sub-tratadas ou ignoradas, e, devido a isto, vem ganhando destaque no meio científico ao longo dos últimos anos, uma vez que, quando empregada, tende a responder de forma efetiva às condições fisiológicas (FACKLAM et al., 2020; ALESSIO et al., 2020).

A abordagem envolvendo terapia celular, está relacionada com a introdução de células saudáveis, as quais desempenham atividades biológicas desejáveis, em tecidos que apresentam alguma patologia (SAVITZ et al., 2007). Esta terapia é encorajada pelo emprego de células já diferenciadas ou, preferencialmente, células-tronco indiferenciadas, as quais tem a capacidade de diferenciarem-se conforme a circunstâncias (SAMPOGNA et al., 2015).

O paradigma da terapia celular apresenta algumas características próprias das células, as quais envolvem a alta capacidade de proliferação, facilidade de manipulação, capacidade de migrar e integrar ao tecido alvo do hospedeiro, bem como interagir ao tecido circundante. Estas características destacam o forte potencial e a grade procura por tratamentos que envolvem a terapia baseada em células e este potencial terapêutico pode ser atribuído ao mecanismo de ação da célula (NADIG et al., 2009; VIZOSO et al., 2017).

Embora a terapia celular tenha demonstrado grande potencial em aplicação clínica (KURAITIS et al., 2014), é importante, ao abordar essa alternativa terapêutica, desenvolver protocolos padrões no que diz respeito a preparação e caracterização das células, bem como avaliação de seu potencial efeito biológico.

Esta comprovação sobre a funcionalidade biológica das células é recomendada anteriormente a introdução à prática clínica a fim de que apresente os potenciais benefícios esperados (SAMSONRAJ et al., 2017).

#### **4.1 Células-tronco mesenquimais**

Células-tronco mesenquimais (MSC), as quais representam uma classe de células-tronco adultas, surgiu como um dos mais promissores e potenciais tipos de células utilizados na engenharia de tecidos e na terapia baseada em células e, sua segurança, viabilidade e eficácia para uma variedade de condições patológicas, continuam constantemente sob investigação (CHEN et al., 2019; SOTIROPOULOU et al., 2006).

Apesar das MSC terem sido isoladas inicialmente de medula óssea na década de 1970 pelo grupo de pesquisa de Friedenstein (FRIEDENSTEIN et al., 1970), posteriormente, buscou-se por populações similares com morfologia de fibroblasto e, a partir de então, sugeriram novas fontes de obtenção de MSC. A morfologia esperada foi observada em diferentes tipos de tecidos obtidos, que envolviam tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, polpa dentária, entre outros. Diante destes avanços, foi possível compreender e explorar melhor as fontes de obtenção destas células e também validar a ideia de que as células-tronco mesenquimais estariam presentes na maioria dos tecidos e órgãos que compõe o organismo. Por meio deste pressuposto, a comunidade científica pode avançar com os estudos e explorar ainda mais estas e outras fontes de obtenção possibilitando

uma melhor compreensão sobre suas funções biológicas (SOUZA et al., 2010; LAROYE et al., 2020).

Assim, explorar os mecanismos pelas quais as MSC atuam como potencial terapêutico na medicina regenerativa tornaram-se instigante devido às suas características biológicas funcionais, que envolvem modulação do sistema imunológico, secreção de mediadores (fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas), auto-renovação, multiplicação e diferenciação (Figura 3) (KO et al., 2013; MAXSON et al., 2012; GUGJOO et al., 2020).

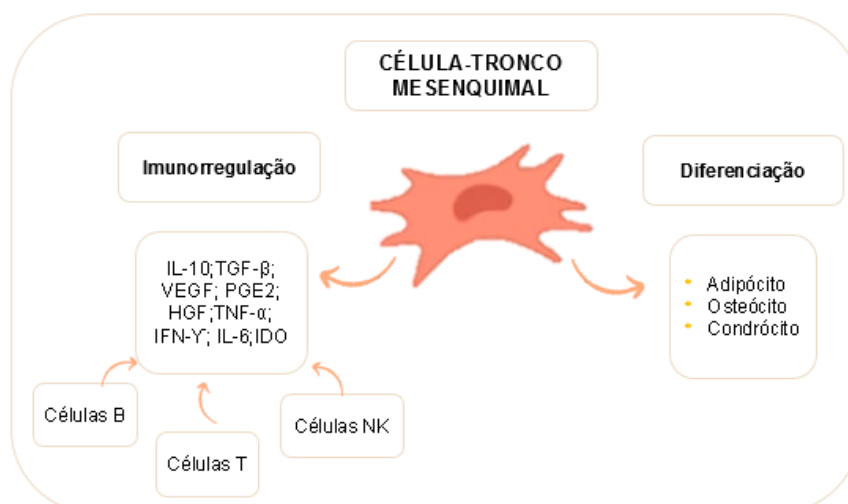


Figura 3. Características particulares das MSC. Fonte: autor.

Ainda, dentre as características potencialmente atraentes, encontra-se a plasticidade e o efeito parácrino, bem como efeitos anti-fibróticos, anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, pró-angiogênicos, neuroprotetores, antibacterianos e quimio-atraentes (Tabela 2) (SONG et al., 2020; KUMAR et al., 2019). Diante das propriedades exercidas pelas MSC, importante, destaca-se sua capacidade de exercer seu efeito imunomodulatório de uma maneira independente do antígeno

leucocitário humano (HLA), tornando cada doador de MSC um potencial doador universal (LOPES et al., 2020).

Tabela 2. Mediadores envolvidos na função biológica das células-tronco mesenquimais.

<b>EFEITO</b>	<b>MEDIADORES</b>
Anti-apoptótico	VEGF, HGF, IGF-I, TGF-beta, GM-CSF
Angiogênico	bFGF, VEGF, MCP-1, IL-6
Anti-fibrótico	bFGF, HGF,
Estímulo proliferativo	SCF, LIF, IL-6, ANGIOPOETINA-1
Imunomodulação	PGE-2, TGF beta, HGF, HLA-G5, LIF

Fonte: autor.

A fim de melhorar o reparo de órgãos e tecidos lesados, ao empregar a terapia baseada em células, neste caso, especificamente, células-tronco mesenquimais, é sabido que ocorrem importantes interações destas células com tecido alvo a partir de uma série de eventos envolvendo sinalizações biológicas específicas que irão remodelar o ambiente desejado (DHOWRE et al., 2015). Neste processo de sinalização, a maneira como as células-tronco irão se comunicar com o ambiente que serão inseridas, dependerá da forma como será introduzida no tecido, bem como de sua arquitetura e do tipo de sinalização (XIN et al., 2016).

Embora existam muitos aspectos referentes as características e propriedades deste tipo celular, em meados de 2006, foi estabelecida uma base de protocolos específicos para o uso das MSC, que envolvem a necessidade de desenvolver testes em modelos *in vitro*, demonstrando a aderência das células ao plástico; capacidade de diferenciarem-se em osteócito, condrócito e adipócito; e positivar a expressão dos marcadores específicos de superfície celular, como por exemplo

CD73, CD90 e CD105 e negativar a expressão de marcadores como CD34, CD45 e CD11b (LAROYE et al., 2020; VISWANATHAN et al., 2019).

#### **4.1.1 Características biológicas das células-tronco mesenquimais**

Na última década, o desenvolvimento da terapia celular baseada em MSC têm influenciado a busca por conhecimento aprofundados sobre suas características biológicas que contribuem e estão associadas diretamente com seu efeito terapêutico no reparo de tecidos e órgãos (KUSUMA et al., 2017). Diante das particularidades envolvendo o mecanismo de ação das MSC, torna-se necessário compreender quais são os principais fatores biologicamente ativos que estas células expressam e liberam no meio em que serão condicionadas e induzidas a restaurar o tecido/órgão alvo (GNECCHI et al., 2008).

O destino alvo na regeneração de tecidos das MSC será determinado pela sua interação com o ambiente. Este ambiente, por sua vez, é composto por matriz extracelular e fatores de sinalização, que, em combinação com características intrínsecas das células-tronco, definem suas propriedades e potencialidades (CHAGASTELLES et al., 2011). Logo, as características biológicas das MSC é o que permitirá sua sobrevivência no local da lesão. Dentre elas, a sinalização parácrina tem sido o principal mecanismo pelas quais as MSC agem nestas condições cuja recuperação tecidual é necessária. Considerando sua aplicação e este principal efeito, é esperado que ocorra uma redução nos níveis inflamatórios, bem como um aumento na formação de novos vasos, ou seja, no processo angiogênico (MAXSON et al., 2012).

Biologicamente, as MSC têm a capacidade de dividir-se de forma assimétrica a fim de produzir dois tipos de células-filhas. Enquanto uma permanece como uma célula-tronco auto-renovadora, a outra se torna uma célula precursora que entra em uma via de proliferação e diferenciação resultando na formação de um tipo de célula madura (CHAGASTELLES et al., 2011).

A partir das características biológicas das MSC, que envolvem a capacidade de secretar diversos fatores promovendo a reparação bem-sucedida em razão do seu potencial de diferenciação, secreção de fatores tróficos que auxiliam na remodelação do tecido, indução da neovascularização e propriedade imunomoduladora, elas são qualificadas para uso na terapia celular (SADEGHI et al., 2020; DE SOUZA FERNANDEZ et al., 2016). A seguir, serão exploradas, especificamente, cada uma de suas propriedades.

#### **4.1.1.1 Efeito parácrino**

A sinalização celular é um processo complexo que ocorre entre as células e auxilia em todas as suas atividades, incluindo proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Essa sinalização, dependendo da distância e do contato celular, pode ocorrer pela sinalização parácrina (DOORN et al., 2012). A liberação de substâncias, provenientes das MSC, pode impactar as atividades de outras células no microambiente local, sendo que até 80% do efeito terapêutico das MSC ocorre através das ações mediadas pelo efeito parácrino (KUSUMA et al., 2017; COSTA et al., 2020).

O efeito parácrino ocorre a partir de um estímulo, ou seja, sinalização com células vizinhas, em curtas distâncias, resultando na liberação de moléculas biologicamente bioativas, promovendo angiogênese, a regeneração do tecido, a inibição de fibrose, apoptose e inflamação, conseqüentemente, exercendo efeitos benéficos ao tecido/órgão alvo. Importaneamente, um dos métodos pelos quais as células irão se comunicar e trocar informações envolverão a secreção de fatores, que por sua vez irão induzir as alterações fenotípicas e funcionais nas células receptoras. Este mecanismo de ação das MSC, a partir da sinalização parácrina, tem sido observado como efeito primário dentre seus principais efeitos terapêuticos que elas conduzem (KUSUMA et al., 2017; VENERUSO et al., 2019; KOBOLAK et al., 2016; LINERO et al., 2014).

Os mediadores parácrinos, além de agir diante destas circunstâncias, na qual há uma condição patológica, são capazes de influenciar a biologia das células adjacentes em condições normais. Em resposta ao tecido/órgão lesado, as células-tronco podem expressar e secretar importantes fatores parácrinos, exercendo efeito autócrino na própria célula, de tal forma que são capazes de aumentar a sobrevivência celular e influenciar a auto-renovação e o crescimento celular ativando mecanismos endógenos de reparo e regeneração (GNECCHI et al., 2008). O efeito parácrino liberado pelas MSC, a fim de manter a capacidade de auto-renovação, ocorre através da secreção de prostaglandin 2 (PGE2) para o ambiente extracelular, e, por sua vez, aumenta a proliferação celular e neovascularização a partir do aumento da secreção de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF). Logo, a liberação de VEGF será responsável pela

melhora da sobrevivência celular e efeito parácrino das células (KUMAR et al., 2019; LEE et al., 2020).

Ainda, existem dois aspectos complexos para serem considerados, que envolve como a informação é recebida pela célula para alterar a expressão de fatores parácrinos e, o segundo aspecto é sobre os mecanismos que controlam a liberação subsequente de proteínas da célula (KUSUMA et al., 2017).

Recentemente, como um dos mais promissores tipos celulares abordados, as ADSC têm sido, importantemente, usadas por liberarem importantes fatores parácrinos que incluem interleucina (IL) -6, IL-8, proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), VEGF-A, VEGF-D e leptina, entre outros (KUSUMA et al., 2017).

A sinalização parácrina proveniente das MSC, pode também ocorrer devido a presença de vesículas extracelulares (EV) que são secretadas de forma autócrina pelas MSC, que, por sua vez, são responsáveis por transferir proteínas, lipídios e material genético para células receptoras (HARRELL et al., 2018; LIANG et al., 2014). Os potenciais fatores terapêuticos das MSC encontradas nestas pequenas vesículas poderiam ajudar a superar os obstáculos regulatórios e de segurança da aplicação celular (BEEKEN et al., 2020; RATAJCZAK et al., 2012).

#### **4.1.1.2 Efeito imunomodulatório**

As MSC têm sido amplamente empregadas na engenharia de tecidos uma vez que, quando combinadas, são capazes de induzir grandes quantidades de fatores imunomodulatórios para controlar o processo de regeneração de todo o



tecido, porém esta interação ocorre de forma complexa. As MSC desempenham um importante papel de regulação no sistema imunológico inato e adaptativo. Inicialmente, a regulação ocorre por meio do contato e da secreção celular, finalmente, atuando diretamente nas células do sistema imunológico a fim de inibir sua atividade. A ativação das MSC é realizada por meio das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Uma vez ativadas, as MSC são capazes de inibir a proliferação e ativação de células T, além de secretar os fatores imunomoduladores PGE2, indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), IL-6 e IL-10 (LI et al., 2019; WU et al., 2017; AYALA-CUELLAR et al., 2019; QU et al., 2018).

As MSC são capazes de interagir com diferentes tipos de células imunes, incluindo células B, células T, células dendríticas, células 'exterminadoras naturais' (NK - Natural Killer), neutrófilos e macrófagos. O mecanismo pelo qual ocorre a interação entre as células depende diretamente do contato e da secreção de fatores imunológicos necessários para induzir a imunossupressão pela qual será, por sua vez, regulada pelas MSC (WANG et al., 2018).

Uma vez abordada a engenharia de tecidos, a partir da combinação de MSC e biomateriais, este arcabouço – quando implantado, geralmente, apresenta propriedades imuno-estimuladoras. O arcabouço implantado, por sua vez, é reconhecido pelo hospedeiro como corpo estranho, desencadeando uma reação que habilita o recrutamento dos monócitos para o local de implantação a partir de sinais provenientes das interleucinas 4 e 1. Quando identificadas as moléculas de superfície do material que foi implantado, os macrófagos fagocitam corpos estranhos e formam células gigantes de corpo estranho, secretando agentes degradantes (como superóxido e radicais livres) para a lesão (LI et al., 2019; SHI et al., 2010).

As características que medeiam a função imunomoduladora das MSC, também envolvem a baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, os quais impedem a apoptose das MSC, e não expressam moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD40, CD80 e CD86 (HADDAD et al., 2014). A partir destas características, as MSC são consideradas células imunes privilegiadas, devido à ausência da expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) – do complexo principal de histocompatibilidade classe MHC II – por serem capazes de modular o processo de rejeição que ocorre após o implante (YAGI et al., 2010; AL-GHADBAN et al., 2020).

Outro fato importante, é a ocorrência do processo inflamatório durante a regeneração do tecido, o qual é um processo contínuo que envolve a interação das células-tronco com o sistema imunológico. As quantidades e os diferentes mediadores inflamatórios presentes no microambiente durante todo o processo de reparo, desde a regressão da fase inflamatória até a fase de regeneração, são os responsáveis pela ativação dos efeitos imunomoduladores gerado pelas MSC (LI et al., 2019; WANG et al., 2014) .

De maneira geral, as MSC são capazes de inibir a produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , bem como são capazes de aumentar a quantidade de IL-10, limitando assim a proliferação das células T. Além disso, as MSC também têm a capacidade de inibir a proliferação das células NK e a citotoxicidade via PGE2, bem como monócitos e células dendríticas maduras (regulando negativamente a expressão de superfície de moléculas CD80, CD86 e MHC de classe II), tornando-os mais suscetíveis à degradação por células NK (YI et al., 2012; SADEGHI et al., 2020).

#### **4.1.1.3 Efeito angiogênico**

A pesquisa desenvolvida no campo da medicina regenerativa tem se dedicado a explorar o envolvimento das MSC no processo de angiogênese que ocorre na reparação de tecidos (MAZINI et al., 2020).

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Este evento desempenha um papel fisiológico importante na cicatrização de feridas e no reparo de tecidos, resultando em uma atividade central para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos (LARGO et al., 2011).

Considerando a potencial efeito das MSC, estas são capazes interagir com células hospedeiras, como por exemplo células endoteliais e macrófagos, a fim de aumentar a secreção de MCP-1 e VEGF que, por sua vez, estimulam a formação de novos vasos durante a fase proliferativa. Outro fato relevante nesta abordagem, é que as MSC agem de tal forma por meio da secreção parácrina e, não apenas fornecem células para a formação do neovaso mas, também, fornecem fatores de crescimento e regulam o processo (MAZINI et al., 2020).

Na abordagem de engenharia de tecidos, considerando a combinação de biomateriais e MSC, o processo de angiogênese ocorre de maneira espontânea em razão de uma resposta inflamatória induzida pelo procedimento cirúrgico. Além disso, as células cultivadas no biomaterial são capazes de estimular a liberação de fatores pró-angiogênicos. Os fatores pró-angiogênicos são capazes de interagir com uma variedade de receptores celulares para ativar células endoteliais de seu estado quiescente, resultando na produção de metaloproteinases de matriz (MMPs), migração e proliferação com cada função em direção à formação de uma nova rede vascular (DHAVALIKAR et al., 2020). Assim, a progressão e o desenvolvimento dos

vasos sanguíneos nos tecidos transplantados são estimulados após a indução de vias de sinalização pró-angiogênicas (SABERIANPOUR et al., 2018).

Dentre os diferentes fatores envolvidos na angiogênese, um dos principais é o VEGF, o qual é responsável pela proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais (DEBSKI et al., 2020; SONG et al., 2016).

Importantemente, explorar sobre o principal fator envolvido neste processo torna-se necessário. O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que é distribuído em diferentes classes (A – D) (Tabela 3). Dentre estas diferentes classes, o VEGF-A é considerado o mais amplamente compreendido de todos. É uma citocina potente e multifuncional que exerce seu efeito no endotélio ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes a família de receptores tirosina quinase (LARGO et al., 2011; VALIATTI et al., 2011).

Tabela 3. Classes de VEGF envolvida em específicas funções.

CLASSE DE VEGF	FUNÇÃO ENVOLVIDAS
A	Angiogênese; ↑ migração das células endoteliais; ↑ mitose das células endoteliais; ↑ atividade das metaloproteinases; Quimiotático para macrófagos e granulócitos;
B	Angiogênese embrionária;
C	Linfangiogênese;
D	Desenvolvimento da vasculatura linfática;

Fonte: autor.

#### 4.1.2 Diferenciação das MSC

As MSC têm o grande potencial de se diferenciar em diferentes tipos celulares, incluindo adipócitos, osteócito e condrócitos (Tabela 4). A eficácia da diferenciação das MSC, na tentativa de regenerar tecidos lesados, requer a capacidade de manter constante este processo. Logo, seu potencial de diferenciação tem contribuído de forma positiva, aumentando o interesse por essas células, promovendo novas perspectivas clínicas sobre sua função. Este processo de diferenciação ocorre de forma complexa a partir da sinalização parácrina, que por sua vez, inicia a liberação de citocinas, fatores de crescimento, moléculas de matriz extracelular e fatores de transcrição que permitem a diferenciação das células. Logo, o processo completo é alcançado a partir de uma série de fatores ativados e modificações epigenéticas que conduzem a transcrição do gene responsável pelo destino único da célula (GARG et al., 2017; SQUILLARO et al., 2016; MEYER et al., 2016; WU et al., 2017).

O processo de diferenciação gera diferentes transformações, tanto fenotípicas quanto metabólicas. As primeiras etapas da diferenciação, envolvem a redução da expressão e a ativação de alguns genes que resultarão em uma alteração morfológica da célula. Uma vez diferenciadas, as MSC são capazes de expressar todos os genes característicos do tipo de célula diferenciada. Logo, as MSC demonstram ser responsivas a seus ambientes, adaptando sua função e fenótipo às circunstâncias que a envolvem (ROBERT et al., 2020; PITTENGER et al., 2019; DZOBO et al., 2016).

Importantemente, a aplicação terapêutica das MSC depende de sua capacidade de se replicar *in vitro* e capacidade de diferenciação que pode regenerar células, tecidos ou órgãos danificados (YANG et al., 2018).

Tabela 4. Efeitos e fatores químicos na cultura celular para induzir o processo de diferenciação.

COMPOSTOS	EFEITO	DIFERENCIAÇÃO
$\beta$ -glicerofosfato, dexametasona e ácido ascórbico	Aumento deposição de cálcio e alcalinidade	Osteócito
Insulina, indometacina e dexametasona	Aumento deposição de gordura no citoplasma	Adipócito
Ácido ascórbico, albumina sérica bovina e TGF- $\beta$ 1	Aumento deposição de cálcio	Condrócito

Fonte: autor.

Para que ocorra a indução da diferenciação, diferentes tipos de protocolos, frente a condição do meio de cultura, foram estabelecidos a fim de promover a adipogênese, condrogênese e osteogênese, que inclui o uso de diferentes tipos de meios de cultura (ROBERT et al., 2020). Diante disto, é possível concluir que, para a aplicação terapêutica das MSC na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, é necessária uma organização em questões tanto estruturais como também induzir um processo de diferenciação celular (PITTINGER et al., 2019). Para isto, abaixo serão mencionados os fatores necessários para a indução e regulação da diferenciação celular (CHEN et al., 2016).

#### 4.1.2.1 Diferenciação em osteócito

A diferenciação das MSC em osteócitos é induzida *in vitro* pela adição de fatores químicos que incluem  $\beta$ -glicerofosfato, dexametasona e ácido ascórbico-2-fosfato (STEWART et al., 2011). A diferenciação osteogênica das células-tronco é iniciada ao 4<sup>o</sup> dia, na forma de pequenos grânulos, que, posteriormente, exibirão a presença de sais de cálcio em regiões isoladas. O processo completo de

diferenciação das MSC em adipócitos ocorre em cerca de 20 dias (ROBERT et al., 2020; EI SAYYAD et al., 2016).

Em termos de adição de fatores químicos, a fim de induzir o processo de diferenciação das MSC, especificamente, o ácido ascórbico é um cofator responsável pelo aumento da biossíntese de colágeno e por constituir a base para a deposição da matriz extracelular calcificada ainda, desempenha um papel importante na regulação positiva da fosfatase alcalina (ALP), que por sua vez é potencializada pela adição do composto dexametasona. A dexametasona é um potente glicocorticoide que auxilia no processo de mineralização ao aumentar a atividade da fosfatase alcalina e as respostas do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP). Por fim, o  $\beta$ -glicerofosfato é o composto adicionado responsável por fornece íons fosfato para promover a formação de hidroxiapatita, além de atuar como substrato para ALP, gerando altos níveis de íons fosfato para deposição da matriz extracelular mineralizada (KOCH et al., 2012; ASSIS-RIBAS et al., 2018).

#### **4.1.2.2 Diferenciação em adipócito**

A diferenciação adipogênica das MSC é estimulada em meio de cultura contendo insulina, indometacina e dexametasona. A diferenciação das MSC em adipócitos ocorre em razão do acúmulo de lipídios em vacúolos intracelulares (STEWART et al., 2011). Este processo completo de diferenciação das MSC em adipócitos ocorre pelo mesmo período de tempo que a diferenciação em osteócito (ROBERT et al., 2020). O composto químico dexametasona é utilizado para induzir a diferenciação celular, uma vez que é capaz de ativar a proteína de ligação

intensificadora (C/EBP $\gamma$ ), que por sua vez se liga ao receptor de glicocorticóide intracelular, resultando em um processo potencializado pela ativação de receptores proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) o qual são induzidos pela exposição à indometacina, logo, as atividades C/EBP e PPAR- $\gamma$  são essenciais durante os estágios iniciais e tardios da adipogênese. A insulina presente neste meio de diferenciação é adicionada a fim de promover a captação de glicose para a síntese de triglicérides nos adipócitos (CHEN et al., 2016; ASSIS-RIBAS et al., 2018; NAJI et al., 2019).

#### **4.1.2.3 Diferenciação em condrócito**

A diferenciação condrogênica das MSC é induzida por um meio suplementado com ácido ascórbico, albumina sérica bovina e TGF- $\beta$ 1 (STEWART et al., 2011). O processo completo de diferenciação condrogênico ocorre aos 21 dias. O TGF- $\beta$ 1 tem a capacidade de induzir diferenciação condrogênica a partir de uma regulação positiva mediada por transdução de sinal de fatores de transcrição (ZHOU et al., 2019; ASSIS-RIBAS et al., 2018). Ao final deste processo é possível verificar a presença de glicosaminoglicanos na matriz extracelular (BRÄUNIG et al., 2018).

Durante o processo de condrogênese, os proteoglicanos sulfatados são formados e incluem colágeno tipo II e IX. A diferenciação das MSC em condroblastos é regulada por vias moleculares, incluindo Wnt/ $\beta$ -catenina e TGF- $\beta$  (NAJI et al., 2019). As proteínas Wnt são membros de uma família de moléculas secretadas, que se ligam aos seus receptores e resultam na ativação do agente central da via, a  $\beta$ -catenina. Logo, essa sinalização desempenha uma função



substancial na proliferação celular, diferenciação, crescimento, sobrevivência, desenvolvimento, regeneração e auto-renovação celular (MAJIDINIA et al., 2018).

#### **4.1.3 Células-tronco mesenquimais adipo-derivadas**

As células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC) têm sido um dos principais tipos celular abordados no campo da engenharia de tecidos e terapia celular devido à sua capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares e seus potentes efeitos antiinflamatórios, antifibróticos, antiapoptóticos e pró-angiogênicos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AL-GHADBAN et al., 2020). Estas células são obtidas a partir de tecido adiposo (Figura 4), que por sua vez é considerado uma fonte abundante de MSC tanto para utilização imediata quanto para utilização a longo prazo, e, portanto, uma fonte importante para terapia baseada em células e engenharia de tecidos. A facilidade de obtenção desse tipo celular é de grande interesse para a pesquisa do campo da engenharia de tecidos, além de apresentarem grandes propriedades imunológicas. Além disso, as ADSC são capazes de modular a ativação e proliferação de células do sistema imunológico, o que pode ter um impacto significativo nas reações de corpo estranho a estruturas sintéticas implantadas (NADER et al., 2020).

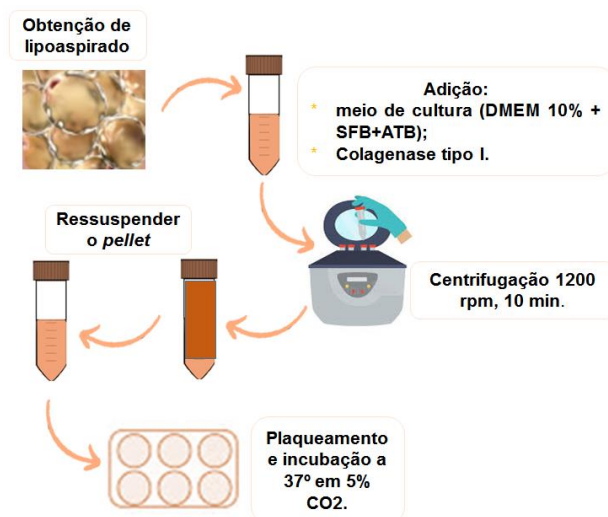


Figura 4. Etapas do processo de isolamento e obtenção de ADSC. Fonte: autor.

As ADSC foram, inicialmente, descobertas e definidas como MSC isoladas de lipoaspirado processado por Zuk et al., (2001). Uma das principais vantagens é sua abundância. Uma vez que suas características tem sido exploradas (tabela 5), estudos realizados anteriormente, com base no comprimento do telômero e na atividade da beta-galactosidase, foi demonstrado que as ADSC exibem capacidade de proliferação maior que as células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC), visto que a partir de 1 g de tecido adiposo, uma média de  $0,5-2,0 \times 10^6$  células podem ser isoladas, o que consiste em 1–10% de rendimento em comparação com as BMSC as quais rendem cerca de 0,001–0,01%. Além disto, são capazes de manter um cariótipo diplóide normal por várias gerações de cultura e seu desempenho, diante das características biológicas, ser 40 vezes maior do que o das BMSC (LI et al., 2018 BAJEK et al., 2016). Ainda, em comparação com outros tipos de células-tronco, as ADSC também são mais ativas na produção autócrina de alguns fatores de crescimento e imunomoduladores, incluindo a expressão de níveis

mais altos de mRNA para fator de crescimento endotelial vascular-D (VEGF-D), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e IL-8 (BACAKOVA et al., 2018).

Considerando uma potencial abordagem terapêutica, uma vez que o sucesso da engenharia de tecidos depende da adequada restauração tanto do tecido lesado, quanto da vascularização, curiosamente, as ADSC parecem ser os principais reguladores da formação de novos vasos sanguíneos e demonstraram se diferenciar facilmente em células endoteliais e formar estruturas semelhantes a vasos de forma funcional e simples (FRESE et al., 2016).

Tabela 5. Proteínas de superfície celular identificadas em células-tronco adipo-derivadas.

CATEGORIA DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA
Moléculas de adesão	Integrina b1 e a4; Molécula de adesão intercelular 1; Molécula de adesão vascular; Molécula de adesão de linfócitos ativados;
Moléculas receptoras	Receptores de transferrina;
Enzimas de superfície	Endopeptidase; Aminopeptidas;
Proteínas da MEC e glicoproteínas	Colágeno I e III;
Proteínas de citoesqueleto	Actina de músculo liso alfa intracelular; Vimentina;
Histocompatibilidade	A, B, C (Classe I);

Fonte: Adaptado de SALGADO et al., 2010.

#### 4.1.4 Cultura celular

A cultura celular é uma das principais técnicas utilizadas na pesquisa experimental, uma vez que permite a manipulação em laboratório de células vivas independente do organismo que a originou. Essa técnica envolve a remoção de

células e sua inserção em um ambiente artificialmente favorável à sua sobrevivência e proliferação. As células podem ser obtidas a partir de um tecido ou órgão e desagregadas por meios enzimáticos ou mecânicos antes do cultivo, podendo, ainda, ser derivadas de uma linhagem celular já estabelecida previamente (GIBCO, 2016).

Historicamente, em meados do século XX, acreditava-se que as células em cultura poderiam ser cultivadas infinitamente, desde que fossem fornecidos todos os substratos necessários. Transcorridos alguns anos, estabeleceu-se que uma cultura celular seria nominada como primária, quando suas células seriam diretamente obtidas de um tecido humano ou animal. Já linhagens celulares contínuas, por outro lado, foram, então, classificadas como aquelas nas quais as células sofreram imortalização, ou seja, adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente. A cultura de células humanas subcultivada indefinidamente só foi possível em meados de 1950, onde a primeira linhagem celular (HeLa) foi estabelecida em laboratório pelo pesquisador George Gey no Hospital Johns Hopkins, (EUA). Estas células foram derivadas de um adenocarcinoma cervical agressivo da paciente chamada Henrietta Lacks, o qual originou o livro “A vida imortal de Henrietta Lacks” (SKLOOT et al., 2011). Após, tantos anos de pesquisas e descobertas envolvendo a cultura de células, esta técnica tornou-se um recurso valioso, uma vez que as células mantidas em cultura são modelos biológicos simples e tendem a fornecer respostas simplificadas para problemas complexos de investigação. A propósito, os dados produzidos a partir de culturas de células em modelos *in vitro* podem ser suficientemente informativos, particularmente para estudos funcionais, bioquímicos e

moleculares, como também para produção de produtos biológicos (MIGITA, 2012; LUCEY et al., 2009).

As condições para a realização de uma adequada cultura celular variam conforme o tipo de célula, porém o ambiente artificial em que as células são cultivadas, ou seja, o meio de cultivo, temperatura e substrato, em que elas serão inseridas, irá fornecer os nutrientes essenciais (aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais) para a sobrevivência e proliferação. Existem alguns requisitos básicos para que estas células sejam capazes de sobreviver e proliferar de forma otimizada os quais incluem temperatura controlada, substrato para fixação celular, meio de cultura para que ocorra o crescimento/proliferação e uma incubadora para manter o pH adequado (YAO et al., 2017; ARORA, 2013).

Logo, a obtenção, sobrevivência e manutenção de uma população de células-tronco requer uma sequência de etapas que incluem obtenção, decomposição mecânica, decomposição química, purificação e, ao final, aderência ao plástico (cultura celular). Este último processo, desempenha um papel crucial que permite atingir um número de células/confluência necessárias para a realização dos estudos *in vitro* (FRANCIS et al., 2018; LISINI et al., 2019; PALUMBO et al., 2018).

As células em cultura, geralmente, proliferam seguindo um padrão de crescimento. A fase inicial do crescimento celular em cultura consiste na fase de latência, que é um período de crescimento lento quando as células estão se adaptando ao ambiente e se preparando para um crescimento rápido. A fase de latência é seguida pela fase log, período esse que as células proliferam exponencialmente e consomem os nutrientes no meio de crescimento. Quando todo o meio de crescimento é utilizado ou quando as células ocupam todo o substrato

disponível, as células entram na fase estacionária, cuja proliferação é reduzida ou cessa totalmente (GIBCO, 2016).

Complementar às informações essenciais ao cultivo celular, no modelo *in vitro*, é interessante notar sua morfologia fibroblastóide. Uma vez que elas são expandidas em monocamada e são suspensas em meio Eagle (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, destaca-se que o meio de cultura ideal para a expansão celular deve conter nutrientes definidos de acordo com o tipo de célula. Finalmente, para que a cultura celular atenda aos padrões de diferenciação e executem suas habilidades na medicina regenerativa, tanto no modelo *in vitro* quanto no modelo *in vivo*, os sistemas de cultura devem ser otimizados e padronizados a fim de garantir sua reprodutibilidade, segurança e qualidade (NAJI et al., 2019; GLASS et al., 2019; PALUMBO et al., 2018).

## **5. Arcabouço**

Arcabouços, também conhecidos em inglês no termo *scaffolds* (ABE, 2016), são caracterizados como estruturas artificiais derivadas de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis. Os arcabouços, muitas vezes, são capazes de causar pouca ou até mesmo nenhuma reação indesejada no organismo quando implantado, podendo ser absorvido pelo próprio corpo sem deixar vestígios pós-implantação. O primeiro implante de tecido biológico produzido artificialmente, a partir de células vivas, ocorreu em 1991. Naquela ocasião, o paciente, que era portador de uma malformação congênita recebeu um novo esterno formado a partir de um arcabouço sintético semeado com células (LEVIN et al., 2019; ANDERSON et al., 2008).

Em 1997, foi realizado uma experiência conduzida por Vacanti, o qual criou, artificialmente, uma orelha humana e a implantou sobre o dorso de um camundongo, sendo que novo tecido de substituição funcional foi produzido a partir de células cartilaginosas, obtidas de vaca, crescidas sobre um arcabouço no formato de orelha e implantada sobre a pele do camundongo para maturação. Com este resultado, Dr. Vacanti foi considerado um dos principais célebres da Engenharia Tecidual. A partir do desenvolvimento destas pesquisas, foi possível determinar que um arcabouço combinado com células teria como objetivo final reparar, manter ou melhorar a função de um tecido ou órgão específico (LEVIN et al., 2019; VACANTI 2006). Desde então, Langer et al. demonstraram a formação de mais de 20 tecidos diferentes do corpo em modelos animais, bem como vários tecidos em humanos (LANGER, 2019).

Importantemente, é necessário esclarecer que os arcabouços se referem a materiais de apoio usados em aplicações de engenharia de tecidos para reparar ou restaurar tecidos danificados. Já quando se utiliza o termo biomaterial, estes são usados para fabricar os arcabouços. Logo, o biomaterial apropriado deve ser escolhido de acordo com as características e aplicações desejadas do arcabouço (Figura 5) (SULTANA et al., 2015).

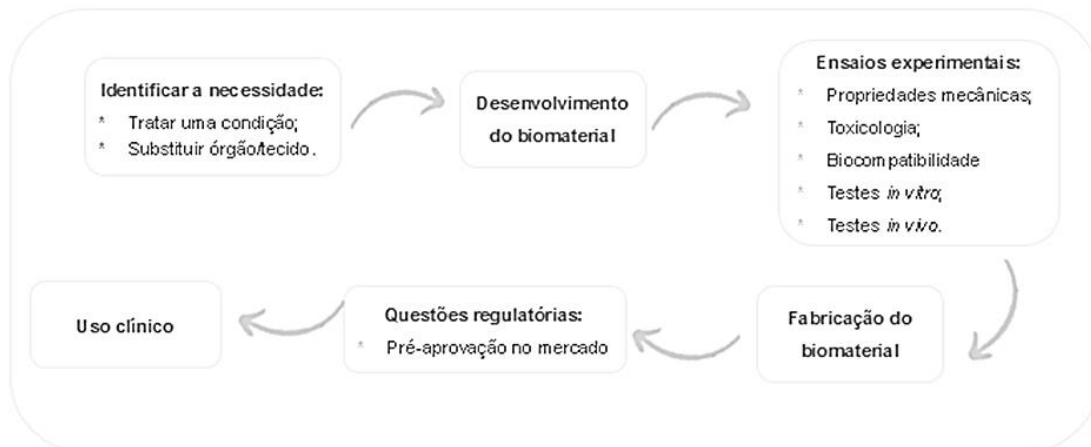


Figura 5. Etapas para produção/desenvolvimento de um biomaterial. Fonte: autor.

Ao longo dos anos, novos produtos e estratégias à base de polímeros vem sendo exploradas e encontram-se disponíveis no mercado, promovendo novas oportunidades terapêuticas (HOSSEINI et al., 2019). Frente a isso, diferentes tipos de biomateriais, incluindo composição tanto sintética quanto natural, estão, continuamente, sendo estudados por influenciarem a capacidade regenerativa das MSC (WOBMA et al., 2017).

Existem algumas maneiras diferentes de empregar as MSC em arcabouços, e estas envolvem, primeiramente, em modelo *in vitro*, a adição/cultura das MSC - que se ligam aos arcabouços, seguida pela incubação para garantir a ligação, e, finalmente, ocorre a implantação em modelo *in vivo*. No segundo método, o arcabouço contendo as células são cultivados em meio apropriado para induzir a diferenciação em precursores celulares específicos (osteócitos, condrócitos e adipócitos) e após 7–14 dias são implantados *in vivo* no local predeterminado (TROHATOU et al., 2017).

Nos últimos anos, houve uma grande expansão envolvendo o mercado global de biomateriais. Em 2008, este mercado movimentou US\$ 25,6 bilhões



mundialmente, tendo a seguinte distribuição: 43% nos USA, 33% na Europa, 3% na Ásia (Pacífico), 2% no Brasil e 19% no restante do mundo. Em 2012, este mercado atingiu a cifra de US\$ 44 bilhões. Há uma estimativa que este mercado atinja uma taxa de crescimento de 22,1% ao ano sendo, possivelmente, liderado pela América do Norte, Europa e Ásia (PIRES et al., 2015).

### **5.1 Interações arcabouço-hospedeiro**

Ao abordar a terapia baseada em arcabouços e células, é de grande importância explorar a interação que ocorre entre esta combinação e o tecido do hospedeiro. O arcabouço ideal deve apresentar resistência suficiente para proteger as células, bem como permitir que nutrientes e fatores de diferenciação se difundam através dele (KOCH et al., 2009). A interação que ocorrerá entre as células e a superfície do arcabouço será determinante para a sobrevivência e a adequada função que as células-tronco deverão exercer no hospedeiro (DASH et al., 2018), podendo a composição bioquímica do arcabouço impactar diretamente o comportamento das MSC (WOBMA et al., 2017).

Quanto mais conhecido e explorado o mecanismo fisiológico de interação que ocorre entre arcabouço-hospedeiro, mais complexos são os desafios que envolvem a engenharia de tecidos. Existem alguns fatores determinantes (Tabela 6) que impedem ou permitem que um arcabouço seja utilizado na prática clínica, e isto envolve diversos fatores, desde sua funcionalidade até sua biocompatibilidade (ROMERO et al., 2019).

Tabela 6. Propriedades envolvidas com a interação arcabouço-hospedeiro.

PROPRIEDADES	DEFINIÇÕES
Bioatividade	Interação do arcabouço com o hospedeiro;
Arquitetura do arcabouço	Porosidade que permite a migração celular e interação célula-arcabouço;
Biocompatibilidade	Componentes não-tóxico e não-inflamatório;

Fonte: Adaptado de Sadtler et al., 2016.

Quando um arcabouço é implantado (Figura 6), de forma geral, ele entra em contato com um ambiente que apresenta diferentes variáveis, muitas vezes desconhecidas e que variam de forma imprevisível, isto inclui inflamação e absorção de proteínas (GASIK, 2017).

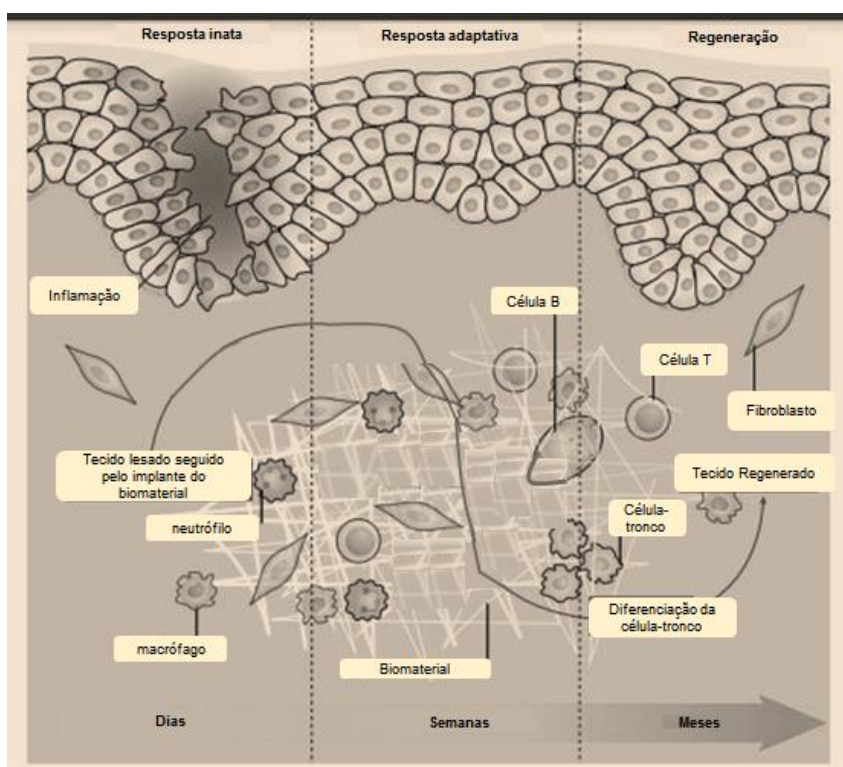


Figura 6. Interação biomaterial-hospedeiro. A interação arcabouço-hospedeiro ocorre em locais lesados, é mediada pelo surgimento de células imunes inatas e adaptativas. Dependendo da interação dessas células com outros tipos de células, bem como com o arcabouço, é provável que seja gerado um tecido similar ao original ou, até mesmo, um tecido fibroso. Neste caso, em resposta ao arcabouço-hospedeiro, é potencialmente esperado que o microambiente formado apoie o desenvolvimento adequado do tecido recém formado. Fonte: Adaptado de Sadtler et al., 2016.

Uma vez que os implantes são, muitas vezes, desenvolvidos a partir de materiais sintéticos, que são estranhos aos tecidos vivos, podem ocorrer reações envolvendo o tecido circundante. As interações que ocorrem entre arcabouço-hospedeiro podem ser divididas em dois grupos: (I) o efeito do implante no tecido, e (II) a influência do organismo no implante. O primeiro grupo inclui os efeitos locais que envolvem infecção, toxicidade, efeito sistêmico, e reações de hipersensibilidade. O segundo grupo inclui a interação do organismo ao implante que envolvem efeitos biológicos e a absorção do arcabouço (VELNAR et al., 2016).

A interação arcabouço-hospedeiro é mediada por células residentes e migratórias, matriz extracelular, bem como por fatores subjacentes que incluem mediadores inflamatórios e fatores de crescimento; interações célula-célula e célula-matriz extracelular que orientam a proliferação, migração e diferenciação celular; angiogênese e remodelação (VELNAR et al., 2016).

Diante da interação arcabouço-hospedeiro, o grau e a extensão da resposta biológica, irá depender das propriedades do arcabouço, que envolvem:

- I. composição;
- II. duração do contato;
- III. taxa de degradação;
- IV. morfologia;
- V. porosidade;
- VI. arquitetura;
- VII. química de superfície.

Em uma tentativa de melhorar os aspectos envolvendo a interação arcabouço-hospedeiro, inicialmente, torna-se necessário compreender reações do

hospedeiro induzidas pelos arcabouços, incluindo adsorção de proteínas, respostas inflamatórias e fibróticas; em seguida, é necessário adaptar a superfície do arcabouço para que resulte em uma resposta apropriada do hospedeiro, para que este, por sua vez, cause uma resposta inflamatória inferior e suporte a regeneração do tecido (ZHOU et al., 2018).

## **5.2 Biocompatibilidade**

Um dos principais e mais importantes termos envolvendo a pesquisa com biomateriais, é a biocompatibilidade. Este termo tem sido utilizado por mais de 40 anos com a finalidade de descrever o desempenho de um material após implantação e para distinguir biomateriais que podem ser usados na prática clínica de outros materiais (HUSSEIN et al., 2016).

A biocompatibilidade de um biomaterial está associada com a capacidade de agir em direção a uma resposta positiva do hospedeiro após uma aplicação específica, ou seja, sem provocar quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no receptor, gerando a resposta celular ou tecidual benéfica (KOWALCZUK, 2020).

Um dos pré-requisitos que um biomaterial de sucesso deve cumprir é que seja aceito pelo corpo sem causar danos, ou seja, deve ser biocompatível. A natureza da interação dos biomateriais com o microambiente biológico circundante é quem define sua biocompatibilidade (CHANDORKAR et al., 2019; RAHMATI et al., 2020).

Portanto, a biossegurança dos biomateriais poliméricos precisa ser conhecida para que seja avaliada possíveis complicações decorrentes do seu uso

(KOWALCZUK, 2020). Logo, a avaliação da biocompatibilidade requer experimentos complexos em modelos tanto em *in vitro* quanto *in vivo* a fim de testar seus efeitos (MORAIS et al., 2010).

A fim de prever um possível o desempenho funcional, diante da biocompatibilidade do arcabouço, previamente ao implante, a técnica de cultura celular tem sido abordada (MORAIS et al., 2010). Para padronizar os métodos e comparar os resultados desses ensaios, é importante controlar alguns fatores que incluem (I) o número de células, (II) a fase de crescimento celular, (III) tipo de célula, (IV) a duração de exposição e (V) tamanho da amostra de teste (MORAIS et al., 2010).

A introdução de um biomaterial em um hospedeiro, normalmente, desenvolve uma reação fisiológica e, em consequência disto, espera-se que o hospedeiro desenvolva alguma resposta adaptativa. Logo, o grau de resposta diante do implante *versus* hospedeiro irá depender do tamanho da perturbação gerada pela lesão e introdução do biomaterial, sendo este um fator decisivo na determinação da biocompatibilidade (CHANDORKAR et al., 2019).

Para determinar a biocompatibilidade, sugere-se identificar os processos fisiológicos que podem sofrer alterações em decorrência da presença do biomaterial, e descrever os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem, por exemplo as células que normalmente interagem com uma matriz extracelular respondem à superfície de uma estrutura não fisiológica (WILLIAMS et al., 2017).

O desenvolvimento de estruturas envolvendo tecidos bioartificiais para aplicações reconstrutivas provocou a necessidade de realização de ensaios envolvendo citotoxicidade, a fim de rastrear compostos e caracterizar os efeitos

potencialmente prejudiciais dessas estruturas previamente ao uso clínico. Um dos parâmetros mais importantes na avaliação *in vitro* da biocompatibilidade do implante é a citocompatibilidade, a qual é capaz de determinar aspectos diante do impacto do produto no que diz respeito à viabilidade das células que serão cultivadas (HUSSEIN et al., 2016).

A fim de explorar e determinar a biocompatibilidade, como ferramenta comumente abordada em modelo *in vivo*, a avaliação histopatológica do tecido adjacente ao biomaterial implantado é o método mais utilizado (RABBERS et al., 2016).

### **5.3 Biomateriais como suporte e entrega de células-tronco**

Nas últimas décadas, a entrega das células-tronco a um alvo específico, em combinação com biomateriais à base de polímeros, tem sido amplamente investigada. A partir da especificidade existente em diferentes polímeros, em termos de propriedades funcionais e características físico-químicas, é possível produzi-los com propriedades desejadas para uma ampla gama de aplicações envolvendo terapia celular. No entanto, é, imprescindivelmente, necessário levar em consideração fatores como sua bioatividade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (NOUR-ELDEEN et al., 2020). À medida que ocorrem os avanços nas modificações das propriedades dos biomateriais a base de polímeros, a aplicação de MSC na engenharia de tecidos se destaca fortemente, uma vez que é associada a eles, que, por sua vez, são projetados a aumentar a sobrevivência celular e orientar a diferenciação das células (KUSUMA et al., 2017).

Os biomateriais poliméricos são categorizados com base em sua origem, podendo ser natural ou sintética (PRADHAN et al., 2017). Biomateriais poliméricos naturais, geralmente, incluem proteínas (colágeno, fibrina) e polissacarídeos (alginato, quitina/quitosana, derivados de ácido hialurônico). Apesar dos polímeros naturais demonstrarem potencial vantagem de suportar/conduzir a função e adesão celular, existem algumas limitações em relação à sua aplicabilidade, uma vez que é difícil controlar as propriedades mecânicas bem como sua taxa de degradação podendo, ainda, existir um potencial para que o polímero natural provoque alguma resposta imune (SONG et al., 2018).

Diferentemente dos polímeros naturais, os polímeros sintéticos (Tabela 7) podem ser produzidos sob condições e propriedades mecânicas e químicas controladas, além de evitar problemas com imunogenicidade, toxicidade e infecções. Além destas propriedades serem facilmente modificadas, é possível, ainda, incorporar grupos funcionais e cadeias laterais a estes polímeros sintéticos para serem bioativados com moléculas específicas (HACKER et al., 2019).

Tabela 7. Polímeros sintéticos abordados na engenharia de tecidos.

NOMECLATURA	
PCL	<i>polycaprolactone</i>
PDLLA	<i>poly-d l-lactic acid</i>
PGA	<i>polyglycolic acid</i>
PLA	<i>poly(lactic) acid</i>
PLGA	<i>poly(lactide-co-glycolide)</i>
PLLLA	<i>poly(L-lactic acid)</i>

Fonte: autor.

Outra característica importante envolvendo os materiais poliméricos sintéticos é que estes oferecem versatilidade a partir das suas propriedades físicas e químicas

que podem ser facilmente controladas e alteradas. Uma dessas propriedades é a degradabilidade, que pode ser alterada criando copolímeros ou misturas de polímeros. Esses polímeros e misturas são, geralmente, mais fáceis de processar do que os polímeros naturais e têm resultados mais previsíveis. Por outro lado, os polímeros sintéticos são menos biocompatíveis do que os polímeros derivados naturalmente e não tão bioativos (NAAHIDI et al., 2017; DWIVEDI et al., 2020).

Dentre um dos principais polímeros empregados na engenharia de tecidos, o PLGA é um dos mais conhecidos. Embora este polímero tenha provado ser um excelente material para ser abordado na engenharia de tecido devido às suas propriedades biodegradáveis, resistência mecânica e facilidade de fabricação, sua aplicação como entrega de células ao tecido alvo tem sido bastante criticada, pois ele não oferece um desejável ambiente para adesão celular devido à sua limitação de sítios de ligação mediados por reconhecimento biológico e alta hidrofobicidade. Com base em uma etapa fundamental inicial, na qual as interações célula-substrato permitem a proliferação, migração e diferenciação celular na superfície dos materiais, muitos estudos se concentraram na modificação da superfície da matriz em um esforço para aumentar a interação célula-substrato para entrega celular (SEO et al., 2011).

A partir destas razões, Guerra e colaboradores (2018; 2020) aperfeiçoaram, de maneira inovadora, uma blenda polimérica, a qual consiste em PLGA/PIepox. A inovação consiste na modificação química envolvendo o processo de epoxidação da blenda e na sua combinação com MSC (HENCKES et al., 2019). Esta modificação permitiu maximizar o potencial efeito da blenda polimérica diante do crescimento celular (GUERRA et al., 2018; HENCKES et al., 2019).



## 5.4 Técnica de fabricação dos arcabouços

### 5.4.1 *Electrospinning*

O termo “*electrospinning*”, cuja derivação segue de “*spinning* eletrostático”, tem sido explorado desde a década de 30, no qual foi descrito uma configuração experimental para a produção de filamentos de polímero usando uma força eletrostática (HUANG et al., 2003).

*Electrospinning* é uma técnica de fabricação de arcabouços (Figura 7) com a capacidade de formar poros nano-fibrosos interconectados. Este método utiliza um campo elétrico aplicado externamente para desenhar fios de polímero como jatos finos em direção a uma placa coletora (SAFINSHA et al., 2020). A partir da técnica de *electrospinning* é possível gerar um arcabouço para ser utilizado como curativo biológico (MIRJALILI et al., 2016).

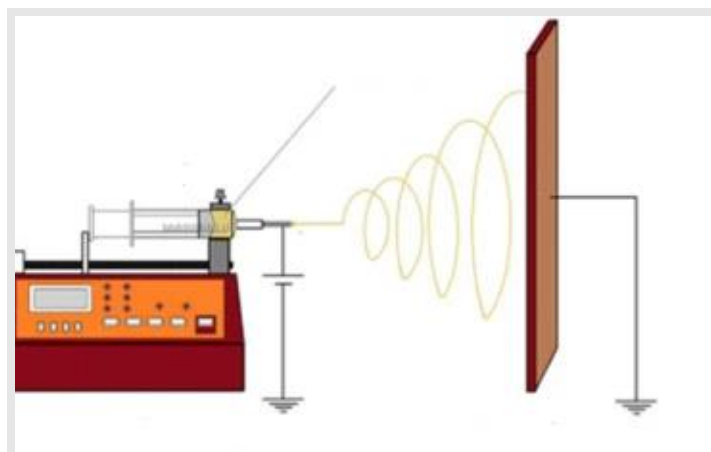


Figura 7. *Electrospinning*. Fonte: Biorender.

O processo envolve, basicamente, três componentes: (i) um fornecedor de alta tensão, (ii) uma seringa com uma agulha de pequeno diâmetro e (iii) uma tela coletora. No processo de *electrospinning*, uma alta voltagem é usada para criar um jato eletricamente carregado de solução de polímero. O jato de solução solidifica é coletado em forma de pequenas fibras interconectada (Tabela 8) (HUANG et al., 2003; XUE et al., 2019).

Uma vez que os parâmetros envolvidos no processo podem ser ajustados, a maioria dos polímeros solúveis, incluindo polímeros naturais, sintéticos ou uma mistura de ambos, podem ser utilizados. A partir da técnica de *Electrospinning*, é possível optar por variações na morfologia e nos diâmetros das fibras produzidas (ISLAM et al., 2019).

Tabela 8. Parâmetros que influenciam a morfologia das fibras.

VARIÁVEIS DO PROCESSO	VARIÁVEIS AMBIENTAIS
Voltagem; Tensão; Formato do coletor; Condutividade; Distância; Carga do jato; Ângulo; Tipo do polímero.	Humidade;  Temperatura;  Fluxo de ar.

Fonte: Adaptado de Berton et. al., 2020.

Geralmente, no *electrospinning*, os polímeros são caracterizados em dois termos: físico e estrutural, mecânico e químico. Além disso, as propriedades biológicas do biomaterial obtido devem ser determinadas antes da pesquisa *in vitro* e *in vivo*. Uma das vantagens mais aparentes dos arcabouços fabricados por

*electrospinning* é a capacidade de reproduzir a matriz extracelular (ECM). A distribuição dos poros, a hidrofobicidade, o tamanho e a orientação das fibras desempenham um papel importante no comportamento celular, afetando a adesão, proliferação e diferenciação das células (BERTON et al., 2020).

Considerando o desenvolvimento das fibras, estas podem ser produzidas para ter serem encapsuladas, enxertadas, revestidas ou combinadas com compostos biologicamente ativos, como proteínas, enzimas e fatores de crescimento (TORNELLO et al., 2016).

## **6. Inovação em biomateriais**

A aplicação de novas tecnologia voltadas à medicina regenerativa tem despertado o interesse e motivado o desenvolvimento de novas *startups* brasileiras, com base científica, envolvendo terapias celulares à diferentes enfermidades. De acordo com Decoster (2020) a habilidade de inovar está diretamente relacionada à habilidade de despertar e impulsionar ideias e gerenciar conhecimento (DECOSTER, 2020).

A principal força diante da inovação tecnológica em biomateriais é melhorar a qualidade de vida. A fase inicial deste processo inclui estas etapas (Figura 8): (I) identificação de um problema clínico que precisa ser resolvido; (II) determinação de que existe um mercado viável para a inovação resultante; e (III) a aplicação sensata e sofisticada de tecnologias existentes ou em desenvolvimento para resolver esse problema (SCHOEN et al., 2020). Partindo deste pressuposto, PLGA/PLepox combinado com ADSC surge como uma abordagem inovadora para ser

translacionada para a clínica (HENCKES et al., 2019; HENCKES et al., 2021; GUERRA et al., 2020; CARAZAI et al., 2021).

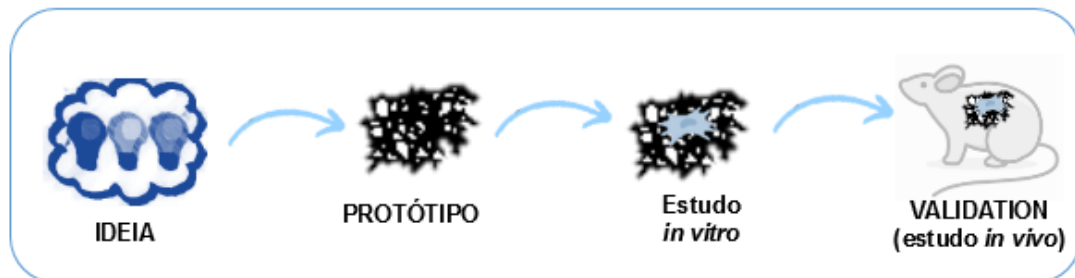


Figura 8. Etapas de geração e desenvolvimento de ideias. Fonte: Adaptado de COHEN et al., 2019.

É importante destacar que uma invenção, por si só, tem pouco valor; o valor da ideia representada por uma invenção é através da inovação, ou seja, a validação e implementação dessa ideia ou concretização da mesma para afetar indivíduos e populações através da sua utilização e aceitação por outros (SCHOEN et al., 2020).

Wang (2016) desenvolveu um inovador conceito para o emprego de biomateriais. O objetivo é que com o conceito nomeado de ‘bioadaptabilidade’, novos pesquisadores fomentem novas ideias de funcionalização de biomateriais, além de incentivar os cientistas para que estes explorem questões que estão diretamente ligadas ao processo de reparação tecidual a partir de biomateriais (WANG, 2016).

## 7. Aplicação clínica

O desenvolvimento de novas tecnologias que venham somar aos tratamentos clínicos existentes na saúde pública ainda é um grande desafio. A disponibilidade

dessas tecnologias tem envolvido grandes esforços na ciência, medicina e políticas públicas com o objetivo de obter uma maior compreensão sobre os tecidos cultivados em laboratório e órgãos bioartificiais e transluzi-los à pratica clínica. Espera-se que as terapias baseadas em células-tronco e biomateriais tragam benefícios substanciais para pacientes que sofrem uma ampla gama de doenças e lesões (GIWA et al., 2017; TROUNSON et al., 2015).

A tecnologia clínica ideal para reconstrução de tecidos, idealmente, envolve uma substituição de tecido/estrutura sintética universal que se integra e atua como um modelo para o corpo regenerar o tecido/estrutura perdida. As necessidades que essa tecnologia atende é emergente em tratamentos que necessitam substituir a forma e a função ausentes. Os tratamentos que necessitam de uma tecnologia mais eficaz incluem lesões agudas, queimaduras ou traumas, feridas crônicas, malformações congênitas, resignação de sexo, entre outras (DYE et al., 2019; SADTLER et al., 2016).

O desenvolvimento de uma tecnologia que envolve a aplicação de arcabouços e células-tronco deve ser focada na necessidade do paciente, e, para isso, destacamos algumas necessidades que priorizamos para a aplicação terapêutica desta combinação.

## **7.1 Curativo cirúrgico**

Uma grande variedade de efeitos benéficos tem sido atribuída aos curativos biológicos (PRUITT et al., 1984). Idealmente, um curativo deve apresentar características não tóxicas e não alérgicas. Os curativos cirúrgicos/biológicos são

desenvolvidos com a finalidade de proteção o tecido ou órgão lesado. A fim de apresentar uma inovadora alternativa terapêutica de curativo cirúrgico, os biomateriais estão sendo amplamente explorados quanto a sua eficácia no recobrimento ou preenchimento de defeitos ou lesões. Para tanto, a combinação de biomaterial e células-tronco, para fins de curativo biológico, tem se apresentado como adequada oportunidade, uma vez que são capazes de promover a formação do tecido e diminuir a cicatrização hipertrófica (ARAMWIT et al., 2016).

Considerando esta uma aplicação inovadora em curativos cirúrgicos, existem algumas propriedades básicas exigidas diante de comprovação a fim de tornar substituto clinicamente eficaz que incluem:

- I) Biocompatibilidade;
- II) Ausência de toxicidade local e sistêmica;
- III) Estrutura que permita o crescimento interno do tecido fibrovascular.

A formação de cicatriz é um grande problema de especial importância em casos de feridas. A fim de evitar diversos procedimentos de transplante de tecido e a formação de tecido cicatricial, bem como minimizar o número de trocas de curativos necessárias, muitos esforços de pesquisa têm se concentrado na indução da regeneração da pele usando arcabouços para a regeneração (EGAÑA et al., 2009). Seguindo esta abordagem, diferentes tipos de curativos cirúrgicos têm sido desenvolvidos (Tabela 9).

Tabela 9. Biomateriais empregados atualmente na cirurgia plástica.

PRODUTO	CARACTERÍSTICAS	TRATAMENTOS	VANTAGENS	DESVANTAGENS
My Skin	Queratinócitos cultivados em um	Queimaduras de espessura parcial;	Sem rejeição;	Tempo de preparação da

	suporte de silicone;	enxerto de pele;		cultura;
VivoDerm	Estrutura produzida com ácido hialurônico e cultivada com queratinócitos;	Queimaduras de espessura parcial e vitiligo;	Sem rejeição;	Tempo de preparação da cultura;
Dermagraft	Estrutura biodegradável cultivada com fibroblastos;	Pé diabético e úlceras;	Não informado;	Vida útil de 6 meses
Integra	Substituto epidérmico de silicone acelular temporário;	Queimaduras de espessura parcial profunda e total.	Boa função de barreira e longa vida útil;	Não informado;

Fonte: Adaptada de ZAREI et al., 2017.

Desde meados dos anos 2000, Cuzzell (1997) tem sugerido curativos sintéticos como uma alternativa para proteção de feridas cirúrgicas. Suas pesquisas destacavam que um curativo colocado sobre uma linha de sutura poderia servir como proteção de lesões e imobilização do sítio cirúrgico.

Kim et al., (2014), importantemente, destacam a maneira como devem ser classificados os curativos cirúrgicos. Esta classificação depende das características de cada curativo, e incluem:

- i) Duração da cobertura: temporária, semipermanente ou permanente;
- ii) Composição celular: celular ou acelular;
- iii) Tipo de material: biológico ou sintético.

As MSC têm mostrado efeitos benéficos de cicatrização de feridas melhorando a neovascularização e reduzindo a formação de cicatrizes, sendo este último, uma das principais solicitações clínicas (RUSTAD et al., 2012).

Em razão disto, biomateriais combinados com células-tronco como curativo biológico têm sido desenvolvidos com o objetivo estimular um aumento da produção de VEGF e a diferenciação, trazendo funcionalidade ao tecido, bem como e

maturação dos fibroblastos, aumentando a taxa de tecido de granulação (BITTO et al., 2008). Essa abordagem se destina também não só a fim de aumentar a sobrevivência das células, mas também a retenção das células para que ocorra um reparo completo e adequado (KIISKINEN et al., 2019; GONZÁLEZ MARTÍNEZ et al., 2018).

ZHANG e colaboradores (2021) destacam que o processo de cicatrização de feridas é, geralmente, dividido em três fases distintas, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Figura 9). Para tanto, mencionam que alguns biomateriais abordados como curativos, como por exemplo o biomaterial fabricado a partir de polifenol, podem ter grandes impactos em todas as fases, principalmente na fase de hemostasia (ZHANG et al., 2021).

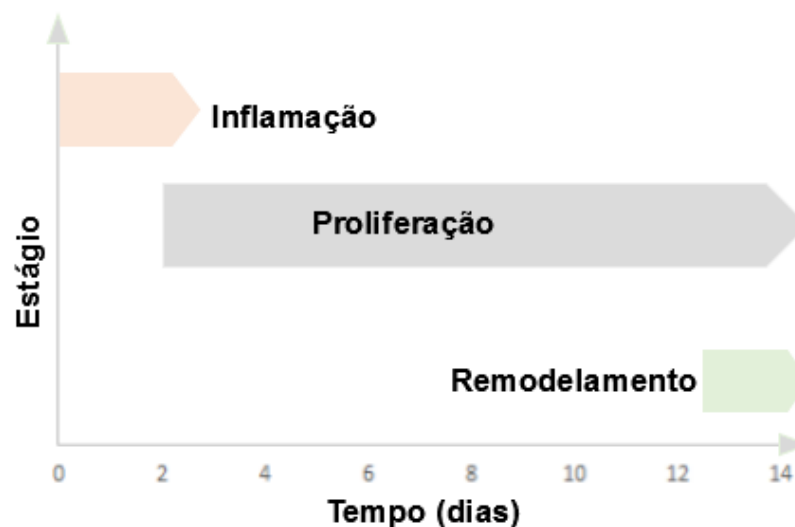


Figura 9. Estágios envolvidos no processo de reparo de tecidos. Fonte: autor.

Atendendo às principais características apresentadas pelas MSC no processo de reparo e reconstrução tecidual, as ADSC têm sido uma opção altamente empregada na cultura sobre biomateriais, que, por sua vez, têm sido empregados



nas cirurgias plásticas. Esta abordagem, é, interessantemente, explorada, pois a combinação de células-tronco e biomateriais é capaz de promover maior funcionalidade ao tecido lesado, bem como reduzir a formação ou ressurgimento de cicatrizes (CHU et al., 2020; KIM et al., 2014).

Considerando que o campo da cirurgia plástica, direcionado à restauração e melhoramento de condições que perderam a funcionalidade, está diante de tecnologias inovadoras, é importante que o cirurgião plástico se prepare para translação destas metodologias para a prática clínica (BANYARD et al., 2015).

Ainda, na cirurgia plástica, existem alguns biomateriais que podem servir como curativos ativos, que manipulam o ambiente bioquímico local (ZAREI et al., 2017). Conforme Zarei e colaboradores (2017) o conhecimento completo dos mecanismos que envolvem a interação entre ADSC e biomateriais percorrerá um longo caminho para potencialmente ser utilizado com sucesso nas cirurgias plásticas.

## **7.2 Reconstruções vaginais**

A cirurgia reconstrutiva é necessária para uma ampla variedade de doenças patológicas que incluem patologias congênitas ou adquiridas, por exemplo síndrome de Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser. Em certos casos, vários procedimentos são necessários ao longo do tempo para que corra a reconstrução/reparo total. Dentre as cirurgias reconstrutivas abordadas até então, desde meados dos anos 2000, a reconstrução vaginal tem sido tradicionalmente desafiadora (WEFER et al., 2002).

Considerando esta necessidade, a viabilidade de desenvolver tecido artificial, a fim de recuperar e restaurar problemas vaginas, tem sido cada vez mais explorada e, diante do potencial terapêutico, tem sido proposta a realização de cultura celular combinada com arcabouços com a finalidade de propor novas alternativas terapêuticas. Esta estratégia está sendo abordada em estudos pré-clínicos e aplicada com sucesso em pacientes (MAGALHAES et al., 2020; ATALA, 2007).

De maneira geral, as propostas de reconstrução vaginal envolvem criar um canal neovaginal de diâmetro e comprimento adequados. No entanto, a combinação de arcabouços e células tende a agregar maior funcionalidade ao órgão/tecido, além de ter fatores que contribuem para uma estética adequada (PAPADOPULOS et al., 2017; HENCKES et al., 2020).

Embora não haja um procedimento padrão para cirurgia reconstrutiva da neovagina, existem muitas técnicas cirúrgicas e não cirúrgicas que são frequentemente abordadas (WALCH et al., 2011). Unger et al., (2015) citaram, resumidamente, algumas destas técnicas:

- i) Métodos de dilatação vaginal;
- ii) Vaginoplastia a partir da técnica de McIndoe utilizando enxertos de pele de espessura parcial;
- iii) Vaginoplastia a partir da técnica de McIndoe modificada utilizando pele de espessura total e enxertos de mucosa;
- iv) Técnicas laparoscópicas.

Embora, conforme mencionado, existam técnicas que utilizam tecidos como enxertos, dependendo de sua origem, estes tecidos podem não ser ideais para serem empregados em casos que é necessária a reconstrução vaginal, uma vez que

podem apresentar problemas como encolhimento, falta de lubrificação, secreção mucosa, formação de estenose e prolapso neovaginal (SARTONEVA et al., 2018).

Visto isto, diante das anomalias complexas que envolvem a reconstrução vaginal, novas técnicas e ideias de diferentes campos estão inovando em uma tentativa de apresentar novas alternativas terapêuticas à estas condições.

Considerando o emprego do arcabouço PLGA/PIepox+ADSC, conforme sugerido por Henckes et al., (2019) nas pesquisas iniciais realizadas em modelo *in vitro*, em contrapartida a técnica proposta nas pesquisas envolvendo pele de tilápia, conforme Dias et al., (2020), sugerem estas como potenciais metodologias a serem consideradas com a finalidade de reconstrução vaginal.

Abaixo, segue um modelo proposto e desenvolvido no Brasil, o qual utiliza pele de tilápia na reconstrução vaginal e que segue sendo explorado (DIAS et al., 2019; DIAS et al., 2020) (Figura 10).



Figura 10. Proposta de reconstrução vaginal. O modelo proposto por DIAS et al., (2019) consiste na tentativa de reconstruir o canal vaginal a partir da inserção de um molde acrílico ou de silicone, com cerca de 3 centímetros de diâmetro, recoberto com a pele de tilápia, inserido no espaço criado. Fonte: adaptado de Dias et al., 2019.

Segundo Dias et al., (2020) o molde permanece internamente no paciente cerca de dez dias a fim de evitar o fechamento da cavidade criada. Durante esse período, o material envolto do molde começará a ser absorvido pelo organismo da paciente e as células iniciarão o processo de diferenciação até atingir um ambiente funcional similar ao de origem.

Finalmente, considerando as pesquisas em modelo *in vitro*, realizadas por Henckes et al., (2019), Guerra et al., (2020), Carazai et al., (2021) PLGA/Plépo combinado com as células-tronco mesenquimais tem grande potencial para ser, de fato, abordado na criação do canal vaginal de forma a trazer funcionalidade ao tecido recém criado como, similarmente, sugerido por DIAS et al., (2020).

## JUSTIFICATIVA

Todos os anos, existem milhões de pessoas que sofrem com a perda de tecidos em decorrências de lesões não tratadas adequadamente e, às vezes, negligenciadas. A necessidade de encontrar terapias alternativas para auxiliar nestes tratamentos tem sido um grande desafio tanto para a comunidade científica, a qual desenvolve novas tecnologias, quanto aos pacientes que estão à espera destes tratamentos. Como uma nova alternativa terapêutica, inovadora para a prática clínica e experimental, biomateriais combinados com células têm sido empregados na tentativa de restaurar e manter, ou melhorar a atividade biológica de tecidos e órgãos que requerem reconstrução mais complexa. Neste momento, diversos cientistas têm se empenhado em explorar esta complexa e promissora abordagem diante das novas tecnologias, baseada em biomateriais e células-tronco, que estão surgindo. Este empenho corrobora com a perspectiva do mercado brasileiro, o qual estima atingir cerca de US\$ 5,18 bilhões até 2022 na produção de biomateriais. Em reflexo a isto, é esperado que ao longo dos próximos anos haverá um aumento ainda maior na demanda por novos biomateriais e, até mesmo, abordagens terapêuticas mais consolidadas que venham atender as necessidades clínicas. Este intenso crescimento, é atribuído, principalmente, às melhorias inovadoras e tecnológicas que estão sendo realizadas envolvendo esta abordagem.

Uma importante estratégia a ser considerada na construção de novas tecnologias que envolvam biomateriais e células-tronco como suporte mecânico, substitutos biológicos e curativos cirúrgicos, é a maneira inovadora, mais eficiente, moderna e segura que será abordada. Ao encorajar os cientistas frente a estes

desafios, são constantes os esforços para apresentar novas alternativas aos protocolos tradicionais para futura translação.

Avaliando a grande perspectiva deste estudo, o qual envolve a combinação do biomaterial PLGA/PIepox e ADSC, a partir da construção dessa experiência, pretende-se levar, futuramente, sua aplicação para a clínica. Para que isto ocorra, compreender seu comportamento biológico em modelo *in vivo*, com o intuito de diminuir os problemas envolvendo rejeição, biocompatibilidade, integração e viabilidade, é essencial garantir a comprovação da eficácia de seu uso para a reconstrução/restauração de tecidos.

Estudos prévios em modelo *in vitro*, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que as ADSC preservaram suas características biológicas e habilidades de proliferação quando combinadas com o biomaterial PLGA/PIepox, e estes resultados apresentaram-se promissores. A partir disto, em busca de mais comprovações científicas, seguimos propondo e realizando este trabalho em modelo *in vivo*, uma vez que a combinação de PLGA/PIepox e ADSC aparece como uma nova opção de aplicação terapêutica promissora de engenharia de tecidos.

## **HIPÓTESES**

### **HIPÓTESE NULA**

A combinação de PLGA/PlepoX e células-tronco mesenquimais não é biocompatível ao tecido do receptor.

### **HIPÓTESE ALTERNATIVA**

A combinação de PLGA/PlepoX e células-tronco mesenquimais é biocompatível ao tecido do receptor.

## **OBJETIVOS**

### **Principal**

Comprovar a eficácia, integração e biocompatibilidade do biomaterial PLGA/PlepoX combinado com células-tronco mesenquimais adipo-derivadas.

### **Secundários**

- Avaliar e comparar quantitativamente a expressão de proteínas específicas presentes no citoesqueleto (AE1/AE) nos diferentes períodos de tempo pós-implante entre os grupos;

- Avaliar e comparar quantitativamente a proliferação celular (Ki67) nos diferentes períodos de tempo pós-implante entre os grupos;

- Avaliar e comparar quantitativamente a formação de novos vasos (CD31) nos diferentes períodos de tempo pós-implante entre os grupos;

- Avaliar e comparar qualitativamente os níveis de inflamação nos diferentes períodos de tempo pós-implante entre os grupos.



## REFERÊNCIAS

ABE, Gabriela Laranjeira. Efeitos da fotobiomodulação na adesão e proliferação das células-tronco da papila apical humana em scaffold de quitosana com incorporação de coágulo sanguíneo. Estudo *in vitro*. Universidade de São Paulo. 2016

ALESSIO, Nicola et al. New Frontiers in Stem Cell Research and Translational Approaches. **Biology**, v. 9, n. 1, p. 11, 2020.

AL-GHADBAN, Sara; BUNNELL, Bruce A. Adipose tissue-derived stem cells: immunomodulatory effects and therapeutic potential. **Physiology**, v. 35, n. 2, p. 125-133, 2020.

ANDERSON, James M.; RODRIGUEZ, Analiz; CHANG, David T. Foreign body reaction to biomaterials. In: Seminars in immunology. **Academic Press**. p. 86-100, 2008.

ARAMWIT, P. Introduction to biomaterials for wound healing. In: **Wound healing biomaterials**. Woodhead Publishing. p. 3-38, 2016.

ARORA, Meenakshi. Cell culture media: a review. **Mater methods**, v. 3, n. 175, p. 24, 2013.

ASSIS-RIBAS, Thais et al. Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation. **Developmental biology**, v. 437, n. 2, p. 63-74, 2018.

ATALA, Anthony. Engineering tissues, organs and cells. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 1, n. 2, p. 83-96, 2007.

AYALA-CUELLAR, Ana Patricia et al. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. **Biomolecules & therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 25, 2019.

BACAKOVA, Lucie et al. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—a review. **Biotechnology advances**, v. 36, n. 4, p. 1111-1126, 2018.

BADYLAK, Stephen F.; NEREM, Robert M. Progress in tissue engineering and regenerative medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 8, p. 3285-3286, 2010.

BAJEK, Anna et al. Adipose-derived stem cells as a tool in cell-based therapies. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 6, p. 443-454, 2016.

BAMBOLE, Vaishali; YAKHMI, Jatinder Vir. Tissue engineering: Use of electrospinning technique for recreating physiological functions. In: **Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering**. William Andrew Publishing. p. 387-455, 2016.

BANYARD, Derek A. et al. Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 19, n. 1, p. 21-30, 2015.

BEEKEN, Lydia J.; TING, Darren SJ; SIDNEY, Laura E. Potential of mesenchymal stem cells as topical immunomodulatory cell therapies for ocular surface inflammatory disorders. **Stem cells translational medicine**. 2020

BERTHIAUME, François; MAGUIRE, Timothy J.; YARMUSH, Martin L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 2, p. 403-430, 2011.

BERTON, Federico et al. A critical review on the production of electrospun nanofibres for guided bone regeneration in oral surgery. **Nanomaterials**, v. 10, n. 1, p. 16, 2020.

BITTO, Alessandra et al. Polydeoxyribonucleotide improves angiogenesis and wound healing in experimental thermal injury. **Critical care medicine**, v. 36, n. 5, p. 1594-1602, 2008.

BRÄUNIG, P. et al. The differentiation potential of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cell lineage related to male germ cells. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p. 160-168, 2018.

CADDEO, Silvia; BOFFITO, Monica; SARTORI, Susanna. Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 40, 2017.

CARAZZAI, Rafael et al. Electrospun natural rubber latex biocomposite for scaffolds in tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, 2021.

CARVALHO, J. et al. Innovative strategies for tissue engineering. **Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications**. InTech, Rijeka, Croatia, p. 295-313, 2013.

CHAGASTELLES, Pedro C.; NARDI, Nance B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney international supplements**, v. 1, n. 3, p. 63-67, 2011.

CHANDORKAR, Yashoda; Ravikumar K, Basu, Bikramjit. The Foreign Body Response Demystified. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, 2019.

CHEN, Meikai et al. Mesenchymal stem cell sheets: a new cell-based strategy for bone repair and regeneration. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 3, p. 305-318, 2019.

CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1128-1139, 2016.

CHU, Dinh-Toi et al. An update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application of human bone marrow mesenchymal stem/stromal cells. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 3, p. 708, 2020.

COHEN, Mark S.; KAO, Lillian (Ed.). **Success in Academic Surgery: Innovation and Entrepreneurship**. Springer, 2019.

COSSU, Giulio et al. Lancet commission: stem cells and regenerative medicine. **The Lancet**, v. 391, n. 10123, p. 883-910, 2018.

COSTA, Péricles Natan Mendes da. Caracterização de células mesenquimais-like diferenciadas a partir de células-tronco humanas de pluripotência induzida. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2020.

CUZZELL, Jan. Choosing a wound dressing. **Geriatric nursing**, v. 18, n. 6, p. 260-265, 1997.

DAN, He; HAIYAN, Li. Biomaterials affect cell-cell interactions in vitro in tissue engineering. **Journal of Materials Science & Technology**, 2020.

DASH, Biraja C. et al. Stem cells and engineered scaffolds for regenerative wound healing. **Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 23, 2018.

DE SOUZA Fernandez, Teresa; De Souza Fernandez, Cecília. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications for haematopoietic stem cell transplantation. **Pluripotent Stem Cells-From the Bench to the Clinic**. IntechOpen, 2016.

DEBSKI, Tomasz et al. Scaffold vascularization method using an adipose-derived stem cell (ASC)-seeded scaffold prefabricated with a flow-through pedicle. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2020.

DECOSTER, Sonia Arbues. **Inovação e novos modelos de negócios**. Editora Senac São Paulo, 2020.

DHAVALIKAR, Prachi et al. Review of Integrin-Targeting Biomaterials in Tissue Engineering. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 23, p. 2000795, 2020.

DHOWRE, Hala S. et al. Responsive cell–material interfaces. **Nanomedicine**, v. 10, n. 5, p. 849-871, 2015.

DIAS, Maria Tereza Pinto Medeiros et al. Neovaginoplasty using Nile Tilapia fish skin as a new biologic graft in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 27, n. 4, p. 966-972, 2020.

DIAS, Maria Tereza Pinto Medeiros et al. Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertility and sterility**, v. 112, n. 1, p. 174-176, 2019.

DOORN, Joyce et al. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 18, n. 2, p. 101-115, 2012.

DWIVEDI, Ruby et al. Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 10, n. 1, p. 381-388, 2020.

DYE, J. F. From Secondary Intent to Accelerated Regenerative Healing: Emergence of the Bio-intelligent Scaffold Vasculogenic Strategy for Skin Reconstruction. **Vascularization for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, p. 205-271, 2021.

DZOBO, Kevin et al. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: Innovation and transformation of medicine. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

DZOBO, Kevin et al. Fibroblast-derived extracellular matrix induces chondrogenic differentiation in human adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in vitro. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1259, 2016.

EGAÑA, José T. et al. The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5918-5926, 2009.

El Sayyad, Sobh MA, Khalif SA, El-Sayyad OKR. Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Adipogenic and Osteogenic Stem Cells. **Stud Stem Cells Res Ther**. 017-024, 2016.

ELLIS, M. J. Two-and three-dimensional tissue culture bioprocessing methods for soft tissue engineering. In: **Standardisation in Cell and Tissue Engineering**. Woodhead Publishing. p. 34-53, 2013.

FACKLAM, Amanda L.; Volpatti, Lisa R.; Anderson, Daniel G. Biomaterials for personalized cell therapy. **Advanced Materials**, v. 32, n. 13, p. 1902005, 2020.

FATHI-ACHACHELOUEI, Milad et al. Use of nanoparticles in tissue engineering and regenerative medicine. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 113, 2019.

FRANCIS, Sam L. et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells in the use of cartilage tissue engineering: the need for a rapid isolation procedure. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

FRESE, Laura; Dijkman, Petra E.; Hoerstrup, Simon P. Adipose tissue-derived stem cells in regenerative medicine. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 268-274, 2016.

FRIEDENSTEIN, A. J.; Chailakhjan, R. K.; Lalykina, K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FURTH, Mark E.; Atala, Anthony. Tissue Engineering: Future Perspectives. In: **Principles of Tissue Engineering**. Academic Press. p. 83-123, 2014.

GARG, Priyanka et al. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. **Orthopaedic surgery**, v. 9, n. 1, p. 13-19, 2017.

GASIK, Michael. Understanding biomaterial-tissue interface quality: combined in vitro evaluation. **Science and Technology of advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 550-562, 2017.

GHOSH, Bikramaditya; PAL, Imon. Basic Ideas and Concepts about Tissue engineering: A Review. 2016.

GIBCO. Cell Culture Basics Handbook Includes transfection. **Thermo Fisher Scientific Inc.** 2016.

GIWA, Sebastian et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 530-542, 2017.

GLASS, Graeme Ewan; Ferretti, Patrizia. Adipose-derived stem cells in aesthetic surgery. **Aesthetic Surgery Journal**, v. 39, n. 4, p. 423-438, 2019.

GNECCHI, Massimiliano et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GONZÁLEZ Martínez, P. C. et al. Mesenchymal Stem-Cells Patches Improve Burn Wound Reepithelization in a Porcine Wound Model: A Prospective, Comparative Study, 2018.

GUERRA, Nayrim Brizuela et al. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 8, p. 1-9, 2018.

GUGJOO, Mudasir Bashir et al. Goat mesenchymal stem cell basic research and potential applications. **Small Ruminant Research**, v. 183, p. 106045, 2020.



HACKER, Michael C.; Krieghoff, Jan; Mikos, Antonios G. Synthetic polymers. In: Principles of regenerative medicine. **Academic press**. p. 559-590, 2019.

HADDAD, Rodrigo; Saldanha-Araujo, Felipe. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

HAN, Fengxuan et al. Tissue engineering and regenerative medicine: achievements, future, and sustainability in Asia. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 2020.

HARRELL, C. Randall et al. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the treatment of eye diseases. In: **Cell Biology and Translational Medicine, Volume 2**. Springer, Cham. p. 47-57, 2018.

HENCKES, Nicole Andréa Corbellini et al. Tissue-engineered solution containing cells and biomaterials—an in vitro study: A perspective as a novel therapeutic application. *The International journal of artificial organs*, v. 42, n. 6, p. 307-314, 2019.

HOSSEINI, Motahare-Sadat; Amjadi, Issa; Mozafari, Masoud. State-of-the-art and future perspectives of functional polymers. In: **Advanced Functional Polymers for Biomedical Applications**. Elsevier, p. 383-395, 2019.

HUANG, Zheng-Ming et al. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites science and technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, 2003.

HUSSEIN, Kamal Hany et al. Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 67, p. 766-778, 2016.

ISLAM, Md Shariful et al. A review on fabrication of nanofibers via electrospinning and their applications. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 10, p. 1-16, 2019.

J SALGADO, Antonio et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Current stem cell research & therapy**, v. 5, n. 2, p. 103-110, 2010.

KEANE, Timothy J.; Badylak, Stephen F. Biomaterials for tissue engineering applications. In: **Seminars in Pediatric Surgery**. WB Saunders. p. 112-118, 2014.

KHADEMHOSEINI, Ali; Langer, Robert. A decade of progress in tissue engineering. **Nature protocols**, v. 11, n. 10, p. 1775-1781, 2016.

KIISKINEN, Jasmi et al. Nanofibrillar cellulose wound dressing supports the growth and characteristics of human mesenchymal stem/stromal cells without cell adhesion coatings. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 292, 2019.

KIM, Yong-Jin, and Jae-Ho Jeong. "Clinical application of adipose stem cells in plastic surgery." **Journal of Korean medical science** vol. 29,4, p. 462-7, 2014.

KO, In Kap et al. In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 11, p. e57-e57, 2013.

KOBOLAK, Julianna et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 99, p. 62-68, 2016.

KOCH, Thomas G.; Berg, Lise C.; Betts, Dean H. Current and future regenerative medicine—principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 2, p. 155, 2009.

KOH, Chester J.; Atala, Anthony. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 5, p. 1113-1125, 2004.

KOWALCZUK, Marek. Intrinsicly Biocompatible Polymer Systems. 2020.

KUMAR, Praveen et al. The mesenchymal stem cell secretome: a new paradigm towards cell-free therapeutic mode in regenerative medicine. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 46, p. 1-9, 2019.

KURAITIS, D. et al. Cell therapy to regenerate the ischemic heart. In: **Cardiac regeneration and repair**. Woodhead Publishing. p. 118-137, 2014.

KUSUMA, Gina D. et al. Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. **Stem cells and development**, v. 26, n. 9, p. 617-631, 2017.

LANGER, R.; Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* 260: 920-926. **Tissue Engineering: the union of biology and engineering**, v. 98, 1993.

LANGER, Robert. Chemical and Biological Approaches to Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Molecular Frontiers Journal**, v. 3, n. 02, p. 122-128, 2019.

LARGO, Remo A. et al. Angiogenesis and vascularity for tissue engineering applications. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering—Cells and Biomaterials**, p. 433-46, 2011.

LAROYE, Caroline et al. Mesenchymal stromal cells for sepsis and septic shock: Lessons for treatment of COVID-19. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2020.

LEE, Byung-Chul; Kang, Kyung-Sun. Functional enhancement strategies for immunomodulation of mesenchymal stem cells and their therapeutic application. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2020.

LEVIN, Gabriel et al. Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. **Índice**, p. 26.

LI, Peng; GUO, Xiutian. A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 302, 2018.

LIANG, Xiaoting et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. **Cell transplantation**, v. 23, n. 9, p. 1045-1059, 2014.

LINERO, Itali; Chaparro, Orlando. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **Plos one**, v. 9, n. 9, p. e107001, 2014.

LISINI, D. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for clinical application: An efficient isolation approach. **Current research in translational medicine**, v. 67, n. 1, p. 20-27, 2019.

LOPES, Sérgio M. et al. Stem cells out of the bag: characterization of ex vivo expanded mesenchymal stromal cells for possible clinical use. **Future science OA**, v. 6, n. 3, p. FSO449, 2020.

LUCEY, Brendan P.; Nelson-Rees, Walter A.; Hutchins, Grover M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 133, n. 9, p. 1463-1467, 2009.

LYSAGHT, Michael J.; Jaklenec, Ana; Deweerd, Elizabeth. Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 2, p. 305-315, 2008.

MAGALHAES, Renata S. et al. A tissue-engineered uterus supports live births in rabbits. **Nature Biotechnology**, p. 1-8, 2020.

MAJIDINIA, Maryam; Sadeghpour, Alireza; Yousefi, Bahman. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. **Journal of cellular physiology**, v. 233, n. 4, p. 2937-2948, 2018.

MAXSON, Scott et al. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 2, p. 142-149, 2012.

MAZINI, Loubna et al. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1306, 2020.

MEYER, Mark B. et al. Epigenetic plasticity drives adipogenic and osteogenic differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 34, p. 17829-17847, 2016.

MIGITA, Natacha Azussa. Cultivo celular in vitro: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares. 2012.

MIRJALILI, Mohammad; Zohoori, Salar. Review for application of electrospinning and electrospun nanofibers technology in textile industry. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 207-213, 2016.

MORAIS, Jacqueline M.; Papadimitrakopoulos, Fotios; Burgess, Diane J. Biomaterials/tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. **The AAPS journal**, v. 12, n. 2, p. 188-196, 2010.

NAAHIDI, Sheva et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*, v. 35, n. 5, p. 530-544, 2017.

NADERI, N. et al. Adipose derived stem cells and platelet rich plasma improve the tissue integration and angiogenesis of biodegradable scaffolds for soft tissue regeneration. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p. 2005-2013, 2020.

NADIG, Roopa R. Stem cell therapy—Hype or hope? A review. **Journal of conservative dentistry: JCD**, v. 12, n. 4, p. 131, 2009.

NAJI, Abderrahim et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-26, 2019.

NOUR-ELDEEN, Ghada et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and chitosan/poly (vinyl alcohol) nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering. **Cell Regeneration**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2020.

PALUMBO, Paola et al. Methods of isolation, characterization and expansion of human adipose-derived stem cells (ASCs): an overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1897, 2018.

PAPADOPULOS, Nikolaos A. et al. Combined vaginoplasty technique for male-to-female sex reassignment surgery: Operative approach and outcomes. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 70, n. 10, p. 1483-1492, 2017.

PINA, Sandra et al. Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Materials**, v. 12, n. 11, p. 1824, 2019.

PIRES, Ana Luiza R.; Bierhalz, Andréa CK; Moraes, Ângela M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

PITTENGER, Mark F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **NPJ Regenerative medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2019.

PLACE, Elsie S.; Evans, Nicholas D.; Stevens, Molly M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 457-470, 2009.

PRADHAN, Shantanu et al. Fundamentals of laser-based hydrogel degradation and applications in cell and tissue engineering. **Advanced healthcare materials**, v. 6, n. 24, p. 1700681, 2017.

PRUITT, Basil A.; Levine, Norman S. Characteristics and uses of biologic dressings and skin substitutes. **Archives of surgery**, v. 119, n. 3, p. 312-322, 1984.

QU, Gaojing et al. Immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: Regulation and application. **Journal of Cellular Immunotherapy**, v. 4, n. 1, p. 1-3, 2018.

RABBERS, Andressa Sabine. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de compósito a base de colágeno e óleo da polpa (caryocar brasiliense camb). 2016.

RAHMATI, Maryam et al. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 15, p. 5178-5224, 2020.

RATAJCZAK, M. Z. et al. Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? **Leukemia**, v. 26, n. 6, p. 1166-1173, 2012.

ROBERT, Anny W. et al. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

ROMERO, Guilherme Carnielli; Trindade, Jéssica Andrade. Aspectos da interação biomaterial-tecido: uma revisão. 2016.

RUSTAD, Kristine C. et al. Enhancement of mesenchymal stem cell angiogenic capacity and stemness by a biomimetic hydrogel scaffold. **Biomaterials**, v. 33, n. 1, p. 80-90, 2012.



SABERIANPOUR, Shirin et al. Tissue engineering strategies for the induction of angiogenesis using biomaterials. **Journal of biological engineering**, v. 12, n. 1, p. 36, 2018.

SADEGHI, Somaye et al. Mesenchymal stem cell therapies for COVID-19: Current status and mechanism of action. **Life Sciences**, p. 118493, 2020.

SADTLER, Kaitlyn et al. Design, clinical translation and immunological response of biomaterials in regenerative medicine. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 7, p. 1-17, 2016.

SAFINSHA, S.; ALI, M. Mubarak. Composite scaffolds in tissue engineering. **Materials Today: Proceedings**, v. 24, p. 2318-2329, 2020.

SAMPOGNA, Gianluca; Guraya, Salman Yousuf; Forgione, Antonello. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 3, p. 101-107, 2015.

SAMSONRAJ, Rebekah M. et al. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 12, p. 2173-2185, 2017.

SARTONEVA, Reetta et al. Porous poly-l-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone scaffold: a novel biomaterial for vaginal tissue engineering. **Royal Society open science**, v. 5, n. 8, p. 180811, 2018.

SCHOBBER, Justine. Ethics and futuristic scientific developments concerning genitoplasty. In: Ethics and intersex. **Springer**, Dordrecht. p. 311-317, 2006.

SAVITZ, Sean I.; Rosenbaum, Daniel M. (Ed.). **Stroke recovery with cellular therapies**. Springer Science & Business Media, 2007.

SCHOEN, Frederick J.; Zhang, Guigen. Introduction: Biomaterials in Medical Devices. In: **Biomaterials Science**. Academic Press. p. 1417-1419, 2020.

SEO, Seogjin; Na, Kun. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011.

SHI, Yufang et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. **Cell research**, v. 20, n. 5, p. 510-518, 2010.

SIERRA-SÁNCHEZ, Álvaro et al. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. **npj Regenerative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-23, 2021.

SKLOOT, Rebecca. A vida imortal de Henrietta Lacks. Editora Companhia das Letras, 2011.

SONG, Na; SCHOLTEMEIJER, Martijn; SHAH, Khalid. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. **Trends in Pharmacological Sciences**, 2020.

SONG, Richard et al. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 3117, 2018.

SONG, Young Hye et al. Adipose-derived stem cells increase angiogenesis through matrix metalloproteinase-dependent collagen remodeling. **Integrative Biology**, v. 8, n. 2, p. 205-215, 2016.

SOTIROPOULOU, Panagiota A. et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 462-471, 2006.

SOUZA, Cristiano Freitas de et al. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 344-353, 2010.

SQUILLARO, Tiziana; Peluso, Gianfranco; Galderisi, Umberto. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. **Cell transplantation**, v. 25, n. 5, p. 829-848, 2016.

STEWART, Matthew C.; Stewart, Allison A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 243-261, 2011.

SULTANA, Naznin; Hassan, Mohd Izzat; Lim, Mim. Scaffolding Biomaterials. In: **Composite Synthetic Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. Springer, Cham, 2015. p. 1-11.

TORNELLO, Pablo R. Cortez et al. Micro/nanofiber-based scaffolds for soft tissue engineering applications: Potential and current challenges. **Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering**, p. 201-229, 2016.

TROHATOU, Ourania; Roubelakis, Maria G. Mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine: past, present, and future. **Cellular reprogramming**, v. 19, n. 4, p. 217-224, 2017.

TROUNSON, Alan; McDonald, Courtney. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges. **Cell stem cell**, v. 17, n. 1, p. 11-22, 2015.

TSIAPALIS, Dimitrios; O'Driscoll, Lorraine. Mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 991, 2020.

Ude, Chinedu Cletus, et al. "Application of stem cells in tissue engineering for defense medicine." **Military Medical Research**. p.1-18, 2018.

UNGER, Cecile A.; Paraiso, Marie Fidela R. Construction of the neovagina. **Female Pelvic Surgery**. Springer, New York, NY. p. 267-290, 2015.

VACANTI, Charles A. The history of tissue engineering. **Journal of cellular and molecular medicine**, 2006.

VALIATTI, Fabiana Borba et al. Papel do fator de crescimento vascular endotelial na angiogênese e na retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 55, n. 2, p. 106-113, 2011.

VELNAR, Tomaz et al. Biomaterials and host versus graft response: a short review. **Bosnian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 2, p. 82, 2016.

VENERUSO, V. et al. Stem cell paracrine effect and delivery strategies for spinal cord injury regeneration. **Journal of Controlled Release**, v. 300, p. 141-153, 2019.

VISWANATHAN, S. et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. **Cytotherapy**, v. 21, n. 10, p. 1019-1024, 2019.

VIZOSO, Francisco J. et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1852, 2017.

WALCH, Katharina et al. Functional and anatomic results after creation of a neovagina according to Wharton-Sheares-George in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome—long-term follow-up. **Fertility and sterility**, v. 96, n. 2, p. 492-497. 2011.

WANG, Mengyuan; Yuan, Quan; Xie, Liang. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

WANG, Ying et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature immunology**, v. 15, n. 11, p. 1009, 2014.

WANG, Yingjun. Biadaptability: an innovative concept for biomaterials. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 801-809, 2016.

WEFER, Joerg et al. Homologous acellular matrix graft for vaginal repair in rats: a pilot study for a new reconstructive approach. **World journal of urology**, v. 20, n. 4, p. 260-263, 2002.

WILLIAMS, D.F. Biocompatibility pathways: Biomaterials-induced sterile inflammation, mechanotransduction and principles of biocompatibility control. **ACS Biomater. Sci. Eng.** p.3, 2–35, 2017.

WOBMA, Holly M.; Liu, David; Vunjak-Novakovic, Gordana. Paracrine effects of mesenchymal stromal cells cultured in three-dimensional settings on tissue repair. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 4, p. 1162-1175, 2017.

WU, Hai et al. Chromatin dynamics regulate mesenchymal stem cell lineage specification and differentiation to osteogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1860, n. 4, p. 438-449, 2017.

WU, Yongkang et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have a heterogenic cytokine secretion profile. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

XIN, Tianchi; Greco, Valentina; Myung, Peggy. Hardwiring stem cell communication through tissue structure. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1212-1225, 2016.

XU, Yibo et al. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. **Bioactive materials**, v. 4, p. 366-379, 2019.

XUE, Jiajia et al. Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications. **Chemical reviews**, v. 119, n. 8, p. 5298-5415, 2019.

YAGI, Hiroshi et al. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. **Cell transplantation**, v. 19, n. 6-7, p. 667-679, 2010.

YANG, Yueh-Hsun Kevin et al. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

YAO, Tatsuma; ASAYAMA, Yuta. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. **Reproductive medicine and biology**, v. 16, n. 2, p. 99-117, 2017.

YI, TacGhee; Song, Sun U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of pharmacal research**, v. 35, n. 2, p. 213-221, 2012.

ZAMBON, Joao Paulo; Atala, Anthony; Yoo, James J. Methods to generate tissue-derived constructs for regenerative medicine applications. **Methods**, v. 171, p. 3-10, 2020.

ZAREI, Farshad; Negahdari, Babak. Recent progresses in plastic surgery using adipose-derived stem cells, biomaterials and growth factors. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 7, p. 699-706, 2017.

ZHANG, Xueqian et al. Polyphenol scaffolds in tissue engineering. **Materials Horizons**, 2021.

ZHOU, Guoying; Groth, Thomas. Host Responses to Biomaterials and Anti-Inflammatory Design—a Brief Review. **Macromolecular bioscience**, v. 18, n. 8, p. 1800112, 2018.

ZHOU, Sheng et al. Determinants of stem cell lineage differentiation toward chondrogenesis versus adipogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 9, p. 1653-1680, 2019.

ZUK P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., Hedrick M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.** p.7:211–228, 2001.



## ARTIGO 1

O artigo 1 foi elaborado de acordo com as normas da revista *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, que possui fator de impacto 3.96 e foi avaliada pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) com o nível qualis A1. A submissão ocorreu em 08 de novembro de 2021.

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine  
Research Article

### Tissue engineering application combining epoxidized natural rubber blend and mesenchymal stem cells in in vivo response: a therapeutic approach

Submission Status	Under Review
Manuscript ID	TERM-21-0444
Submitted On	8 November 2021 by Nicole Henckes
Submission Started	6 November 2021 by Nicole Henckes

This submission is under consideration and cannot be edited. Further instructions will be emailed to you from ScholarOne.

[View Submission Overview](#)

# Tissue engineering application combining epoxidized natural rubber blend and mesenchymal stem cells in *in vivo* response: a therapeutic approach

Nicole Andréa Corbellini Henckes<sup>1,2</sup>, Laura Chuang<sup>1</sup>, Isadora Bosak<sup>1</sup>, Rafael Carazzai<sup>3</sup>, Tuane Garcez<sup>6</sup>, Cristiana Palma Kuhl<sup>1,2</sup>, Fernanda dos Santos de Oliveira<sup>1</sup>, Luis Alberto Loureiro dos Santos<sup>3</sup>, Fernanda Visioli<sup>5,7</sup>, Elizabeth Obino Cirne-Lima<sup>1,2,4</sup>

1. Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular - Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
2. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
3. Laboratório de Biomateriais e Cerâmicas Avançadas, Departamento de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
4. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
5. Unidade de Patologia Experimental – Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
6. Unidade de Experimentação Animal - Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
7. Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

**Abstract:** The development of novel scaffolds is appreciated for being able to mimic a natural complex environment. This is a new challenge into cell–material interactions and presents opportunities in a variety of regenerative medicine applications. In this sense, mesenchymal stem cells have played a significant role in tissue repair and regeneration. The present research investigates the biocompatibility of Poly(Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA)/Poly(isoprene) (PI) epoxidized (PLGA/PIepox) scaffolds combined with adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC) in *in vivo* model.

GFP-labeled ADSC rats were seeded on PLGA/Plepox and were implanted by dorsal subcutaneous. The tissue histology was assessed at 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day post-implant. Histology was analyzed based on tissue integration and inflammation (Hematoxylin and Eosin) and immunohistochemistry was analyzed according to the expression of specific protein such as cytokeratin (AE1/AE3), to verify the microvessel density (CD31), cell proliferation (Ki67) and collagen content (picrossirius). At 7<sup>th</sup> day implants containing PLGA/Plepox+ADSC demonstrated reduction of inflammation levels as well as an adequate tissue integration, a high microvessel density and higher cell proliferation. Cytokeratin expression on PLGA/Plepox revealed the maintenance of the epithelium and the low expression of collagen (picrossirius analysis) showing an important possible reduction on scar formation. At 14<sup>th</sup> day post-implantation PLGA/Plepox+ADSC showed similar levels of CD31, Ki67 and AE1/AE3 staining when compared to PLGA/Plepox and sham group. Finally, we demonstrated that PLGA/Plepox+ADSC is able to provide an effective delivery system for ADSCs on tissue host and this combination is able to enhance the biocompatibility and provide a novel therapeutic application.

**Keywords:** Tissue engineering, scaffolds, adipose derived mesenchymal stem cells.

## 1. INTRODUCTION

Understanding the scientific approach of tissue engineering provides a new insight to scientific researchers on the development of new technologies involving scaffolds and stem cells for future translation via the creation of biological substitutes. Tissue engineering has recently emerged as one of the highly advancing fields, which also tries to address the ideal conditions of scaffolds in association with the biological constituents combining stem cells and biological factors to restore, maintain or improve biological tissue (Dias et al., 2020; Richbourg et al., 2019; Albanna et al., 2019).

The recent years have shown a significant global increase in the number of people suffering from the loss or failure of an organ or tissue due to trauma, severe dysfunction and congenital conditions. One of the key issues in tissue engineering is the potential to develop a surface that responds biologically, increases the cell-material interaction and is translated into a biological response in the clinical applications (Langer, 2019; Dhowre et al., 2015). The selection of an appropriate biomaterial and the suitable conditions for the use of cells combined with scaffolds is essential to develop alternative treatment strategies for tissue reconstruction (Sartoneva et al., 2018; Chan et al., 2008; Atala, 2004).

Assuming the interaction of cells combined with scaffolds in tissue host, some properties and characteristic should be modified to provide therapeutic potential and encourage self-regeneration of damaged tissue (Dhowre et al., 2015). In this sense, the scaffold's ability to protect, support and stimulate cell growth will depend on its mechanical and chemical characteristics (Yang et al., 2014; Amer et al., 2018). Poly(Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA)/Poly(isoprene) (PI) epoxidized (PLGA/PIepox)

scaffold was developed in our research group and its efficiency and biological activity in *in vitro* model was already tested (Henckes et al., 2019). The scaffold structure was able to mediate cell adhesion on its surface and maintain the conditions, morphological and biochemical, exclusive to mesenchymal stem cells (Guerra et al., 2021; Guerra et al., 2018; Henckes et al., 2019).

Based on that, different encouraging outcomes have shown the promise of mesenchymal cells (MSCs) for the treatment of tissue reconstruction due to their ability to enhance the capable of migrating to injury/inflammation locals and to promote re-epithelization and increase the neo-vascularization (Hu et al., 2018; Almeida-Porada et al., 2020). Beyond that, the remarkable biological feature of paracrine signalling and immune mediation has potentiated the beneficial effects of MSC-mediated improvements in tissue repairing (Benam et al., 2015; Wang et al., 2018).

The report on positive effects of the particular characteristics of the adipose derived mesenchymal stem cells has caught our attention and once allied to their potential application combined to the development of PLGA/PLepox can be promising as a new treatment in regenerative medicine.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Experimental design**

The animal experiments were conducted at the Ethical Principles of Animal Experimentation; Brazilian Law (nº11.794/08) and Brazilian normative resolutions following approval by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (process number 18-0499). Subcutaneous implantations in animal

models are indicated in preclinical studies involving engineered tissue to evaluate biocompatibility and host response (Khorramirouz et al., 2018). The experimental animals were 18 female adults Wistar rats (*Rattus norvegicus* sp.) weighing between 250 and 300g. Animal housing was kept with water ad libitum and an environment on a 12h/12h light/dark cycle at 20-24°C temperature and humidity (40–60%). All efforts were made to minimize the animal suffering. All animals were kept under equal conditions. The rats received 2 equal implants each. The implant scheme follows: the animals were divided into three groups: (i) the first group received PLGA/Plepox without cells, (ii) the second group received PLGA/Plepox with cultured adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC), (iii) the third group served as sham group. Evaluations were performed in two different moments: 3 animals per group in each point (7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day post-implantation). And, each group was compound by 6 animals, further each individual received 2 equal implants, producing 6 implant samples per group. When graft samples were collected (*post-mortem*) each tissue sample was divided in two parts, one was cryopreserved (-20°C) and the other part was fixed in 10% formol solution during 48h.

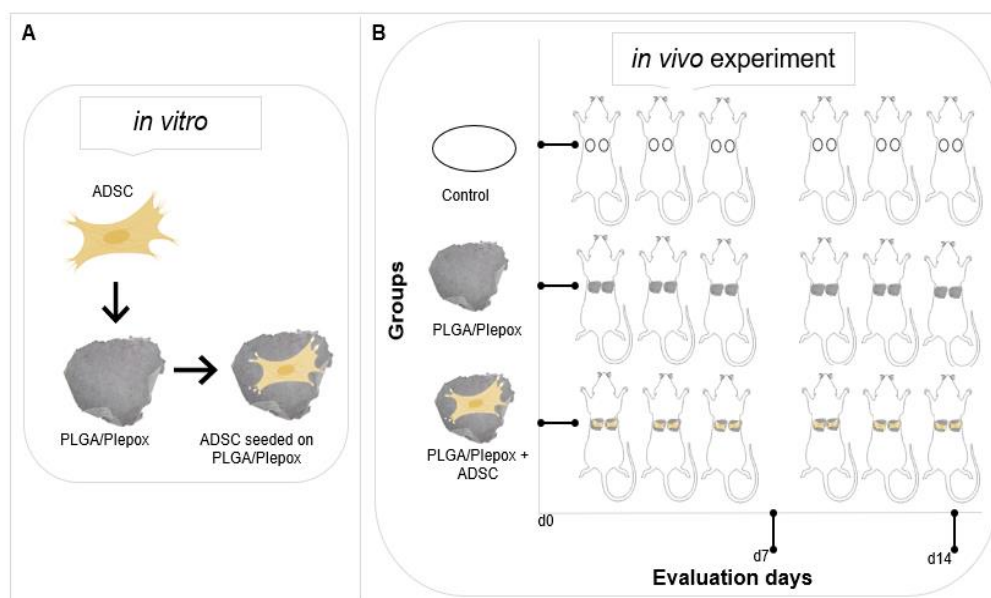


Figure 1. Schematic representation of PLGA/PlepoX+ADSC samples preparation (*in vitro*) (A) and illustration of *in vivo* experimental groups formation (B).

### 2.1.1 Scaffold sample preparation

PLGA/PlepoX was prepared as described previously (Guerra et al., 2018; Guerra et al., 2020; Carazzai et al., 2021; Henckes et al., 2019). The blends were obtained through the Electrospinning technique, in which polyisoprene is epoxidized with PLGA (PLGA/PlepoX) and dissolved in chloroform in a ratio of 3:2 (w/w). After standardizing the parameters, the metallic collector was used in a static way and the diameter of the metallic needle (0.7 mm) was maintained in all tests. The scaffolds were kept in hydration prior to cell culture for a minimum of 24h, according to Henckes et al. (2019). For experimental purposes the polymer was cut into  $\cong 11$  mm diameter disks to be used in 24-well plates.

### 2.1.2 PLGA/PlepoX+ADSC complex formation

Transgenic mesenchymal stem GFP-labeled cells were isolated, expanded and characterized previously (approval by process number 18-0590) (Franco, 2020). Rat GFP-labeled ADSC were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (GIBCO, USA), 1% penicillin/streptomycin (GIBCO, USA) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. ADSC ( $1.3 \times 10^5$  cells, passage 4 or 5) were seeded on the scaffolds 48h prior to *in vivo* implantation (Henckes et al., 2019).

### 2.1.3 Surgical procedure

The rat dorsal subcutaneous model allowed two pieces of implant per rat. The surgical procedure was performed under anesthetic induction with inhaled 5% isoflurane (Instituto Bioquímico Indústria Farmacêutica LTDA, Brazil), with maintenance in 2-3% isoflurane vaporized in 100% oxygen at a flow of 500ml/min. After trichotomy of the dorsal regions and the proper cleaning with chlorhexidine, in the rat in a ventral decubitus position, a cutaneous incision (2cm) and divulsion reaching the subcutaneous layer was performed to implant the cell-seeding scaffold. Each rat received two identical implants. Immediately after the surgical procedure, the rats received a dose of Enrofloxacin (10 mg/kg) intraperitoneally and tramadol chloride (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Brazil) (20 mg/kg). After 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day post-implantation, the animals were killed by anesthetic overdose with inhaled isoflurane and, respectively, the graft retrieved and processed for histological analysis.

#### **2.1.4 Histological analysis**

Graft samples were obtained immediately after euthanasia on 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day post-implantation. The tissue samples were obtained from the area where the scaffolds were previously inserted, then splitted to be cryopreserved or fixed. Samples were embedded in paraffin, sliced (3 µm), and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Using optical microscopy samples were evaluated for granulation tissue formation and inflammatory infiltrated cells occurrence. A blinded pathologist analyzed the histologic sections and classified the presence of inflammatory cells according to the following score: 0: absent; 1: discrete; 2: moderate; 3: severe.



Tissue sections were also stained with picosirius-red and analyzed under polarized light to determine collagen samples contents. To determine the colour of different collagen fibers, the hue component was subtracted. The number of pixels with a red (0-9, 230-256) and orange (10-38) range was recorded and expressed as the percentage of the total number of pixels in the regions analyzed (total of collagen pixels). Image J software (NIH, Bethesda, MD) was used to quantify staining based upon pixel-positive per area using the same intensity threshold for all images (Gonzalez et al., 2018).

### **2.1.5 Immunohistochemistry analysis**

At 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day post-implantation, immunohistochemistry analysis was performed with the biomarkers anti-CD31 polyclonal (1:100 - Life Technologies – PA516301), anti-Ki67 polyclonal (1:500 – AB15580; Brazil), and AE1/AE3 monoclonal (1:50 – AB80826; Brazil). The slides were incubated overnight at 4°C with the respective primary and secondary antibody according to the manufacturer's instructions. Finally, the reaction was developed with Liquid DAB (Dako, California), according to the manufacturer's recommendations. Vessel density was scored by counting the number of CD31+ vessels from randomly selected fields at 400x magnification and the average of vessels/mm<sup>2</sup> was calculated. Ki-67 was performed by counting the total cell (positive and negative cells) in aleatory fields, obtaining a mean positive cells percentage (400x magnification). Epidermal cell layers were identified immunohistochemically based on their reactivity with the AE1/AE3 pan-cytokeratin antibody (200x magnification). The slides were photographed and the staining was quantified with ImageJ.

### **2.1.6 Statistical analysis**

Generalized estimating equations (GEE) were performed in categorical variables (i.e., inflammation level) with an unstructured working correlation and Bonferroni multiple to comparison tests for analysis between groups in different moments. Kruskal-Wallis test were used to compare the three groups regarding quantitative variables (e.g., specific proteins expression as KI67, CD31, AE1/AE3 and picrosirius) between groups followed by the appropriate post hoc comparison. Correlations were evaluated by Spearman correlation test. Statistical tests were two-sided and p values <.05 were considered statistically significant.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Histology and immunohistochemistry Evaluations**

#### **3.1.1 H&E Analysis**

To elucidate the mechanism of the biocompatibility and repair potential, microscopic evaluation was performed with histological evaluation (H&E) after grafting at 7<sup>th</sup> day and at 14<sup>th</sup> day. On PLGA/PlepoX and PLGA/PlepoX+ADSC an intense cellular response largely comprising of inflammatory leukocytes was observed. Numerous macrophages and multinucleated giant cells were observed surrounding the remnants of the exogenous material and the scaffold, which is birefringent, was occasionally found inside the giant cells. The presence of a discrete mononuclear and a fibrous capsule surrounding the foreign body reaction was identified. PLGA/PlepoX (without cell) implanted showed higher inflammation levels in 7 and 14 days (Figure 2). PLGA/PlepoX+ADSC showed an interesting reduction on inflammation level when compared to PLGA/PlepoX (without cell), but there were no

statistics differences when compared to sham and PLGA/Plepox groups. We assigned an inflammatory score to measure inflammation quantitatively, and these scores were significantly different between PLGA/Plepox and sham group (Table 1). The results indicated that a PLGA/Plepox+ADSC implant has an interesting tendency of no inflammation process induction and indicate an adequate biocompatibility.

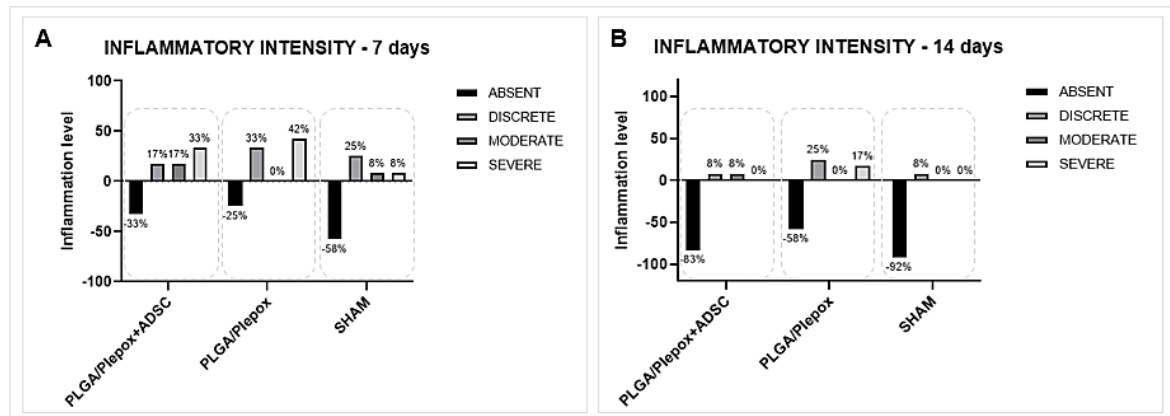


Figure 2. Inflammatory reaction score by H&E staining at 7<sup>th</sup> day (A) and 14<sup>th</sup> day (B) post-implantation. The negative values in black color highlight the absence of inflammation comparing groups.

	Sham	PLGA/Plepox	PLGA/Plepox +ADSC	
<b>Inflammation score 7<sup>th</sup> day</b>	mean (SE) 0.67(0.13)	mean (SE) 1.58 (0.180) *	mean (SE) 1.50 (0.312)	p value 0.16
<b>Inflammation Score 14<sup>th</sup> day</b>	mean (SE) 0.08 (0.068)	mean (SE) 0.63 (0.214)**	mean (SE) 0.25 (0.118)	p value 0.035

Table 1. Generalized estimating equations (GEE) performed in inflammation levels.

Significance levels between groups  $p=0.16$  (7<sup>th</sup> day) e  $p=0.035$  (14<sup>th</sup> day).  $p$  = significance levels between groups; \*  $p= 0.015$  (sham versus PLGA/Plepox 7<sup>th</sup> day); \*\*  $p= 0.044$  (sham versus PLGA/Plepox 14<sup>th</sup> day). Standard error (SE).

### 3.1.2. Vascularization Evaluation

To determine microvessels density the specific marker of endothelial cells CD31 was used. The results of microvessels density analysis are shown in Figure 3. Considering the microvessel density there is statistical significance between groups at 7<sup>th</sup> day but no at 14<sup>th</sup> day ( $p=0.0062$  and  $p=0.12$ , respectively). At 7<sup>th</sup> day post-implantation PLGA/PLepox+ADSC and PLGA/PLepox display higher microvessels density when compared with sham group ( $p=0.034$ ) and ( $p=0.010$ ), respectively. At 14<sup>th</sup> day, microvessels density decreased and there was no significant difference among the groups. This suggests that the neovascularization is more activated and important during early stages of the proliferative phase (Johnson et al., 2014) (Figure 3). Correlation test showed the influences of proliferation *versus* neovascularization in all groups and in both times.

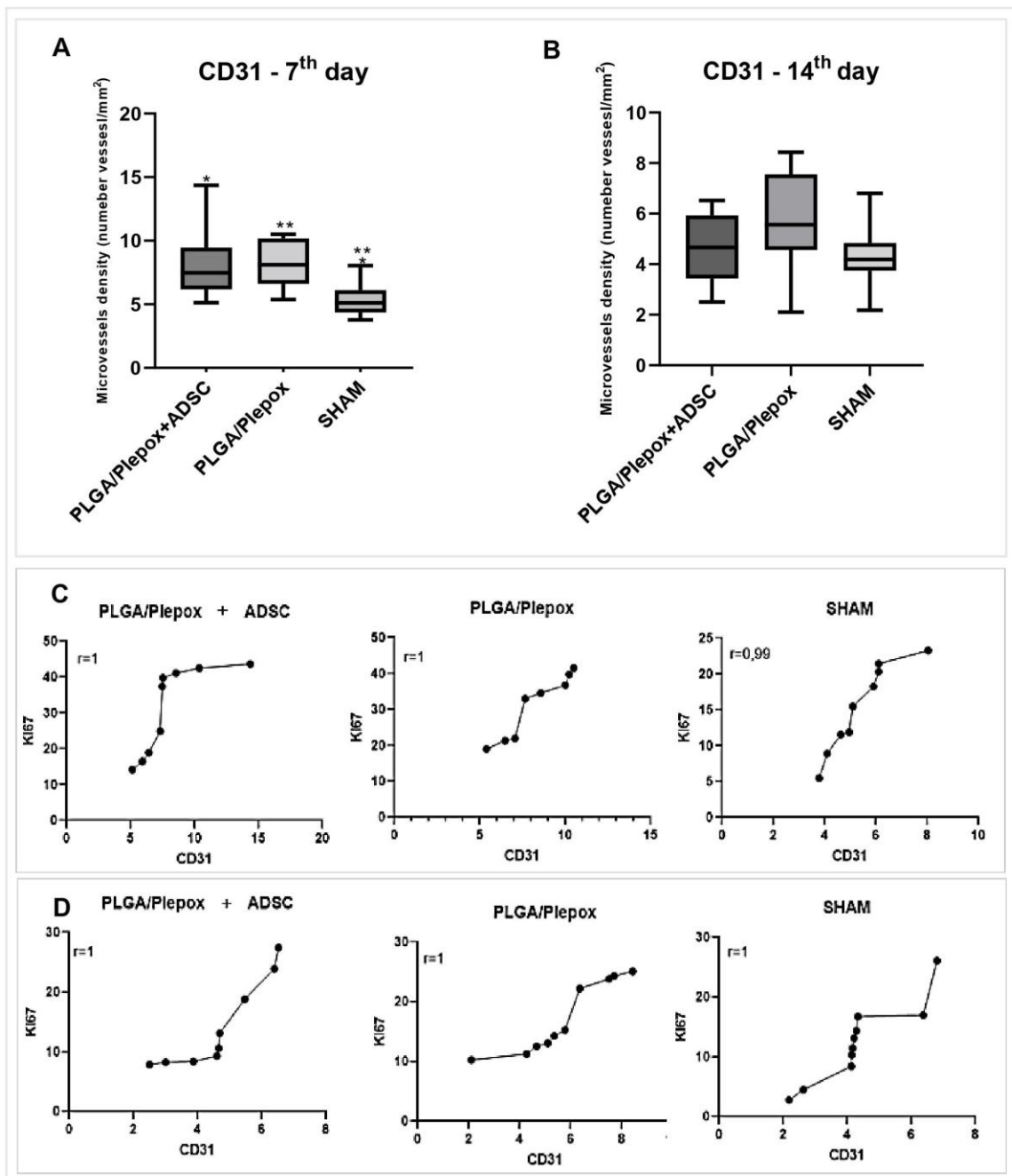


Figure 3. Quantification of microvessels density (number of vessels/mm<sup>2</sup>). Results represent microvessel density value in 7<sup>th</sup> day (A) and 14<sup>th</sup> day (B). Significance levels between groups \*p=0.034 (PLGA/PlepoX+ADSC versus sham 7 days); \*\*p=0.010 (PLGA/PlepoX versus sham at 7<sup>th</sup> day). Correlations between microvessel density (CD31) and proliferative activity (KI67) at 7<sup>th</sup> day (C) and 14<sup>th</sup> day (D).

Significance levels at 7<sup>th</sup> day PLGA/PlepoX+ADSC (p=0.0001), PLGA/PlepoX (p=0.0001) and sham group (p=0.0001); and PLGA/PlepoX+ADSC (p=0.0001), PLGA/PlepoX (p=0.0001) and sham group (p=0.0001) at 14<sup>th</sup> day post-implantation.

### 3.1.3. Cytokeratin molecules expression

Cytokeratin expression, which is a typical epithelial marker, didn't show statistical significance between groups at 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day analysed periods (p=0.38 and p=0.27, respectively). There is a tendency of greater expression (Figure 4) on PLGA/PlepoX+ADSC compared to sham (p=0.56) and PLGA/PlepoX group (p=0.90) at 7<sup>th</sup> day, but with no statistical difference. At 14<sup>th</sup> day post-implantation, sham group showed lower expression compared to both PLGA/PlepoX+ADSC (p>0.99) and PLGA/PlepoX (p=0.46), without statistical significance.

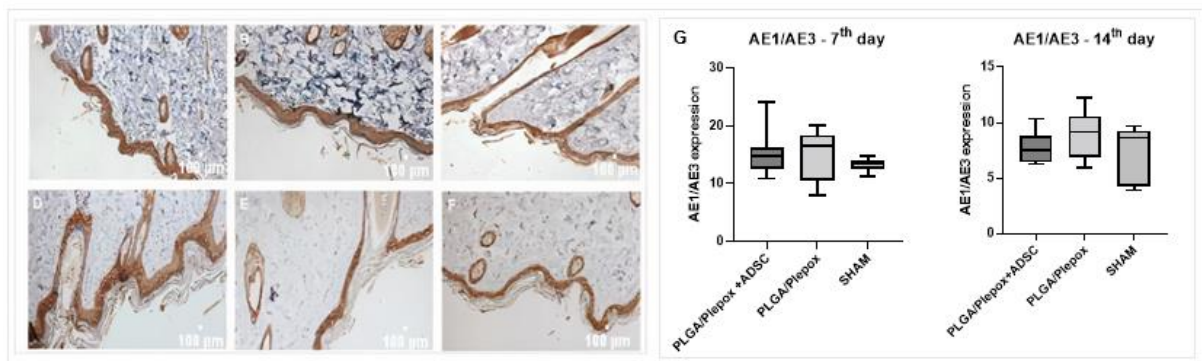


Figure 4. Photomicrographies depicting cytokeratin proteins expression on tissues samples obtained on the 7<sup>th</sup> day from the follows groups, **A** – PLGA/PlepoX+ADSC, **B** – PLGA/PlepoX, **C**- sham. And 14<sup>th</sup> day, **D**– PLGA/PlepoX+ADSC, **E** – PLGA/PlepoX, **F**- sham. (200x magnification) **G** – Boxplot diagram illustrating cytokeratin expression in each experimental group.

### 3.1.4. Cell Proliferation

Cell proliferation was examined by measuring the expression of Ki67 protein, a cellular marker for proliferation (Scholzen et al., 2000). Considering positive proliferative cells there is statistical significance between samples evaluated at 7<sup>th</sup> day but no at 14<sup>th</sup> day ( $p=0.004$  and  $p=0.43$ , respectively). As expected, the analysis performed with the samples collected at the 7<sup>th</sup> day (Figure 5), there was a significant increase in positive cells for Ki67 on PLGA/PlepoX+ADSC ( $p=0.023$ ) and PLGA/PlepoX ( $p=0.006$ ) groups in comparison to sham group. But, in the other hand, the expression of Ki67 in PLGA/PlepoX+ADSC and PLGA/PlepoX groups remained superior than the one in sham group but with no statistical significance ( $p>0.99$  and  $p=0.61$ , respectively) on samples obtained at the 14<sup>th</sup> day.

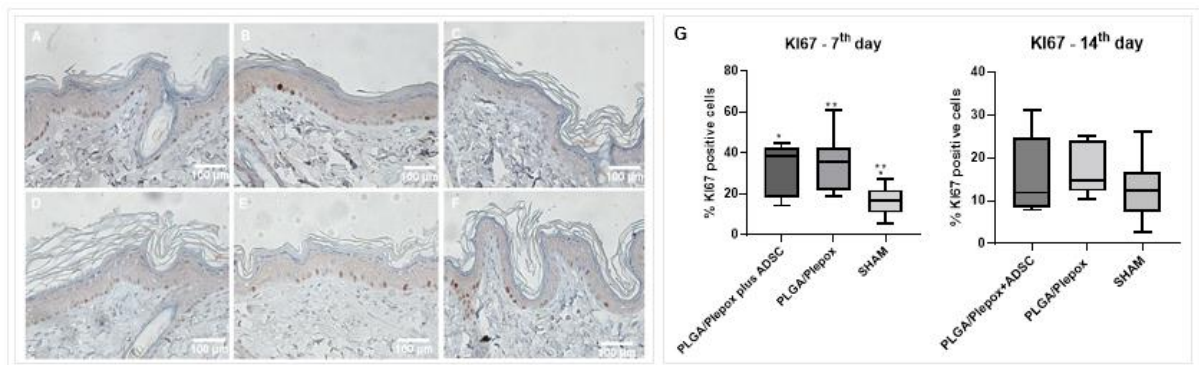


Figure 5. Photomicrographies demonstrating Ki67 expression in basal epidermis at 7<sup>th</sup> day in samples from the follows groups: **A** – PLGA/PlepoX+ADSC, **B** – PLGA/PlepoX, **C**- sham, and at 14<sup>th</sup> day (**D**– PLGA/PlepoX+ADSC, **E** – PLGA/PlepoX, **F**- sham). (400x magnification) **G** – Boxplot diagrams showing percentage of positive cells at 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days obtained materials. Significance levels between groups \* $p=0.023$  (PLGA/PlepoX+ADSC *versus* sham at 7<sup>th</sup> day); \*\* $p=0.006$  (PLGA/PlepoX *versus* sham at 7<sup>th</sup> day).

### 3.1.5. Demonstration of Collagen expression

Considering collagen expression there is no statistical significance between samples obtained from experimental groups at 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day ( $p=0.32$  and  $p=0.35$ , respectively). Although PLGA/Plepox+ADSC presented an interesting reduction in collagen signal intensity expression when compared with different groups in both periods (Figure 6). At 7<sup>th</sup> day there is no statistical significance between PLGA/Plepox+ADSC when compared to PLGA/Plepox ( $p=0.42$ ) and sham group ( $p>0.99$ ). At 14<sup>th</sup> day PLGA/Plepox+ADSC also showed no statistical difference when compared with sham group ( $p= 0.52$ ) and PLGA/Plepox group ( $p=0.84$ ).

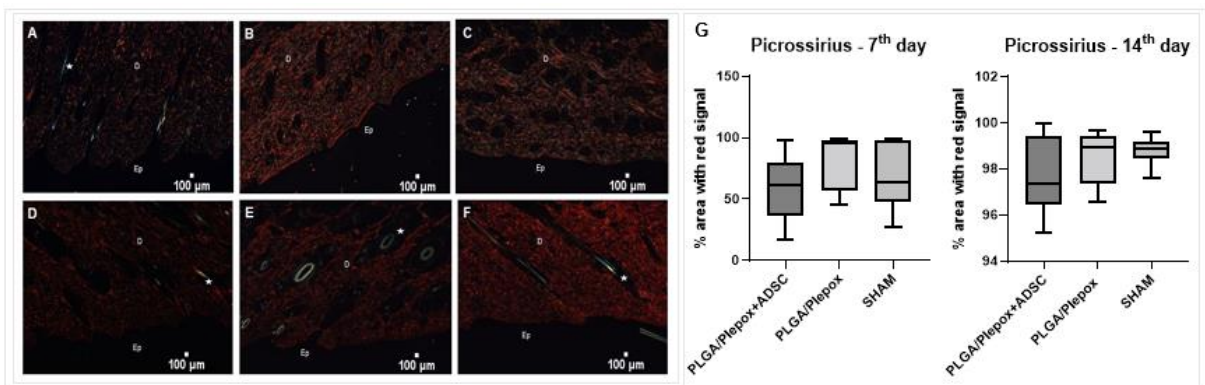


Figure 6. Photomicrographies demonstrating collagen expression evaluation on the 7<sup>th</sup> day (A – PLGA/Plepox+ADSC, B – PLGA/Plepox, C - sham) and at 14<sup>th</sup> day post-implantation (D - PLGA/Plepox+ADSC, E - PLGA/Plepox, F - sham) using picosirius red staining and polarized light (100x magnification). \* hairs; D: dermis; Ep: epidermis. Intensity hue for the red signal, a parameter of collagen integrity, expressed in mean percentage of the area with red signal was evidenced in the boxplot diagrams (G).

#### 4.DISCUSSION

This *in vivo* study reaffirm the ability of a new solution-tissue graft to integrate, respond to microenvironment and increase or preserve the typical pattern of proteins



expression overtime post-implantation. PLGA/Pllepox+ADSC interaction was previously assayed in an *in vitro* model, demonstrating a viable adipose-derived mesenchymal stem cell population on the scaffolds with uniform distribution and optimal adherence (Henckes et al., 2019).

In the present research, electrospinning method for PLGA/Pllepox fabrication was used due to its great promise as inexpensive synthetic grafts and potentially bioresorbable (Carrasai et al., 2021). Significant efforts have been made on modifying surface and hydrophobicity and it is well established that surface chemistry/hydrophobicity wields a direct effect on cell responses (Guerra et al., 2018). It is expected that cell adhesion increases as the wettability or hydrophilicity of the scaffold surface increases (Nair et al., 2017). Recently, Brizuela and collaborators (2018) chemically modified the poly (isoprene) structure prior to the preparation of this blend that confers a chemical modification (epoxidation) (Guerra et al., 2018). It is important to take into account that the integration of bioscaffolds in the surrounding host microenvironment is critical for the success of the implant. When not fabricated adequately it can impair graft functionality. PLGA/Pllepox fibers present high superficial porosity that may facilitate the adhesion of the cells.

Based on these properties, PLGA/Pllepox+ADSC was evaluated for its biocompatibility and inflammation levels of expression to determine the integration and the biological performance post-implantation. Histologically, we showed an interesting tendency of reduction in inflammation level in PLGA/Pllepox+ADSC, which suggests an adequate biocompatibility. Ababayehu et al. (2019) supported that macrophage form multinucleated foreign body giant cells when in contact with a strange material they cannot infiltrate. So, giant cells release highly inflammatory

reactive oxygen species to eliminate the strange material. For this reason, it is important to consider the scaffolds fabrication method.

Our results regarding inflammation quantification suggests that PLGA/Plepox, when implanted without cells, can negatively interfere the wound healing, but when ADSC are seeded there is an inflammation reduction tendency. Thus, the results indicate that the addition of the ADSCs on PLGA/Plepox has a higher chance to better integrate and positively interfere on the tissue. Similar to Laschke et al. (2009), we found a few giant cells on the tissue surrounding the implants, which is expected as a foreign body reaction to implanted biomaterials in the tissue host, and therefore we need to consider the advantageous characteristics in the implant by secreting pro-angiogenic cytokines and important paracrine mediators we can find with the seeded of ADSC on PLGA/Plepox. Perez-Puyana et al. (2020) highlighted that it's expected that the engineered tissue when implanted in the human body activates an adequate response from the host, without altering the performance of the device in the inserted environment. This was associated with the interesting reduction of inflammatory response on PLGA/Plepox+ADSC within the surrounding tissue which is possible to conclude that exhibited remarkable biocompatibility *in vivo*.

As a key point, implanted grafts must present functionality and provide structural characteristics to the body to guarantee the survival of tissues (Dye, 2019). In the last two decades, the integration with host vasculature has shown the main importance for graft success and has long been recognized as one of the most pressing challenges in tissue engineered. Combining cells on a scaffold can present a high dynamic process to tissues making it better vascularized (Mao et al., 2020; Das et al., 2020). We demonstrated with the microvessel density analysis that

vascularity was higher in both groups PLGA/Plepox and PLGA/Plepox+ADSC when compared to sham group, indicating a better tissue repair due to the ADSC functions as paracrine effects and addition of natural latex (polyisoprene) material. According to Laschke et al. (2012), the rapid vascularization process is directly involved with cell survival, better integration *in vivo* reflecting directly in the successful engineered tissue post-implantation. Mendonça et al. (2010) importantly hypothesized that the material based on natural latex (rubber tree *Hevea brasiliensis*) stimulates and induces the angiogenesis process, increasing the vascular permeability in the ear dermal wound model which may have been noticed in the results.

Besides the analysis of vascularization, we also investigated the capability of correlating the vascularization *versus* proliferation. The correlation test presented in this study indicates that the increase in the number of blood vessels can result in a greater supply of nutrients and, consequently, in a greater proliferative activity. All these aspects are in accordance with the response to injury conditionate to tissue engineered construct which is expected not only to develop blood vessels but to ensure mature and organized neovasculature (Masson-Meyers et al., 2021). Moreover, the correlation between vascularization and cell proliferation on tissue host after PLGA/Plepox+ADSC implantation strongly suggests that (i) the ADSC has an angiogenic role; (ii) PLGA/Plepox+ADSC may regulate blood vessel growth in a paracrine manner; (iii) vascularization act as a regulator of cell proliferation; (iv) vascularization and cell proliferation are related. Finally, it was possible to show that PLGA/Plepox was able to interact with ADSCs and host cells resulting in activating signaling pathways to reconstruct tissue damage (Sarker et al., 2019).

The cell source choice is a challenge in the development of a tissue-engineered model (Caddeo et al., 2017). ADSCs were selected to perform this research due to its capacity of differentiating into mesenchymal tissue, easily obtention and immunoprivilege *in vitro* and *in vivo* models. The immunoprivilege potential allows universal donor cells for allogeneic transplant (Zhu et. al., 2010). At the same time, we need to take into account the ADSC performance. ADSC are stimulated by growth factors and biologically active molecules, exercising immunomodulatory effects inhibiting or decreasing activation of inflammatory cells (Naderi et al., 2020).

We demonstrated that PLGA/Plepor can support ADSC growth, and also keep cells at a more active proliferative state according to the upregulation of Ki67 expression in comparison with the sham group. We can presume that PLGA/Plepor architecture and chemical properties can ensure efficient transport of nutrition for tissue host facilitating cell migration and proliferation as well as maintain cellular functions. Carrasai et al., (2021) investigated the influence of the PLGA/Plepor and the connectivity on cell migration using ADSC. Additionally, Guerra et al., (2020) performed another study presenting a different method of prepare PLGA/Plepor that can influence the cell proliferation.

Overall, the results support that Ki-67 expression, which is considered an indicator of cell proliferation and the antigen must be continuously present during the cell cycle, mainly observed between three to ten days after the wound, and decrease expression in non-proliferative stage (Zhao et al., 2021; Scholzen et. al., 2000). When our results were analysed was possible to observe a Ki67 augmented in analysed samples at 7<sup>th</sup> day and this expression was decreased at 14<sup>th</sup> day post-

implantation. These results suggested that cell proliferation is a biological process possess a directly interference in growth and maintenance of tissue homeostasis (Van Diest et al., 2018). The obtained data so far clearly show that the scaffolds promoted orientation, adhesion and proliferation of MSC (Landau et al., 2018).

In addition, cytokeratin expression levels on animals treated with PLGA/Pllepox combined with ADSC cells, although with no statistical significance detection between the groups, a tendence was indicated to a better tissue restructuration due possibly to the ADSC paracrine function which shown to stimulate increase of cytokeratins molecules expression recognized by AE1/AE3. Cytokeratin (CK) proteins are typically expressed on the different stages of epithelial cells development in epithelial stratified tissue. Then these increased expression of CK molecules observed should be related with a positive *stimuli* to accelerate epithelial cell turnover and differentiation process collaborating with a better tissue reconstruction also highlighting an important functional roles to ADSC-epithelium communication. This increased expression, according to Liu et al. (2020) is a direct result of the integrity and continuity of the epithelial tissue. Finally, the positive biological response of the cytokeratin molecules expression surrounding about PLGA/Pllepox+ADSC grafts *in vivo* suggests that tissue reconstruction is dependent on the environment which needs of a functional tissue restructuration.

Our tissue engineered construction PLGA/Pllepox+ADSC demonstrated that it can bring tissue functionality when implanted *in vivo* and we can understand the efficacy of this system and to detail histologically this functionality concept in collagen deposition by picrosirius analysis. We discovery a tendency of decrease in collagen deposition in the PLGA/Pllepox+ADSC in picrosirius analysis, which represents a

greater functionality to the tissue, although with no statistical significance detection between the groups. In functionality terms, it is also expected, according to Hu et al. (2018) that excessive collagen deposition negatively influences scars formation and decreased movement of the epithelium. Accordingly, studies reported by Marfia et al. (2015) confirm that it is possible to expect that the addition of MSC in tissue host can positively modulate scar formation through PGE2 secretion, IL-10 up-regulation, IL-6 and IL-8 down-regulation and reduction of collagen production. Our results indicate the optimal action of the PLGA/Pllepox+ADSC in tissue functionality terms which is an important aspect to be considered in tissue repair and regeneration. Adding ADSC to PLGA/Pllepox in tissue reconstruction purposes is considered a promise to promote regeneration of healthy, plastic and functional tissue.

## **Conclusions**

The application of PLGA/Pllepox combined with ADSC generate positive effects when implanted in damage tissues further then to be able to integrate and to promote tissue repair. We believe that the combination between PLGA/Pllepox with ADSC can be used as an important candidate with therapeutic potential for tissue engineering, considering its optimal performance, beside to no observed negative response post-implantation. Nevertheless, studies in human involving PLGA/Pllepox+ADSC grafts implanted in damage tissues will be necessary.

## **Acknowledgements**

We would like to thank to the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) and to the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Higher Education/Brazilian Ministry of Education (CAPES/MEC).

### **Conflict of interest statement**

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

### **Author's contribution**

Henckes NAC, Cirne-Lima EO, Oliveira FS and Santos LAL assisted in research design.

Henckes NAC, Chuang LC, Garcez T and Carrasai R, carried out the research. Henckes NAC, Bosak I, Kuhl CP, Visioli F and Cirne-Lima EO, analysed data.

Henckes NAC and Cirne-Lima EO wrote manuscript. Visioli F assisted with histological grading and immunohistochemistry analysis. All authors reviewed and approved the manuscript.

### **Ethics statement**

The authors confirm that all applicable guidelines for the care and use of animals were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines with approval by Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (process number 18-0499).

### **Funding**

This work was supported by the Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA). The funding sources had no role in the writing of the manuscript or the decision to submit it for publication.

## References

ABEBAYEHU, Daniel et al. Polymer scaffold architecture is a key determinant in mast cell inflammatory and angiogenic responses. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 4, p. 884-892, 2019.

ALBANNA, Mohammed et al. In situ bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019.

ALMEIDA-PORADA, Graça; ATALA, Anthony J.; PORADA, Christopher D. Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells for Immunotherapy and for Gene and Drug Delivery. **Molecular Therapy-Methods & Clinical Development**, 2020.

AMER, Mahetab H. et al. A biomaterials approach to influence stem cell fate in injectable cell-based therapies. **Stem cell research & therapy**, v. 9, n. 1, p. 39, 2018.

ATALA, Anthony. Tissue engineering and regenerative medicine: concepts for clinical application. **Rejuvenation research**, v. 7, n. 1, p. 15-31, 2004.

BENAM, Kambez H. et al. Engineered in vitro disease models. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, p. 195-262, 2015.



CADDEO, Silvia; BOFFITO, Monica; SARTORI, Susanna. Tissue engineering approaches in the design of healthy and pathological in vitro tissue models. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 5, p. 40, 2017.

CARAZZAI, Rafael et al. Electrospun natural rubber latex biocomposite for scaffolds in tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, p. 08839115211046415, 2021.

CHAN, B. P.; LEONG, K. W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. **European spine journal**, v. 17, n. 4, p. 467-479, 2008.

DAS, Suradip et al. Innervation: the missing link for biofabricated tissues and organs. **NPJ Regenerative medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2020.

DHOWRE, Hala S. et al. Responsive cell–material interfaces. **Nanomedicine**, v. 10, n. 5, p. 849-871, 2015.

DIAS, Juliana R. et al. In situ Enabling Approaches for Tissue Regeneration: Current Challenges and New Developments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 85, 2020.

DYE, J. F. From secondary intent to accelerated regenerative healing: emergence of the bio-intelligent scaffold vasculogenic strategy for skin reconstruction. 2019.

FRANCO, Nathalia. Células mesenquimais adipoderivadas alogênicas na angiogênese durante a fase inflamatória de cicatrização em enxertos cutâneos de espessura completa. 2020.

GONZALEZ, Esteban Alberto et al. Cathepsin B inhibition attenuates cardiovascular pathology in mucopolysaccharidosis I mice. **Life sciences**, v. 196, p. 102-109, 2018.

GUERRA, Nayrim Brizuela et al. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, v. 25, n. 8, p. 1-9, 2018.

GUERRA, Nayrim Brizuela et al. Dense and Fibrous Membranes of Poly (lactic-co-glycolic acid)/Epoxidized Poly (isoprene): Chemical and Biological Evaluation. **Fibers and Polymers**, p. 1-11, 2021.

HENCKES, Nicole Andréa Corbellini et al. Tissue-engineered solution containing cells and biomaterials—an in vitro study: A perspective as a novel therapeutic application. *The International journal of artificial organs*, v. 42, n. 6, p. 307-314, 2019.

HU, Michael S. et al. Mesenchymal stromal cells and cutaneous wound healing: a comprehensive review of the background, role, and therapeutic potential. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

JOHNSON, Kelly E.; WILGUS, Traci A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. **Advances in wound care**, v. 3, n. 10, p. 647-661, 2014.

KHORRAMIROUZ, Reza et al. A novel surgical technique for a rat subcutaneous implantation of a tissue engineered scaffold. **Acta histochemica**, v. 120, n. 3, p. 282-291, 2018.

LANDAU, Shira; GUO, Shaowei; LEVENBERG, Shulamit. Localization of engineered vasculature within 3D tissue constructs. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, p. 2, 2018.

LANGER, Robert. Chemical and Biological Approaches to Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Molecular Frontiers Journal*, v. 3, n. 02, p. 122-128, 2019.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Vascularization in tissue engineering: angiogenesis versus inosculation. **European Surgical Research**, v. 48, n. 2, p. 85-92, 2012.

LIU, Guochang et al. Tissue-engineered PLLA/gelatine nanofibrous scaffold promoting the phenotypic expression of epithelial and smooth muscle cells for urethral reconstruction. **Materials Science and Engineering: C**, v. 111, p. 110810, 2020.

MAO, Angelo S.; MOONEY, David J. Regenerative medicine: current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 47, p. 14452-14459, 2015. GHOLOBOVA, D. et al. Vascularization of tissue-engineered skeletal muscle constructs. **Biomaterials**, v. 235, p. 119708, 2020.

MARFIA, Giovanni et al. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. **Organogenesis**, v. 11, n. 4, p. 183-206, 2015.

MASSON-MEYERS, Daniela Santos; TAYEBI, Lobat. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2021.

MENDONÇA, Ricardo José et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.

NADERI, N. et al. Adipose derived stem cells and platelet rich plasma improve the tissue integration and angiogenesis of biodegradable scaffolds for soft tissue regeneration. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p. 2005-2013, 2020.

NAIR, Ashwin; TANG, Liping. Influence of scaffold design on host immune and stem cell responses. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2017. p. 62-71.

PEREZ-PUYANA, Victor et al. Polymer-based scaffolds for soft-tissue engineering. **Polymers**, v. 12, n. 7, p. 1566, 2020.

RICHBOURG, Nathan R.; PEPPAS, Nicholas A.; SIKAVITSAS, Vassilios I. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 13, n. 8, p. 1275-1293, 2019.

SARKER, M. D. et al. Bioprinting of vascularized tissue scaffolds: influence of biopolymer, cells, growth factors, and gene delivery. **Journal of healthcare engineering**, v. 2019, 2019.

SARTONEVA, Reetta et al. Porous poly-l-lactide-co-ε-caprolactone scaffold: a novel biomaterial for vaginal tissue engineering. *Royal Society open science*, v. 5, n. 8, p. 180811, 2018.

SCHOLZEN, Thomas; GERDES, Johannes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of cellular physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

VAN DIEST, Paul J.; BRUGAL, Gerard; BAAK, J. P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **Journal of clinical pathology**, v. 51, n. 10, p. 716, 1998.

WANG, Mengyuan; YUAN, Quan; XIE, Liang. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.

YANG, Tianli et al. Therapeutic potential of adipose-derived mesenchymal stem cell exosomes in tissue-engineered bladders. **Journal of Tissue Engineering**, v. 12, p. 20417314211001545, 2021.

YANG, Wanxun et al. Performance of different three-dimensional scaffolds for in vivo endochondral bone generation. 2014.

ZHAO, Ming et al. Advances on Graphene-Based Nanomaterials and Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Applied in Cutaneous Wound Healing. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 2647, 2021.

ZHU, Wei-dong et al. Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. **World Journal of Urology**, v. 28, n. 4, p. 493-498, 2010.

## ARTIGO 2

Artigo Publicado na revista *Cell Regeneration* em 2021.

Scaffold strategies combined with mesenchymal stem cells in vaginal construction:  
a review.

Nicole Andrea Corbellini Henckes (1,2), Dalana Faleiro (1,2), Laura Chao Chuang (2), Elizabeth Obino Cirne-Lima (1,2,3).

1.Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde—Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

2.Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

3.Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Nicole Andréa Corbellini Henckes,  
Email: nicolecorbellini@hotmail.com

**ABSTRACT:** Tissue engineering has provided new treatment alternatives for tissue reconstruction. Advances in the tissue engineering field have resulted in mechanical support and biological substitutes to restore, maintain or improve tissue/organs structures and functions. The application of tissue engineering technology in the vaginal reconstruction treatment can not only provide mechanical requirements, but also offer tissue repairing as an alternative to traditional approaches. In this review, we discuss recent advances in cell-based therapy in combination with scaffolds strategies that can potentially be adopted for gynaecological transplantation.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells; scaffolds; tissue engineering; vaginal reconstruction.

## INTRODUCTION

Tissue engineering advances and cell-based therapies have presented promising opportunities for repairing tissue and organ defects as well as acceleration of the regenerative process. Given that the body has a limited self-regeneration ability of tissues and organs (Chen et al., 2016), the development of tissue engineering can offer an alternative tailored to meet the specific cases where vaginal reconstruction is required and also provide biological substitutes to restore or maintain tissue/organs function in order to improve the quality of life (Jakubowska et

al., 2020). While there is no standard procedure for surgical repair, there are many surgical techniques that require multiple surgeries and often additional tissues and nonsurgical techniques (Schenke-Layland et al., 2015; Unger et al., 2017). For women that present complex reproductive structural anomalies, several new techniques and ideas from different fields are leading to support surgical innovations.

In recent times, the therapeutic application of mesenchymal stem cells (MSCs) have been investigated and the outcome brings new expectations about the management and possible long-term effects in a wide array of disease models (e.g. vaginal agenesis) (Galipeau et al., 2018). The usage of MSC in combination with scaffolds is promising as a tool in the treatment of damaged tissues that have specific functions, once they create a favourable regenerative microenvironment (De Francesco 2019; Yi et al., 2017) even in cases where the patient has limited amount of available native organ tissue and when tissue regeneration is required.

A positive biological response in this interesting strategy includes the support for cell growth (e.g. scaffold matrices) and biological signals that guide secretory products, including immunoregulatory cytokines, growth factors and exosomes into the desired tissue (Klimek et al., 2020; Pittenger et al., 2019; Cherian et al., 2020). This aspect of the cell behaviour, combined with biomaterials, results in the release of different factors into the surrounding environment (Yi et al., 2017) leading the way for successful tissue regeneration (Reddy et al., 2020).

Our group has recently developed a PLGA/Pllepox scaffold and the in vitro model MSCs have shown biological features in the proliferation ability in poly (lactic-co-glycolic acid)/ epoxidized poly (isoprene) (PLGA/Pllepox) scaffold (Henckes et al., 2019; Guerra et al., 2018). As a result, many efforts have been focusing in the application of technologies involving an in vivo model approach to further extend the use to clinical practice as well as to restore or repair reproductive organs and other organs with similar tissue structures therapies.

This review aims to present the current knowledge acquired in our research group to contextualise and a perspective on the most important characteristic involving mesenchymal stem cells combined with scaffolds for tissue engineering in gynaecological application. The list of bibliographic material contains the relevant

scientific literature on the subject and the analysis of the same was used to provide an overview of the combined use of mesenchymal stem cells and PLGA/PIepox.

### **Vaginal agenesis requiring regenerative therapies**

Scientific researchers have recently expanded their research involving stem cells to offer the opportunity to treat gynecological pathologies such as pelvic floor prolapse and uterine and vaginal reconstruction. New techniques and ideas from different fields are leading to surgical procedures innovations and these available therapies involve biological substitutes that can provide a favourable microenvironment for cells and tissues to grow and restore biological activities (Magalhães et al., 2020). In this vein, considering the advances in scientific experiments, the tissue engineering may offer new therapies for vaginal reconstruction as well as congenital agenesis by combining cell therapy and new technologies to create new tissue.

When it comes to the condition of vaginal agenesis, it is important to notice that this gynecological pathology is linked to a complex anomaly involving reproductive structural formation problems it can occur in different situations with total or partial absence of the vagina (De Souza et al., 2012; Thomas et al., 2007).

There are some cases, such as patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (MRKH) and transsexual individuals who desire a male-to-female sex reassignment, where the individuals are extremely affected by the absence of vagina. In both cases it is necessary to intervene with a reconstructive surgery to adapt the anatomy to a natural female appearance (Morais et al., 2020; Dreher et al., 2018).

The principle is to surgically create a cavity for the vagina (Tarry et al., 1986) and submit patients to a series of surgical procedures combined that later require a continuous usage of vaginal dilators in order to keep the newly constructed physical structure, bring functionality and support sexual neo-organ epithelization (Callens et al., 2014; Mendes et al., 2019).

Thus, the current therapy is the uncomfortable, long and invasive process, briefly described in table 1, not to mention that the surgery has to be performed twice in about 40% of the cases (Grimbizis et al., 2015; Oelschlager et al., 2019).

**Table 1.** A short description about causes and current therapy of the vaginal reconstruction



<b>Factors which can promote the vaginal abnormalities</b>	<b>Conventional therapies to vaginal reconstruction</b>	<b>Critical issues regarding conventional therapies</b>
I. Genetic alterations II. Hormonal alterations III. Epigenetic factors	McIndoe technique: reconstruction of the vaginal canal through full-thickness skin grafting; surgical methods.	Continuous use of molds until complete epithelialization
	Frank's technique: progressive dilation for distension and the creation of a vaginal neocavity; non-surgical methods.	Requires great motivation and persistence from patients
	Vecchietti technique; laparoscopic approach	Pain during vaginal traction, lack of lubrication and prolonged use of vaginal prostheses.

Therefore, surgical reconstructive approaches to replace the tissues with functionally equivalents would improve the outcome of reconstructive surgery and the quality of life compared to the currently available options (Ko et al., 2013; Rothberg et al., 2018). The chosen treatment will depend on the experience of the surgeon, considering that repeated surgeries might become more challenging with less successful outcomes over time (Unger et al., 2017).

Toward this goal, tissue engineering combining cells and scaffolds emerged as an alternative method for gynecological reconstruction and for that the selection of an appropriate scaffold is essential to provide tissue functionality providing an adequate anatomy (Sartoneva et al., 2018; Papadopulos et al., 2017; Wu et al., 2020), hence the importance of the approach involving PLGA/PLepox plus MSCs. Although this combination does not confer structural strength, it brings functionality and coating and must be combined with dilators in order to confer physical structure. Recently studies described the current belief is that biological materials used in vaginal construction are expected to provide a protective layer and allow tissue to undergo epithelization (Dias et al., 2020).

Considering the procedures offered to patients with gynecological pathologies, it is necessary to deeply understand the biological mechanisms involved in technologies that combine scaffolds and MSCs in order to provide better solutions to patients who require tissue reconstruction.

Several studies in the literature have already demonstrated results regarding the applicability of new scaffolds in tissue engineering for gynaecological reconstruction and treatments (De Filippo et al., 2003; De Filippo et al., 2008; Orabi

et al., 2017; Boennelycke et al., 2011) (Table 2). Although they are biocompatible and appear as candidates in gynaecological application as describe in Table 2, there are no publications involving mesenchymal stem cells for this purpose so far.

**Table 2.** Main researches developed in in vivo experiments upon the potential of cell co-cultured in scaffolds to vaginal abnormalities.

Reference	Study model	Regeneration strategy	Cells seeded on scaffolds	Benefits
De Filippo, et al., 2003	Mice	Engineering vaginal tissues	Vaginal epithelial and smooth muscle cells + PGA	Neovascularization
De Phlippo, et al., 2008	Rabbit	Vaginal replacement	Vaginal epithelial cells and smooth muscle cells + PGA	Neovascularization and appropriate physiological responses
Raya-Rivera, et al., 2014	Human	Tissue engineered autologous vaginal organs in MRKH syndrome + SIS	Epithelial and smooth muscle cells + SIS	Organized vaginal histology
ZHU, et al., 2013	Human	MRKH syndrome	No cells; acellular dermal matrix	No complications; anatomic success 100% and normal sexual function
PANICI, et al., 2015	Human	Canal lining in patients with MRKH syndrome	Mucosal vaginal cells; no scaffold	Normal and satisfying sexual intercourse

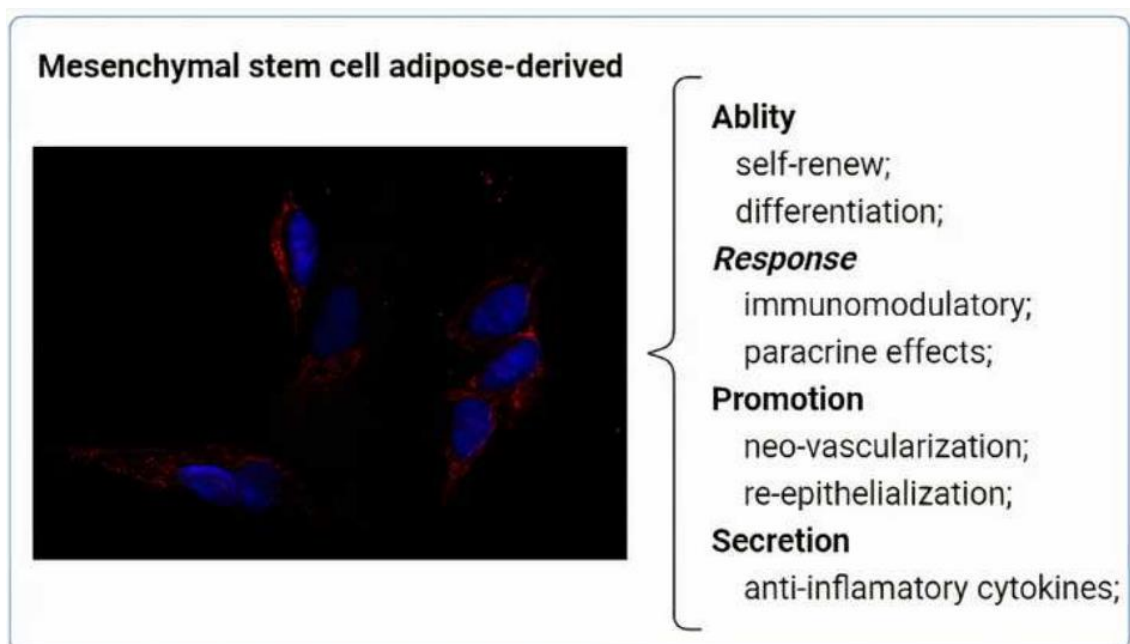
Further studies have shown the outcomes from a vaginal reconstruction using tissue-engineering biomaterial graft and reveals great results upon vaginoplasty and confirms the safety and effective procedure provide near normal sexual function (Zhu et al., 2013). In a new discovery involving autologous in vitro cultured vaginal tissue for vaginoplasty, Panicci et al. has highlighted that although there are several suggestions in different approaches altering the scaffolds and the biological combination (Table 2), there is not a consensus on what material should be used for the neovagina canal wall lining (Panicci et al., 2015).

These promising results might bring innovative solutions. In this vein, considering the advances in experiments (Henckes et al., 2019; Guerra et al., 2020;

Guerra et al., 2018), the option of tissue engineering with the combination of mesenchymal stem cells and scaffolds for patients who require additional tissues and need immediate and multiple reconstructive surgeries has increased considerably. Certainly, the use of seeded cells-therapy combined with scaffolds for vaginal reconstruction and others abnormalities is promising and requires further investigation.

### **Biological function of MSCs in in vitro and in vivo model**

Mesenchymal stem cells have been extensively studied due to features such as self-renewal and differentiation properties, facility to isolate from tissues and manipulate that brings less ethical concerns and also a high in vitro expansion capacity (Aghebatl-Maleki et al., 2019; Samsonraj et al., 2017). Beyond these features, MSCs have shown extraordinary results due to the ability to exhibit anti-inflammatory effects involving cytokines production and immunomodulatory activities as well as production of growth factors and capacity to migrate to damaged tissue (Guadix et al., 2017; Regmi et al., 2019; Gneccchi et al., 2008). Once MSCs are isolated, they must adhere to the plastic and be able of differentiate into osteocytes, chondrocytes and adipocytes lineages in in vitro culture under certain conditions (Saeedi et al., 2019; Luck et al., 2020) (Figure 1).



**Figure.11.** Brief description of mesenchymal stem cells (MSCs) functions. MSCs has self-renewal ability and differentiation potential in different lineages (e.g. adipocytes, chondrocytes and osteocytes)

and can be isolated from different sources. MSC has immunomodulatory function acting by paracrine effect and is able to promote tissue neo-vascularize and re-epithelize as well secretes anti-inflammatory cytokines during tissue restoration.

In order to improve and maintain desired biological function and maximize the therapeutic effects produced by MSC it is necessary to prepare and optimize the in vitro culture. This strategy plays an important role in the MSC function and contributes to the efficacy of transplantation to the host tissue (Thirumala et al., 2013; Sart et al., 2014; Hu et al., 2018). Consequently, all strategies involving tissue engineering that address the combination of cells and scaffolds should be tested in in vitro models under different controlled conditions in order to demonstrate the efficacy of the approach (Conci et al., 2020).

According to the review carried out by Uder et al. due to the ability of in vitro expansion, proliferation and self-renewal of MSCs, clinical usage has become attractive since it requires a number of cells far higher than those originally obtained from a donor sample, and - even after extensive expansion and manipulation in vitro - MSCs have shown the ability to maintain their function and performance (Uder et al., 2018).

Gowen et al. brought to their review the ideas that initially the MSC-based therapy was promising due to its ability to migrate in the target host tissue. Over the years, however, the ability of cells to secrete factors has been added as biological activity and linked to several beneficial effects (Gowen et al., 2020). Charras et al. supports the idea that the adequate MSC biological activity of the cell migration is a fundamental ability to the self-regeneration and depends on the protein expression and signalling (Charras et al., 2014).

Over the years, based on studies that have been carried out highlighting the potential benefit of using MSC in cell-based therapy for organ and tissue reconstruction, new studies have been conducted with different types of MSCs as adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs), which may have greater regenerative potential than other types of MSC such as Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) and MSCs derived from dental pulp tissues (DPSCs) (EI-badri 2016; Luck et al., 2020; Forsberg et al., 2020). Although different types of MSCs share common stem cell properties, they differ regarding their population number, proliferation rates, differentiation abilities, and clinical outcomes

(Mazini et al., 2019). Here we present some differences between the main characteristics of mesenchymal stem cells types.

The multipotent cells group of type BM-MSCs are present in the bone marrow stroma and capable of differentiating into several cell lines of the mesodermal and non-mesodermal cell types (Berebichez-Fridman et al., 2018). They are linked to the maintenance of a microenvironment based on the secretion of chemokines and growth factors that contribute to cell proliferation, self-renewal and differentiation (Leuning et al., 2018). Furthermore, BM-MSCs express intermediate levels of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules which contribute to immune tolerance due to the low immunogenicity and the immunosuppressive effect (Machado et al., 2013). These cells are capable of osteogenic, chondrogenic, adipogenic, neurogenic and cardiogenic differentiations. However, the use of BM-MSCs has some disadvantages, such as a low number of MSCs (0,01% a 0,001%) and the isolation depending on the patient status and the volume of aspirates (Bydlowski et al., 2009; Pontikoglou et al. 2011).

The adherent cells of type DPSCs have the morphology like fibroblasts and have been confirmed by their ability to differentiate into neural ectodermal cells and adipocytes, odontoblasts, osteoblasts, chondrocytes and myoblast cells of mesodermal origin, confirming their plasticity besides high proliferation capacity (Mattei et al., 2021). When compared to BM-MSCs, DPSCs have a greater potential ability to induce mineralization, but may be more restricted in their differentiation potency (Ma et al., 2019).

DPSCs cells are located within the dental crown, in a niche that houses the connective tissue. The resident tissue cells are a heterogeneous population represented by stromal fibroblasts and accompanied by vascular and inflammatory immune cells (Aydin et al., 2019). DPSCs do not seem to express a marker that exclusively identifies them and might have an immunophenotype difference from that others MSCs types. It is possibly due to the presence of different subpopulations of MSCs in dental pulp that have different biological activities. Their limitations are the risk of contamination during collection and the limited number of cells initially available for therapy (Ledesma-Martínez et al., 2016; Huang et al., 2009; Kichenbrand et al., 2019).

The cells of type ADSCs can be maintained and expanded in culture for long periods of time without losing their differentiation capacity, leading to abundant quantities and with a high cellular activity being increasingly used for cell therapy purposes (Sterodimas et al., 2010). MSCs obtained from adipose tissue is the main stem cell source due to its accessibility and abundance when compared to other sources. Their frequency is about 2% in its stromal vascular fraction and it is the highest one when comparing all tissues (Ntege et al., 2020; Mazini et al., 2019). ADSCs also maintain their potential to differentiate into cells of mesodermal origin and are commonly known for their low immunogenicity, modulatory and paracrine effects (Mazini et al., 2019). ADSCs approaches seem to be safer and more efficient in terms of the side effects reported.

The development of allogeneic approach means that ADSCs can be isolated from a volunteer donor, expanded and cryopreserved to supply the need for tissue repair. Thus, cells that were obtained from a single donor can be used to treat different patients due to an immune-privileged characteristic (Wang et al., 2020). ADSCs secrete higher amounts of pro-angiogenic molecules, such as extracellular matrix components and metalloproteinases (MMPs) and vascular endothelial growth factor (VEGF) compared with other MSC. This suggests that ADMSC may be preferred over other MSC populations for augmenting therapeutic approaches dependent upon angiogenesis (Mazini et al., 2019; Costa et al., 2020).

The scientific researchers have focused on the use of ADSCs due to its easy of obtaining and expansion process along with regenerative potential. In addition, ADSCs can assist in the repair of damaged tissue through cytokines secretion and growth factors from the paracrine and immunomodulatory effects. As expected, there are numerous advantages of using ADSCs in cell-therapy owing to its biocompatibility and biological characteristics (Conci et al., 2020).

Considering the promising preliminary clinical translation to the in vivo model, the importance of understanding the tissue repair process needs to be highlighted. MSC-specific tissue reconstruction mechanism occurs when MSCs prepare a microenvironment and the enzymes present lead them towards the specific organs and tissues. Once the MSCs have reached the specific target, the cytokine releasing

process begins in response to the inflammatory stimulus (Naji et al., 2019; Madrigal et al. 2014).

Contributing to this process, there are other remarkable properties involved in MSC cell-therapy that also play important roles in the treatment efficacy - besides signalling molecules, they also connect tissue, influence the therapeutic response, contribute to immunomodulatory activities and mediate and regulate angiogenesis and apoptosis processes (Wang et al., 2018; Langhans 2018). Considering these characteristics and all the benefits, the use of MSCs can be seen as vital for tissue reconstruction strategies.

### **PLGA/PlepoX scaffold in tissue reconstruction**

The majority of the current existing strategies for tissue reconstruction involve the development of new scaffolds (Lanza, 2020). Scaffolds plus cells approaches became an emerged field to be filled with new materials such as PLGA/PlepoX in cases where there is a need for tissue replacement/restoration.

A wide number of scaffolds combined with cells have been presented as a viable option for vaginal reconstruction and for repair genital and gynaecological structures (Laurence et al., 2015). Since both the chemical characteristics and versatility are the main advantage of synthetic blends (Almouemen et al., 2019), we can consider that PLGA/PlepoX stands out as the more suitable approach.

Many different polymeric scaffolds have been developed in both scientific researches and in clinical tests and mainly differ in comparison to the compounds. As described in Table 3, these scaffolds include in their composition: collagen (Dong et al., 2016), alginate (Bhattarai et al., 2006), polyglycolic acid (PGA) (De Filippo et al., 2003; Bissoli et al., 2018), poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), poly(L-lactic acid) (PLLA) (Kuo et al., 2010; Yang et al., 2004) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) (Zhang et al., 2016).

**Table 3. Possibilities of applications of some scaffolds available as well as advantages and perspectives.**

Material	Application perspective	Advantage
----------	-------------------------	-----------

<b>Alginate</b>	- Skin, - Cartilage, - Bone, - Liver, - Cardiac tissue.	- Biocompatibility, - Fast degradation, - Biodegradability.
<b>Collagen</b>	- Nerve, - Bone, - Cartilage, - Tendon, - Ligament, - Blood vessel, - Skin.	- Low immunogenicity, - Good permeability, - Biocompatibility, - Biodegradability.
<b>PGA</b>	- Vaginal reconstruction, - Pelvic floor repair.	- Hydrophilic, - Biodegradability, - Non-toxic - Biocompatibility.
<b>PLGA</b>	- Intestine, - Liver.	- Biodegradability, - Suitable mechanical properties.
<b>PLLA</b>	- Ligament tears, - Central nerve system.	- Biodegradability, - Resorbable.
<b>PCL</b>	- Meniscus.	- Biodegradability.
<b>PLGA/PI (Cellprene®)</b>	- Cranioplasty, - Pneumology.	- Resorbable, - Biocompatibility.
<b>PLGA/PlepoX</b>	- Tissue reconstruction, - Biological dressing.	- Hydrophilic, - Resorbable, - Biocompatibility, - Non-cytotoxic, - Suitable mechanical properties, - Easily fabricated, - Low cost.

Among those potential applications, one of the most promising uses is for developing fibrous scaffolds that can mimic the physical structure and provide an ideal environment to promote cell growth (Atala 2011; Liu et al., 2013). Another possibility, from a tissue reconstruction perspective, is to combine or join different types of scaffolds in an attempt to maximize their advantages (Conci et al., 2020).

One of the potential applications of PLGA/PlepoX is a combination between PLGA, that shows a biocompatible characteristic, and Poly(isoprene) that exhibits strong angiogenic properties (Guerra et al., 2018; Kerche-Silva et al., 2017). The



epoxidation (epox) procedure is considered one of the most important processes in organic synthesis due to its particular characteristic of increasing the hydrophilicity of rubber (Guerra et al., 2018). These characteristics are important for cells to adhere in greater quantity and to promote their fixation in the host tissue, so the choice of scaffold is fundamental for the success of the regenerative therapies.

Regardless of the fabrication approach used, scaffolds have a key role in the integration in new tissue having a crucial performance in the host microenvironment (Dias et al., 2020), although the barrier to scaffold translation demands specific and appropriated conditions to successfully reconstruct tissue and organs defects (Naderi et al., 2020).

Previously, a study involving PLGA/PI blend (known commercially as Cellprene®), described the production process, the physical and chemical characteristics and the in vivo application in an animal model scaffold usage. This publication reports the efficacy of manufactured PLGA/PI fibres suggesting that this blend can be an attractive alternative for tissue engineering (Marques et al., 2016). In parallel, a study concerning about a new application of PLGA/PI as a stent was developed and the material implanted into the trachea of rabbits (Schopf et al., 2018). Schopf's study demonstrated the occurrence of an inflammatory reaction in the adjacent tissue to PLGA/PI polymeric implanted fragment (Schopf et al., 2018). In a recent progress, novel studies were conducted to improve and overcome limitations in the process of PLGA/PI (Cellprene®) fabrication as well as its chemical composition where modifications have been applied and new applications were tested, resulting in a new scaffold epoxidized called PLGA/Plepox (Guerra et al., 2018; Henckes et al., 2019).

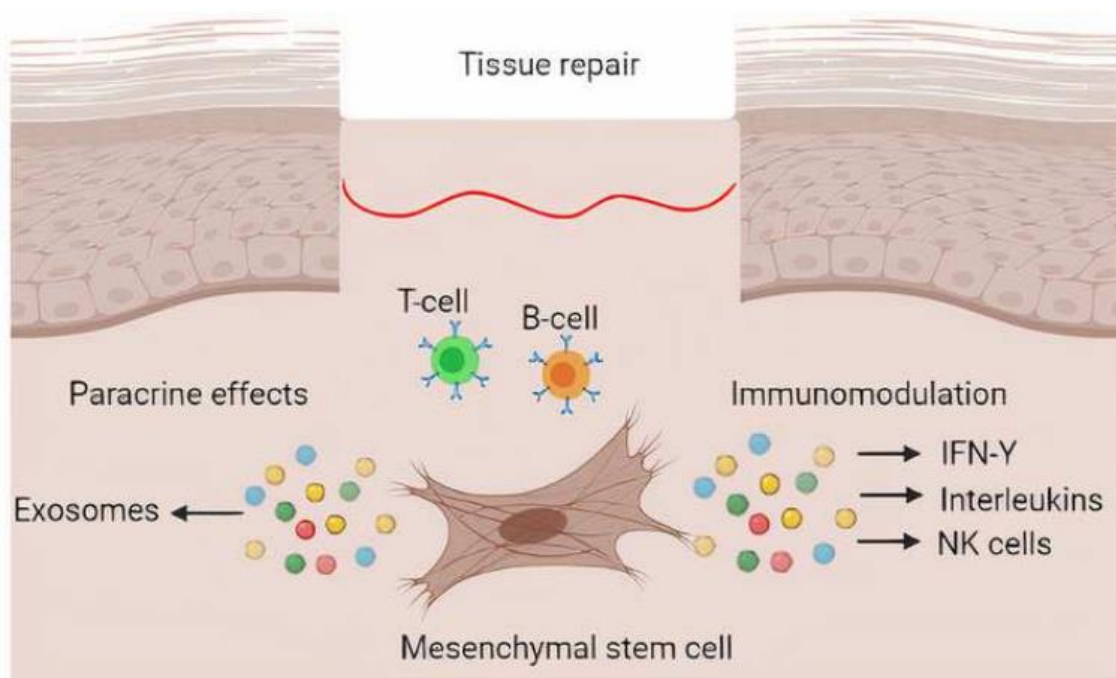
With the new compound, additional advantages were obtained as a consequence of its characteristics. When the polymer PLGA/Plepox was compared to Cellprene® in biostudies, it was possible to demonstrate higher performance to the epoxidized polymer, suggesting a positive clinical application perspective. For this, our research group is developing a relevant study to the overall in vivo assessment of tissue compatibility and biological evaluation of the PLGA/Plepox produced by electrospinning. Considering the results obtained so far by our research group on the effect of ADSC (Martins et al., 2019; Vidor et al., 2018; Beheregaray et al., 2017),

there is an indication that they are a great candidate for the experimental tests carried out in an in vivo model.

### **Potential applications of PLGA/PlepoX and MSC-based cell therapy**

In recent years, cell-based therapy has surfaced as a promising therapeutic approach and has many enthusiastic researchers that consider it an opportunity to restore tissues and organs (Golchin et al., 2020). Regarding the safety and efficacy of MSCs therapies, it is important to consider that MSCs do not express major histocompatibility complex (MHC) antigens which are involved in the antigen recognition by the immune system (Rawat et al., 2019; Cherian et al., 2020; Lukomska et al., 2019). For this reason, MSCs are not recognized as foreign cells giving them the ability not to induce rejection reactions when transplanted to different individuals or species. This particular aspect of MSCs has become commercially attractive and clinically practical usage for cell therapy, since it enriches the repair potential from cell transplantation and promotes restore function (Cherian et al., 2020; Lee et al., 2020). Scarritt, et al. interestingly indicates that scaffolds can increase and improve the MSC differentiation and this probably occurs due to the interaction with tissue host (Scarritt et al., 2015).

Current cell-therapy approaches, mainly using MSC, can greatly impact the regenerative medicine, as they have a capacity to migrate into damage tissue and to release paracrine factors, which are able to decrease inflammation and promote immunomodulation producing a potential anti-apoptotic benefit by cytokines production and secretion (Figure 2) (Fu et al., 2019; Brown et al., 2019; Hong et al., 2019). Despite being one of the main tools used today in cell therapy, it is still important to elucidate the mechanisms through which they interact with the host tissue. Hence, novel strategies for exploring the biological activities would help us to make better choosing your approach for cell-therapy (Li et al., 2019).

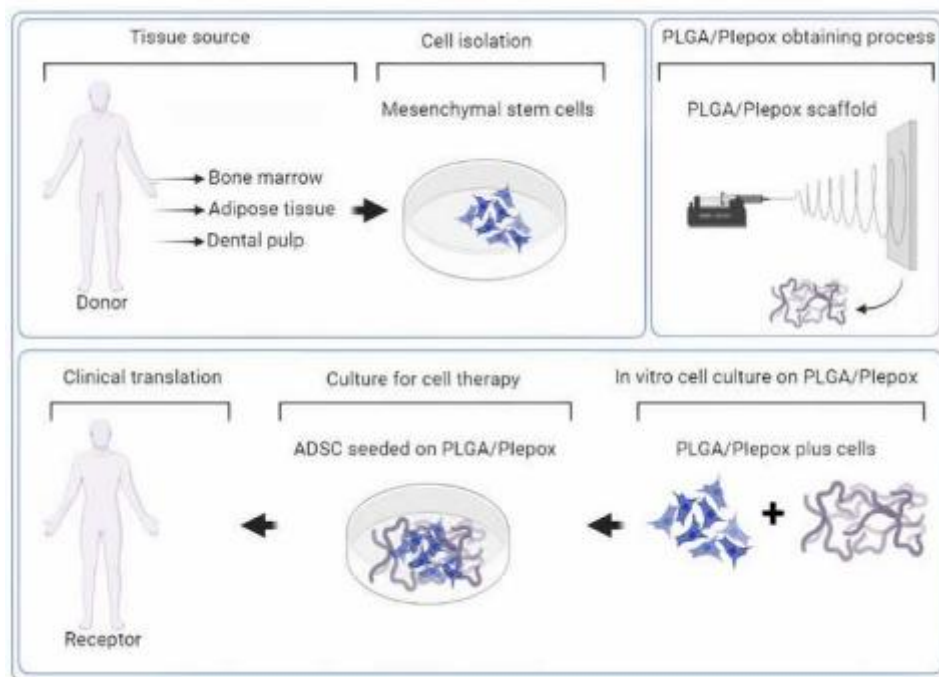


**Figure.2.** Representative image of the mechanism of action of cells in the tissue repair shows the immune response of MSCs by immunomodulatory secretion factors and the paracrine effect of MSCs through secretion of exosomes which release of the biological active content for immunomodulatory effect.

Alternatively, cell-therapy approaches combined with several scaffolds have been considered to tissue reconstruction and the biocompatibility of the scaffold is a fundamental feature to the successful engineering of tissues in regenerative medicine (Yesmin et al., 2017). Considering the promising therapeutic approach, it is important to understand the mechanisms of MSC interactions with scaffolds since they can provide structural property and also improve cells delivery in the host tissue and maximize their beneficial potential either long-term or short-term (Lee et al., 2020; Zonari et al., 2015; Khaled et al., 2011). To address these challenges, researchers are improving the composition of scaffolds and performing necessary tests to make them available for clinical practice (Garcia-Garreta et al., 2013).

Therapies combining stem cells and scaffolds appear to be a new attempt to treat damaged tissues and organs (Figure 3). The clinical translation importance of MSCs, especially when combined with scaffolds, in recent times is focused on off-the-shelf cells (Thirumala et al., 2013). However, although there are advances involving cell-based therapy and scaffolds so far, there is a lack of treatment focusing on gynecological approaches with the purpose of accelerate the tissue repairing process and to promote regeneration of damaged or lost tissue by the ADSC and

scaffolds regenerative properties. Therefore, a promising new therapeutic opportunity could be explored (De Coppi 2013; Wu et al., 2012). According to Garcia-Garreta et al. the potential beneficial effects of ADSC integration with scaffolds in clinical application to restore the biological activity of the host tissue plays a key role in tissue engineering (Garcia-Garreta et al., 2020).



**Figure 3. Schematic process involving MSC-therapy combined with PLGA/Plepor. The tissue sample is obtained from a donor. The cells are isolated, characterized and expanded in culture. In parallel to this, the process of obtaining the PLGA/Plepor scaffold is initiated by electrospinning technique. After obtaining of the scaffold and characterizing the cells, these cells are attached to a scaffold. After adding the cells to the PLGA/Plepor scaffold, the construction is implanted into the host.**

Although there are strategies to the translation in cell-therapy, these technologies are still far from the clinical practice. In attempt to bring it as a novel alternative to conventional therapies, it's necessary to overcome certain challenges, such as defining a cell source that could be used reliably and the ideal scaffold to provide an optimal environment for potential tissue regeneration (Yang et al., 2019).

According to Thirumala et al. it is important to mention that depending on the complexity involving the lack of tissue and organs this approach can take many years to finalize, due to the evaluation of the cell-based therapy and scaffolds having to be proven in the long-term (Thirumala et al., 2013). Bouten et al. highlights that, to address these challenges, understanding and acknowledging the complexity of the

processes involving stem cells and scaffolds in biological responses in tissue regeneration is important (Bouten et al., 2012).

Within this challenging perspective, scientific researchers need to find an alternative to overcome these disadvantages and make the engagement of these new therapies with innovative potential and great therapeutic promise more plausible and attractive.

## **CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES**

The aim of regenerative medicine applied to vaginal tissue engineering is to overcome the main difficulties encountered with conventional approaches. To overcome the side effects of the standard treatments, a combination of PLGA/PlepoX plus MSCs might emerge as a promising technique into biomaterials combined with cell-based therapy. We have been developing this combination to be capable of interacting with tissue host and promote tissue remodelling. This potential offers hope to patients with diseases that are often ignored or treated inadequately with non-effective treatments. PLGA/PlepoX combined with MSCs may be considered as a consistent opportunity and affording advantages abound for the clinical application and can be a key challenge to patients which requiring extensive vaginal reconstruction surgery. Recent progress suggests that cell-based tissue engineering strategies in female organs may have a great potential for regenerative medicine that would benefit of tissue replacement or repair (Atala 2012; Sadri-Ardekani et al., 2015; Shea et al., 2014; Schenke-Layland et al., 2015). Yet, it is still necessary to evolve in studies with the usage of signalling, such as synthetic factors or isolated cell factors in attempt to increase the treatment biosafety. In addition, in another perspective, an evolution in the use of combined scaffolds is suggested in order to provide mechanical structure and *stimuli* for a more adequate formation of the neovagina, surpassing the chemical characteristics of the current scaffolds.

### **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

Not applicable

### **Consent for publication**

Not applicable

**Availability of data and material**

Not applicable

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests

**Funding**

Not applicable

**Authors' contributions**

NH developed the idea, wrote the manuscript with support from DF, LC and EL. Both DF and LC contributed to the writing of the manuscript. EL supervised the approaches of this work and reviewed all manuscripts. All authors read and approved the final manuscript, provided critical feedback, and helped shape the research and manuscript.

**Acknowledgements**

Not applicable

**Authors' information (optional)**

Not applicable

**REFERENCES**

AGHEBATI-MALEKI, Leili et al. Prospect of mesenchymal stem cells in therapy of osteoporosis: a review. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 8570-8578, 2019.

ALMOUEMEN, Nour; KELLY, Helena M.; O'LEARY, Cian. Tissue engineering: understanding the role of biomaterials and biophysical forces on cell functionality through computational and structural biotechnology analytical methods. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 591-598, 2019.

ATALA, Anthony. Tissue Engineering and Regenerative Medicine—Current Concepts. In: **Pediatric Urology**. Humana Press, 2011. p. 287-305.

ATALA, Anthony. Tissue engineering of reproductive tissues and organs. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 1, p. 21-29, 2012.

AYDIN, Safa; ŞAHIN, Fikrettin. Stem cells derived from dental tissues. **Cell Biology and Translational Medicine**, Volume 5, p. 123-132, 2019.

BEHEREGARAY, Wanessa Kruger et al. Células-tronco mesenquimais aplicadas nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização de feridas cutâneas. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 69, n. 6, p. 1591-1600, 2017.

BEREBICHEZ-FRIDMAN, Roberto; MONTERO-OLVERA, Pablo R. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: state-of-the-art review. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 18, n. 3, p. e264, 2018.

BHATTARAI, Narayan et al. Alginate-based nanofibrous scaffolds: Structural, mechanical, and biological properties. **Advanced Materials**, v. 18, n. 11, p. 1463-1467, 2006.

BISSOLI, Julio; BRUSCHINI, Homero. Scaffolds for pelvic floor prolapse: logical pathways. **International journal of biomaterials**, v. 2018, 2018.

BOENNELYCKE, Marie et al. Tissue response to a new type of biomaterial implanted subcutaneously in rats. **International urogynecology journal**, v. 22, n. 2, p. 191-196, 2011.

BOUTEN, Carlijn VC; DRIESSEN-MOL, Anita; BAAIJENS, Frank PT. In situ heart valve tissue engineering: simple devices, smart materials, complex knowledge. **Expert review of medical devices**, v. 9, n. 5, p. 453-455, 2012.

BROWN, Christina et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 13, n. 9, p. 1738-1755, 2019.

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CALLENS, Nina et al. An update on surgical and non-surgical treatments for vaginal hypoplasia. **Human reproduction update**, v. 20, n. 5, p. 775-801, 2014.

CHARRAS, Guillaume; SAHAI, Erik. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 12, p. 813-824, 2014.

CHEN, Fa-Ming; LIU, Xiaohua. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in polymer science**, v. 53, p. 86-168, 2016.

CHERIAN, Darshana S. et al. Biological Considerations in Scaling Up Therapeutic Cell Manufacturing. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 654, 2020.

CONCI, Claudio et al. Tissue engineering and regenerative medicine strategies for the female breast. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, n. 2, p. 369-387, 2020.

COSTA, Luis A. et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-21, 2020.

DE COPPI, Paolo. Regenerative medicine for congenital malformations. **Journal of pediatric surgery**, v. 48, n. 2, p. 273-280, 2013.

DE FILIPPO, Roger E.; YOO, James J.; ATALA, Anthony. Engineering of vaginal tissue in vivo. **Tissue engineering**, v. 9, n. 2, p. 301-306, 2003.

DE FRANCESCO, Francesco. Mesenchymal Stem Cells and Interactions with Scaffolds-Biomaterials in Regenerative Medicine: From Research to Translational Applications. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 193, 2019.

DE PHILIPPO, Roger E. et al. Tissue engineering a complete vaginal replacement from a small biopsy of autologous tissue. **Transplantation**, v. 86, n. 2, p. 208-214, 2008.

DE SOUZA, Jesus Pires et al. Vaginal reconstruction with two lower abdominal skin flaps in rabbits: histological and macroscopic evaluation. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 160, n. 2, p. 179-184, 2012.



DIAS, Juliana R. et al. In situ Enabling Approaches for Tissue Regeneration: Current Challenges and New Developments. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 85, 2020.

DONG, Chanjuan; LV, Yonggang. Application of collagen scaffold in tissue engineering: recent advances and new perspectives. **Polymers**, v. 8, n. 2, p. 42, 2016.

DREHER, Paulette Cutruzzola et al. Complications of the neovagina in male-to-female transgender surgery: A systematic review and meta-analysis with discussion of management. **Clinical Anatomy**, v. 31, n. 2, p. 191-199, 2018.

EL-BADRI, Nagwa (Ed.). **Advances in stem cell therapy: bench to bedside**. Humana Press, 2016.

FORSBERG, Matthew H. et al. Mesenchymal stromal cells and exosomes: progress and challenges. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 665, 2020.

FU, Xiaorong et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 784, 2019.

GALIPEAU, Jacques; SENSÉBÉ, Luc. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. **Cell stem cell**, v. 22, n. 6, p. 824-833, 2018.

GARCÍA-GARETA, Elena et al. A novel multiparameter in vitro model of three-dimensional cell ingress into scaffolds for dermal reconstruction to predict in vivo outcome. **BioResearch open access**, v. 2, n. 6, p. 412-420, 2013.

GARCÍA-GARETA, Elena et al. Decellularised scaffolds: just a framework? Current knowledge and future directions. **Journal of Tissue Engineering**. V. 11, p.1–18, 2020.

GNECCHI, Massimiliano et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GOLCHIN, Ali; SEYEDJAFARI, Ehsan; ARDESHIRYLAJIMI, Abdolreza. Mesenchymal stem cell therapy for COVID-19: present or future. **Stem cell reviews and reports**, p. 1-7, 2020.

GOWEN, Austin et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles: Challenges in Clinical Applications. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 2020.

GRIMBIZIS, Grigoris F. et al. Successful Isthmo-neovagina Anastomosis After Davydov's Colpopoiesis in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome Patients With a Functional Rudimentary Uterine Horn. **Journal of minimally invasive gynecology**, v. 22, n. 1, p. 142-150, 2015.

GUADIX, Juan A.; ZUGAZA, José L.; GÁLVEZ-MARTÍN, Patricia. Characteristics, applications and prospects of mesenchymal stem cells in cell therapy. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, n. 9, p. 408-414, 2017.

GUERRA, Nayrim Brizuela et al. Chemical and in vitro characterization of epoxidized natural rubber blends for biomedical applications. **Journal of Polymer Research**, v. 25, n. 8, p. 172, 2018.

GUERRA, Nayrim Brizuela; CASSEL, Júlia Bünecker; MUNIZ, N. O.; HENCKES, N. A. C.; OLIVEIRA, F. S.; CIRNE-LIMA, E. O.; SANTOS, L. A. Dense and fibrous membranes of poly (lactic-co-glycolic acid)/epoxidized poly(isoprene): Chemical and biological evaluation. **FIBERS AND POLYMERS**. 2020.

HENCKES, Nicole Andréa Corbellini et al. Tissue-engineered solution containing cells and biomaterials—an in vitro study: A perspective as a novel therapeutic application. **The International journal of artificial organs**, v. 42, n. 6, p. 307-314, 2019.

HONG, Pengyu et al. The functions and clinical application potential of exosomes derived from adipose mesenchymal stem cells: a comprehensive review. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 242, 2019.

HU, Chenxia; LI, Lanjuan. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 3, p. 1428-1442, 2018.

HUANG, GT-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

JAKUBOWSKA, Weronika et al. Prevascularized Tissue-Engineered Human Vaginal Mucosa: In Vitro Optimization and In Vivo Validation. **Tissue Engineering Part A**, 2020.

Kerche-Silva, L.E., Cavalcante, D.G.S.M., Job, A.E. Natural Rubber Latex Biomaterials in Bone Regenerative Medicine. Biomaterials in Regenerative Medicine, Chapter 13, **Intech Open**, pp. 303-318, 2017.

KHALED, E. G. et al. Suppl 2: Tissue Engineering for Bone Production-Stem Cells, Gene Therapy and Scaffolds. **The open orthopaedics journal**, v. 5, p. 289, 2011.

KICHENBRAND, Charlène et al. Dental pulp stem cell-derived conditioned medium: an attractive alternative for regenerative therapy. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 25, n. 1, p. 78-88, 2019.

KLIMEK, Katarzyna; GINALSKA, Grazyna. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Applications—A Review. **Polymers**, v. 12, n. 4, p. 844, 2020.

KO, In Kap et al. In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 11, p. e57-e57, 2013.

KUO, Catherine K.; MARTURANO, Joseph E.; TUAN, Rocky S. Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: advanced biomaterials and regeneration motifs. **BMC sports science, medicine and rehabilitation**, v. 2, n. 1, p. 20, 2010.

LANGHANS, Sigrid A. Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 6, 2018.

LANZA, Robert et al. (Ed.). **Principles of tissue engineering**. Academic press, 2020.

LAURENCE, Jeffrey; BAPTISTA, Pedro; ATALA, Anthony (Ed.). **Translating regenerative medicine to the clinic**. Academic Press, 2015.

LEDESMA-MARTÍNEZ, Edgar; MENDOZA-NÚÑEZ, Víctor Manuel; SANTIAGO-OSORIO, Edelmiro. Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: a review. **Stem cells international**, v. 2016, 2016.

LEE, KangJu et al. A Patch of Detachable Hybrid Microneedle Depot for Localized Delivery of Mesenchymal Stem Cells in Regeneration Therapy. **Advanced Functional Materials**, p. 2000086, 2020.

LEUNING, Daniëlle G. et al. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

LI, Zhongjun; HU, Xingbin; ZHONG, Jiang F. Mesenchymal stem cells: characteristics, function, and application. 2019.

LIU, Haifeng et al. Electrospinning of nanofibers for tissue engineering applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, 2013.

LUCK, Joshua et al. Adipose-derived stem cells for regenerative wound healing applications: understanding the clinical and regulatory environment. **Aesthetic surgery journal**, v. 40, n. 7, p. 784-799, 2020.

LUKOMSKA, Barbara et al. Challenges and controversies in human mesenchymal stem cell therapy. **Stem Cells International**, v. 2019, 2019.

MA, Linsha et al. Maintained properties of aged dental pulp stem cells for superior periodontal tissue regeneration. **Aging and disease**, v. 10, n. 4, p. 793, 2019.

MACHADO, Cíntia de Vasconcellos; TELLES, Paloma Dias da Silva; NASCIMENTO, Ivana Lucia Oliveira. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 62-67, 2013.

MADRIGAL, Marialaura; RAO, Kosagisharaf S.; RIORDAN, Neil H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2014.

MAGALHAES, Renata S.; WILLIAMS, James K.; ATALA, Anthony. Tissue engineering for female reproductive organs. In: **Principles of Tissue Engineering**. Academic Press, 2020. p. 863-870.

MARQUES, Douglas R. et al. Poly (lactic-co-glycolic acid)/polyisoprene fibres applied as scaffolds for soft tissue engineering. 2016.

MARTINS, João Maximiliano Pedron et al. Use of derived adipose stem cells to reduce complications of cutaneous scarring in smokers. An experimental model in rats. **Acta cirurgica brasileira**, v. 34, n. 6, 2019.

MATTEI, Vincenzo et al. Regenerative Potential of DPSCs and Revascularization: Direct, Paracrine or Autocrine Effect?. **Stem Cell Reviews and Reports**, p. 1-12, 2021.

MAZINI, Loubna et al. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2523, 2019.

MENDES, Luanne Cardoso et al. Avaliação do desempenho de biomateriais para a construção de um molde vaginal usado em cirurgias de vaginoplastia. 2019.

MORAIS, Andréia Vanessa Carneiro; CORTES, Helena Moraes. Cirurgia de redesignação sexual: implicações para o cuidado. **J. nurs. health**, p. 20103002-20103002, 2020.

NADERI, N. et al. Adipose derived stem cells and platelet rich plasma improve the tissue integration and angiogenesis of biodegradable scaffolds for soft tissue regeneration. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 3, p. 2005-2013, 2020.

NAJI, Abderrahim et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1-26, 2019.

NTEGE, Edward H.; SUNAMI, Hiroshi; SHIMIZU, Yusuke. Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions. **Regenerative therapy**, v. 14, p. 136-153, 2020.

OELSCHLAGER, Anne-Marie Amies; DEBIEC, Katherine. Vaginal dilator therapy: a guide for providers for assessing readiness and supporting patients through the process successfully. **Journal of pediatric and adolescent gynecology**, v. 32, n. 4, p. 354-358, 2019.

ORABI, Hazem et al. Novel three-dimensional autologous tissue-engineered vaginal tissues using the self-assembly technique. **Translational Research**, v. 180, p. 22-36, 2017.

PANICI, Pierluigi Benedetti et al. Autologous in vitro cultured vaginal tissue for vaginoplasty in women with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: anatomic and functional results. **Journal of Minimally Invasive Gynecology**, v. 22, n. 2, p. 205-211, 2015.

PAPADOPULOS, Nikolaos A. et al. Combined vaginoplasty technique for male-to-female sex reassignment surgery: Operative approach and outcomes. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 70, n. 10, p. 1483-1492, 2017.

PITTENGER, Mark F. et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. **NPJ Regenerative medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2019.

PONTIKOGLOU, Charalampos et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 3, p. 569-589, 2011.

RAWAT, Sonali; GUPTA, Suchi; MOHANTY, Sujata. Mesenchymal stem cells modulate the immune system in developing therapeutic interventions. In: **Immune Response Activation and Immunomodulation**. IntechOpen, 2019.

RAYA-RIVERA, Atlántida M. et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. **The Lancet**, v. 384, n. 9940, p. 329-336, 2014.

REDDY, Lekkala Vinod K. et al. Recent Approaches for Angiogenesis in Search of Successful Tissue Engineering and Regeneration. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 15, n. 2, p. 111-134, 2020.

REGMI, Shobha et al. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: challenges, opportunities, and future perspectives. **European journal of cell biology**, v. 98, n. 5-8, p. 151041, 2019.

ROTHBERG, Michael B.; ATALA, Anthony. History and development of regenerative medicine and tissue engineering in urology. In: **The History of Technologic Advancements in Urology**. Springer, Cham, 2018. p. 289-317.

SADRI-ARDEKANI, Hooman; ATALA, Anthony. Regenerative medicine for the treatment of reproductive system disorders: current and potential options. **Advanced drug delivery reviews**, v. 82, p. 145-152, 2015.

SAEEDI, Pardis; HALABIAN, Raheleh; FOOLADI, Abbas Ali Imani. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and modification strategies. **Stem cell investigation**, v. 6, 2019.

SAMSONRAJ, Rebekah M. et al. Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. **Stem cells translational medicine**, v. 6, n. 12, p. 2173-2185, 2017.

SART, Sébastien et al. Stem cell bioprocess engineering towards cGMP production and clinical applications. **Cytotechnology**, v. 66, n. 5, p. 709-722, 2014.

SARTONEVA, Reetta et al. Porous poly-l-lactide-co-ε-caprolactone scaffold: a novel biomaterial for vaginal tissue engineering. **Royal Society open science**, v. 5, n. 8, p. 180811, 2018.

SCARRITT, Michelle E.; PASHOS, Nicholas C.; BUNNELL, Bruce A. A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 43, 2015

SCHENKE-LAYLAND, Katja; BRUCKER, Sara Y. Prospects for regenerative medicine approaches in women's health. **Journal of anatomy**, v. 227, n. 6, p. 781-785, 2015.

SCHOPF, Luciano F. et al. Experimental use of new absorbable tracheal stent. **Journal of pediatric surgery**, v. 53, n. 7, p. 1305-1309, 2018.

SHEA, Lonnie D.; WOODRUFF, Teresa K.; SHIKANOV, Ariella. Bioengineering the ovarian follicle microenvironment. **Annual review of biomedical engineering**, v. 16, p. 29-52, 2014.

STERODIMAS, Aris et al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1886-1892, 2010.

TARRY, W. F.; DUCKETT, John W.; STEPHENS, F. Douglas. The Mayer-Rokitansky syndrome: pathogenesis, classification and management. *The Journal of urology*, v. 136, n. 3, p. 648-652, 1986.

THIRUMALA, Sreedhar; GOEBEL, W. Scott; WOODS, Erik J. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. **Expert opinion on biological therapy**, v. 13, n. 5, p. 673-691, 2013.

THOMAS, John C.; BROCK, John W. Vaginal substitution: attempts to create the ideal replacement. *The Journal of urology*, v. 178, n. 5, p. 1855-1859, 2007.

UDER, Christiane et al. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 32-49, 2018.

UNGER, Cecile A.; PARAISO, Marie Fidela R. Construction of the neovagina. In: **Female Pelvic Surgery**. Springer, New York, NY, 2015. p. 267-290.

VIDOR, Silvana Bellini et al. Adipose-derived stem cells improve full-thickness skin grafts in a rat model. **Research in veterinary science**, v. 118, p. 336-344, 2018.

WANG, Mengyuan; YUAN, Quan; XIE, Liang. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. **Stem cells international**, v. 2018, 2018.



WANG, Yinmin et al. Ex-vivo treatment of allografts using adipose-derived stem cells induced prolonged rejection-free survival in an allogenic hind-limb transplantation model. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 14, 2020.

WU, Xiaotong et al. Tissue engineering in female pelvic floor reconstruction. **Engineering in Life Sciences**, v. 20, n. 7, p. 275-286, 2020.

WU, Xiuwen; REN, Jianan; LI, Jieshou. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. **Cytotherapy**, v. 14, n. 5, p. 555-562, 2012.

YANG, F. et al. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1891-1900, 2004.

YANG, Heejo; ATALA, Anthony; YOO, James J. Kidney regeneration approaches for translation. **World Journal of Urology**, p. 1-5, 2019.

YESMIN, S. et al. Bio-scaffolds in organ-regeneration: Clinical potential and current challenges. **Current research in translational medicine**, v. 65, n. 3, p. 103-113, 2017.

YI, Sheng et al. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Current stem cell research & therapy**, v. 12, n. 3, p. 233-246, 2017.

ZHANG, Zheng-Zheng et al. Role of scaffold mean pore size in meniscus regeneration. **Acta biomaterialia**, v. 43, p. 314-326, 2016.

ZHU, Lan et al. Anatomic and sexual outcomes after vaginoplasty using tissue-engineered biomaterial graft in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: A new minimally invasive and effective surgery. **The journal of sexual medicine**, v. 10, n. 6, p. 1652-1658, 2013.

ZONARI, Alessandra et al. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. **Acta biomaterialia**, v. 17, p. 170-181, 2015.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou os efeitos positivos da implantação de PLGA/PlepoX+ADSC em tecido hospedeiro. Conforme proposto, foi possível avaliar, por análise de H&E, a ocorrência dos níveis de inflamação e foi encontrada uma redução destes níveis no grupo PLGA/PlepoX+ADSC, indicando uma adequada integração e reparo de tecido. A semelhança na expressão de proteínas específicas, como a citoqueratina, mostrou que a adição das ADSC ao PLGA/PlepoX é capaz de fornecer uma melhor restauração do tecido em razão do efeito parácrino exercido pelas mesmas. A quantificação e a avaliação da proliferação celular e da densidade microvascular apresentou uma alta intensidade no grupo PLGA/PlepoX+ADSC, apontando para uma potencial alternativa terapêutica para uso na medicina regenerativa, uma vez que essas características são um dos principais desafios para o sucesso da integração do implante. A baixa expressão de colágeno encontrada no grupo PLGA/PlepoX+ADSC indicou uma possível redução na formação de cicatriz. Tendo em vista o conjunto de dados encontrados, podemos considerar que PLGA/PlepoX+ADSC é biocompatível com sistemas *in vivo* e pode contribuir de forma positiva na recuperação e restauração de tecidos.

## PERSPECTIVAS

- Seguir em estudos *in vivo* com PLGA/PlepoX+ADSC em diferentes modelos de lesão de tecidos;
- Combinar PLGA/PlepoX com outros polímeros e/ou fatores bioativos para uso na reconstrução de tecidos e criação de estruturas com sistema funcional.