UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ANNA CECÍLIA BEZERRA DE OLIVEIRA

**DERME RECONSTITUÍDA (EQUIVALENTE) *IN*
*VITRO***

VERSÃO CORRIGIDA

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

Coorientadora: Dra. Priscila Fernanda Campos de
Menezes

São Carlos

2015

ANNA CECÍLIA BEZERRA DE OLIVEIRA

**DERME RECONSTITUÍDA (EQUIVALENTE) *IN*
*VITRO***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi

Coorientadora: Dra. Priscila Fernanda Campos de Menezes

São Carlos

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

O48d Oliveira, Anna Cecília Bezerra de
 Derme reconstituída (equivalente) in vitro / Anna
 Cecília Bezerra de Oliveira; orientadora Janice
 Rodrigues Perussi; coorientadora Priscila Fernanda
 Campos de Menezes. São Carlos, 2015.

 Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
 Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
 Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
 Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
 2015.

 1. Cultura celular 3D. 2. Matriz de suporte
 celular. 3. Colágeno. 4. Fotobiomodulação. I. Título.

*Dedico à minha mãe,
com amor.*

AGRADECIMENTOS

Como afirmou o poeta John Donne, “Nenhum homem é uma ilha, completo em si próprio; cada ser humano é uma parte do continente, uma parte de um todo”. Assim, não seria possível realizar este trabalho sem a colaboração das pessoas e dos amigos que conquistei durante minha estada em São Carlos. Então, agradeço a todos que estiveram comigo nesta trajetória.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Janice Rodrigues Perussi, que sempre confiou no meu trabalho, que estimulou a minha carreira, pela paciência e dedicação que sempre expressou durante as horas que precisei, pela sua generosidade e carinho.

À Dra. Priscila Fernanda Campos de Menezes, minha coorientadora, agradeço pelo apoio, a atenção e a disponibilidade para me ensinar sobre este projeto que me proporcionou uma formação valiosa.

Às pessoas que me ajudaram com as técnicas empregadas neste trabalho. No Instituto de Física de São Carlos agradeço ao Prof. Dr. Francisco Eduardo Gontijo Guimarães e ao técnico Dr. Sebastião Pratavieira, pelo auxílio na microscopia confocal. Ao técnico Geraldo José Mangerona Frigo, pela ajuda na porosimetria. No Instituto de Química de São Carlos agradeço à técnica Dr^a. Virginia da Conceição Amaro Martins, pelo tempo dedicado ao ensino de biomateriais. Ao técnico Márcio de Paula, pelo auxílio na microscopia eletrônica de varredura. À Dr^a. Joyce Laura da Silva Goncalves, pelos ensinamentos em estatística. E, à técnica Dr^a. Claudia Bernal, pela paciência e dedicação em ensinar e discutir os ensaios celulares.

Aos meus amigos de laboratório Alex, Claudia, Joyce, Larissa, Lucas, Ma, Marília, Milene, Thayz e Yara, que sempre contribuíram para que as dúvidas fossem sanadas, que os experimentos fossem finalizados e que a alegria se fizesse presente.

Aos meus amigos da USP/Campus São Carlos, aos amigos de São Carlos, muitos dos quais trilham o mesmo caminho na esperança de um futuro sólido, aos

meus amigos da República (RGEM), a qual posso chamar de lar, e a todos os outros amigos, que continuam amigos mesmo com a distância.

À minha família que me dá o suporte emocional que preciso. À minha mãe Walquíria, ao meu pai Vanderly e ao meu pai Adauto (*in memoriam*), meu anjo da guarda.

Ao meu amor e futuro marido Renan, que compartilha comigo todas as conquistas, compactuando as mesmas ambições. Que não me deixa falhar, que é meu porto-seguro, meu melhor amigo.

“A adversidade desperta em nós capacidades que, em circunstâncias favoráveis, teriam ficado adormecidas.”

(Quintus Horatius Flaccus)

RESUMO

OLIVEIRA, A. C. B. DERME RECONSTITUÍDA (EQUIVALENTE) *IN VITRO*. 2015. 94 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2015.

Um dos desafios atuais da engenharia de tecidos é o desenvolvimento de biomateriais substitutos e/ou equivalentes que mimetizem o tecido normal. Os estudos empregando cultura celular em monocamada encontram limitações no que concerne às interações bidimensionais entre as células e experimentos utilizando animais, devido à elevada variabilidade, não conseguem prever os resultados em humanos, comprometendo a sua relevância clínica. À vista disso, a cultura tridimensional de células (3D) utilizando um biomaterial fabricado para promover a proliferação e diferenciação celular tem sido utilizada para recriar a complexidade de um tecido normal, permitindo uma maior e complexa interação celular. Visando mimetizar o ambiente encontrado *in vivo*, este trabalho investiu no desenvolvimento de uma derme reconstituída (equivalente dérmico) *in vitro* utilizando como matriz biológica o colágeno, componente mais abundante da derme como suporte para os fibroblastos humanos, assim como na avaliação da fotobiomodulação com luz em 630 nm. Foi preparada uma esponja a partir do colágeno de serosa porcina 1,1% hidrolisado por 96 h. A caracterização do biomaterial foi realizada pela determinação da porosidade, do diâmetro dos poros, da absorção de fluidos e por ensaios de biocompatibilidade, uma vez que estes parâmetros são importantes para a proliferação e diferenciação celular na consequente formação do tecido *in vitro*. O biomaterial exibiu porosidade de 95,2%, com poros medianos de 44 μm estimados por porosimetria de injeção de mercúrio, além de canais com distância média entre as paredes de $78 \pm 14 \mu\text{m}$ estimado por MEV. Esses valores são considerados como ideais para um biosuporte de crescimento de fibroblastos. A absorção de água e meio de cultura foi de 95% e a esponja não apresentou citotoxicidade para a linhagem celular Vero. Adicionalmente, foi investigado o efeito de irradiação na cultura 3D com luz vermelha (dose 30 J cm^{-2}), que mostrou fotobiomodulação na dose de 30 J cm^{-2} para cultura de células em monocamada e no início da fase de crescimento celular em cultura tridimensional. Por microscopia confocal, verificou-se que as células cultivadas na presença da esponja (cultura 3D), apresentaram diferenciação e secreção de matriz extracelular. Portanto, os resultados apresentados mostraram que a esponja de colágeno utilizada como biomaterial para suporte celular é eficiente para a produção de uma derme reconstituída (equivalente) *in vitro* e que a fotobiomodulação em 630 nm na dose de 30 J cm^{-2} de fato acelera o crescimento celular na matriz.

Palavras-chave: Cultura celular 3D. Matriz de suporte celular. Colágeno. Fotobiomodulação.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. C. B. RECONSTITUTED DERMIS (EQUIVALENT) *IN VITRO*. 2015. 94 f. Master's dissertation. Graduate program in Bioengineering - School of Engineering of São Carlos / Ribeirão Preto Medical School / São Carlos Institute of Chemistry, University of São Paulo, 2015.

The development of biomaterials substitutes and/or equivalents to mimic normal tissue is a currently challenge in tissue engineering. Studies using cell monolayer culture presents limitations with respect to two-dimensional interactions between the cells, and experiments using animals cannot predict results in humans, due to the high viability, thus compromising their clinical relevance. In consequence, three-dimensional cell culture (3D) using a biomaterial designed to promote cell proliferation and differentiation has been used to recreate the complexity of a normal tissue, allowing a larger and complex cellular interaction. Aiming to mimic the *in vivo* environment, the present work refers to create a reconstituted dermis (dermal equivalent) *in vitro* using collagen, the most abundant component of the dermis, as biological matrix, as support for human fibroblasts, as well evaluate the photobiomodulation with light at 630 nm. First, a sponge was prepared from serous 1.1% porcine collagen hydrolyzed for 96 h. The biomaterial was characterized by determination of its porosity, pore diameter, the fluid absorption and the biocompatibility assays, since these parameters are important to the cell proliferation and differentiation resulting in the *in vitro* tissue formation. The biomaterial showed porosity of 95.2%, with a median pore of 44 μM estimated by mercury porosimetry injection, and channels with an average distance between the walls of $78 \pm 14 \mu\text{M}$ estimated by SEM. These values are considered as ideal for a biosupport fibroblast growth. The absorption of water and growth medium was 95%, and the sponge showed no cytotoxicity for the Vero cell line. Additionally, it was investigated the effect of irradiation in 3D culture with red light (dose 30 J cm^{-2}), that showed photobiomodulation on the dose 30 J cm^{-2} , for culturing cells in monolayer and in the early-stage of the cell growth in three-dimensional culture. By confocal microscopy, it was verified that the cells cultured in the presence of the sponge (3D culture), allows differentiation and extracellular matrix secretion. Therefore, the results showed that the collagen sponge used as a biomaterial for cell support and the photobiomodulation at 630 nm and dose of 30 J cm^{-2} are efficient for the production of a reconstructed dermis (equivalent) *in vitro*.

Keywords: 3D culture cell. Matrix cell support. Collagen. Photobiomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Camadas da pele e seus anexos.	18
Figura 2. Camadas da epiderme.	20
Figura 3. Camadas da derme.	21
Figura 4. Métodos de cultura celular.	25
Figura 5. Estrutura do colágeno tipo I.	27
Figura 6. Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas.	28
Figura 7. Espectro eletromagnético com destaque para a região do visível.	30
Figura 8. Interação entre a luz e o tecido biológico.	30
Figura 9. Placa de teflon com 36 poços.	35
Figura 10. Sistema para irradiação com lâmpada ultravioleta no interior do fluxo laminar para cultura celular do Grupo de Fotossensibilizadores do IQSC.	36
Figura 11. Amostras após irradiação com UV acondicionadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo de cultura microbiológico. A) Caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) e B) caldo Luria Bertani (LB).	37
Figura 12. Curva representativa da determinação da temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno por DSC.	39
Figura 13. Amostras após incubação com MTT mostrando o metabolismo celular pela observação da coloração característica da produção do composto formazam. A) Células em monocamada e B) células em cultura tridimensional.	44
Figura 14. Mesa ótica de LED 630 nm.	46
Figura 15. Fotografia digital da esponja de colágeno obtida a partir do gel de serosa com 96 h de hidrólise alcalina.	50
Figura 16. Análise qualitativa do efeito da irradiação ultravioleta na esterilização de esponja de colágeno 96 h em ágar Sabouraud glicose 4%. A) Controle – amostra não submetida à irradiação com UV; B) e C) amostras submetidas à irradiação com UV.	51
Figura 17. Análise qualitativa do efeito da irradiação ultravioleta na esterilização de esponja de colágeno 96 h em ágar Mueller Hinton. A) Controle – amostra não submetida à irradiação com UV; B) e C) amostras submetidas à irradiação com UV.	52
Figura 18. Curva DSC para o colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento de 96 h. ($10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$).	53

Figura 19. Curva DSC para o colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento de 96 h submetido a irradiação com ultravioleta. ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$).	54
Figura 20. Fotomicrografias das fibras das esponjas de colágeno utilizado na avaliação da matriz biológica para obtenção de suporte dérmico. A) Colágeno Tendão 72 h 0,7%; B) Colágeno Serosa 96 h 1,1%; C) Colágeno Tendão 120 h 0,93%. 500x.	57
Figura 21. Fotomicrografia superficial da esponja de colágeno de serosa porcina 1,1% com tratamento alcalino de 96 h. Aumento de 100x.	58
Figura 22. Fotomicrografia transversal da esponja de colágeno de serosa porcina 1,10% com tratamento alcalino de 96 h. Aumento de 100x.	59
Figura 23. Curva de porosimetria por injeção de mercúrio pelo diâmetro de poros. .	60
Figura 24. Curva de absorção de água pela esponja de colágeno de serosa porcina 96 h. Ajuste exponencial, $R^2 = 0,9987$	61
Figura 25. Curva de absorção de meio de cultura na esponja de colágeno de serosa porcina 96 h. Ajuste exponencial, $R = 0,9994$	62
Figura 26. Curva de crescimento em monocamada da linhagem celular Vero [10^6 cel mL]. Absorbância do MTT em 570 nm, onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).	65
Figura 27. Curva de crescimento tridimensional da linhagem celular Vero cultivada na MPSC de colágeno, onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).....	67
Figura 28. Crescimento em monocamada da linhagem celular Vero após irradiação com luz em 630 nm (30 J cm^{-2}).	69
Figura 29. Crescimento tridimensional da linhagem celular Vero após irradiação com a luz em 630 nm (30 J cm^{-2}), onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).....	70
Figura 30. Fotomicrografia da porção superficial da esponja de colágeno 96 h <i>in natura</i> . Aumento de 20X.....	71
Figura 31. Fotomicrografia da fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após sete dias de cultivo não submetida à irradiação. Aumento de 20X.....	72
Figura 32. Fotomicrografia da fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após sete dias de cultivo submetida à irradiação 630 nm (30 J cm^{-2}). Aumento de 20X.....	73

Figura 33. Fotomicrografia da fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após seis dias de cultivo submetida à irradiação em 630 nm. A) Esponja sem corante celular, B) canal verde para observação da fluorescência do corante LA, C) canal vermelho para observação da fluorescência do corante BE e D) sobreposição dos canais verde e vermelho para a observação e células aderidas no colágeno. A escala representa 100µm. Aumento de 20X.75

Figura 34. Fotomicrografia 3D da morfologia da esponja de colágeno 96 h. A) esponja *in natura*; B) esponja após sete dias de cultivo com células Vero não submetidas à irradiação; C) esponja após sete dias de cultivo com células Vero submetidas à irradiação 630 nm (30 J cm^{-2}). Aumento de 20X.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito da luz no processo de modulação celular na pele.....	31
Tabela 2. Reagentes utilizados para verificação do crescimento de culturas microbianas na esponja de colágeno	37
Tabela 3. Géis de colágeno utilizados na avaliação da matriz biológica para obtenção de suporte dérmico.	49
Tabela 4. Distância dos canais nas esponjas de colágeno.	56
Tabela 5. Dados obtidos por porosimetria por injeção de mercúrio na esponja de colágeno.....	59
Tabela 6. Viabilidade celular obtida por ensaio de MTT do colágeno de serosa porcina.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1P	1 fóton
2D	bidimensional
2P	2 fótons
3D	tridimensional
LA	laranja de acridina
art.	artigo
Asn	asparagina
ATP	adenosina trifosfato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (meio Eagle modificado de Dulbecco)
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetria exploratória diferencial
BE	brometo de etídio
Gln	glutamina
irr	irradiação
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organização Internacional para Padronização)
L-	sem irradiação
L+	com irradiação
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i> (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação)
LB	<i>Luria Bertani Broth</i> (caldo Luria Bertani)
LED	Light emitter diode (diodos emissores de luz)
MEC	matriz extracelular
MEV	microscopia eletrônica de varredura
MEV-S	microscopia eletrônica de varredura superficial
MEV-T	microscopia eletrônica de varredura transversal
m_{final}	massa final
m_{inicial}	massa inicial
ML	<i>Mueller Hinton Agar</i> (ágar Mueller Hinton)
MPSC	matriz polimérica de suporte celular

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina
PBS	phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)
PHBV	poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)
PLLA	poli(ácido láctico)
S	<i>Sabouraud 4% Glucose Agar</i> (ágar Sabouraud glicose 4%)
T ₀	tempo zero
T _d	temperatura de desnaturação
TE	engenharia de tecidos
UV	ultravioleta
Vero	linhagem celular epitelial não tumoral de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (extrato de levedura peptona dextrose)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 PELE	18
2.1.1 Anatomia e Fisiologia	18
2.1.2 Camada Epidérmica	19
2.1.3 Membrana ou Lâmina Basal.....	20
2.1.4 Camada Dérmica	21
2.1.4.1 Fibroblasto.....	22
2.2 ENGENHARIA DE TECIDOS.....	23
2.2.1 Modelos baseados em cultura de células.....	23
2.2.1.1 Cultura bidimensional (2D) de células	23
2.2.1.2 Cultura tridimensional (3D) de células.....	24
2.2.2 Matriz polimérica de suporte celular (MPSC)	25
2.2.2.1 Biomaterial	26
2.2.3 Fotobiomodulação	29
3 OBJETIVOS	33
3.1 Geral.....	33
3.2 Específico.....	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 Processamento e Caracterização do Colágeno	34
4.1.1 Seleção do Colágeno	34
4.1.2 Confeção das esponjas	34
4.1.3 Esterilização da MPSC.....	35
4.1.3.1 Esterilização com Irradiação Ultravioleta (UV)	35
4.1.3.2 Esterilização com Óxido de Etileno	38
4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	38
4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.1.6 Porosimetria por injeção de mercúrio	40
4.1.7 Ensaio de Absorção	41
4.2 Cultura Celular	42
4.2.1 Célula	42
4.2.2 Meio de Cultura	42
4.2.3 Subcultura Celular.....	42
4.3 Ensaios Celulares	43
4.3.1 Plaqueamento celular.....	43

4.3.2 Teste de Viabilidade	43
4.3.3 Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	44
4.3.4 Curva de Crescimento Celular	45
4.3.5 Ensaio de Formação de Derme.....	45
4.3.6 Fotobiomodulação celular	46
4.3.7 Microscopia Confocal	47
4.3.8 Análise Estatística	48
4.3.9 Descarte de resíduos gerados nos experimentos	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Processamento e Caracterização do Colágeno	49
5.1.1 Seleção do gel de colágeno	49
5.1.2 Esterilização com Ultravioleta	50
5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	53
5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	55
5.1.4.1 Secção Superficial (MEV-S)	55
5.1.4.2 Secção Transversal (MEV-T)	58
5.1.5 Porosimetria por Injeção de Mercúrio.....	59
5.1.6 Ensaio de Absorção	61
5.1.6.1 Absorção de água	61
5.1.6.2 Absorção de meio de cultura	62
5.2 Ensaio celulares	63
5.2.1 Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	63
5.2.2 Curva de Crescimento Celular	64
5.2.3 Ensaio de formação de derme	66
5.2.4 Fotobiomodulação celular	67
5.2.5 Microscopia Confocal	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1 INTRODUÇÃO

O êxito da criação de materiais utilizados em engenharia de tecidos deve contemplar o uso de estruturas bioativas, similares à matriz extracelular (*in vivo*), composta de fibroblastos dérmicos ou queratinócitos epidérmicos, que sejam capazes de suportar o crescimento celular e auxiliar o processo de adesão, proliferação, maturação e diferenciação celular (SUNDARAMURTHI; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2014; AMIN et al., 2015). Contudo, a engenharia de tecidos ainda possui entraves no que concerne à criação de substitutos e/ou equivalentes que mimetizem o tecido normal. Em boa parte, isso deve-se à complexidade no desenvolvimento de biomateriais de suporte ao crescimento celular que contemplem um amplo espectro de uso, produzindo diferentes protocolos para confecção de tecidos de reparação da pele, dos ossos, do fígado (KUPPAN et al., 2011), das válvulas cardíacas (SIQUEIRA; ZANOTTO, 2011), dos nervos (CEBALLOS et al., 1999) e do músculo cardíaco (ESCHENHAGEN et al., 1997), visto que há carência de células adequadas para os diversos tipos de tecidos e suportes tridimensionais compatíveis para amparar o crescimento destas (SAHOO et al., 2010).

Os ensaios baseados em cultura de células são cada vez mais explorados (WU; HUANG; LEE, 2010) devido à dinâmica das interações célula-célula-substrato (TANG; PENG; DING, 2010). O estudo das interações célula-célula *in vitro* é vantajoso devido à possibilidade de controlar o ambiente experimental, de obter um maior rendimento e custos mais baixos comparados a ensaios que utilizam animais (ZERVANTONAKIS et al., 2011). Mesmo assim, a maioria dos ensaios relativos à biocompatibilidade são tradicionalmente realizados usando tanto cultura de células quanto experimentos animais (NOVOSEL; KLEINHANS; KLUGER, 2011).

Os testes em animais produziram muitos avanços no conhecimento científico, apesar disso, a utilização de animais em experimentos clínicos frequentemente não consegue prever a eficácia dos testes, visto que a heterogeneidade dos resultados faz necessária a utilização de um número elevado de animais para que seja possível excluir os prováveis erros experimentais (CHAGAS; AGOSTINI, 2012), suscitando o questionamento ético sobre o uso e sacrifício destes, já que não se obtêm segurança nos

resultados clínicos. A partir deste princípio, a Lei de Crimes Ambientais, nº 9.605 de 1998, capítulo V, seção I, art. 32, parágrafo 1, diz que quando existirem recursos alternativos, a utilização de animais em pesquisa científica não é permitida e o não cumprimento das normas pode ter punição prevista na lei (BRASIL, 1998).

Nos últimos 20 anos, buscou-se estruturar as condutas para os estudos científicos e o rigor em relação à conduta ética destes experimentos e para a pesquisa animal gerando-se um conjunto de orientações referentes à substituição, aperfeiçoamento e redução dos animais em pesquisa (KILKENNY et al., 2010). Todavia, mesmo com as orientações sobre a redução do uso de animais na pesquisa científica, não é possível remover definitivamente o uso destes, visto a necessidade de estudos de respostas imunológicas e circulatórias em ensaios de toxicidade (MACNEIL, 2007).

Posto isto, os modelos de pele artificial reconstituída são vistos como uma nova alternativa para experimentos científicos (JÄCKH et al., 2012). Dessa maneira, a cultura em monocamada (2D) oferece a possibilidade de controlar o ambiente de crescimento, tornando-o o mais próximo possível do microambiente celular (YOUNG; BEEBE, 2010). Contudo, a cultura de tecidos convencional (monocamada) produz crescimento celular bidimensional em superfícies impermeáveis sólidas (plástico ou vidro) ou em suspensão uniforme (BARRILA et al., 2010). Isso mantém a expressão de genes, a sinalização e a morfologia diferentes daquelas encontradas *in vivo*, comprometendo a sua relevância clínica (SOUZA, G. et al., 2010). Estudos apontam que as interações tridimensionais observadas *in vivo* alteram algumas características celulares (morfologia, fisiologia) (OWEN; SHOICHET, 2010).

À vista disso, a cultura tridimensional de células utilizando um suporte fabricado para crescimento celular tem sido utilizada para recriar a complexidade de um tecido normal, já que a interação entre as células é alterada pela dinâmica dos processos mecânicos e bioquímicos provocados pela matriz extracelular (suporte de ancoragem celular) (CROSS et al., 2010). Esta dinâmica tridimensional é importante para mimetizar o ambiente para uso em engenharia de tecidos (KIM, C. et al., 2011) e devido às limitações encontradas em cultura 2D e à heterogeneidade da resposta em modelos animais tem sido sugerido os modelos de cultura celular tridimensional (3D).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PELE

2.1.1 Anatomia e Fisiologia

A pele é o maior órgão do corpo com uma superfície de cerca de $1,8 \text{ m}^2$ e ocupa aproximadamente 8% da massa total do corpo de um adulto (KRISHNAN et al., 2012). A morfologia da pele é composta por várias camadas diferentes, uma variedade de tipos celulares e anexos como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas, vasos sanguíneos e terminações nervosas (figura 1) com funções específicas e propriedades particulares (YILDIRIMER; THANH; SEIFALIAN, 2012).

Figura 1. Camadas da pele e seus anexos.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de YILDIRIMER; THANH; SEIFALIAN, 2012.

A pele é composta de três camadas básicas: a camada epidérmica ou componente de revestimento epitelial sobre a superfície, a camada dérmica ou o componente conjuntivo da nutrição e a hipoderme ou camada de gordura subcutânea (MIKESH et al., 2013). A lâmina ou membrana basal separa fisicamente os dois compartimentos, epiderme e derme, proporcionando um

estabilizador, bem como uma interface dinâmica entre as camadas (BREITKREUTZ; MIRANCEA; NISCHT, 2009).

É o maior órgão do corpo e serve como uma barreira protetora na interface entre o corpo humano e o ambiente circundante. Ela protege os órgãos subjacentes contra patógenos e micro-organismos (KRISHNA; MILLER, 2012). Assim, está diretamente exposta aos microbianos potencialmente prejudiciais, influências mecânicas, térmicas e químicas (GROEBER et al., 2011). Em situações de estresse a pele é autorrenovável e capaz de produzir uma nova camada de células a cada 14 dias, enquanto continua a enviar as células senescentes para as camadas superiores (YILDIRIMER; THANH; SEIFALIAN, 2012), sendo assim, um dos tecidos com maior capacidade de proliferação celular presentes no corpo (KUPPAN et al., 2011). Algumas outras funções da pele são a manutenção da homeostase, a detecção de estímulo externo, a termorregulação e a regulação hormonal (PEPPIN et al., 2015).

2.1.2 Camada Epidérmica

A epiderme, com uma espessura de 20-94 μm , é a primeira barreira da pele contra ameaças, oferecendo proteção física, química, bioquímica antimicrobiana e imunológica (WICKETT; VISSCHER, 2006). As células constituintes da camada são os queratinócitos aproximadamente 90% das células da camada epidérmica, células de Langerhans e linfócitos T - células imunitárias, e melanócitos - células produtoras de melanina (DE FALCO; PISANO; DE LUCA, 2014).

O desenvolvimento da epiderme inicia-se a partir de células-tronco epidérmicas que estão em contato direto com uma membrana basal (IVANOVA; D'SOUZA; DAGNINO, 2005). Quando novas células se formam elas se diferenciam das células de origem e são empurradas para a superfície, modificando sua morfologia (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2011). Em razão desta diferenciação celular, a epiderme é dividida em estrato basal – composto de células mitóticas, estrato espinhoso, estrato granular e estrato córneo (figura 2), sendo que cada um desses estratos contém queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação e proliferação celular (FUCHS, 2007).

Figura 2. Camadas da epiderme.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de OVAERE et al., 2009.

2.1.3 Membrana ou Lâmina Basal

Como mencionado no item 2.1.1, a membrana basal (60-94 μm de espessura) separa a camada epidérmica da camada dérmica fornecendo um campo de interação entre as camadas (BREITKREUTZ; MIRANCEA; NISCHT, 2009). A membrana basal é uma matriz extracelular especializada associada às células do tecido (HOHENESTER; YURCHENCO, 2013) com função adesiva, ou seja, alta capacidade de junção entre epiderme/derme (YURCHENCO, 2011), e é especializada nas trocas entre queratinócitos epidérmicos e fibroblastos dérmicos (VARKEY; DING; TREDGET, 2013). Também, regula o desenvolvimento e a diferenciação celular e age como uma barreira mecânica que controla o transporte e a difusão de células e macromoléculas no tecido (MOUW; OU; WEAVER, 2014). Os componentes que formam a estrutura comum da membrana basal são a laminina e o proteoglicano de heparam sulfato - responsáveis pela adesão celular e difusão de moléculas -, colágeno tipo IV – responsável pela força e elasticidade – e nidogênio - proteína de ligação entre a laminina e o colágeno tipo IV (BREITKREUTZ et al., 2013). O colágeno tipo VII também é um importante componente basal por fornecer ancoragem da membrana basal na camada dérmica através de fibrilas (VARKEY; DING; TREDGET, 2013).

2.1.4 Camada Dérmica

Diferentemente da epiderme, a derme é uma camada mais fibrosa e densa com espessura de 100-2716 μm , formada por tecido conjuntivo e a sua principal função é atuar como uma matriz resistente e proporcionar suporte para os nervos e os vasos sanguíneos. (RAVICHANDRAN et al., 2012; BELLATINE et al., 2010; BRINCAT; STUDD, 1988). A derme é a camada que protege o corpo contra o estresse físico, confere elasticidade e resistência à pele. Assim, as propriedades físicas da derme são importantes para as funções essenciais da pele (ACHTERBERG et al., 2014; NEMOTO et al., 2012). Os componentes dérmicos da pele incluem fibroblastos, células endoteliais da microvasculatura, as células dendríticas dérmicas, mastócitos e células-T, que também participam das funções cutâneas (KATIIYAR, 2011).

A derme tem duas camadas (figura 3), a mais superficial é a camada papilar (fina camada logo abaixo da epiderme) e a mais profunda é a camada reticular (uma mistura de tecido conjuntivo denso contendo principalmente colágeno do tipo I e feixes de fibras elásticas) (ARDA; GÖKSÜGÜR; TÜZÜN, 2014).

Figura 3. Camadas da derme.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

Dois tipos de fibras são encontrados na derme, principalmente colágeno (97,5%) e elastina (2,5%) (CALLEJA-AGIUS; BRINCAT; BORG, 2013). As fibras elásticas, compostas de elastina e microfibrilas de fibrilina-1, formam uma rede que auxilia no esticamento e relaxamento das fibras promovendo a

elasticidade da derme (ROSSETTI et al., 2011). As fibras de colágeno são os componentes estruturais mais predominantes, sendo a base da construção do tecido, já que sua organização estrutural suprafibrilar influencia nas propriedades mecânicas teciduais (GASSER et al., 2012). Com tal característica, a rede fibrosa formada pela secreção destes componentes que influenciam na regulação estrutural e fisiológica do tecido dérmico está inteiramente relacionada a seu local de síntese, o fibroblasto (MCDOUGALL et al., 2006).

2.1.4.1 Fibroblasto

Deste modo, para a formação da derme as células de fibroblasto desempenham um papel importante no sistema de renovação celular e na manutenção da integridade da pele (PATLOLLA; KNIGHTEN; TCHOUNWOU, 2010). Os fibroblastos são as células do tecido conjuntivo de origem mesodermal, com atribuição relevante na síntese e secreção da matriz extracelular (MEC) (DRISKELL et al., 2013).

Uma vez que o tecido não é composto somente de células, o espaço entre as células é preenchido com uma estrutura formada pela secreção de diferentes proteínas e polissacarídeos pelas células locais (ALBERTS et al., 2002). Assim sendo, a MEC é uma estrutura tridimensional composta de um agregado de proteínas fibrilares secretadas pelo fibroblasto, que promove uma *self-assembly* de macromoléculas moldando o comportamento celular de acordo com os sinais bioquímicos e mecânicos intra e extracelulares expressos no tecido (REILLY; ENGLER, 2010), também é uma rede que secreta colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanas.

Além da função estrutural para os tecidos, a MEC também controla os processos celulares básicos (proliferação, diferenciação, migração e interações celulares) (LU; WEAVER; WERB, 2012, MCCLURE et al., 2010). As interações entre as células e a matriz extracelular são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular, sendo esta uma zona de ação dinâmica que funciona para instruir o fenótipo celular (SOUZA; PINHAL, 2011). Uma vez que na pele normal os fibroblastos aderem-se a fibrilas de colágeno auxiliados pelas integrinas - proteínas de ligação de superfície celular, essa ligação com a

MEC proporciona a formação de complexos de ligação (adesão) que se conectam com os filamentos intracelulares de actina – proteína estrutural, determinando a forma da célula, que por sua vez, determina a função da célula (QUAN et al., 2013).

Isto posto, os fibroblastos são amplamente utilizados nos estudos *in vitro*, por serem uma fonte acessível, abundante e de rendimento substancial de células, que pode ser obtido por biópsia e/ou técnica de expansão celular em duas dimensões (cultura 2D) (SOMMAR et al., 2010).

2.2 ENGENHARIA DE TECIDOS

Atualmente, uma das áreas de pesquisa mais multidisciplinares é a engenharia de tecidos (TE, do inglês *Tissue Engineering*), um campo da engenharia biomédica que está se desenvolvendo rapidamente (JAYAKUMAR et al., 2010). A TE combina estratégias da ciência de materiais e engenharia, biologia celular e molecular, bem como bioquímica e ciências médicas (RAMIER et al., 2014), sendo a aplicação de princípios e métodos para o entendimento fundamental das relações estrutura-função em tecidos normais e patológicos de mamíferos visando o desenvolvimento de substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função do tecido (LANGER; VACANTI, 1993).

Apesar dos grandes avanços na engenharia de tecidos, as estratégias devem estar focadas não apenas no objetivo de replicar a fisiologia e a estabilidade biológica deste, mas também, preservar a natureza original e estética dos tecidos (KIM, H. et al., 2013).

2.2.1 Modelos baseados em cultura de células

2.2.1.1 Cultura bidimensional (2D) de células

Neste íterim, na cultura celular bidimensional ou em monocamada (2D) (figura 4) as células são cultivadas na ausência de matriz extracelular (ou, matriz de suporte celular), multiplicando-se em uma única camada que está aderida à superfície de cultivo. Deste modo, as células não expressam as

características intrínsecas observadas *in vivo*, não proporcionando condições naturais para que as células tenham crescimento que conduza ao desenvolvimento e diferenciação celular (CHITCHOLTAN et al., 2013). Vários fatores de crescimento e componentes importantes são fornecidos no meio, mas no ambiente natural o arranjo supramolecular da MEC proporciona estímulos físico-químicos que permitem a diferenciação morfológica e fisiológica das células (DUTTA; DUTTA, 2009).

Assim sendo, recriar a estrutura estratificada do tecido é importante, para que haja interações célula-célula-matriz extracelular, recriando a função normal do tecido (LEE et al., 2009).

2.2.1.2 Cultura tridimensional (3D) de células

A inevitabilidade de trabalhar com modelos celulares que contemplem a fisiologia e bioquímica normal do tecido é o que impulsiona a cultura 3D (figura 4), já que funções e respostas celulares presentes nos tecidos são muitas vezes perdidas em culturas celulares bidimensionais (2D) limitando a capacidade preditiva em testes biológicos (TUNG et al., 2011).

Neste campo, uma das estratégias para a criação de tecidos envolve o uso de uma matriz de suporte utilizada em combinação com células e/ou compostos biologicamente ativos para induzir a geração de tecidos *in vitro* ou *in vivo* (MELCHELS; FEIJEN; GRIJPM, 2010). A matriz serve como um modelo tridimensional (sintético ou biológico), em torno do qual reconstrói-se um tecido funcional através do recrutamento ou a oferta exógena de células (BADYLAK et al., 2012).

Para atingir os requisitos básicos na TE, é exigida uma organização eficaz de células *in vitro*, com características morfológicas e fisiológicas semelhantes às observadas *in vivo* (DVIR et al., 2011). Desta forma, a matriz de suporte deve dispor de uma arquitetura bem definida, oferecendo uma estrutura temporária para as células necessária para guiar a proliferação, diferenciação e organização do tecido novo (RAHAMAN et al., 2011).

A fim de se obter aplicações em TE, os materiais utilizados para confecção da matriz devem ser concebidos para estimular a resposta celular específica ao nível molecular (ARMENTANO et al., 2010). A constituição da

MEC modifica-se dependendo das células que as sintetizam, portanto utilizar materiais que mantêm o máximo da composição nativa do ambiente celular é importante para a preparação destes suportes tridimensionais (BADYLAK; TAYLOR; UYGUN, 2011).

Desta forma, matrizes acelulares podem proporcionar suportes atrativos para o repovoamento com células específicas, porque o modelo de matriz extracelular deve conter adequada arquitetura e composição para a adesão celular (PETERSEN et al., 2010).

Figura 4. Métodos de cultura celular.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de FITZPATRICK; MCDEVITT, 2015.

2.2.2 Matriz polimérica de suporte celular (MPSC)

Uma matriz polimérica de suporte celular é uma estrutura que suporta o crescimento de células e tem sido utilizada em engenharia de tecidos para proporcionar integridade estrutural ao tecido em desenvolvimento (VASANTHAN et al., 2012). As matrizes poliméricas utilizadas para recriar equivalentes dérmicos podem ser sintéticas como o PLLA (poli(ácido láctico)) (CARDOSO et al., 2013) ou naturais como o colágeno (BRAZIULIS et al., 2012) e a celulose bacteriana (FU; ZHANG; YANG, 2013). Elas foram adaptadas como matrizes para cultura de células e para a investigação de

proliferação, crescimento e migração destas (NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011), e devem ser desenvolvidas para reproduzir a estrutura, a química e a propriedade mecânica da matriz extracelular do tecido (KIM, M. et al., 2012).

Portanto, a composição e a arquitetura da matriz polimérica desempenham papéis cruciais na capacidade de colonização das células, bem como, características inerentes do material como a sua distribuição eletrônica e a conformação molecular (HIRATA et al., 2015). O material deve permitir também a difusão de nutrientes (SILL; RECUM, 2008), deve ser biocompatível, bioreabsorvível, tridimensional e altamente poroso (rede de poros interconectados) posto que assim, tem-se aumentada a área superficial de adesão celular (FOOK; APARECIDA; FOOK, 2010).

2.2.2.1 Biomaterial

Para mimetizar ao máximo a composição nativa do ambiente celular em tecidos conjuntivos, é proposta a utilização de colágeno numa forma fibrilar como substrato para cultura de células, uma vez que este é o principal componente estrutural de tecidos de vertebrados (EHRMAN; GEY, 1956; REIS et al., 2012). O colágeno é extraído a partir de tecidos animais, purificado para produzir o biomaterial (CHEVALLAY; HERBAGE, 2000) e modificado quimicamente para a melhoria das propriedades mecânicas, estruturais ou físico-químicas (VULCANI et al., 2013), além de representar uma vantagem em comparação com outros tipos de biomateriais, pois a modificação química pode melhorar a adesão celular pelo incremento da capacidade dielétrica, quando comparado a um colágeno nativo, e também, devido a sua alta disponibilidade, baixo custo para obtenção e a possibilidade de controlar o tamanho e o formato do biomaterial (HIRATA et al., 2015). O fato de o colágeno ser o componente predominante da MEC em tecidos conjuntivos bem como a sua baixa imunogenicidade e propriedades de adesão o torna uma das biomoléculas mais estudadas como matriz polimérica de suporte celular (HOYER et al., 2014).

Existem cerca de 28 tipos de colágenos caracterizados (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003) e todos exibem uma típica estrutura de bastão em tríplice hélice, tendo como unidade básica o tropocolágeno formado por

cadeias polipeptídicas denominadas α (figura 5) (GOES et al, 2007), que em seu estado nativo é eletricamente neutra com ponto isoelétrico entre 6,7 e 7,0 (CHAUDRY et al., 1997). Colágenos tipos I, II, III, V e XI são conhecidos por formarem fibras de colágeno, sendo estes os tipos usados para produzir biomateriais. O colágeno tipo I é o mais abundante, por isto o mais utilizado em engenharia de tecidos (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010).

Figura 5. Estrutura do colágeno tipo I.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013.

A matriz de colágeno derivada de tecidos animais pode ser obtida através de um tipo de modificação química, uma hidrólise alcalina, da molécula de tropocolágeno (figura 6) promovendo uma conversão seletiva de grupos carboxílicos de resíduos de asparagina (Asn) e glutamina (Gln) dos grupos carboxílicos do colágeno (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009). A hidrólise seletiva promove, portanto, um aumento de até 130 cargas negativas na molécula de tropocolágeno, superpostas na molécula nativa, de acordo com o tempo de tratamento empregado (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998). Essa adição de cargas negativas gera pequenas alterações na estrutura da matriz de colágeno relacionadas a um novo padrão eletrostático em função do aumento das cargas negativas. Quanto maior a quantidade de cargas negativas produzidas pelo tratamento, maior a possibilidade de variação de tamanho dos

poros por causa da repulsão eletrostática causada por estas cargas (BET, 2000).

Figura 6. Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas.

Fonte: BET, 2000.

Algumas características como a conformação da MPSC, o tamanho das fibras, concentração de colágeno bem como a porosidade do material são importantes para a avaliação de uma matriz de suporte celular (DOYLE et al., 2013). Sendo que a porosidade é uma consideração relevante em engenharia de tecidos, visto que as MPSC devem ter um tamanho de poros entre 20-120 μm para uma atividade e viabilidade celular adequadas para o desenvolvimento de novos tecidos (MURPHY; HAUGH; O'BRIEN, 2010). Os poros da estrutura da MPSC devem estar interligados para permitir o crescimento celular, migração e fluxo de nutrientes. Quando esses poros são pequenos a migração celular é limitada, se os poros são muito grandes, dificultam a diferenciação celular, visto que há a necessidade de mais células para preencher o poro para que ocorra o contato entre as células (ZHANG et al., 2014).

Além das características do biomaterial serem fundamentais para o metabolismo celular (FERREIRA et al., 2012), outros fatores podem influenciar também a diferenciação das células utilizadas para formação de novos tecidos. Dentre estes, a interação de luz (estímulo energético externo) com o tecido biológico (FREITAS et al., 2013), tem mostrado ser eficiente como modulador da atividade celular (FRARE; NICOLAU, 2008).

2.2.3 Fotobiomodulação

Nos últimos vinte anos, na busca de novas modalidades terapêuticas menos invasivas e mais eficientes, a luz tem sido amplamente utilizada em função de seus efeitos biomodulatórios em estudos *in vitro* e *in vivo* (SANTOS; GOMES FILHO; NICOLAU, 2012), no estudo de tratamento de feridas de pele (GÁL et al., 2009), no tratamento de esclerose múltipla (MUILI et al., 2013), em regeneração óssea (NIMERI et al., 2014), no tratamento de câncer (SANTANA-BLANK et al., 2013), em tratamentos cosméticos e em dermatologia (SAWHNEY; HAMBLIN, 2014), entre outros. Logo, a fotobiomodulação é uma terapia alternativa no processo de modulação da resposta de sistemas biológicos decorrente da irradiação com luz, que atua na estimulação ou inibição de funções biológicas sem resultar em danos irreversíveis para os sistemas (LIU, T. et al., 2012).

Dentre as fontes de luz utilizadas em terapias na área da saúde destacam-se o uso do Laser (do inglês, *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), uma fonte de luz não invasiva, coerente, de alta penetração cutânea, capaz de promover efeitos modulatórios celulares que gera um aumento significativo da temperatura do meio enquanto ocorre a irradiação (KALIL, 2011). E, o uso de diodos emissores de luz (LEDs), uma fonte de luz alternativa ao Laser classificada como sendo de “risco não significativo” pela Food and Drug Administration, por não gerar aumento apreciável na temperatura durante a irradiação, sendo clinicamente aprovada para uso em testes em humanos (SAMPAIO et al., 2013). O LED tem sido utilizado devido a aplicabilidade em estudos experimentais e clínicos, além de ser apresentado como um potencial instrumento de fonte de luz para aplicações em estudos com efeitos biomodulatórios (ADAMSKAYA et al., 2011).

Os LEDs são dispositivos semicondutores que emitem uma banda de radiação eletromagnética (figura 7) que varia do ultravioleta, passando pelo visível e infravermelho, gerando luz de baixa intensidade, sendo ausente de coerência e colimação (BAGNATO, 2002).

Figura 7.

Espectro

eletromagnético com destaque para a região do visível.

Fonte: MICHA et al., 2011.

A aplicação de luz em baixa intensidade com doses e exposições em intervalos de tempo adequados, promove e estimula a migração, a atividade e a proliferação celular, mantendo a viabilidade sem causar danos ou estresse à célula (SILVA et al., 2013). Como fonte de estimulação, a luz tem que penetrar em torno de 150 μm na derme (MANOEL; PAOLILLO; MENEZES, 2014), para assim, interagir com uma variedade de substâncias cromóforas desde o citoplasma até a membrana (proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e porfirinas), ao absorver energia estes cromóforos estimulam as mitocôndrias, acelerando o metabolismo celular. Esta aceleração produz uma cascata de processos bioquímicos estimulando a transferência de elétrons, gerando mais ATP (adenosina trifosfato) (figura 8) (GONÇALVES et al., 2010) e, assim, influenciando o metabolismo celular, gerando efeitos terapêuticos aumentando a proliferação de fibroblastos e consequente produção de colágeno (OLIVEIRA, K. et al., 2015).

Figura 8.
a luz e o
biológico. Interação entre
tecido

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de CHUNG et al., 2012.

Essas propriedades encontram-se bem difundidas em procedimentos dermatológicos de prevenção e tratamento de afecções na pele. A modulação da resposta em tratamentos em dermatologia são mostradas na tabela 1.

Tabela 1. Efeito da luz no processo de modulação celular na pele.

Faixa de comprimento de onda	Camada da Pele	Mecanismo de Ação
400-450 nm	Extrato córneo, epiderme superficial	Ativação da porfirina do microorganismo ocasionando a destruição de bactérias e de fungos.
450-495 nm	Extrato córneo, epiderme superficial	Ativação da porfirina do microorganismo ocasionando a destruição de bactérias e de fungos; Ativação da queratina, fortalecendo a barreira de proteção, impedindo a perda de água deixando a pele mais hidratada; Degradação dos cromóforos presentes na pele diminuindo as manchas.
495-570 nm	Extrato córneo, epiderme e lâmina basal	Degradação dos cromóforos presentes na pele diminuindo as manchas.
570-590 nm	Extrato córneo, epiderme, lâmina basal e derme papilar	Degradação dos cromóforos presentes na pele diminuindo as manchas; Ativação da síntese de colágeno na derme papilar superficial.
590-620 nm	Extrato córneo, lâmina basal, derme papilar e início da derme reticular	Ativação da síntese de colágeno na derme papilar superficial.
620-750 nm	Extrato córneo, epiderme, lâmina	Ativação da síntese de colágeno, elastina, proteínas de membrana, entre outros, na derme papilar e

	basal e derme papilar e reticular	reticular; Efeitos bioestimulatórios e biomoduladores com ação anti-inflamatória e analgésica.
750-1200 nm	Extrato córneo, epiderme, lâmina basal, derme papilar e reticular e hipoderme	Lipólise das células de gordura; Efeitos bioestimulatórios e biomoduladores com ação anti-inflamatória e analgésica.

Fonte: Adaptação de Oliveira (2015) a partir de MANOEL; PAOLILLO; MENEZES, 2014.

Ainda assim, para que haja uma boa interação entre a luz e o tecido biológico torna-se necessário definir o comprimento de onda a ser utilizado de acordo com o tipo de tecido tratado e da ação desejada para a modulação (MANOEL; PAOLILLO; MENEZES, 2014). Como os comprimentos de onda exibem diferentes profundidades de penetração (BAROLET, 2008), para modular uma resposta proliferativa na derme, a modulação com luz deve ser entre a faixa do vermelho com comprimento de onda entre 620-750 nm (MANOEL; PAOLILLO; MENEZES, 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Padronizar um protocolo de formação de derme reconstituída equivalente *in vitro* utilizando uma matriz biológica à base de colágeno como suporte dérmico para fibroblastos humanos além de avaliar a proliferação celular induzida pela fotoestimulação.

3.2 Específico

- Confeccionar uma matriz biológica de suporte celular à base de colágeno;
- Padronizar um protocolo de formação de derme reconstituída equivalente *in vitro*;
- Verificar resposta fotoquímica de formação de derme pela estimulação com LED de 630 nm;
- Avaliar a formação de tecido através da análise de microscopia confocal.

4 METODOLOGIA

4.1 Processamento e Caracterização do Colágeno

4.1.1 Seleção do Colágeno

A matriz biológica à base de colágeno escolhida para a obtenção da derme humana reconstituída *in vitro* deve ter propriedades de boa aderência, facilidade de manuseio, deve proporcionar um ambiente que suporta conexão celular, crescimento, proliferação e formação de construção extracelular (MEC) (RICH et al., 2014). Elegeu-se o colágeno como suporte dérmico para multiplicação e crescimento dos fibroblastos na tentativa de se obter um equivalente dérmico similar à derme humana *in vivo*. Os colágenos utilizados para a seleção foram de origem porcina e bovina, que são de fácil obtenção, baixo custo e podem sofrer modificações químicas por hidrólise alcalina (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009; HORN et al., 2013). As concentrações de colágeno nos géis foram determinadas pesando-se aproximadamente 2,0 g de cada gel e comparando as massas após liofilização. Foram analisados três tipos de géis de colágeno com diferentes tempos de hidrólise (tendão bovino 72 h, serosa porcina 96 h e tendão bovino 120 h) obtidos em colaboração com a Prof^a. Ana Maria de Guzzi Plepis, no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química de São Carlos - IQSC.

4.1.2 Confecção das esponjas

Para a preparação das esponjas de colágeno foi utilizada uma placa de teflon com 36 poços (aproximadamente 0,6 cm de profundidade) colocando-se 1,0 g de gel em cada poço (figura 9). As esponjas obtidas foram neutralizadas com bicarbonato de sódio 0,5 mol L⁻¹ por 24 h, e, posteriormente lavadas com água deionizada três vezes ao dia para retirada do sal por 15 dias, procedimento realizado no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química de São Carlos - IQSC.

Figura 9. Placa de teflon com 36 poços.

Fonte: Autoria própria.

4.1.3 Esterilização da MPSC

4.1.3.1 Esterilização com Irradiação Ultravioleta (UV)

As amostras liofilizadas de esponja de colágeno de serosa porcina foram submetidas à irradiação com lâmpada ultravioleta, a fim de obter um protocolo de esterilização com baixo custo, menor tempo de processamento e menor toxicidade que fosse alternativo ao uso do gás óxido de etileno como agente esterilizante, já que este é um gás tóxico para os operadores do processo, além de poder deixar resíduos no interior do material esterilizado. (RAINER et al., 2010). Como controle foram utilizadas esponjas não submetidas à irradiação com ultravioleta. As esponjas submetidas à irradiação com UV (tratamento) foram colocadas em placas de Petri de plástico em um suporte com garras metálicas a uma distância de 30 cm da lâmpada e irradiadas com uma lâmpada ultravioleta de λ 254 nm, com fluência média de $51,4 \text{ mW cm}^{-2}$ (aferida pelo equipamento Coherent Laser Power / Energy Meter LabMax_Top, com sensor Coherent LM-2 UV que mede até 50 mW, com uma área de $0,49 \text{ cm}^2$). O erro estimado para estas medições foi de $\pm 10\%$, durante 1 h (cada lado da esponja) (figura 10). Após a irradiação, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio (duplicata) contendo 10 mL de caldo de cultura microbiológico e armazenadas em incubadora com agitação orbital a 37°C por 24 h (figura 11),

seguindo protocolo estabelecido no laboratório em trabalho ainda não publicado. Após 24 h, o caldo de cultura microbiológico foi plaqueado em duas placas de ágar e armazenado em estufa a 37 °C por 24 h. Após o intervalo, foi realizada a observação do crescimento de culturas microbianas. Na tabela 2 encontram-se descritos os reagentes utilizados no experimento para a cultura dos microorganismos. O experimento adaptado de Rainer et al. (2010) e Hofmann et al. (2014), foi realizado em duplicata utilizando a esponja sem irradiação como controle negativo e a esponja irradiada com UV como tratamento. Foi realizada uma Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da amostra, visando avaliar se o processo não alteraria a estrutura do colágeno.

Figura 10. Sistema para irradiação com lâmpada ultravioleta no interior do fluxo laminar para cultura celular do Grupo de Fotossensibilizadores do IQSC.

Fonte: Autoria própria.

Figura 11. Amostras após irradiação com UV acondicionadas em tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo de cultura microbiológico. A) Caldo extrato de levedura peptona dextrose (YPD) e B) caldo Luria Bertani (LB).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2. Reagentes utilizados para verificação do crescimento de culturas microbianas na esponja de colágeno

Caldo de Cultura	Agar	Microorganismo
YPD - extrato de levedura peptona dextrose (Acumedia)	S - ágar Sabouraud glicose 4% (Fluka Analytical)	Indicado para o crescimento de fungos.
LB - caldo Luria Bertani (Himedia)	ML - ágar Mueller Hinton (Himedia)	Indicado para o crescimento de microorganismos em geral.

Fonte: Autoria própria.

4.1.3.2 Esterilização com Óxido de Etileno

As amostras liofilizadas de esponja de colágeno de serosa porcina foram embaladas em pares em embalagens produzidas com papel grau cirúrgico e filme laminado de poliéster/propileno e seladas com uma seladora manual de 20 cm. Após embalagem, as amostras foram enviadas para esterilização com o gás óxido de etileno (C_2H_4O) na Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda. - ACECIL, Campinas - São Paulo. A técnica é adequada já que a esterilização é realizada através da alquilação direta desnaturando organismos vivos, além de agregar vantagens, tais como a eficácia a baixas temperaturas, alta penetração e compatibilidade com uma vasta gama de materiais (FRANÇA et al., 2013).

Após esterilização, as amostras foram aeradas por 15 dias. Este processo de aeração permite a circulação de ar nos materiais esterilizados, visando à eliminação total dos resíduos do gás na amostra, já que o mesmo é tóxico para as células (SOUZA, R. et al., 2013).

4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A Calorimetria Exploratória Diferencial (do inglês Differential Scanning Calorimetry), é uma análise térmica na qual se acompanha a variação da energia entre a amostra e a referência (BERNAL et al., 2002), tendo sido utilizada neste estudo para a determinação da temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno (figura 12).

Para a análise, a esponja de colágeno foi intumescida em água deionizada e colocada em um suporte de alumínio. A curva foi obtida em um equipamento TA Instruments modelo DSC 2010, calibrado com padrão de índio. A razão de aquecimento foi de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de 5 a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, em atmosfera de N_2 . Foi utilizada uma massa com cerca de 10 mg, em suporte de alumínio hermético e o valor da temperatura de desnaturação (T_d) foi obtido pela inflexão da curva (VULCANI; MACORIS; PLEPIS, 2008). O experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química de São Carlos – IQSC, pela Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins.

Figura 12. Curva representativa da determinação da temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno por DSC.

Fonte: LOCILENTO, 2012.

4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análises por MEV fornecem dados da arquitetura do biomaterial tais como a morfologia da superfície, sendo possível inferir o tamanho dos canais e a conexão entre os seus poros, indicando a acessibilidade entre estes (OLIVEIRA, L. et al., 2010).

Para esse tipo de análise, a esponja foi intumescida por 24 h em água deionizada e congelada com nitrogênio líquido. A esponja congelada foi fraturada em uma secção transversal com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, nº 10, em aço carbono. A amostra fraturada foi novamente submetida a congelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente, a esponja foi liofilizada por 10 horas. A amostra liofilizada foi preparada para MEV de secção superficial e transversal. As imagens por MEV foram obtidas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos

(CAQI/IQSC/USP), em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, Inglaterra) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 15 kV. As amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = 2×10^{-2} mbar; corrente = 60 mA; taxa de deposição $0,60 \text{ nm s}^{-1}$). As amostras foram colocadas no porta amostra de alumínio (*stubs*), para a observação. Como as amostras analisadas não apresentam condutividade elétrica, para esta fixação foi empregado um adesivo condutor, necessário para garantir um caminho condutivo. A obtenção da distância entre as paredes dos canais, presentes na estrutura da esponja, foi realizada pelo processamento das imagens no programa de computador UTHSCSA *Image Tool* 3.0 através da medida de 30 determinações em cada imagem.

4.1.6 Porosimetria por injeção de mercúrio

Investigar a porosidade, o tamanho dos poros, a forma e a interligação dos poros é relevante, já que estes fatores desempenham um papel importante na promoção da migração celular e crescimento interno de tecido novo (VIANA et al., 2013). Isto posto, para um crescimento celular efetivo o biomaterial deve apresentar uma alta porosidade (DUAN et al., 2015). A fim de se obter a distribuição de tamanhos de poros da esponja de colágeno, utilizou-se a técnica de porosimetria por injeção de mercúrio (PRZEKORA et al., 2014). O ensaio de porosimetria foi realizado no Laboratório da Tecnologia do Pó, Grupo de Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A esponja de colágeno liofilizada pesando 0,0088 g foi colocada no porta-amostra. O porta-amostra e a esponja foram pesados juntos antes de serem colocados no porosímetro (Micromeritics Poro Sizer 9320), exibindo massa de 68,94 g. Após pesagem, a amostra foi colocada no compartimento pneumático de baixa pressão para fazer vácuo de 0,5 psi a 2,5 psi em temperatura de 25 °C. Foi feita a injeção de mercúrio, sendo a amostra recoberta superficialmente e o porta-amostra ficando impregnado de mercúrio.

Após impregnação, o mercúrio foi retirado da linha do sistema interno do equipamento, permitindo a passagem de ar para o porta-amostra. O interior da amostra de esponja de colágeno foi preenchido por mercúrio sob pressão. Após impregnação com baixa pressão, o porta-amostra com a amostra de esponja de colágeno foi pesado novamente para determinar a quantidade de mercúrio dentro da amostra. O porta-amostra com a esponja e o mercúrio apresentou massa de 115,82 g. Após pesagem, a amostra foi recolocada no porosímetro por 1 h no compartimento hidráulico de alta pressão, para expulsão do ar pela impregnação de óleo no porta-amostra, para que o mercúrio internalizasse os poros de menores diâmetros. Ao final do ensaio, foi possível visualizar o resumo de dados da injeção de mercúrio.

4.1.7 Ensaio de Absorção

Dois grupos de esponjas de colágeno, previamente armazenados por 48 h em um dessecador de vidro com hidróxido de sódio (NaOH)_{sólido} para remoção da umidade, foram pesados (m_{inicial}). Após pesagem, as esponjas foram acondicionadas em placas de Petri, onde o grupo 1 representa as esponjas que foram imersas em água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Estados Unidos) e o grupo 2 representa as esponjas que foram imersas em meio de cultura Iscove's (do inglês Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma). Os volumes de água e meio de cultura utilizados para a absorção foram de 10 mL para cada esponja. O grau de absorção foi verificado a cada minuto, durante 15 minutos. Para isso, as amostras foram retiradas da placa de Petri e a remoção do excesso de líquido superficial na esponja foi realizado com papel filtro. As porcentagens de água e meio de cultura absorvidos foram determinadas pela relação entre m_{final} e m_{inicial} usando-se a equação 1. O ensaio foi realizado usando-se a média de 11 determinações independentes, adaptado de Rodrigues (2011).

$$\% \text{ água absorvida} = 100 \times \frac{m_{\text{final}} - m_{\text{inicial}}}{m_{\text{final}}} \quad (1)$$

4.2 Cultura Celular

4.2.1 Célula

A linhagem utilizada nos ensaios celulares-piloto foi a linhagem Vero (célula de rim de macaco verde africano – *Cercopithecus aethiops*), padrão internacional para a caracterização e estudos de substratos celulares e biomateriais usados para a produção de produtos biológicos e biotecnológicos (SANTOS; WADA, 2007), adquirida do Instituto Adolfo Lutz/SP, provenientes do ATCC:CCL 81.

4.2.2 Meio de Cultura

Para o crescimento celular foi utilizado o meio Iscove's (do inglês Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma). Para manutenção do pH entre 7,2 e 7,4 foi adicionado 2,15 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio (Synth). A suplementação foi feita com Soro Fetal Bovino (SFB, Cultilab) na proporção de 10%. Adicionou-se 1% de penicilina 10.000 UI mL⁻¹, estreptomicina 10 mg mL⁻¹. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana e quando observada a confluência, a subcultura era feita.

4.2.3 Subcultura Celular

Retirou-se o meio de cultura por sucção das garrafas de cultura e adicionou-se tripsina (Cultilab) como agente de dissociação, ou seja, para o descolamento das células. A seguir a tripsina foi neutralizada com meio de cultura e, então, transferiu-se a suspensão celular para tubo cônico (Falcon) para centrifugação por 1 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi removido e descartado e as células foram suspensas em 1 mL de meio para contagem da concentração e viabilidade celular em câmara de Neubauer. Para determinação da viabilidade celular, foi utilizado o corante azul de Trypan que é incorporado seletivamente pelas células não viáveis (OLIVEIRA, G. et al., 2010). Após a contagem, as células foram distribuídas em frascos de cultura, na concentração de

$2,0 \times 10^5$ cel mL⁻¹ e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ em meio de crescimento com suplementação específica. As células foram congeladas em nitrogênio líquido utilizando-se SFB e dimetilsulfóxido (DMSO, Synth) a 10% (FRESHNEY, 2010).

4.3 Ensaios Celulares

Todas as manipulações com células empregam materiais estéreis e foram realizados em câmara de fluxo laminar para manutenção da esterilidade e os materiais estavam estéreis.

4.3.1 Plaqueamento celular

O plaqueamento celular para os ensaios de citotoxicidade, de curva de crescimento, de formação de derme e fotobiomodulação foram adaptados de Hofmann et al. (2014). De uma suspensão celular 1×10^6 cel mL⁻¹, 100 µl de solução de células foram adicionados em cada um dos poços das placas de 24 poços destinados aos controles e as amostras (MPSC + células). Após adição da suspensão celular, as placas foram armazenadas na estufa por 15 minutos para acomodação da célula à MPSC. Após esse intervalo, adicionou-se mais 100 µL de meio DMEM para manter as células úmidas e as placas foram armazenadas na estufa de cultura por 30 minutos. Logo após, adicionou-se mais 2 mL de meio e as placas foram armazenadas na estufa de cultura até o momento da análise.

4.3.2 Teste de Viabilidade

A viabilidade celular foi mensurada utilizando-se o método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo de tetrazolina) adaptado de (STOCKERT et al., 2012). Esse teste é usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, é oxidado pelas enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (figura 13) (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

Foi preparada uma solução estoque de 5 mg mL^{-1} de MTT em PBS (tampão fosfato-salino, do inglês Phosphate Buffered Saline, pH 7,4). Adicionou-se 2 mL de uma solução (MTT/PBS e DMEM na proporção de 1:4), aos poços dos experimentos na placa de cultura celular de 24 poços que foi armazenada na estufa de células durante 3 horas. A seguir, o MTT foi retirado e adicionando-se 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço. A placa foi levada para a incubadora com agitação orbital por 30 minutos e 200 μL de cada amostra foram transferidos para três poços de uma placa de 96 poços. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm no leitor de microplacas (VERSAmax). A viabilidade celular (%) foi determinada pela razão entre média dos valores de absorbância do tratamento e da média do controle.

Figura 13. Amostras após incubação com MTT mostrando o metabolismo celular pela observação da coloração característica da produção do composto formazam. A) Células em monocamada e B) células em cultura tridimensional.

Fonte: Autoria própria.

4.3.3 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

A citotoxicidade da esponja de colágeno foi avaliada pelo teste de contato direto *in vitro* adaptado da norma ISO 10993-5 (2009), que oferece uma avaliação preliminar sobre a biocompatibilidade de materiais à base de polímeros.

Utilizou-se uma placa de 24 poços estéril com as seguintes amostras, controle positivo = recorte de luva de látex estéril de 5 mm de diâmetro; controle negativo = somente células da linhagem Vero; esponja de colágeno de 5 mm de diâmetro impregnada com células da linhagem celular Vero. O ensaio foi realizado em triplicata. O número de células Vero por poço foi de 1×10^6 células em 20 μL de meio DMEM. Os fragmentos de luva de látex e de esponja de colágeno foram obtidos utilizando-se tesoura e lâmina de bisturi nº 10 estéreis. Antes de serem adicionados à placa de 24 poços para observação do crescimento celular, as amostras foram imersas em PBS estéril em placa de Petri estéril por 2 h e armazenadas na estufa de cultura até completa umidificação. Após 2 h, as amostras umedecidas foram transferidas para a placa de 24 poços estéril, realizando-se o plaqueamento celular conforme descrito no item 4.3.1.

O ensaio de viabilidade celular por MTT foi realizado a cada 24 h, durante sete dias. O grau de citotoxicidade foi avaliado com base na viabilidade celular em relação aos controles como forte, moderado ou leve ou não citotóxico, em que a atividade em relação aos controles era menor de 30%, entre 30 e 60%, entre 60 e 90% ou maior do que 90%, respectivamente.

4.3.4 Curva de Crescimento Celular

As células foram suspensas em DMEM suplementado na concentração de 1×10^6 cel mL^{-1} e plaqueadas em nove placas de 24 poços. O ensaio foi elaborado em triplicata. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. A viabilidade celular foi determinada a cada 24 h durante nove dias pelo método colorimétrico do MTT. A curva de crescimento foi obtida pela média dos valores de absorbância nos poços/dia.

4.3.5 Ensaio de Formação de Derme

A esponja de colágeno foi umedecida em meio de cultura disperso em placa de Petri e armazenada na estufa por 2 h. A seguir, as esponjas foram transferidas para os respectivos poços das placas de cultura de 24 poços. O meio de cultura em excesso foi retirado da superfície da esponja por aspiração

com o auxílio de uma bomba de vácuo e, realizou-se o plaqueamento celular. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e o tecido reconstituído foi obtido em sete dias (SOUTO et al., 2006). As amostras (MPSC) foram trocadas de poços para realização do MTT, visando excluir possíveis células aderidas nas placas.

Para o ensaio, as placas foram identificadas pelo número de horas decorridas (24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas), até a utilização destas para medida de viabilidade celular pelo método de MTT. A viabilidade celular foi determinada a cada 24 h durante nove dias.

4.3.6 Fotobiomodulação celular

Para os ensaios de fotobiomodulação foram realizados os mesmos experimentos de formação de derme, já descritos. Após plaqueamento, as placas de cultura celular foram retiradas da estufa e o meio de cultura foi retirado, com auxílio da bomba de vácuo. Adicionou-se 2 mL de meio de cultura sem adição de fenol em cada poço. As placas em seus respectivos dias foram levadas para fotoestimulação sendo submetidas à irradiação em comprimento de onda de 630 ± 10 nm, para a modulação da derme papilar e reticular como indicado na tabela 1 (MANOEL; PAOLILLO; MENEZES, 2014), utilizando uma Biotable, uma mesa ótica de constituída de 40 LEDs vermelhos (figura 14) desenvolvida no Laboratório de Apoio Tecnológico - LAT do Grupo de Óptica do Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

Figura 14. Mesa ótica de LED 630 nm.

Fonte: Autoria própria.

Para a bioestimulação utilizou-se fluência (dose de energia) de 30 J cm^{-2} , valor anteriormente utilizado pelo grupo em trabalho ainda não publicado, e irradiância (densidade de potência) de $24,1 \text{ mW cm}^{-2}$. Para a determinação do tempo de irradiação utilizou-se a equação 2:

$$\text{Dose} = \frac{I \cdot t}{1000} \quad (2)$$

onde, I = valor fixo de irradiância (mW), determinado pelo fabricante do LED 630 nm; t = tempo de irradiação (s) e dose é descrita em unidades de J cm^{-2} .

4.3.7 Microscopia Confocal

A observação da formação da matriz extracelular secretada pela célula em cultura (3D) foi realizada em um microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) utilizando objetiva Plan-Apochromat M27 com aumento de 20X e abertura numérica de 0,8. A excitação das amostras foi realizada por um e dois fótons, (1P) e (2P), respectivamente, utilizando Laser de 800 nm para o colágeno, 405 nm e 543 nm para os corantes laranja de acridina (LA) e brometo de etídio (BE), respectivamente. A emissão foi coletada nas regiões espectrais de 400 a 800 nm, com detecção em 2º harmônico em 400 nm para o colágeno, 522-591 nm e 563-740 nm para os corantes LA e BE, respectivamente. O experimento foi realizado no Laboratório Multi-usuário do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Para este tipo de análise, utilizou-se esponja de colágeno *in natura* (controle negativo), esponja cultivada com células da linhagem VERO na ausência de marcador celular (brometo de etídio e laranja de acridina) e esponja cultivada com células da linhagem VERO com marcador celular (brometo de etídio e laranja de acridina). A mistura dos corantes brometo de etídio e laranja de acridina permite a visualização de alterações morfológicas através da marcação do núcleo da célula (BYCZKOWSKA; KUNIKOWSKA; KAŻMIERCZAK, 2013). Utilizou-se o meio DMEM sem a adição de fenol, visando diminuir a interferência do corante na avaliação da amostra por microscopia confocal. As amostras foram colocadas sobre uma lâmina fosca

lapidada de 26x76 mm, com espessura de 1,0-1,2 mm (Kasvi). As amostras foram marcadas com 10 µL de uma solução de brometo de etídio e laranja de acridina

(100 µg mL⁻¹, numa razão de 1:1) (BYCZKOWSKA; KUNIKOWSKA; KAŻMIERCZAK, 2013) para observação da fluorescência.

4.3.8 Análise Estatística

Todos os dados experimentais foram expressos como a média ± desvio padrão. A análise estatística para os valores experimentais foi realizada utilizando-se o teste t de Student para mostrar a significância da diferença entre os pares de médias. A diferença foi considerada significativa quando o valor de $p < 0,05$. Os tratamentos estatísticos foram realizados no programa Excel®2010, segundo protocolo estabelecido no Grupo de Fotossensibilizadores (GONÇALVES, 2015).

4.3.9 Descarte de resíduos gerados nos experimentos

Os resíduos gerados durante os experimentos foram descartados de acordo com os protocolos de segurança estabelecidos pelo Grupo de Fotossensibilizadores. Para o descarte, os experimentos com células foram tratados com solução de hipoclorito de sódio 3% durante 1 h ou esterilizados em autoclave à 120 °C por 30 min. Os resíduos provenientes dos ensaios, assim como, soluções e vidrarias utilizados, foram encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos do Campus da USP – São Carlos (BERNAL, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processamento e Caracterização do Colágeno

5.1.1 Seleção do gel de colágeno

Para a produção da esponja selecionou-se três tipos de géis de colágeno (tabela 3) por apresentarem diferentes quantidades de grupos carboxílicos formados por hidrólise alcalina. Esse aumento de cargas negativas leva a diferenças morfológicas na conformação dos poros da esponja, já que o tratamento alcalino introduz modificações na estrutura básica da molécula de colágeno.

Tabela 3. Géis de colágeno utilizados na avaliação da matriz biológica para obtenção de suporte dérmico.

Origem do Colágeno (Tipo I)	Hidrólise Alcalina (h)	Concentração de Colágeno (%)
Serosa porcina	96	1,1
Tendão bovino	72	0,7
Tendão bovino	120	0,9

Com base nos géis selecionados foram feitas esponjas em forma cilíndrica com massa média de 0,0082 g (n=5), exibindo um raio médio de 0,1809 cm (n=55) e altura de 0,02 cm (n=55). A área da esponja foi (0,2284 cm²), calculada pela área de um cilindro, e com volume de 0,0021 cm³.

As esponjas de colágeno de tendão bovino com tratamentos de hidrólise alcalina de 72 e 120 h exibiram uma concentração de colágeno inferior a 1%. Já a esponja de serosa porcina com tratamento de 96 h, exibiu uma concentração superior (1,1%) em relação às outras esponjas de tendão. Por este motivo, foi considerada entre as esponjas obtidas a partir dos géis selecionados, como o suporte de crescimento celular para a confecção do equivalente dérmico *in vitro*.

As esponjas obtidas a partir desses géis são todas similares e têm aparência homogênea, esbranquiçada e macia como mostrada na figura 15.

Figura 15. Fotografia digital da esponja de colágeno obtida a partir do gel de serosa com 96 h de hidrólise alcalina.

Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Esterilização com Ultravioleta

A análise do efeito da esterilização com lâmpada ultravioleta na esponja de colágeno 96h foi realizado através da avaliação da atividade microbiana das amostras semeadas em placa de cultura com ágar (figura 16 e 17). A figura 16 apresenta as amostras inoculadas em caldo de cultivo extrato de levedura peptona dextrose - YPD e semeadas em ágar Sabouraud glicose 4%, específicos para o desenvolvimento de leveduras, segundo Kamita et al. (2011) e Hymavathy et al. (2015). Observou-se que não houve atividade microbiana nas placas de cultura, tanto na amostra do controle (figura 16A), quanto nas placas de cultura das amostras irradiadas com UV (figura 16B e C, respectivamente), indicando que não houve contaminação com fungo (levedura).

Figura 16. Análise qualitativa do efeito da irradiação ultravioleta na esterilização de esponja de colágeno 96 h em ágar Sabouraud glicose 4%. A) Controle – amostra não submetida à irradiação com UV; B) e C) amostras submetidas à irradiação com UV.

Já na figura 17, estão apresentadas as amostras inoculadas em caldo de cultivo Luria Bertani – LB, específico para o desenvolvimento de *Escherichia coli* e microorganismos não fastídicos, que crescem em meio de cultura habituais, segundo Misra et al. (2012) e semeadas em ágar Mueller Hinton, específico para o desenvolvimento de bactérias, segundo Kim, S.-H. et al. (2011). Diferente da figura 16, observou-se que houve atividade microbiana nas placas de cultura, tanto nas repetições da amostra do controle 4I e 4II (figura 17A), quanto nas placas de cultura 5I, 5II, 6I e 6II (figura 17B e C, respectivamente) das amostras irradiadas com UV. Assim, mesmo que a placa 6I (figura 17C) não apresente colônias visíveis, sua repetição na placa 6II

(figura 17C) apresenta colônias visíveis, portanto, indicando que houve contaminação.

Figura 17. Análise qualitativa do efeito da irradiação ultravioleta na esterilização de esponja de colágeno 96 h em ágar Mueller Hinton. A) Controle – amostra não submetida à irradiação com UV; B) e C) amostras submetidas à irradiação com UV.

Como houve contaminação por bactérias como apresentado na figura 17, pode-se inferir que o método de esterilização das esponjas de colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento alcalino de 96 h utilizando lâmpada ultravioleta, não foi eficiente no tempo de irradiação de 1 h (*per side*).

Desta maneira, tornou-se necessário realizar novos experimentos para variar o tempo de irradiação e avaliar se a luz UV realmente seria um método alternativo ao uso da esterilização com óxido de etileno, como descrito por Rainer et al. (2010).

5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A curva DSC baseada na transição endotérmica característica da mudança estrutural da tríplice hélice para o colágeno de serosa porcina 1,1 % com tempo de tratamento de 96 h está mostrada na figura 18. Essa temperatura é relativa à transição do colágeno para a gelatina, provocada pela quebra de ligações intramoleculares fazendo com que a proteína passe de uma estrutura cristalina a uma forma desorganizada (HORN, 2008), onde a temperatura de desnaturação observada foi de 46,3 °C. Quando comparada ao colágeno tipo I comercial (Novaprom Food Ingredients Ltda., São Paulo) que apresenta uma temperatura de desnaturação de 52,7 °C (PEDROSO, 2009), o colágeno de serosa porcina de 96 h de tratamento alcalino possui uma temperatura inferior. Esta observação de que o tempo de tratamento alcalino altera o valor da T_d , quanto maior o tempo de tratamento, menor será a temperatura de desnaturação, está de acordo com a literatura (BET; GOISSIS; LACERDA, 2001; BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009), sendo possível afirmar que o colágeno 96 h apresenta uma T_d característica para o biomaterial.

Figura 18. Curva DSC para o colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento de 96 h. ($10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$).

As amostras de colágeno submetidas à esterilização com lâmpada ultravioleta – UV foram analisadas por DSC, quanto à modificação de sua estrutura ocasionada pela ação do método de irradiação. As amostras de colágeno tratadas com UV podem sofrer reticulação, processo no qual há um aumento das ligações covalente no polímero, conhecido como crosslinking ou ligação cruzada, deixando a amostra mais dura e quebradiça (MEGHEZI; CHEVALLIER; MANTOVANI, 2012).

Na figura 19 está apresentada a curva DSC das amostras de colágeno após tratamento de esterilização com UV. É possível observar que a temperatura de desnaturação obtida foi de $57,3^\circ\text{C}$, além de apresentar uma menor intensidade. Comparando-a à temperatura de desnaturação da esponja sem irradiação com UV (figura 18), o tratamento com UV causou um aumento da temperatura de desnaturação da amostra de colágeno irradiada. Este resultado corrobora com a literatura que afirma que colágeno tratamento com UV apresenta T_d maior que o colágeno sem tratamento (MEGHEZI; CHEVALLIER; MANTOVANI, 2012).

Figura 19. Curva DSC para o colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento de 96 h submetido a irradiação com ultravioleta. ($10^\circ\text{C min}^{-1}$).

Devido a pequena intensidade observada para a T_d do colágeno, após a irradiação com luz ultravioleta, não é possível afirmar que toda a esponja de colágeno foi irradiada, e portanto a esterilização pode não ser efetiva para descontaminação, como observado na figura 17. Desta forma, optou-se por esterilizar a esponja de colágeno com óxido de etileno.

5.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

5.1.4.1 Secção Superficial (MEV-S)

A MEV-S das esponjas evidenciou estruturas morfológicas semelhantes, organizadas em canais fibrilares paralelos. Não foi possível determinar a profundidade dos poros e nem ao menos se estão interligados em camadas subjacentes à visualizada. As imagens obtidas por MEV-S (figura 20) foram analisadas no programa *Image Tool* e as médias e os desvios padrão da distância entre os canais estão expressos na tabela 4.

Esponja de colágeno	Distância média (μm)
---------------------	-----------------------------------

Tendão bovino 72 h	135±27
Serosa porcina 96 h	78±14
Tendão bovino 120 h	38±7

Tabela 4. Distância dos canais nas esponjas de colágeno.

A esponja de serosa porcina apresentou tamanho médio de canal intermediário comparada às esponjas analisadas. Assim, corroborando com a determinação de que apresenta uma maior concentração de colágeno entre as esponjas analisadas, elegeu-se a esponja de serosa porcina 96h como suporte ideal para ancoragem celular, propiciando acessibilidade para as células permearem nos poros, já que o tamanho de células de mamífero está em torno de 10-30 μm (ALBERTS et al., 2002).

Figura 20. Fotomicrografias das fibras das esponjas de colágeno utilizado na avaliação da matriz biológica para obtenção de suporte dérmico. A) Colágeno Tendão 72 h 0,7%; B) Colágeno Serosa 96 h 1,1%; C) Colágeno Tendão 120 h 0,93%. 500x.

A figura 20 apresenta a morfologia superficial da esponja de colágeno 96h escolhida para ser utilizada como matriz polimérica de suporte celular. Na imagem é possível observar a distribuição heterogênea dos poros na esponja, além de ser possível inferir que estes poros superficiais se comunicam entre si. No entanto, para que a esponja seja ideal para o cultivo de células, esta deve permitir a permeabilidade das células pelos poros em toda a extensão da esponja (ZHANG et al., 2014). Como observado, na figura 21 não é possível prever a profundidade dos poros subsequentes e tampouco, avaliar se estes poros comunicam-se com a outra face da esponja de colágeno.

Portanto, um corte da esponja em uma secção transversal foi realizado para a observação da característica de interconectividade entre as faces adjacentes e subjacentes da esponja.

Figura 21. Fotomicrografia superficial da esponja de colágeno de serosa porcina 1,1% com tratamento alcalino de 96 h. Aumento de 100x.

5.1.4.2 Secção Transversal (MEV-T)

Após a escolha do gel de colágeno a ser utilizado para a produção do suporte dérmico, obteve-se imagens da esponja de serosa porcina 96 h por microscopia transversal (figura 22).

Figura 22. Fotomicrografia transversal da esponja de colágeno de serosa porcina 1,10% com tratamento alcalino de 96 h. Aumento de 100x.

A imagem obtida a partir da MEV-T revelou interconexão dos poros entre as faces adjacentes e subjacentes da esponja. Além disso, atestou a presença de poros por toda a extensão da esponja com tamanhos heterogêneos. Contudo, não foi possível inferir que a esponja tem poros com tamanho suficiente para acomodar as células de mamíferos utilizadas. Isto posto, tornou-se necessário a medição do tamanho dos poros da esponja, sendo esta auferida pela técnica de porosimetria por injeção de mercúrio.

5.1.5 Porosimetria por Injeção de Mercúrio

Na tabela 5 estão apresentados os dados obtidos por injeção de mercúrio visando a obtenção do tamanho do poro na esponja de colágeno de serosa 96 h 1,1%.

Tabela 5. Dados obtidos por porosimetria por injeção de mercúrio na esponja de colágeno.

Dados da injeção de mercúrio	
Massa de esponja	0,0088 g
Volume total de Injeção	25,4929 mL g ⁻¹
Densidade aparente (esqueleto)	0,7690 g mL ⁻¹
Diâmetro mediano dos poros (volume)	44 µm
Porosidade	95,2%

O elevado grau de porosidade observado (95,2%) constitui como uma importante característica para o biomaterial analisado neste trabalho, visto que quanto maior o grau de porosidade do material, maior a área superficial proporcionando uma maior interação célula-MPSC (YANNAS et al., 2014). Um estudo descrito na literatura empregando o poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)–PHBV, um polímero natural produzido por bactérias, obteve porosidade de $82,2\% \pm 0,5\%$ (ZONARI et al., 2015), inferior ao observado no colágeno de serosa 96 h 1,1%.

Outro fator importante é o espaço disponível para a geração da matriz extracelular, uma vez que este espaço determina a superfície de ligação célula-substrato (SANTOS et al., 2012). O diâmetro mediano dos poros apresentado na figura 23 foi de 44 μm , mostrando que a esponja de colágeno é viável para ancorar as células. De acordo com Yannas et al. (2014), poros menores que 10 μm e maiores que 50 μm não proporcionam uma superfície de ligação eficiente para adesão celular, permitindo que a célula, quando cultivada sobre a esponja de colágeno, possa permear toda a extensão desta, para posterior diferenciação e formação de derme. Além disso, sabe-se que o diâmetro médio das células de mamífero é cerca de 30 μm (ALBERTS et al., 2002).

Portanto, a esponja de colágeno de serosa porcina apresentou resultados satisfatórios como matriz de suporte para obtenção de equivalente dérmico *in vitro*.

Figura 23. Curva de porosimetria por injeção de mercúrio pelo diâmetro de poros.

5.1.6 Ensaio de Absorção

A fim de verificar a capacidade de absorção da esponja, embasada pelos resultados de porosimetria, realizou-se o ensaio de absorção de água e de meio de cultura. A temperatura controlada foi de 27 °C.

5.1.6.1 Absorção de água

A figura 24 resume os dados da absorção de água pela esponja de colágeno. O comportamento da absorção de água pela esponja segue o padrão de uma curva exponencial.

Figura 24. Curva de absorção de água pela esponja de colágeno de serosa porcina 96 h. Ajuste exponencial, $R^2 = 0,9987$.

onde, $y_0 = 0,19009$; $A = (-0,18193)$ e $R_0 = (-0,52945)$.

Observou-se que a absorção de água tornou-se estável aos 4 min de ensaio. A massa seca média da esponja (m_{inicial}) foi de 0,0081 g e a massa média final, ou seja, massa da esponja seca + massa de água (m_{final}) obtida após

15 min foi de 0,1834 g. Aplicando os dados da na equação 1 (item 4.1.7), determinou-se a porcentagem média de água absorvida em 95%. A relevância

deste resultado deve-se ao fato de que a água representa a maior percentagem do peso total da MEC *in vivo* (SANTOS et al., 2012). Portanto, a capacidade de retenção é fundamental para o crescimento celular, já que este é facilitado em materiais que absorvem mais fluidos (RODRIGUES, 2011).

5.1.6.2 Absorção de meio de cultura

Após a determinação do grau de absorção da esponja de colágeno em água, realizou-se o mesmo teste empregando-se meio de cultura como fluido, para observar se a absorção ocorreria no mesmo intervalo de tempo, já que para as células serem adicionadas à esponja, é necessário que esta esteja completamente preenchida com meio de cultura.

A massa seca média da esponja (m_{inicial}) foi de 0,0081 g e a massa média final, ou seja, a massa da esponja seca mais a massa de meio (m_{final}) obtida após 15 min foi de 0,1929 g. Aplicando estes dados na equação 1 (item 4.1.7), determinou-se a percentagem de meio de cultura em 95%.

Figura 25. Curva de absorção de meio de cultura na esponja de colágeno de serosa porcina 96 h. Ajuste exponencial, $R = 0,9994$.

onde, $y_0=0,19462$; $A=(-0,18645)$ e $R_0=(-1,68458)$.

O comportamento da absorção de meio de cultura pela esponja segue o mesmo padrão da curva de absorção em água. O gráfico obtido no ensaio de absorção de meio de cultura (figura 25) indica que em 1 min a esponja obteve uma absorção máxima de meio de cultura. Assim sendo, a absorção de meio de cultura ocorre em tempo menor do que a absorção com água, indicando que a absorção de meio pela esponja de colágeno não influenciará no tempo de obtenção de derme equivalente.

5.2 Ensaio celulares

5.2.1 Ensaio de Citotoxicidade *in vitro*

A norma ISO 10933-5 estabelece um delineamento para mensurar a citotoxicidade dos dispositivos com potencial uso em saúde, tais como dispositivos médicos e/ou materiais que entrem em contato direto ou indireto com o corpo humano. Como o colágeno é a matriz que ancorará as células para crescimento dérmico, com possível utilização em testes de eficácia de fármacos e cosméticos, o ensaio foi aplicado para eliminar esta variável.

O ensaio de biocompatibilidade permitiu avaliar a proliferação de células na esponja de colágeno de serosa porcina quantitativamente. O grau de citotoxicidade foi avaliado com base na viabilidade celular em relação aos controles, classificando como forte, moderado ou leve ou não citotóxico, em que a atividade em relação aos controles é menor que 30%, entre 30 e 60%, entre 60 e 90% ou maior do que 90%, respectivamente. A tabela 6 mostra os resultados de viabilidade celular obtidos por MTT em intervalos de 24 h durante sete dias.

Tabela 6. Viabilidade celular obtida por ensaio de MTT do colágeno de serosa porcina.

Tempo (h)	Viabilidade de Proliferação Celular (%)
24	95
48	118
72	94
96	113
120	109
144	91

168

100

Foi possível observar que durante 168 h a viabilidade celular permaneceu elevada, com viabilidade média de $103\% \pm 11\%$. A atividade celular em relação ao controle negativo permaneceu maior do que 90%, indicando que o colágeno de serosa porcina não apresentou citotoxicidade para as células da linhagem Vero, de acordo com os parâmetros estabelecidos na norma ISO 10933-5. Assim, o colágeno de serosa porcina apresenta-se adequado para utilização como suporte de crescimento celular dérmico.

5.2.2 Curva de Crescimento Celular

A figura 26 mostra o comportamento do crescimento em monocamada da linhagem celular Vero. Nela é mostrada a proliferação celular seguindo um padrão de crescimento característico com fase lag (adaptação), fase log (crescimento exponencial), fase platô (estacionária) e fase de declínio (morte celular) (FRESHNEY, 2010).

Figura 26. Curva de crescimento em monocamada da linhagem celular Vero [10^6 cel mL]. Absorbância do MTT em 570 nm, onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).

A linhagem celular Vero apresenta uma fase lag de cerca de 24 h, onde não ocorre uma grande variação do número de células. Um aumento da absorbância em 48 h com um ponto máximo em 192 h indica um aumento exponencial do número de células (fase log). Em 216 h não se observou alteração na absorbância, já que os valores de 192h e 216h são iguais estatisticamente (teste t de Student, $p < 0,05$). Deste modo essa falta de alteração pode estar associada ao início da fase platô. Todos os valores diferem estatisticamente do controle (24h) caracterizando o crescimento celular, como observado na figura 26 (teste t de Student, $p < 0,05$). Um novo experimento onde o crescimento celular seja acompanhado por um intervalo mais longo deverá ser realizado para que seja possível a visualização da fase platô e da fase de declínio.

Portanto, a observação das fases de crescimento das células é importante para entender o ciclo celular da linhagem utilizada para os experimentos, assim como para definir o tempo de cultivo para a utilização da célula como modelo de estudo.

5.2.3 Ensaio de formação de derme

Para o ensaio de formação de derme foi realizada uma curva de crescimento das células na presença do substrato, ou seja, a MPSC de colágeno. Os dados da absorbância das médias e desvios padrão de MTT estão mostrados na figura 27, para observar se o comportamento em cultura tridimensional seria parecido com o crescimento em monocamada. Assim, o comportamento celular 3D foi observado pela viabilidade celular obtida pelo ensaio de MTT.

O crescimento tridimensional apresentou um comportamento parecido com o crescimento em 2D (figura 26), quando os valores são comparados ao controle (24 h), os resultados, exceto 48 h, diferem estatisticamente (teste t de Student, $p < 0,05$), indicando o crescimento celular na MPSC. Na cultura em monocamada a fase lag foi de 24 h, já na cultura 3D a fase lag durou 48 h (24 h e 48 h foram considerados estatisticamente iguais; teste t de Student, $p < 0,05$), indicando que as células demoraram mais tempo para se adaptar ao substrato, que pode estar relacionado à migração das células permeando a esponja. O aumento da proliferação iniciou-se em 48 h, já o máximo do crescimento 3D foi em 96 h. Este tempo de crescimento em cultura 3D quando comparado ao crescimento em monocamada (figura 26) é menor, uma redução de quatro dias, sugerindo que o colágeno acentuou a proliferação celular como descrito por Bott et al. (2010). Desse modo, a redução de quatro dias observados quando cultivadas células sobre a matriz de colágeno 96 h 1,1% é favorável para a utilização da esponja de colágeno como MPSC para a formação de derme (equivalente) *in vitro*, uma vez que o protocolo poderá ser obtido em um menor tempo de execução.

Não foi observado aumento da concentração de células na MPSC, uma vez que a absorbância em monocamada foi superior ao observado em 3D. Assim, novos experimentos serão realizados para confirmar se o método de avaliação da viabilidade celular (MTT) está sendo eficaz para solubilizar os cristais dentro da esponja de colágeno.

Figura 27. Curva de crescimento tridimensional da linhagem celular Vero cultivada na MPSC de colágeno, onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).

5.2.4 Fotobiomodulação celular

Como discutido, os dados sugerem que o colágeno reduz o tempo de proliferação celular. Assim, também foi avaliado o efeito da luz na diminuição do tempo de proliferação celular (LINS et al., 2010), na tentativa de obter uma formação de derme em menor tempo, para estabelecimento de um protocolo para testes de eficácia em produtos cosméticos e farmacêuticos.

De acordo com Souto et al. (2006) a formação de derme ocorre em sete dias. Para que a célula possa se diferenciar é necessário um estímulo extracelular, como o contato com outras células. Se a célula em 120 h atingiu seu máximo de crescimento (como mostrado na curva de crescimento 3D – figura 27), as células cultivadas estão em sua completa interação com as células vizinhas, permitindo-se diferenciar. Isto posto, se houver a diminuição do tempo para o momento máximo da proliferação, a diferenciação ocorrerá em

um intervalo menor e a obtenção da derme será mais rápida, tornando eficiente o protocolo de obtenção desta.

Visando-se uma proliferação celular mais rápida pela estimulação com luz, o crescimento em monocamada foi repetido com a estimulação da célula com LED no comprimento de 630 nm, 30 J cm^{-2} (vide item 4.3.6). Para o grupo sem irradiação as amostras em monocamada foram analisadas por ensaio colorimétrico de MTT a cada 24 h. Já, o grupo submetido à luz foi irradiado a cada 24 h durante sete dias e para a observação da resposta à luz, os resultados por MTT foram obtidos 24 h após a irradiação. Assim, como exemplo do modo de avaliação das amostras irradiadas, a amostra 24 h indicada no gráfico refere-se a uma irradiação em 0 h e leitura da absorbância das amostras por MTT realizada 24 h depois; (24 h = irr 0 h + MTT 24 h).

A figura 28 mostra o resumo das médias e desvios padrão obtidas no ensaio de MTT para o controle de células sem irradiação (L-) e após serem submetidas à irradiação (L+) no crescimento em monocamada. Quando os grupos são comparados entre os dias de experimento, todos os valores diferem estatisticamente dos seus pares (teste t de Student, $p < 0,05$).

Observa-se que houve um efeito modulatório da luz no comprimento de 630 nm, 30 J cm^{-2} , pela diferença entre a absorbância entre os grupos analisados, onde o grupo das amostras submetidas à irradiação apresenta absorbância superior ao grupo das amostras não submetidas à irradiação, exceto para 192 h. Essa diminuição da absorbância da amostra irradiada em 192 h pode significar que a cultura começa, a partir desse ponto, a fase de declínio. Como mostra a figura 28, no intervalo 96 h ao 192 h não houve alteração da atividade celular indicando uma fase estacionária, onde o número de células vivas é igual ao de células mortas.

Figura 28. Crescimento em monocamada da linhagem celular Vero após irradiação com luz em 630 nm (30 J cm^{-2}).

Confirmado o efeito modulatório da atividade celular em monocamada com irradiação no comprimento de 630 nm foi possível realizar o ensaio de fotobiomodulação celular em cultura tridimensional que foi realizada do mesmo modo que na cultura em monocamada. As amostras do grupo sem irradiação foram analisadas por MTT a cada 24 h e, as submetidas à luz a cada 24 h durante sete dias. Para a observação da resposta à luz, os resultados por MTT foram obtidos 24 h após a irradiação. Assim, como exemplo do modo de avaliação das amostras irradiadas, a amostra 24 h indicada no gráfico refere-se a uma irradiação em 0 h e leitura da absorbância das amostras por MTT realizada 24 h depois; (24 h = irr 0 h + MTT 24 h).

Os resultados na figura 29 mostram o resumo das médias e desvios padrão obtido no ensaio de MTT para o controle de células sem irradiação (L-) e após serem submetidas à irradiação (L+) no crescimento tridimensional.

Figura 29. Crescimento tridimensional da linhagem celular Vero após irradiação com a luz em 630 nm (30 J cm^{-2}), onde * representa valores estatisticamente iguais (teste t de Student, $p < 0,05$).

Verifica-se uma proliferação celular em cultura 3D (figura 29) para os grupos controle (escuro) e irradiado. Esta observação, evidencia que a esponja de colágeno é eficiente como matriz polimérica de suporte de celular. Ainda, constatou-se uma resposta à fotoestimulação em 630 nm na cultura 3D verificada pelo aumento da média da absorbância das amostras em 24 h e em 72 h para o grupo irradiado em relação ao grupo não irradiado. Essa resposta positiva à irradiação, sugere que existe uma relação entre o início da fase de crescimento celular e o estímulo causado pela irradiação neste período. Segundo Freshney (2010), o crescimento celular inicia-se próximo a 48 h e os resultados expressos em 72 h para os grupos irradiados resultam de uma irradiação feita em 48 h e analisada por MTT 24 h depois. Já, a menor absorbância das amostras irradiadas observada a partir do intervalo de 96 h pode estar associada à entrada da fase estacionária, observada no padrão da curva de crescimento tridimensional no escuro (figura 27) mencionada no item 5.2.3.

Uma vez que os valores da absorbância para a cultura 3D são menores que os observados em cultura 2D, torna-se necessário repetir o experimento utilizando um outro método de avaliação da viabilidade celular, como a citometria de fluxo por exemplo, visto que este método já é utilizado para determinação da viabilidade celular em materiais à base de colágeno como suporte de crescimento celular em engenharia de tecidos (FONG et al., 2013; KIEVIT et al., 2014).

5.2.5 Microscopia Confocal

A microscopia confocal de fluorescência foi realizada para observar a diferença entre a esponja *in natura* e a esponja povoada por células a partir da observação de um aumento da densidade da matriz extracelular.

A figura 30 mostra a porção superficial X-Y (com dimensionamento 1,351 μm , para ambas as porções) da esponja de colágeno 96 h *in natura*, onde a fluorescência do colágeno é apresentada em cor verde. Na imagem é possível observar a distribuição heterogênea dos poros da esponja de colágeno, como já observado por MEV-S (figura 21), as fibras de colágeno (verde) e espaços vazios (preto) caracterizando os poros vazios da estrutura, uma vez que a esponja de colágeno não estava populada por células.

Na figura 31 está apresentada a fluorescência da esponja de colágeno 96h povoada com células da linhagem Vero após sete dias de cultivo (porção X-Y com dimensionamento 0,675 μm , para ambas as porções). É possível observar as diferenças entre a esponja *in natura* (figura 30) e a esponja povoada com células (figura 31) pelo aumento da espessura das fibras de colágeno na esponja povoada por células.

A partir da observação do aumento da densidade da matriz de colágeno é possível afirmar que a MPSC promoveu a diferenciação celular, caracterizada pelo aumento de substâncias secretadas pelas células aderidas, formando uma matriz extracelular, corroborando com a literatura (FITZPATRICK; MCDEVITT, 2015).

Figura 30. Fotomicrografia da porção superficial da esponja de colágeno 96 h *in natura*. Aumento de 20X.

Figura 31.
fluorescência da
célula da linhagem
cultivo não submetida
de 20X.

Fotomicrografia da
esponja povoada com
Vero após sete dias de
à irradiação. Aumento

A fim de
tratamento de
das células pela
luz (630 nm) pela
aumento da

avaliar o
fotobiomodulação
estimulação com
observação do
proliferação de

células na esponja de colágeno, como discutido no item 5.2.4, a fluorescência da esponja povoada com células da linhagem Vero após sete dias de cultivo

não submetida à irradiação foi comparada à a fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após sete dias de cultivo submetida à irradiação. Na figura 32 está apresentada da fluorescência da esponja de colágeno 96 h povoada com célula da linhagem Vero após sete dias de cultivo submetida à irradiação em 630 nm (porção X-Y com dimensionamento 0,675 μm , para ambas as porções). Observa-se o aumento da espessura das fibras de colágeno na esponja povoada por células submetida à irradiação em 630 nm, além da visualização do aumento de deposição de matriz extracelular pelas células presentes na esponja. Quando comparadas, a figura 32 apresenta uma maior quantidade de matriz extracelular depositada na esponja de colágeno do que o observado na figura 31, indicando que houve fotobiomodulação da atividade celular induzida pelo LED 630 nm (30 J cm^{-2}), estimulando a proliferação e diferenciação celular.

Figura 32. Fotomicrografia da fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após sete dias de cultivo submetida à irradiação 630 nm (30 J cm^{-2}). Aumento de 20X.

Assim, para evidenciar a presença de células na esponja de colágeno 96 h, foram utilizados corantes para marcar as células cultivadas sob a MPSC. A membrana plasmática da célula tem permeabilidade pelo corante corante laranja de acridina (LA), que marca o DNA celular apresentando fluorescência na cor verde, assim esta observação indica que a célula está viva. O corante brometo de etídio (BE) só consegue ser assimilado pela célula quando a

membrana plasmática está danificada. Portanto, se a célula perde a integridade da membrana, o corante BE liga-se ao DNA celular apresentando fluorescência na cor laranja-avermelhado, indicando o processo de morte celular (MARQUARDT et al., 2015).

Na figura 33 está apresentada a fluorescência da esponja de colágeno 96 h povoada com célula da linhagem Vero após seis dias de cultivo submetida à irradiação em 630 nm. A figura 33A (porção X-Y com dimensionamento 1,351 μm , para ambas as porções) mostra a matriz de colágeno povoada com células Vero evidenciando o aumento da espessura das fibras de colágeno e a visualização do aumento de deposição de matriz extracelular pelas células presentes na esponja de colágeno, assim como mostrado na figura 32. Da mesma forma, na figura 33D (porção X-Y com dimensionamento 0,664 μm , para ambas as porções) é possível observar a deposição de matriz extracelular na esponja de colágeno, além da visualização de células Vero aderidas à fibra de colágeno. Esta imagem (figura 33D) é uma sobreposição de imagens obtidas das células coradas com BE e LA, já que a emissão foi coletada em duas regiões espectrais distintas (vide item 4.3.7). Por isso, as células coradas com LA apresentam-se na cor verde (figura 33B), indicando células vivas. Já as células mortas apresentam-se na cor vermelha (figura 33C), características da ruptura da membrana celular, pela fluorescência da amostra na região espectral do corante BE.

Figura 33. Fotomicrografia da fluorescência da esponja povoada com célula da linhagem Vero após seis dias de cultivo submetida à irradiação em 630 nm. A) Esponja sem corante celular, B) canal verde para observação da fluorescência do corante LA, C) canal vermelho para observação da fluorescência do corante BE e D) sobreposição dos canais verde e vermelho para a observação e células aderidas no colágeno. A escala representa 100µm. Aumento de

20X.

Segundo Viana et al. (2013) a MPSC fornece um apoio biomecânico para a diferenciação celular, a difusão de nutrientes, o oxigênio e o estabelecimento de um ambiente adequado para que as células secretem suas próprias matrizes extracelulares de uma forma organizada. Consequentemente, as células plaqueadas sobre a esponja de colágeno se proliferam, crescem e migram (NYGA; CHEEMA; LOIZIDOU, 2011), permeando por entre os poros da estrutura, preenchendo todos os espaços vazios. Com o aumento do contato célula-célula ocorre a diferenciação celular, promovendo a formação do novo tecido (LEE et al., 2009).

A representação da morfologia 3D de um tecido (equivalente) *in vitro* está mostrada na figura 34. Observa-se uma diferença na quantidade da matriz extracelular depositada após sete dias de cultivo de células Vero sobre a esponja de colágeno de serosa porcina utilizada como MPSC (figuras 34B e 34C), em relação à esponja *in natura* (figura 34A). Pode ser observado ainda que a esponja submetida à irradiação 630 nm (figura 34C) apresentou uma densidade de matriz extracelular depositada maior que a esponja não submetida à irradiação (figura 34B).

Figura 34. Fotomicrografia 3D da morfologia da esponja de colágeno 96 h. A) esponja *in natura*; B) esponja após sete dias de cultivo com células Vero não submetidas à irradiação; C) esponja após sete dias de cultivo com células Vero submetidas à irradiação 630 nm (30 J cm^{-2}). Aumento de 20X.

Portanto, as imagens obtidas por microscopia confocal comprovaram que a esponja de colágeno de serosa porcina tratada por 96 h e na concentração 1,1% que foi selecionada como suporte para a formação de derme reconstituída foi eficiente, uma vez que promoveu a adesão celular e um ambiente propício para a diferenciação celular.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram estudadas as características estruturais de uma esponja de colágeno de serosa porcina 1,1% com tempo de tratamento por hidrólise alcalina de 96 h e temperatura de desnaturação de 46,3 °C, para utilização como matriz polimérica de suporte celular em cultura tridimensional. A esponja avaliada exibiu uma alta porosidade (95%), poros interconectados com distância média entre os canais de $78 \pm 14 \mu\text{m}$ e poros médios de $44 \mu\text{m}$. Estas características são importantes para a utilização do biomaterial em engenharia de tecidos, visto a necessidade de um espaço disponível para a geração da matriz extracelular, migração celular e difusão de fluidos. A difusão de fluidos na esponja de colágeno foi avaliada através de um ensaio de absorção com máximo de 95% para água e para meio de cultura, em um tempo inferior a 5 min. Esse biomaterial mostrou-se biocompatível com a linhagem celular Vero utilizada nos ensaios celulares, já que durante 168 h a viabilidade média foi de $103\% \pm 11\%$. O método de esterilização com luz ultravioleta não se mostrou eficiente para prevenir contaminação por bactéria. Deste modo, optou-se por esterilizar o biomaterial com óxido de etileno.

A microscopia confocal permitiu observar uma deposição de matriz extracelular preenchendo toda a estrutura da esponja de colágeno caracterizando a utilização do biomaterial como eficiente, pois promoveu a adesão celular e um ambiente propício para a diferenciação de células da linhagem Vero em cultivo de sete dias. A esponja plaqueada com células apresentou um aumento da espessura das fibras de colágeno da esponja, relativas à deposição de matriz extracelular em relação à esponja *in natura*. Além disso, o tempo de crescimento em cultura 3D quando comparado ao crescimento em monocamada é menor, uma redução de quatro dias, sugerindo que o colágeno acentuou a proliferação celular. Por outro lado, as células demoraram mais tempo para se adaptar ao substrato em cultura 3D (intervalo de 48 h) que pode estar relacionado à migração das células dentro da esponja, diferente do verificado na fase lag de 24 h observada em cultura 2D.

A fotobiomodulação da atividade celular induzida pelo LED 630 nm estimulou a proliferação e diferenciação celular, observada pelo aumento da

espessura das fibras de colágeno e da matriz extracelular depositada na esponja de colágeno irradiada, comparada a esponja de colágeno não submetida à irradiação. Além disso, foi observada uma absorbância superior na amostra tratada com luz quando comparada ao controle no escuro na dose empregada para cultura de células da linhagem VERO. Verificou-se ainda, uma diferença nos valores das absorbâncias na cultura tridimensional em relação a cultura em monocamada, que pode estar associada à dificuldade de solubilização do MTT dentro da esponja. Portanto, sugere-se novos experimentos utilizando a técnica de citometria de fluxo como avaliação de viabilidade celular.

À vista disso, será necessário avaliar se outras doses de luz podem influenciar positivamente a cultura de células tridimensional em todos os intervalos de tempo para a formação de derme. Além disso, será importante avaliar se a mesma resposta será encontrada quando a esponja for cultivada com fibroblastos humanos.

Os resultados obtidos sugerem, portanto, que a esponja de colágeno utilizada como biomaterial para suporte celular é eficiente para a produção de uma derme reconstituída (equivalente) *in vitro* e que a fotobiomodulação em 630 nm na dose de 30 J cm^{-2} de fato acelera o crescimento celular na matriz.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTERBERG, V.F. et al. The Nano-scale mechanical properties of the extracellular matrix regulate dermal fibroblast function. **Journal of Investigative Dermatology**, v.134, p.1862–1872, 2014. Doi:10.1038/jid.2014.90.
- ADAMSKAYA, N. et al. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. **Injury**, v.42, n.9, p.917-921, 2011. Doi:10.1016/j.injury.2010.03.023.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 6th ed. New York: Garland Science, 2002.
- AMIN, A. et al. Preparation and characterization of chitosan–hydroxyapatite–glycopolymer/Cloisite 30 B nanocomposite for biomedical applications. **Polymer Bulletin**, v.72, n.6, p.1497-1513, 2015. Doi:10.1007/s00289-015-1351-2.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v.32, n.1, p.3–13, 2014. Doi:10.1016/j.clindermatol.2013.05.021.
- ARMENTANO, I. et al. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. **Polymer Degradation and Stability**, v.95, n.11, p.2126-2146, 2010. Doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.06.007.
- BADYLAK, S.F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.13, p.27–53, 2011. Doi:10.1146/annurev-bioeng-071910-124743.
- BADYLAK, S.F. et al. Engineered whole organs and complex tissues. **The Lancet**, v.379, n.9819, p.943–952, 2012. Doi:10.1016/S0140-6736(12)60073-7.
- BAGNATO, V.S. **Uso de LEDs (Light Emitting Diodes) para terapia bioestimuladora**. BR n.PIO200200-0, 23 jan. 2002, 14 out. 2003.
- BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. In: **Seminars in cutaneous medicine and surgery**. Elsevier, v.27, n.4, p.227-238, 2008.
- BARRILA, J. et al. Organotypic 3D cell culture models: using the rotating wall vessel to study host–pathogen interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, n.11, p.791-801, 2010. Doi:10.1038/nrmicro2423.

BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95, n.3, p.945-949, 2009. Doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s10973-007-8897-7>.

BELLATINE, T. et al. Estudo morfofuncional das glândulas mamárias de Mão Pelada, *Procyon cancrivorus*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.8, p.689-695, 2010. Doi:10.1590/S0100-736X2010000800014.

BERNAL, C. **Hipericina, Photodithazine e Photogem: um estudo comparativo da atividade fotodinâmica**. 2011. 155 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011. Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-21062011-094049/en.php>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais-DSC. **Química Nova**, v.25, n.5, p.849-855, 2002. Doi:10.1590/S0100-40422002000500023.

BET, M.R. Colágeno aniônico: **propriedades físico-químicas, estruturais e comportamento biológico**. 2000. 107 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074-1079, 2001. Doi:10.1021/bm0001188.

BOTT, K. et al. The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. **Biomaterials**, v.31, n.32, p.8454-8464, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.046.

BRASIL. Decreto-lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Lex: coletânea de legislação: edição federal**, São Paulo, 1998. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm>. Acesso em: 3 jan. 2015.

BRAZIULIS, E. et al. Modified plastic compression of collagen hydrogels provides an ideal matrix for clinically applicable skin substitutes. **Tissue Engineering Part C: methods**, v.18, n.6, p.464-474, 2012. Doi:10.1089/ten.tec.2011.0561.

BREITKREUTZ, D.; MIRANCEA, N.; NISCHT, R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?. **Histochemistry and Cell Biology**, v.132, n.1, p.1–10, 2009. Doi:10.1007/s00418-009-0586-0.

- BREITKREUTZ, D. et al. Skin basement membrane: the foundation of epidermal integrity-BM functions and diverse roles of bridging molecules nidogen and perlecan. **BioMed Research International**, v.2013, 2013. Doi:10.1155/2013/179784.
- BRINCAT, M.; STUDD, J.W. Menopause: a multi system disease. **Baillieres Clinical Obstetrics Gynaecology**, v.2, n.2, p.289–316, 1988. Doi:10.1016/S0950-3552(88)80006-3.
- BYCZKOWSKA, A.; KUNIKOWSKA, A.; KAŻMIERCZAK, A. Determination of ACC-induced cell-programmed death in roots of *Vicia faba* ssp. minor seedlings by acridine orange and ethidium bromide staining. **Protoplasma**, v.250, n.1, p.121-128, 2013. Doi:10.1007/s00709-012-0383-9.
- CALLEJA-AGIUS, J.; BRINCAT, M.; BORG, M. Skin connective tissue and ageing. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.27, n.5, p.727–740, 2013. Doi:10.1016/j.bpobgyn.2013.06.004.
- CARDOSO, L. et al. Implante de membranas de PLLA/Trietil-Citrato como alternativa no tratamento de feridas cutâneas. **Polímeros**, v.23, n.6, p.798-806, 2013. Doi:10.4322/polimeros.2013.058.
- CEBALLOS, D. et al. Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. **Experimental Neurology**, v.158, n.2, p.290-300, 1999. Doi:10.1006/exnr.1999.7111.
- CHAGAS, F.B.; AGOSTINI, F.M. Considerações sobre a experimentação animal: conhecendo as implicações éticas do uso de animais em pesquisas. **Revista Redbioética / UNESCO**, v.2, n.6, p.35-46, 2012. Disponível em:<http://www.unesco.org.uy/shs/red-bioetica/fileadmin/shs/redbioetica/Revista_6/RevistaBioetica6b-35a46.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2014.
- CHAUDRY, Z.F. et al. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 7, n. 2, p. 40-46, 1997. Doi:10.1590/S0104-14281997000200006.
- CHEVALLAY, B.; HERBAGE, D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v.38, n.2, p.211-218, 2000. Doi:10.1007/BF02344779.
- CHITCHOLTAN, K. et al. Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. **Experimental Cell Research**, v.319, n.1, p.75-87, 2013. Doi:10.1016/j.yexcr.2012.09.012.
- CHUNG, H. et al. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 2, p. 516-533, 2012. Doi:10.1007/s10439-011-0454-7.

CROSS, V.L. et al. Dense type I collagen matrices that support cellular remodeling and microfabrication for studies of tumor angiogenesis and vasculogenesis in vitro. **Biomaterials**, v.31, n.33, p.8596–8607, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.072.

DE FALCO, M.; PISANO, M.M.; DE LUCA, A. Embryology and anatomy of the skin. In: BALDI, A.; PASQUALI, P.; SPUGNINI, E.P. (Ed.). **Skin cancer: a practical approach**. Berlin: Humana Press, 2014. p.1-15. (Current Clinical Pathology). Doi:10.1007/978-1-4614-7357-2_1.

DOYLE, A.D. et al. Dimensions in cell migration. **Current opinion in cell biology**, v.25, n.5, p.642-649, 2013. Doi:10.1016/j.ceb.2013.06.004.

DRISKELL, R.R. et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, v.504, n.7479, p.277–281, 2013. Doi:10.1038/nature12783.

DUAN, G. et al. Ultralight, soft polymer sponges by self-assembly of short electrospun fibers in colloidal dispersions. **Advanced Functional Materials**, v.25, n.19, p.2850-2856, 2015. Doi:10.1002/adfm.201500001.

DUTTA, R.C.; DUTTA, A.K. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. **Biotechnology Advances**, v.27, n.4, p.334–339, 2009. Doi:10.1016/j.biotechadv.2009.02.002.

DVIR, T. et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. **Nature Nanotechnology**, v.6, n.1, p.13-22, 2011. Doi:10.1038/nnano.2010.246.

EHRMAN, R.L.; GEY, G.O. The Growth of cells on a transparent gel of reconstituted rat tail collagen. **Journal of the National Cancer Institute**, v.16, n.6, p.1375–1403, 1956. Doi:10.1093/jnci/16.6.1375.

ESCHENHAGEN, T. et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. **The FASEB Journal**, v.11, n.8, p.683-694, 1997. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/content/11/8/683.long>>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

FERREIRA, A.M. et al. Collagen for bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, v.8, n.9, p.3191-3200, 2012. Doi:10.1016/j.actbio.2012.06.014.

FITZPATRICK, L.E.; MCDEVITT, T.C. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. **Biomaterials Science**, v.3, n.1, p.12-24, 2015. Doi:10.1039/C4BM00246F.

FONG, E.L.S. et al. Modeling Ewing sarcoma tumors in vitro with 3D scaffolds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6500-6505, 2013. Doi:10.1073/pnas.1221403110.

FOOK, A.C.B.M.; APARECIDA, A.H.; FOOK, M.V.L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para regeneração óssea. **Revista Matéria**, v.15, n.3, p.392-399, 2010. Disponível em: <<http://www.materia.coppe.ufrj.br/sarra/artigos/artigo11110/>>. Acesso em: 6 set. 2014.

FRANÇA, R. et al. The Effect of ethylene oxide sterilization on the surface chemistry and in vitro cytotoxicity of several kinds of chitosan. **Journal of Biomedical Materials Research B: applied biomaterials**, v.101, n.8, p.1444-1455, 2013. Doi:10.1002/jbmb.32964.

FRARE, J.C.; NICOLAU, R.A. Análise clínica do efeito da fotobiomodulação laser (GaAs–904 nm) sobre a disfunção temporomandibular. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.12, n.1, p.37-42, 2008. Doi:10.1590/S1413-35552008000100008.

FREITAS, R.P.A. et al. Laserterapia e microcorrente na cicatrização de queimadura em ratos. Terapias associadas ou isoladas?. **Fisioterapia e Pesquisa**, v.20, n.1, p.24-30, 2013. Doi:10.1590/S1809-29502013000100005.

FRESHNEY, R.I. Defined media and supplements. In: _____. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6thed. New Jersey: John Wiley, 2010. p.99-114.

FU, L.; ZHANG, J.; YANG, G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. **Carbohydrate polymers**, v.92, n.2, p.1432-1442, 2013. Doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.071.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, v.445, n.7130, p.834–842, 2007. Doi:10.1038/nature05659.

GÁL, P. et al. Effect of equal daily doses achieved by different power densities of low-level laser therapy at 635 nm on open skin wound healing in normal and corticosteroid-treated rats. **Lasers in Medical Science**, v.24, n.4, p.539-547, 2009. Doi:10.1007/s10103-008-0604-9.

GASSER, T.C. et al. Spatial orientation of collagen fibers in the abdominal aortic aneurysm's wall and its relation to wall mechanics. **Acta Biomaterialia**, v.8, n.8, p.3091-3103, 2012. Doi:10.1016/j.actbio.2012.04.044.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, n.12, p.1531-1546, 2003. Doi:10.1016/j.addr.2003.08.002.

GOES, J.C. et al. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. **Acta Biomaterialia**, v.3, n.5, p.773-778, 2007. Doi:10.1016/j.actbio.2007.02.008.

GONÇALVES, J.L.D. **Caracterização físico-química e fotodinâmica de fotossensibilizadores:** efeito da modificação química para aumentar a solubilidade em meio aquoso. 2015. 131 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

GONÇALVES, R.V. et al. Influência do laser arseneto de gálio-alumínio em feridas cutâneas de ratos. **Fisioterapia em Movimento**, v.23, n.3, p.381-388, 2010. Doi:10.1590/S0103-51502010000300005.

GROEBER, F. et al. Skin tissue engineering — *In vivo* and *in vitro* applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, n.4-5, p.352–366, 2011. Doi:10.1016/j.addr.2011.01.005.

HIRATA, H.H. et al. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. **Injury**, v.46, n.7, p.1215-1222, 2015. Doi:10.1016/j.injury.2015.03.039.

HOFMANN, S. et al. Effect of sterilization on structural and material properties of 3-D silk fibroin scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.1, p.308-317, 2014. Doi:10.1016/j.actbio.2013.08.035.

HOHENESTER, E.; YURCHENCO, P.D. Laminins in basement membrane assembly. **Cell Adhesion & Migration**, v.7, n.1, p.56-63, 2013. Doi:10.4161/cam.21831.

HORN, M.M. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico.** 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75132/tde-18042008-164504/en.php>>. Acesso em: 16 jun. 2015.

HORN, M.M. et al. Uso de curvas termogravimétricas para a determinação do teor de mineralização em hidrogéis. **Brazilian Journal of Thermal Analysis**, v.2, n.1, p.50–54, 2013. Doi:10.1234/bjta.v2i1.12.

HOYER, B. et al. Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.2, p.883–892, 2014. Doi:10.1016/j.actbio.2013.10.022.

HYMAVATHY, V. et al. Helicobacter pylori eradication and probiotics critical application of knowledge for the development of a clinical problem solution. **International Journal of Contemporary Microbiology**, v.1, n.1, p.78-81, 2015. Doi:10.5958/2395-1796.2015.00018.6.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5:** biological evaluation of medical devices - part 5: tests for in vitro cytotoxicity. Genebra, 2009.

IVANOVA, I.A.; D'SOUZA, S.J.; DAGNINO, L. Signalling in the epidermis: the E2F cell cycle regulatory pathway in epidermal morphogenesis, regeneration and transformation. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, n.2, p.87-95, 2005. Doi:10.7150/ijbs.1.87.

JÄCKH, C. et al. Relevance of xenobiotic enzymes in human skin in vitro models to activate pro-sensitizers. **Journal of Immunotoxicology**, v.9, n.4, p.426-438, 2012. Doi:10.3109/1547691X.2012.664578.

JAYAKUMAR, R. et al. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - a short review. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.2, p.227–232, 2010. Doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.074.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALIL, C. **Laser e outras fontes de luz em dermatologia**. São Paulo: Elsevier Brasil, 2011.

KAMITA, M. et al. α -Acetylation of yeast ribosomal proteins and its effect on protein synthesis. **Journal of proteomics**, v.74, n.4, p.431-441, 2011. Doi:10.1016/j.jprot.2010.12.007.

KATİYAR, S.K. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.508, n.2, p.152–158, 2011. Doi:10.1016/j.abb.2010.11.015.

KIEVIT, F.M. et al. Proliferation and enrichment of CD133+ glioblastoma cancer stem cells on 3D chitosan-alginate scaffolds. **Biomaterials**, v. 35, n. 33, p. 9137-9143, 2014. Doi:10.1016/j.biomaterials.2014.07.037.

KILKENNY, C. et al. Animal research: reporting in vivo experiments - the ARRIVE guidelines. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.31, n.4, p.991–993, 2010. Doi:10.1038/jcbfm.2010.220.

KIM, C. et al. 3-Dimensional cell culture for on-chip differentiation of stem cells in embryoid body. **Lab on a Chip**, v.11, n.5, p.874-882, 2011. Doi:10.1039/C0LC00516A.

KIM, H.N. et al. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.4, p.536–558, 2013. Doi:10.1016/j.addr.2012.07.014.

KIM, M.S. et al. Polycaprolactone-chitin nanofibrous mats as potential scaffolds for tissue engineering. **Journal of Nanomaterials**, v.2012, p.10, 2012. Doi:10.1155/2012/635212.

KIM, S.H. et al. Antibacterial activity of silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.39, n.1, p.77-85, 2011. Disponível em: <http://gim.kormb.or.kr/storage/journal/KJMB/39_1/8743/articlefile/article.pdf>. Acesso em: 20 Mar. 2015.

KRISHNA, S.; MILLER, L.S. Host–pathogen interactions between the skin and *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v.15, n.1, p.28–35, 2012. Doi:10.1016/j.mib.2011.11.003.

KRISHNAN, R. et al. Polysaccharide nanofibrous scaffolds as a model for in vitro skin tissue regeneration. **Journal of Material Science: material medicine**, v.23, n.6, p.1511-1519, 2012. Doi:10.1007/s10856-012-4630-6.

KUPPAN, P. et al. Development of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) fibers for skin tissue engineering: effects of topography, mechanical, and chemical stimuli. **Biomacromolecules**, v.12, n.9, p.3156-3165, 2011. Doi:10.1021/bm200618w.

LACERDA, C.; PLEPIS, A.M.G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v.2, n.3, p.267-271, 1998. Doi:10.1590/S0100-40421998000300006.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920–926, 1993. Doi:10.1126/science.8493529.

LEE, W. et al. Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. **Biomaterials**, v.30, n.8, p.1587–1595, 2009. Doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.009.

LINS, R.D. et al. Efeitos bioestimulantes do laser de baixa potência no processo de reparo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.6, p.849-855, 2010. Doi:10.1590/S0365-05962010000600011.

LIU, T.C.Y. et al. Photobiomodulation on stress. **International Journal of Photoenergy**, v.2012, ID 628649, 2012. Doi:10.1155/2012/628649.

LOCILENTO, D.A. **Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LU, P.; WEAVER, V.M.; WERB, Z. The Extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. **The Journal of Cell Biology**, v.196 n.4, p.395–406, 2012. Doi:10.1083/jcb.201102147.

MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. **Nature**, v.445, n.7130, p.874-880, 2007. Doi:10.1038/nature05664.

MANOEL, C.A.; PAOLILLO, F.R.; MENEZES, P.F.C. **Conceitos fundamentais e práticos da fotoestética**. São Carlos: Compacta, 2014.

MARQUARDT, J.U. et al. Curcumin effectively inhibits oncogenic NF- κ B signaling and restrains stemness features in liver cancer. **Journal of Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 661-669, 2015. Doi:10.1016/j.jhep.2015.04.018.

MCCLURE, M.J. et al. A Three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study. **Acta Biomaterialia**, v.6, n.7, p.2422–2433, 2010. Doi:10.1016/j.actbio.2009.12.029.

MCDUGALL, S. et al. Fibroblast migration and collagen deposition during dermal wound healing: mathematical modelling and clinical implications. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: mathematical, physical and engineering sciences**, v.364, n.1843, p.1385-1405, 2006. Doi:10.1098/rsta.2006.1773.

MEGHEZI, S.; CHEVALLIER, P.; MANTOVANI, D. Why Mechanical properties of collagen scaffolds should be tested in a pseudo-physiological environment?. **Advanced Materials Research**, v.409, p.158-163, 2012. Doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.409.158.

MELCHELS, F.P.; FEIJEN, J.; GRIJPMAN, D.W. A Review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. **Biomaterials**, v.31, n.24, p.6121-6130, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.050.

MICHA, D.N. et al. "Vendo o invisível". Experimentos de visualização do infravermelho feitos com materiais simples e de baixo custo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.33, n.1, p.1501-1506, 2011. Disponível em:<<http://www.sbfisica.org.br/rbef/pdf/331501.pdf>>. Acessado em: 21 jan. 2015.

MIKESH, L.M. et al. Proteomic anatomy of human skin. **Journal of Proteomics**, v.84, p.190–200, 2013. Doi:10.1016/j.jprot.2013.03.019.

MISRA, R.D.K. et al. Hybrid nanoscale architecture for enhancement of antimicrobial activity: immobilization of silver nanoparticles on thiol-functionalized polymer crystallized on carbon nanotubes. **Advanced Engineering Materials**, v.14, n.4, p.B93-B100, 2012. Doi:10.1002/adem.201180081.

MOUW, J.K.; OU, G.; WEAVER, V.M. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.15, n.12, p.771-785, 2014. Doi:10.1038/nrm3902.

MULI, K.A. et al. Photobiomodulation induced by 670 nm light ameliorates MOG35-55 induced EAE in female C57BL/6 mice: a role for remediation of nitrosative stress. **PloS One**, v.8, n.6, p.e67358, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0067358.

MURPHY, C.M.; HAUGH, M.G.; O'BRIEN, F.J. The Effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.31, n.3, p.461-466, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.

NEMOTO, T. et al. Viscoelastic properties of the human dermis and other connective tissues and its relevance to tissue aging and aging–related disease. In: DE VICENTE, J. (Ed.). **Viscoelasticity - from theory to biological applications**. [S.l.:s.n.], 2012. Doi:10.5772/50146.

NIMERI, G. et al. The Effect of photobiomodulation on root resorption during orthodontic treatment. **Clinical, cosmetic and investigational dentistry**, v.6, p.1, 2014. Doi:10.2147/CCIDE.S49489.

NOVOSEL, E.C.; KLEINHANS, C.; KLUGER, P.J. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Review**, v.63, v.4-5, p.300-311, 2011. Doi:10.1016/j.addr.2011.03.004.

NYGA, A.; CHEEMA, U.; LOIZIDOU, M. 3D tumour models: novel in vitro approaches to cancer studies. **Journal of Cell Communication and Signaling**, v.5, n.3, p.239–248, 2011. Doi:10.1007/s12079-011-0132-4.

OLIVEIRA, G.K. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.72-79, 2010. Doi:10.1590/S0102-09352010000100010.

OLIVEIRA, K.T. et al. Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.1, 2015. Doi:10.5935/1984-6835.20150016.

OLIVEIRA, L.S.A.F. et al. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.9, n.1, p.37-44, 2010. Disponível em:<<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4730/3503>>. Acesso em: 23 dez. 2014.

OVAERE, P. et al. The Emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. **Trends in Biochemical Sciences**, v.34, n.9, p.453-463, 2009. Doi:10.1016/j.tibs.2009.08.001.

OWEN, S.C.; SHOICHET, M.S. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research – part A**, v.94, n.4, p.1321-1331, 2010. Doi:10.1002/jbm.a.32834.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v.3, n.3, p.1863-1887, 2010. Doi:10.3390/ma3031863.

PATLOLLA, A.; KNIGHTEN, B.; TCHOUNWOU, P. Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells. **Ethnicity & Disease**, v.20, n.1, s.1, p.65–72, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2902968/>>. Acesso em: 7 Dec. 2014.

PEDROSO, M.G.V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com adição de PVA**. 2009. 71p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PEPPIN, J.F. et al. Skin matters: a review of topical treatments for chronic pain. Part one: skin physiology and delivery systems. **Pain and Therapy**, v.4, n.1, p.1-16, 2015. Doi:10.1007/s40122-015-0031-0.

PETERSEN, T.H. et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. **Science**, v.329, n.5991, p.538-541, 2010. Doi:10.1126/science.1189345.

PRZEKORA, A. et al. Do Novel cement-type biomaterials reveal reactivity that affects cell viability in vitro?. **Central European Journal of Biology**, v.9, n.3, p.277-289, 2014. Doi:10.2478/s11535-013-0261-2.

QUAN, T. et al. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, n.3, p.658-667, 2013. Doi:10.1038/jid.2012.364.

RAHAMAN, M.N. et al. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.7, n.6, p.2355–2373, 2011. Doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.

RAINER, A. et al. Comparative study of different techniques for the sterilization of poly-L-lactide electrospun microfibers: effectiveness vs. material degradation. **International Journal of Artificial Organs**, v.33, n.2, p.76-85, 2010.

RAMIER, J. et al. Biocomposite scaffolds based on electrospun poly (3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering: C**, v.38, p.161-169, 2014. Doi:10.1016/j.msec.2014.01.046.

RAVICHANDRAN, R. et al. Composite poly-L-lactic acid/poly-(α,β)-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v.32, n.6, p.1443–1451, 2012. Doi:10.1016/j.msec.2012.04.024.

REILLY, G.C.; ENGLER, A.J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of Biomechanics**, v.43, n.1, p.55–62, 2010. Doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.009.

REIS, L.A. et al. A Peptide-modified chitosan–collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery. **Acta Biomaterialia**, v.8, n.3, p.1022-1036, 2012. Doi:10.1016/j.actbio.2011.11.030.

RICH, H. et al. Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils. **Journal of Materials Science: materials in medicine**, v.25, n.1, p.11–21, 2014. Doi:10.1007/s10856-013-5038-7.

RODRIGUES, F.T. **Desenvolvimento de membranas acelulares de colágeno derivadas de pericárdio porcino para o uso em engenharia de tecido**. 2011. 96 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

ROSSETTI, D. et al. A Novel anti-ageing mechanism for retinol: induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation. **International Journal of Cosmetic Science**, v.33, n.1, p.62–69, 2011. Doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00588.x.

SAHOO, S. et al. Growth factor delivery through electrospun nanofibers in scaffolds for tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.93, n.4, p.1539–1550, 2010. Doi:10.1002/jbm.a.32645.

SAMPAIO, S.C.P.O. et al. Effect of laser and LED phototherapies on the healing of cutaneous wound on healthy and iron-deficient Wistar rats and their impact on fibroblastic activity during wound healing. **Lasers in Medical Science**, v.28, n.3, p.799-806, 2013. Doi:10.1007/s10103-012-1161-9.

SANTANA-BLANK, L. et al. Laser photobiomodulation as a potential multi-target anticancer therapy-review. **Journal of Solid Tumors**, v.3, n.2, p.p50, 2013. DOI:10.5430/jst.v3n2p50.

SANTOS, A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 4, p. 308, 2007. Doi.:10.1590/S0104-14282007000400010.

SANTOS, E. et al. Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.6, p.331-341, 2012. Doi:10.1016/j.tibtech.2012.03.005.

SANTOS, M.C.M.; GOMES FILHO, F.C.; NICOLAU, R.A. Efeitos terapêuticos do diodo emissor de luz - LED em mastites lactacionais. **Revista Univap**, v.18, n.32, p.42-51, 2012. Disponível em:<<http://revista.univap.br/index.php/revistaunivap/article/view/75/105>>. Acesso em: 2 out. 2014.

SAWHNEY, M.K.; HAMBLIN, M.R. Low-level light therapy (LLLT) for cosmetics and dermatology. In: MECHANICS FOR LOW-LIGHT THERAPY, 9., 2014. **Proceedings...** [S.l.:s.n.], 2014. (SPIE 8932). Doi:10.1117/12.2041330. SILL, T.J.; VON RECUM, H.A. Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v.29, n.13, p.1989-2006, 2008. Doi:10.1016/j.biomaterials.2008.01.011.

SILVA, E.B. et al. Análises macro e microscópicas de enxertos cutâneos por sementeira após laserterapia de baixa intensidade. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.40, n.1, p.44-48, 2013. Doi:10.1590/S0100-69912013000100008.

SIQUEIRA, R.L.; ZANOTTO, E.D. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. **Química Nova**, v.34, n.7, p.1231-1241, 2011. Doi:10.1590/S0100-40422011000700023.

SOMMAR, P. et al. Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporousgelatinemicrocarriers. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.63, n.6, p.1036–1046, 2010. Doi:10.1016/j.bjps.2009.02.072.

SOUTO, L.R.M. et al. Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **Sao Paulo Medical Journal**, v.124, n.2, p.71-76, 2006. Doi:10.1590/S1516-31802006000200005.

SOUZA, G.R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v.5, p.291–296, 2010. Doi:10.1038/NNANO.2010.23.

SOUZA, R.Q. et al. Citotoxicidade de tubos de PVC esterilizados em óxido de etileno após exposição à radiação gama. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.47, n.2, p.494-499, 2013. Doi:10.1590/S0080-62342013000200031.

SOUZA, R.S.; PINHAL, M.A.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n.1, p.48-54, 2011. Disponível em:<<http://files.bvs.br/upload/S/1983-2451/2011/v36n1/a1924.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

STOCKERT, J.C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v.114, n.8, p.785–796, 2012. Doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006.

SUNDARAMURTHI, D.; KRISHNAN, U.M.; SETHURAMAN, S. Epidermal differentiation of stem cells on poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) nanofibers. **Annals of Biomedical Engineering**, v.42, n.12, p.2589-2599, 2014. Doi:10.1007/s10439-014-1124-3.

TANG, J.; PENG, R.; DING, J. The Regulation of stem cell differentiation by cell-cell contact on micropatterned material surfaces. **Biomaterials**, v.31, n.9, p.2470–2476, 2010. Doi:10.1016/j.biomaterials.2009.12.006.

TUNG, Y.C. et al. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **The Analyst**, v.136, n.3, p.473-478, 2011. Doi:10.1039/C0AN00609B.

UTHSCSA ImageTool version 3.0. Disponível em:<<http://compdent.uthscsa.edu/dig/download.html>>. Acesso em: 10 Dec. 2014.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G.J.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods in Molecular Biology**, v.731, p.237–245, 2011. Doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20.

VARKEY, M.; DING, J.; TREDGET, E.E. Superficial dermal fibroblasts enhance basement membrane and epidermal barrier formation in tissue-engineered skin: implications for treatment of skin basement membrane disorders. **Tissue Engineering Part A**, v.20, n.3-4, p.540-552, 2013. Doi:10.1089/ten.tea.2013.0160.

VASANTHAN, K.S. et al. Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v.30, n.3, p.742-752, 2012. Doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.004.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery**, v.29, n.10, p.471–474, 2011. Doi:10.1016/j.mpsur.2011.06.010.

VIANA, T. et al. Permeability evaluation of lay-down patterns and pore size of PCL scaffolds. **Procedia Engineering**, v.59, p.255–262, 2013. Doi:10.1016/j.proeng.2013.05.119.

VULCANI, V.A.S.; DA GRAÇA MACORIS, D.; DE GUZZI PLEPIS, A.M. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em eqüinos. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1329-1334, 2008. Doi:10.1590/S0103-84782008000500020.

VULCANI, V.A.S. et al. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de eqüinos. **Ciência Rural**, v.43, n.8, 2013. Doi:10.1590/S0103-84782013005000100.

WICKETT, R.R.; VISSCHER, M.O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v.34, n.10, p.98–110, 2006. Doi:10.1016/j.ajic.2006.05.295.

WU, M.H.; HUANG, S.B.; LEE, G.B. Microfluidic cell culture systems for drug research. **Lab on a Chip**, v.10, n.8, p.939-956, 2010. Doi:10.1039/B921695B.

YANNAS, I.V. et al. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization. **Philosophical transactions Serie A: mathematical, physical and engineering sciences**, v.368, n.1917, p.2123-2139, 2014. Doi:10.1098/rsta.2010.0015.

YILDIRIMER, L.; THANH, N.T.K.; SEIFALIAN, A.M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach. **Trends in Biotechnology**, v.30, n.12, p.638-648, 2012. Doi:10.1016/j.tibtech.2012.08.004.

YOUNG, E.W.K.; BEEBE, D.J. Fundamentals of microfluidic cell culture in controlled microenvironments. **Chemical Society Reviews**, v.39, n.3, p.1036-1048, 2010. Doi:10.1039/b909900j.

YURCHENCO, P.D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v.3, n.2, p.a004911, 2011. Doi:10.1101/cshperspect.a004911.

ZERVANTONAKIS, I.K. et al. Microfluidic devices for studying heterotypic cell-cell interactions and tissue specimen cultures under controlled microenvironments. **Biomicrofluidics**, v.5, n.1, p.013406, 2011. Doi:10.1063/1.3553237.

ZHANG, Q. et al. Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. **Acta Biomaterialia**, v.10, n.5, p.2005-2013, 2014. Doi:10.1016/j.actbio.2013.12.042.

ZONARI, A. 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. Doi:10.1016/j.actbio.2015.01.043.