

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA

**APLICAÇÃO DA HIDROXIPROPILMETILCELULOSE
NA SÍNTESE DE BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO
E ENGENHARIA DE TECIDOS E ANÁLISE DE SUA TOXICIDADE
EM CULTURA DE CÉLULAS ADIPOSEO-DERIVADAS HUMANAS**

Autor: **Paulo Pereira de Souza Favalli**

Porto Alegre
2009

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

**APLICAÇÃO DA HIDROXIPROPILMETILCELULOSE NA SÍNTESE DE
BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO E ENGENHARIA DE TECIDOS
E ANÁLISE DE SUA TOXICIDADE EM CULTURA DE CÉLULAS
ADIPOSO-DERIVADAS HUMANAS**

Paulo Pereira de Souza Favalli

(Bolsista do CNPq - Brasil)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Prof. Dr. Jefferson Braga da Silva

Orientador

Porto Alegre
2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

F272a Favalli, Paulo Pereira de Souza

Aplicação da hidroxipropilmetilcelulose na síntese de biomateriais para regeneração e engenharia de tecidos e análise de sua toxicidade em cultura de células adiposo-derivadas humanas / Paulo Pereira de Souza Favalli. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

92 f.: il. graf. tab. Inclui um artigo científico submetido para publicação.

Orientação: Prof. Dr. Jefferson Luís Braga da Silva.

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado

Prof. Dr. Brenno Amaro Dasilveira Neto.

Dissertação (Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. ENGENHARIA DE TECIDOS. 2. HIDROGEL. 3. METILCELULOSE/análogos & derivados. 4. MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS. 5. TESTES IMUNOLÓGICOS DE TOXICIDADE. 6. REGENERAÇÃO TECIDUAL GUIADA. 7. ADIPÓCITOS. 8. SILANOS. 9. PEPTIDEOS. 10. HUMANOS. I. Silva, Jefferson Luís Braga da. II. Machado, Denise Cantarelli. III. Dasilveira Neto, Breno Amaro. IV. Título.

C.D.D. 620.11

C.D.U. 611-018.2:57.086.86(043.3)

N.L.M. QT 37

PAULO PEREIRA DE SOUZA FAVALLI

**APLICAÇÃO DA HIDROXIPROPILMETILCELULOSE NA SÍNTESE DE
BIOMATERIAIS PARA REGENERAÇÃO E ENGENHARIA DE TECIDOS
E ANÁLISE DE SUA TOXICIDADE EM CULTURA DE CÉLULAS
ADIPOSO-DERIVADAS HUMANAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pedro Bins Ely

Prof. Dr. Cláudio Corá Mottin

Dr. Marcos Ricardo de Oliveira Jaeger

EQUIPE TÉCNICA

Co-orientadores

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

Centro de Terapia Celular – Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB)

Prof. Dr. Brenno Amaro Dasilveira Neto

Faculdade de Farmácia da PUCRS

Colaboradores

Prof. Dr. André Arigony Souto

Faculdade de Química da PUCRS

Profa. Dra. Mara Lise Zanini

Faculdade de Química da PUCRS

MSc. Christian Viezzer

Técnico de Laboratório – IPB/ Pós-graduando

Jeremiah Mistrello Lubianca

Técnico de Laboratório – IPB

Tiago Giuliani Lopes

Técnico em Histologia – Lab. de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS

Laura de Miranda Pinheiro

Acadêmica da Faculdade de Química da PUCRS/ Bolsista CNPq

Dr. Vinícius Schenke Michaelsen

Farmacêutico/ Doutor em Medicina e Ciências da Saúde pela PUCRS

Rosária Maria Lúcia Prena Geremia

Bibliotecária da Biblioteca da Faculdade de Medicina da PUCRS

Mathias Azevedo Bastian Bressel

Estatístico

AGRADECIMENTOS

À minha família com carinho: minha esposa Sílvia, meu filho Dante, meus pais Paulo e Clotilde e minha irmã Gabriela. Obrigado por todo o apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jefferson Braga Silva, que, além de me oportunizar este mestrado, permitiu-me aperfeiçoar minha formação através de 2 estágios na França, entre os anos de 2004 e 2005 (período de intensas e inesquecíveis vivências).

A todos que compuseram a Equipe Técnica, sem os quais seria impossível a realização deste estudo.

Em dezembro de 1996, ainda como acadêmico da Faculdade de Medicina da PUCRS, realizei estágio de férias no Serviço de Cirurgia Plástica e Microcirurgia do Dr. Roberto Corrêa Chem, na Santa Casa de Porto Alegre. A partir daquele momento tive a certeza de que eu seria feliz atuando na área de Cirurgia Plástica. Presto aqui uma homenagem ao Dr. Chem, a quem também tive como mestre e que nos deixou precocemente.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	3
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 – INTRODUÇÃO	10
2 – REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 CÉLULAS-TRONCO.....	13
2.2 A RELAÇÃO CÉLULA – MATRIZ EXTRACELULAR E A IMPORTÂNCIA DA CULTURA TRIDIMENSIONAL.....	17
2.3 A ENGENHARIA DE TECIDOS.....	21
2.4 BIOMATERIAIS.....	26
2.5 HIDROGÉIS.....	29
2.6 HIDROXIPROPILMETICELULOSE – HPMC.....	32
3 – OBJETIVOS	34
3.1 GERAIS	34
3.2 ESPECÍFICOS	34
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 ASPECTOS BIOÉTICOS	35
4.2 DESENHO DO ESTUDO	35
4.3 CONTEXTO	35
4.4 PROCEDIMENTOS	36
4.4.1 PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS À BASE DE HPMC.....	36
4.4.1.1 <i>Síntese da HPMC silanizada (HPMC-Si)</i>	36
a) <i>Síntese do pó de HPMC-Si</i>	36
b) <i>Preparo da solução de HPMC-Si</i>	36
c) <i>Indução da reticulação do hidrogel de HPMC-Si em função do pH</i>	37
4.4.1.2 <i>Síntese da HPMC contendo peptídeos de adesão R-G-D-S (HPMC-RGDS)</i>	37
a) <i>Síntese do polímero de HPMC-RGDS</i>	37
b) <i>Preparo da solução de HPMC-RGDS</i>	38
4.4.1.3 <i>Preparo da solução de HPMC pura</i>	38

4.4.2 CULTURAS DE CÉLULAS ADERENTES ADIPOSEO-DERIVADAS HUMANAS (CAADh) EM MEIOS CONTENDO OS HIDROGÉIS DE HPMC.....	39
4.4.3 DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS HIDROGÉIS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE TESTE DE VIABILIDADE CELULAR	42
4.5 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	42
5 – RESULTADOS.....	43
5.1- SOBRE A SÍNTESE DA HPMC-Si E SUA RETICULAÇÃO.....	43
5.2- SOBRE A SÍNTESE DA HPMC-RGDS.....	45
5.3- SOBRE A VIABILIDADE DAS CAADh CULTIVADAS EM 2D NA PRESENÇA DOS HIDROGÉIS DE HPMC PURA, HPMC-Si E HPMC-RGDS E A DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DOS MESMOS	45
6 – DISCUSSÃO.....	48
7 – CONCLUSÃO.....	57
8 – REFERÊNCIAS/ FONTES CONSULTADAS.....	58
9 – ANEXOS.....	63
COVER LETTER.....	63
AUTHOR FORMS.....	64
“Plastic and Reconstructive Surgery” SUBMISSION CONFIRMATION.....	66
MANUSCRIPT.....	67
TABLE LEGEND.....	90
FIGURE LEGENDS.....	91
TABLE 1.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	alpha
β	beta
%	por cento
®	marca registrada
μ l	microlitro
2D	bidimensional
3D	tridimensional
3-GPTMS	3-glicidoxipropiltrimetoxisilano
aC	antes de Cristo
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
BCP	<i>biphasic calcium phosphate</i>
CAADh	células aderentes adiposo-derivadas humanas
cols.	colaboradores
CEMM	células estromais mesenquimais multipotentes
cm ²	centímetro quadrado
CN	controle negativo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CP	controle positivo
CT	células-tronco
CTA	células-tronco adultas
CTC	Centro de Terapia Celular
CTE	células-tronco embrionárias
CTM	células-tronco mesenquimais
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
ET	engenharia de tecidos
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>

fmol	fentomol (10^{-15} mol)
g	grama
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPMC	hidroxipropilmetilcelulose
HPMC-RGDS	hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão RGDS
HPMC-Si	hidroxipropilmetilcelulose silanizada
IBS-2	<i>injectable bone substitute-2</i>
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
IQ-UFRGS	Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
l	litro
M	molar
MEC	matriz extracelular
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
MOI	microscopia ótica invertida
mP s	miliPascal segundo (unidade de viscosidade dinâmica)
MTT	ensaio colorimétrico com metiltetrazolio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
nm	nanômetro
O ₂	oxigênio
°C	grau centígrado
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	potencial hidrogeniônico
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RGD	arginina- glicina- ácido aspártico
RGDS	arginina- glicina- ácido aspártico -serina

s	segundo
U	unidade
USA	<i>United States of America</i>
v/v	volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto macroscópico da gelatina (polímero) resultante da síntese de HPMC com peptídeos de adesão R-G-D-S.....	39
Figura 2: Esquema gráfico mostrando a distribuição das culturas em 3 placas de 96 poços. HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMC-Si: hidroxipropilmetilcelulose silanizada; HPMC-RGDS: hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão; CN: controle negativo; CP: controle positivo.....	41
Figura 3: HPMC após sua síntese com silano (HPMC-Si). Verifica-se o aspecto viscoso do hidrogel antes de sua reticulação.....	43
Figura 4: HPMC-Si. Verifica-se o aspecto gelatinoso do hidrogel após sua reticulação em função do pH.....	44
Figura 5: Exemplo da capacidade moldável da HPMC-Si após sua reticulação (orelha).....	44
Figura 6: Exemplo da capacidade moldável da HPMC-Si após sua reticulação (nervo periférico).....	45
Figura 7: Viabilidade das células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh) cultivadas na presença de hidrogéis de HPMC em função do tempo. MTT: ensaio colorimétrico com metiltetrazolio; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMC-Si: hidroxipropilmetilcelulose silanizada; HPMC-RGDS: hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão; CN: controle negativo; CP: controle positivo.	47
Figura 8: Fibroblastos de camundongos (NIH3T3) cultivados em 3D, no interior de hidrogel de HPMC pura a 3% (estudo piloto). Após 5 dias observa-se o conglomerado de células em formato esférico, englobadas pelo gel e sem as expansões citoplasmáticas características da adesão celular. MOI, aumento de 100X.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Viabilidade (% de atividade MTT) das CAADh cultivadas na presença de hidrogéis de HPMC.....	46
--	-----------

RESUMO

A regeneração e engenharia de tecidos passam pela aplicação de células precursoras multipotentes associadas a biomateriais, os quais devem oferecer a elas um ambiente tridimensional análogo à matriz extracelular existente nos organismos vivos. Aprimorar um hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), agregando a ele duas funções características de *scaffolds*, isto é, ser moldável ou favorável à adesão celular tridimensional, para o uso em regeneração e engenharia de tecidos foi a intenção do presente estudo.

O desenvolvimento de uma propriedade moldável foi obtido baseado em experiências da literatura que citam a síntese de HPMC com silano (HPMC-Si). Esta síntese permitiu que o hidrogel assumisse o aspecto de gelatina, através de autorreticulação em função do pH, moldável de acordo com o defeito a ser corrigido. Paralelamente, seguindo outra tendência no desenvolvimento de scaffolds compostos por hidrogéis, sintetizou-se HPMC com peptídeos R-G-D-S (arginina- glicina- ácido aspártico- serina), através de reação por esterificação. Isto conferiu ao hidrogel sítios de adesão, visando a sua interação com células dentro de um contexto tridimensional.

A partir das sínteses, avaliou-se a viabilidade de células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh), cultivadas em 2D na presença dos hidrogéis HPMC pura, HPMC-Si e HPMC-RGDS, para se determinar a citotoxicidade dos mesmos (ensaio MTT – de acordo com a ISO 10993-5), comparando-os entre si e com grupos-controle negativo (CN) e positivo (CP), em 24, 48 e 72h. Os três hidrogéis presentes nas culturas não interferiram na viabilidade das células (% de atividade MTT), durante os 3 momentos observados, quando comparados com o grupo CP ($P < 0,001$). Ao mesmo tempo, as células cultivadas em contato com os géis demonstraram viabilidade semelhante ao grupo CN. Entretanto, ainda que sejam atóxicos em contato com culturas de células em monocamada, testes de citotoxicidade em 3D devem confirmar a efetividade dos hidrogéis aprimorados HPMC-Si e HPMC-RGDS como scaffolds aplicáveis em regeneração e engenharia de tecidos.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; hidrogel; hidroxipropilmetilcelulose; silanos; peptídeo RGD; toxicidade.

ABSTRACT

Tissue engineering and regeneration involves the use of multipotent precursor cells associated with biomaterials that are capable of providing these cells with a three-dimensional environment similar to the extracellular matrix found in living organisms. The objective of this study was to enhance a hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogel with two scaffold properties, via independent processes, so as to produce a hydrogel capable of being molded or favorable for three-dimensional cell adhesion.

Previously described methods were employed to develop effective elastic (moldable) properties through the synthesis of silane on HPMC (Si-HPMC). This synthesis caused the hydrogel to acquire a gelatin state, moldable according to the defect to be corrected, as a result of pH-controlled auto-cross-linking. In a parallel experiment, following another trend in the development of hydrogel scaffolds, HPMC was synthesized with RGDS (arginine-glycine-aspartic acid-serine) adhesion peptides through esterification (RGDS-HPMC). This process provided the hydrogel with adhesion sites, aimed at allowing its interaction with cells in a three-dimensional environment.

Next, the viability of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells cultured in two-dimensional environments in the presence of pure HPMC, Si-HPMC, and RGDS-HPMC hydrogels was tested to assess cytotoxicity (MTT assay – ISO 10993-5). A comparison was performed between the groups and also with negative (NC) and positive controls (PC) after incubation for 24, 48 and 72 hours. No impact was recorded on cell viability (% MTT activity) at the three incubation times with any of the hydrogels when compared to PC ($p < 0.001$). Cells cultured in contact with hydrogels showed viability results similar to those of NC. Despite being nontoxic in contact with two-dimensional cell cultures, three-dimensional cytotoxicity tests should be performed to confirm the effectiveness of Si-HPMC and RGDS-HPMC hydrogels as suitable scaffolds for use in tissue engineering and regeneration.

Keywords: tissue engineering; hydrogel; hydroxypropyl methylcellulose; silanes; RGD peptide; toxicity.

1 - INTRODUÇÃO

A busca do homem pelo reparo de tecidos lesados atravessa os séculos, contendo entre seus registros mais antigos o Sushruta Samhita (Índia, aprox. 600 aC). O compêndio, escrito por Sushruta, considerado pai da cirurgia na Índia, descreve, entre outras técnicas, a reconstrução de narizes mutilados através da confecção de um retalho de pele oriundo da bochecha do próprio paciente. Modificações posteriores passaram a usar a pele da região frontal, sendo esta técnica reconhecida até hoje como o “Tradicional Método Indiano de Rinoplastia”.¹ O célebre quadro medieval de Fra Angélico intitulado “Um Milagre de São Cosme e São Damião” também ilustra esta busca através da imagem dos santos realizando um transplante de perna em um diácono ferido.

A reconstrução nasal segue até hoje muitos dos preceitos descritos na técnica indiana, e o transplante de tecidos compostos, incluindo mãos e até mesmo regiões da face, também já é uma realidade graças ao domínio de técnicas microcirúrgicas e um controle mais adequado da imunossupressão nos pacientes receptores.²

Mesmo assim, muitas doenças ainda dependem de alternativas no que tange à busca pela regeneração de tecidos. O processo de cicatrização, já bastante estudado pela ciência, demonstra ser uma ferramenta de reparo limitada em nosso organismo, visto que o tecido cicatricial, ao reparar uma lesão, é incapaz de substituí-la com a mesma funcionalidade presente nos tecidos sadios.³

Nas últimas décadas um grupo de células específicas vem merecendo especial atenção pela comunidade científica por apresentar características que vão ao encontro do anseio por novas terapêuticas na regeneração tecidual. As células-tronco (CT), como são chamadas genericamente, são capazes de proliferar e se diferenciar em tecidos especializados, o que confere a elas a função de reparar tecidos suscetíveis a

lesões ao longo da vida. Entre as CT, aplicações terapêuticas já estão bem estabelecidas com o uso das células-tronco hematopoéticas nos transplantes de medula óssea.^{4,5} Porém são as células-tronco mesenquimais que vêm merecendo atenção especial devido a sua acessibilidade, plasticidade e capacidade de isolamento e cultivo *in vitro*, fatores que reforçam a aplicabilidade clínica destas células.⁴⁻¹⁶

A engenharia de tecidos passa pela aplicação destas células precursoras multipotentes associadas a biomateriais, os quais devem oferecer a elas um ambiente tridimensional (3D) análogo à matriz extracelular existente nos organismos vivos.^{6,17-23} Os hidrogéis estão entre os materiais de destaque na busca pelo desenvolvimento destes substratos 3D, batizados de *scaffolds* pela literatura internacional, visto possuem propriedades importantes dentro do conceito de biocompatibilidade. Entretanto, paradoxalmente, a grande maioria dos hidrogéis carece de uma propriedade indispensável para o adequado funcionamento das células, quando estas se encontram circundadas por biomateriais desta natureza: adesão celular.²⁴⁻³⁰

A experiência dos autores em se aplicarem células estromais mesenquimais multipotentes na regeneração de nervos periféricos, usando-se como veículo um hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), despertou o interesse em se aprimorar este polímero, agregando a ele duas funções características de *scaffolds*, isto é, ser moldável ou favorável à adesão celular tridimensional, para o uso em regeneração e engenharia de tecidos.^{10,31-36}

O desenvolvimento de uma propriedade moldável, através de autorreticulação em função do pH, foi obtido a partir da síntese de HPMC com silano (HPMC-Si), baseado em experiências da literatura.³⁴ Paralelamente, seguindo uma tendência no desenvolvimento de *scaffolds* compostos por hidrogéis, sintetizou-se HPMC com peptídeos de adesão R-G-D-S (arginina- glicina- ácido aspártico -serina).³⁶⁻⁴⁵

Ainda que as intenções futuras sejam aplicar estes biomateriais como *scaffolds* em culturas tridimensionais, o presente estudo ateve-se à análise de citotoxicidade dos mesmos em culturas bidimensionais de células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh).

2 - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT), quando presentes na massa celular interna do blastocisto, denominam-se células-tronco embrionárias (CTE). Neste estágio caracterizam-se por serem pluripotentes, isto é, capazes de se diferenciar em todos os tecidos presentes em um organismo adulto. Entretanto, CT permanecem presentes em diversos tecidos ao longo da vida subsequente à embriogênese. Ainda que não preservem a mesma plasticidade das CTE, as células-tronco somáticas, ou adultas (CTA), como são chamadas, preservam-se multipotentes, sendo capazes de se diferenciar em diversos tecidos. Entende-se que a razão pela permanência de CT nos organismos adultos reside na necessidade de eventuais reparos a danos teciduais ocorridos ao longo da vida, ou mesmo para a manutenção fisiológica de células em tecidos nos quais a reposição é constante, a citar como exemplos o sangue e a pele.^{6,12} Porém estudos recentes sugerem que CTA podem exercer outras funções além da regenerativa, sendo a imunossupressão uma delas.^{6,16,46} Cabe citar que, por definição, as CT oriundas do cordão umbilical também incluem-se no grupo das CTA.⁶

O potencial regenerador das CTA encontra respaldo há mais de três décadas através das aplicações clínicas das células-tronco hematopoéticas.^{4,5} Elas são responsáveis pela permanente renovação celular sanguínea e servem de base terapêutica para inúmeras doenças hematológicas através dos transplantes de medula-óssea.^{5,6}

Sabe-se que, além da medula-óssea, outros órgãos possuem CT específicas, a citar entre eles o sistema nervoso central e os músculos. Porém pouco se sabe sobre a origem e manutenção *in vivo* destes compartimentos-tronco.^{6,12} Entre as CTA, as células-tronco mesenquimais (CTM) vêm merecendo uma especial atenção por

apresentarem características favoráveis ao isolamento, cultivo e manipulação, além de sua acessibilidade e plasticidade. Tais fatores reforçam a aplicabilidade clínica destas células.⁴⁻¹⁶

São vários os estudos que buscam aprofundar a compreensão deste importante grupo de células.^{4,6-9,12,16,46} Mesmo assim, a literatura ainda encontra certa imprecisão quando se tenta definir especificamente as CTM. Entre as razões está a falta de características morfológicas singulares que permitam identificá-las, assim como a ausência de marcadores de membrana específicos. Além disso, o conhecimento existente até agora baseia-se em evidências indiretas oriundas de protocolos *in vitro*, que acabam por tornar as informações ainda mais distintas.⁶

A falta de uma melhor compreensão da identidade das CTM tem resultado na ausência de uma terminologia que possa definir este grupo de células adequadamente. Diversos estudos, na prática, acabam por designar CTM a fração de células estromais, seja ela isolada da medula-óssea ou tecido adiposo, capaz de aderir à superfície plástica dos frascos de culturas. A questão que torna esta nomenclatura imprópria é que a este grupo de células falta a uniformidade característica e necessária para se definir a atividade das CTM, ainda que estas estejam presentes entre as células aderentes. CTM propriamente ditas acabam por ter uma definição sobretudo funcional e correspondem a uma pequena fração de células capazes de gerar, através de mitoses assimétricas, novas CTM (proliferação) bem como células maduras de tecidos mesenquimais e não-mesenquimais (diferenciação).^{6,12,47}

Buscando promover um emprego claro e correto de nomes na troca de informações entre pesquisadores, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propôs em 2005 padronizar a terminologia. Ela estabelece que a fração celular aderente isolada do estroma da medula-óssea, tecido adiposo ou mesmo do cordão umbilical, seja denominada de **células estromais mesenquimais multipotentes**

(CEMM). Esta terminologia acaba por abranger outros tipos celulares intermediários, presentes, hierarquicamente, entre as células multipotentes e as totalmente diferenciadas. A denominação **células-tronco mesenquimais (CTM)** deve ser aplicada apenas àquelas que, após devida verificação, apresentem autorrenovação e diferenciação em células maduras de tecidos específicos.⁴⁷

Sob a ótica da fisiologia, é lógico concluir que a capacidade proliferativa das CTM cumpre a função de manter compartimentos-tronco abastecidos, de modo que estes possam oferecer células regeneradoras a tecidos lesados em ocasiões necessárias ao longo da vida. *In vitro* esta capacidade pode ser variável, dependendo de fatores como o protocolo e o tipo de espécie celular utilizados. Além disso, outras funções, como a diferenciação e a reintegração a tecidos *in vivo*, também podem se alterar a partir do momento em que estas células são removidas de seu microambiente original e cultivadas em meios artificiais.⁶

O microambiente em questão, ou nicho, o qual alberga as CTM é, de fato, ainda pouco conhecido. Sabe-se que ele é composto pela matriz extracelular, outras células e fatores (sinalizadores de membrana) que atuam no inter-relacionamento celular e célula-matriz. O nicho é de fundamental importância para a existência e o normal funcionamento das CTM, sendo inclusive determinante para a sua expressão fenotípica.^{6,12} Existem evidências sugerindo que as CTM possam estar presentes em todos os tecidos após o nascimento.¹² Entre as hipóteses levantadas, tecidos adultos conteriam nichos independentes, com CTM similares, que acabariam por assumir características determinadas por cada um destes nichos. Outra hipótese sugere um reservatório comum para as CTM em localização específica. Através da circulação sanguínea estas células colonizariam outros tecidos.⁶ Entretanto, uma terceira hipótese foi levantada por da Silva Meirelles e cols. (2006), baseando-se em um estudo no qual CTM foram isoladas e cultivadas de diversos órgãos e tecidos de

camundongos. CTM foram obtidas, inclusive, das paredes de vasos sanguíneos, sendo estes grandes (aorta, cava), ou pequenos (glomérulos).¹² Os achados reforçam a idéia da relação do compartimento das CTM com os pericitos. Assim sendo, CTM poderiam ser extraídas de diversos órgãos graças a sua localização perivascular e consequente distribuição por todo o organismo adulto.¹²

A medula óssea costuma ser fonte primária na captação de CTM para estudos e aplicações clínicas.⁹ Entretanto, a coleta de células deste sítio pode vir acompanhada de alguns empecilhos, visto ser a punção óssea um procedimento doloroso, que exige anestesia geral ou bloqueio espinhal, além de ofertar uma quantidade de CTM que, para o emprego clínico, exige extensas expansões *ex vivo*. Assim sendo, estudos que buscam fontes alternativas para a obtenção de CTM têm demonstrado que o tecido adiposo apresenta-se como um sítio passível de extração mais simples, de grande quantidade destas células e com menor desconforto, inclusive através de anestesia local.^{7,8} Zuk e cols. (2001, 2002) de fato demonstraram que o tecido adiposo humano é uma fonte de células-tronco multipotentes capazes de se diferenciarem em linhagens mesodérmicas e também ectodérmicas. Seus estudos permitiram evoluir da nomenclatura inicial utilizada, isto é, um “lipoaspirado processado” (heterogêneo, mas com potencial de diferenciação), para achados compatíveis com verdadeiras células-tronco adiposo-derivadas.^{7,8}

Protocolos de diferenciação de CTM em linhagens especializadas já estão bem estabelecidos e a sua caracterização passa pela capacidade de células estromais mesenquimais se diferenciarem em, pelo menos 3 linhagens de origem mesodérmica, sendo elas osso, cartilagem e tecido adiposo.^{6-9,12} Mesmo assim, o potencial de diferenciação pode ser variável, dependendo da fonte de origem das células estromais, e determinadas culturas estabelecidas podem dar origem a células das outras 2 camadas germinativas, isto é, endo e ectoderma.^{8,11}

A literatura destaca que perspectivas sobre os inúmeros potenciais terapêuticos presentes nas CTM passam pela capacidade de estas células se diferenciarem em linhagens especializadas. A possibilidade de se obter de maneira autóloga, através de sítios de fácil acesso, células em razoável quantidade, com tamanho potencial restaurador, renova os horizontes na busca por tratamentos para enfermidades graves e complexas. Expandi-las e reaplicá-las *in situ* segue a linha da regeneração tecidual, que, até onde se pode presumir, tem o sítio receptor como meio atuante na diferenciação celular. Diferenciá-las *in vitro*, associadas a suportes tridimensionais biocompatíveis, que, subsequentemente, substituem zonas lesadas no organismo, amplia suas aplicações para a chamada engenharia de tecidos.^{4,6,10,11,13-16}

2.2 A RELAÇÃO CÉLULA – MATRIZ EXTRACELULAR E A IMPORTÂNCIA DA CULTURA TRIDIMENSIONAL

Além das células, os tecidos são compostos pela matriz extracelular (MEC). Já se acreditou que a MEC fosse uma estrutura inerte, responsável, simplesmente, por estabilizar e dar forma aos tecidos e órgãos. Porém são diversos os trabalhos que, já há algum tempo, demonstram que ela desempenha um complexo papel no comportamento celular, atuando em ações como adesão, migração, proliferação, forma, diferenciação e apoptose.^{17,48-54} A MEC é constituída por uma complexa rede de macromoléculas produzidas pelas próprias células e com as quais apresentam íntima relação. Diferenças na composição e organização destas macromoléculas e a predominância, maior ou menor, delas em relação às células determinam as propriedades físicas dos tecidos, adaptando-os às necessidades funcionais especializadas de cada um.⁴⁸

As duas principais classes de macromoléculas que integram a MEC são os glicosaminoglicanos e as proteínas fibrosas. Os primeiros são polissacarídeos

fortemente hidrofílicos (por exemplo, o ácido hialurônico) que formam géis túrgidos, capazes de preencher espaços e suportar forças de compressão. Quando ligados a proteínas formam os proteoglicanos, que atuam como “peneiras”, regulando o tráfego de moléculas e células dentro da MEC.⁴⁸

Os colágenos são as principais proteínas fibrosas. Entre eles identificam-se os colágenos fibrilares (tipos I, II, III, V e XI), que formam fibrilas resistentes às forças tensoras. Os fibroblastos organizam a distribuição destas fibrilas de acordo com a função específica de cada tecido – entrelaçadas na pele, ou em feixes paralelos nos tendões – o que mostra que a interação célula-MEC é mútua, havendo interferências nas duas direções.^{48,53}

A fibronectina é uma outra proteína presente na MEC composta por múltiplos domínios responsáveis por ligações com outras macromoléculas da matriz (colágeno, heparina, fibrina), bem como com receptores de superfície celular. Um destes domínios apresenta uma sequência peptídica específica de 3 aminoácidos, a citar arginina, glicina e ácido aspártico (*Arg-Gly-Asp*, ou R-G-D), que é reconhecida pela principal família de receptores de adesão celular, as integrinas.^{48,50,51,53,55} Hoje sabe-se que outras proteínas de adesão da MEC, entre elas vitronectina, fibrinogênio, laminina, osteopontina, e mesmo colágenos, também possuem a sequência R-G-D.⁵¹

As integrinas são compostas por duas subunidades de glicoproteínas transmembrana celular denominadas α e β . Vinte e quatro tipos de subunidade α e 9 tipos de subunidade β compõem variados heterodímeros de integrinas humanas que, conforme a combinação, têm afinidade não só com a fibronectina, mas com outras proteínas da MEC como a laminina, a vitronectina e o fibrinogênio. Elas atuam na interface entre o citoesqueleto, presente no interior da célula, e a MEC. Mais do que simples proteínas de ligação célula-MEC, as integrinas são a chave desencadeadora de inúmeras funções celulares vitais. Elas ativam vias de sinalização intracelular,

comunicando para a célula características da matriz à qual ela está ligada, ação denominada mecanotransdução.^{17,48,50,53}

O citoesqueleto compreende os filamentos de actina, os microtúbulos e os filamentos intermediários. Ainda que distintos quimicamente, estes polímeros interagem entre si, participando da cascata de sinalização iniciada nas integrinas, estando implicados em ações como manutenção da forma, migração e geração de força celular.⁵⁰

Assim como ligações da MEC através das integrinas desencadeiam sinais intracelulares, comandos no interior da célula influenciam a conformação das fibrilas protéicas da matriz. As integrinas estão unidas às macromoléculas de adesão, basicamente através de 3 tipos de ligações:

Adesões focais são sítios de ligação bem localizados, com forte ancoragem, geralmente envolvendo um substrato macromolecular rígido como a vitronectina. Muitas outras moléculas (quinase de adesão focal ou FAK - *focal adhesion kinase*, paxilina, talina, tensina, Src, entre outras), além das integrinas, atuam nestes sítios regulando estas ligações. Acredita-se que adesões focais sejam responsáveis pela remodelagem e transmissão de grandes forças exercidas sobre a MEC. Verifica-se que a contração citoplasmática também exerce tensão sobre estas ligações, sendo fundamental para a manutenção delas.^{48,50,53}

Adesões fibrilares são ligações que ocorrem entre a integrina $\alpha_5\beta_1$ e a fibronectina responsáveis pela formação da trama macromolecular em torno da célula. O direcionamento das fibras se dá pelos filamentos de actina presentes no citoplasma, que, junto com moléculas de tensina, translocam a integrina ao longo da membrana plasmática. Esta, por sua vez, tensiona a fibronectina, que, ao expor novos domínios de ligação, polimeriza-se formando a trama (fibrilogênese). Acredita-se que adesões fibrilares influenciem no formato e motilidade celular.^{48,50,53}

Adesões de matrizes tridimensionais são ligações distintas das outras duas, encontradas em culturas, a partir das interações existentes entre células e substratos tridimensionais. Elas possuem as mesmas moléculas encontradas nas adesões focais, porém com a mediação da integrina $\alpha_5\beta_1$ e a participação da fibronectina.^{50,53}

O controle celular sobre estas ligações é indispensável ao desenvolvimento de um organismo, visto que ligações fracas, ou desativadas, permitem que células se desprendam e migrem para outros sítios, dando sequência à formação dos tecidos. A degradação controlada da matriz, através de enzimas proteolíticas, também auxilia na migração celular.⁴⁸

A consciência dos pesquisadores sobre o quanto é significativo o contexto *in natura* das células para o seu normal funcionamento reflete-se em uma mudança de paradigma, na busca por condições ideais de cultivo celular. Sendo assim, as últimas décadas têm testemunhado o desenvolvimento do princípio da cultura tridimensional (3D), contrapondo-se ao método convencional, no qual as células cultivadas aderem a superfícies lisas e planas que compõem os frascos e poços de cultura (cultura em monocamada ou 2D).^{17,50,56} Este princípio baseia-se no fato de as células encontrarem-se, naturalmente, em uma situação tridimensional nos organismos vivos, relacionando-se e dependendo intimamente da matriz que as circunda, conforme foi descrito nos parágrafos anteriores.

A cultura de células em substratos tridimensionais vem desenvolvendo-se principalmente através das pesquisas em oncologia. Cientistas desta área voltaram-se para a cultura celular em 3D, buscando recriar *in vitro* ambientes fisiológicos mais semelhantes aos encontrados *in vivo*. Expressões genéticas, além de outras atividades biológicas, até então não observadas nas culturas celulares em monocamada, passaram a ser estudadas, permitindo avanços no conhecimento do comportamento das células neoplásicas.¹⁷ Evidências referentes ao envolvimento direto das integrinas

no comportamento celular em diferentes circunstâncias não seriam passíveis de verificação, não fosse a aplicação dos experimentos em substratos 3D.^{17,53} Weaver e cols. (1997) demonstraram isto ao reverter o fenótipo maligno de células epiteliais mamárias cultivadas em meio tridimensional (Matrigel[®]) utilizando anticorpos anti-integrinas.⁵² Outras funções celulares, como a apoptose, também são estudadas com maior fidelidade em matrizes 3D, dadas as evidências sobre a importância das integrinas e suas relações com o microambiente pericelular.⁵⁴ Zahir e Weaver (2004) descrevem que uma característica significativa da arquitetura tridimensional do tecido epitelial *in vivo* é a polaridade e, por conseguinte, uma maior resistência a estímulos apoptóticos. Isto ocorre porque a polaridade tecidual depende da ligação da laminina com a integrina $\alpha_6\beta_4$, que ativa a molécula antiapoptótica NFkB. Demonstrou-se isto em culturas tridimensionais com células epiteliais mamárias, mas a mesma resistência à apoptose não foi evidenciada em culturas 2D, o que sugere que a função da NFkB é regulada pela organização tecidual.⁵⁴

2.3 A ENGENHARIA DE TECIDOS

CTM apresentam características que estão permitindo o desenvolvimento de terapêuticas voltadas para a regeneração tecidual através do isolamento, expansão e reaplicação destas células precursoras em sítios anatômicos doentes, seja por causas congênitas, metabólicas, isquêmicas, ou traumáticas.^{6,10,11,13-15} Entretanto, a alta capacidade proliferativa e de diferenciação das CTM, aliada ao uso de fatores bioquímicos indutores e à criação de substratos tridimensionais que mimetizam a MEC, está servindo de alicerce para o surgimento de um outro campo de pesquisas, interdisciplinar, que visa a criar *ex vivo* estruturas precursoras, ou tecidos propriamente ditos, capazes de se incorporarem, do ponto de vista anatômico e, sobretudo fisiológico, a áreas lesadas no organismo de um paciente. Este campo denomina-se

Engenharia de Tecidos (ET) e está sendo impulsionado, sobretudo, graças a um maior conhecimento sobre CT, além das evidências relativas à importância da MEC no comportamento celular e ao desenvolvimento de biomateriais para a cultura em 3D.^{6,18-}

21

Segundo Vacanti (2006), o termo “Engenharia de Tecidos” chegou a ser utilizado na década de 1980 referindo-se ao uso de próteses e à manipulação cirúrgica de tecidos. Entretanto, a adequada aplicação do termo nos dias atuais define a disciplina dedicada a gerar novos tecidos, empregando princípios de engenharia em combinação com princípios de biologia celular.²² Cabe aqui ressaltar que, ainda que CTM se apliquem e contribuam para o desenvolvimento da ET, não é indispensável o uso específico destas células precursoras para se definir este campo de pesquisa. Inclusive, muitos trabalhos que buscam recriar tecidos *in vitro* e *in vivo* associam biomateriais a células de linhagens já diferenciadas.^{23,57-61}

A Sociedade de Engenharia de Tecidos (*Tissue Engineering Society* – TES) foi fundada em Boston, em 1994, mas atualmente recebe o nome mais abrangente de Sociedade Internacional de Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa (*Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society* – TERMIS). Charles Vacanti, um de seus fundadores, argumenta que, embora a medicina regenerativa e a engenharia de tecidos dividam objetivos comuns, isto é, a restauração anátomo-funcional de órgãos e tecidos, cada área busca atingi-los por diferentes meios.²² Os princípios de engenharia, aplicados à fisiologia celular, baseiam-se no desenvolvimento de materiais biocompatíveis, equivalentes à MEC, capazes de oferecer suporte e interação tridimensional a células. Ainda que Green, Burke, Yannas, Bell, entre outros, ao longo das décadas de 1970 e 1980, tenham dado as primeiras contribuições para o desenvolvimento da disciplina, são os estudos de Joseph Vacanti e Robert Langer

(1988) que servem de marco científico, a partir da geração de polímeros sintéticos, visando ao aprimoramento destes biomateriais.²²

A literatura internacional cunhou um termo específico para designar estes substratos tridimensionais. *Scaffold*, traduzido literalmente, significa “andaime, cadafalso, patíbulo”.⁶² Porém, como já descrito anteriormente, a MEC possui funções que vão além do simples suporte estrutural para as células e, portanto, o termo *scaffold* em Engenharia de Tecidos significa a árdua tarefa de se recriarem matrizes que ofereçam interações fisiológicas com as células através de sua tridimensionalidade.¹⁷

Entre os inúmeros trabalhos publicados pelos pesquisadores Charles e Joseph Vacanti, alguns ilustram bem o conceito no qual está fundamentada a ET, sempre partindo do princípio da associação de células e biomateriais. A esta associação eles dão o nome de *construct*.²³ Entre as inovações apontadas por eles está a confecção de *scaffolds* à base de polímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis (poliglactina, material de sutura cirúrgica comercialmente conhecido como Vicryl®), ao invés de polímeros naturais. Entre os argumentos a favor está a possibilidade de se alterar as propriedades físicas do polímero com maior precisão e reprodutibilidade, permitindo que se controlem questões como superfície de adesão às células, ou exposição das mesmas aos nutrientes.²³ A publicação de Cao e cols., em 1997, teve significativa repercussão ao apresentar um camundongo portando em seu dorso uma estrutura cartilaginosa em forma de orelha humana.⁵⁸ A pesquisa, que teve como base o trabalho preliminar de Vacanti (1991), utilizou um *scaffold* de ácido poliglicólico + ácido polilático semeado por condrócitos, que, após um período em cultura, foi transplantado para o subcutâneo de camundongos. Resumidamente, após 12 semanas, os *constructs* foram removidos e analisados histologicamente. O biomaterial havia sido substituído por cartilagem viável. É importante se destacar que, nos dois trabalhos, grupos- controle, contendo apenas a implantação de células isoladas ou do *scaffold* sem ter sido

semeado, não apresentaram o desenvolvimento de tecido cartilaginoso no subcutâneo dos animais.^{23,58}

Marler e cols., em 2000, também reforçaram o conceito de *construct* como base para a ET. Eles demonstraram, em um modelo experimental para avaliar aumento de volume de partes moles, que a injeção de um hidrogel de alginato no subcutâneo de ratos tem sua forma perpetuada quando fibroblastos são adicionados ao gel.⁵⁷

A ET, ao longo das últimas décadas, vem encontrando maior respaldo no desenvolvimento de tecidos avasculares, como osso e cartilagem, além de delgadas membranas celulares como a pele.⁶¹ A literatura chega a descrever, inclusive, alguns relatos clínicos, como, por exemplo, a reposição do esterno de um jovem com Síndrome de Poland através de um implante composto de polímero sintético e condrócitos autólogos, em 1991.²² Entretanto, apesar do progresso científico, a ET ainda encontra-se distante de uma aplicação clínica abrangente. Entre as razões limitantes estão a questão da escala (tamanho) e da morte celular que segue-se à implantação do *construct* no hospedeiro. Um grande número de células é necessário para se gerar um pequeno volume de tecido. Além disso, aquelas que se encontram na parte mais interna dos *scaffolds* também precisam ter acesso a nutrientes e O₂. Além disso, ao serem implantadas, estas células devem ser reconhecidas como próprias e não como estranhas.²²

As dificuldades supracitadas não impedem a incessante busca por soluções. Células maduras, expandidas *in vitro*, tornam-se ineficazes com o passar do tempo.²² Isto reforça a aplicabilidade das CTM na ET, visto que, como já dito anteriormente, estas células possuem capacidade ilimitada de autorrenovação. Além disso, pesquisas *in vitro* apontam para mudanças significativas no comportamento das células que interagem com meios tridimensionais, principalmente no que se refere à expressão de fenótipos e à diferenciação celular, quando comparadas com culturas em duas

dimensões.⁵⁹⁻⁶¹ Deste modo, CTM cultivadas em substratos 3D encontram um ambiente mais favorável à diferenciação em um tipo de tecido específico, conforme o protocolo de indução utilizado.

Wang e cols. (2006) desenvolveram um sistema de prototipagem de um *scaffold* de gelatina já contendo em seu interior hepatócitos de ratos, que se mantiveram viáveis e funcionais por mais de 2 meses, sugerindo a possibilidade de se gerar *ex vivo* substitutos de tecidos mais complexos. O aparato constrói uma trama de gel, contendo as células em várias camadas, de modo que, ao final do processo, obtém-se um *construct* tridimensional que confere estabilidade estrutural aos hepatócitos, além de possuir macroporos uniformes que permitem plena difusão de nutrientes e O₂ provenientes do meio de cultura.⁶¹

A transposição de tecnologias experimentais em ET até atingir a aplicabilidade clínica em grande escala passa, certamente, pelo emprego de biorreatores. Estas máquinas, já utilizadas em diferentes áreas da indústria, são capazes de controlar e monitorar de forma acurada processos bioquímicos e físicos (pH, temperatura, pressão, suporte nutricional, excreção de catabólitos), de modo a tornar padronizados e reprodutíveis parâmetros utilizados na geração de tecidos artificiais.⁶³ Buscando dar um passo além na questão de se criarem tecidos em escala maior, sem que haja carência no aporte nutricional, Mertsching e cols. (2005) publicaram a confecção de um *scaffold* biológico vascularizado (BioVaM[®]) com a ajuda de um biorreator. Resumidamente, os autores retiraram segmentos de intestino delgado de porcos, contendo artéria e veia. Submeteram as peças a um processo de decelularização, obtendo como resultado uma matriz acelular de colágeno e elastina. Dentro de um biorreator, a matriz foi reendotelizada a partir de células endoteliais progenitoras derivadas da medula óssea dos mesmos animais. O trabalho ateu-se a demonstrar o processo de

desenvolvimento deste *scaffold* biológico contendo vasos, passíveis de anastomose em um hospedeiro, mas deixa para futuras publicações a sua aplicação *in vivo*.⁶⁴

2.4 BIOMATERIAIS

Os conceitos sobre biomateriais e biocompatibilidade vêm mudando consideravelmente nas últimas décadas. Biocompatibilidade pode ser definida pela maneira através da qual se dá a coexistência mutuamente aceitável entre biomateriais e tecidos. A questão é que, até meados da década de oitenta, biomateriais eram sinônimos de dispositivos médicos implantáveis que apresentavam como único requisito de biocompatibilidade a capacidade de não causar dano aos tecidos com os quais ficavam em contato. Com o desenvolvimento de áreas de pesquisa como a ET, ficou evidente que a simples característica inerte destes dispositivos restringe em muito os conceitos atuais de biocompatibilidade. As últimas duas décadas testemunham o desenvolvimento de biomateriais que interagem física e bioquimicamente com as células, criando um novo paradigma fundamentado no indispensável papel que o microambiente extracelular exerce sobre elas.³⁰

Assim sendo, biomateriais atualmente são definidos como materiais não vivos, naturais ou sintéticos, idealizados para interagir com sistemas biológicos. Podem ser aplicados como veículos ou como matrizes artificiais que, além de oferecerem suporte estrutural, propiciam um ambiente fisiológico adequado para células e fatores bioquímicos. No que se refere à ET, eles são os responsáveis por determinar a forma e o volume do tecido a ser recriado.^{18,19,21,27}

Entre outras propriedades que caracterizam um biomaterial estão as suas estabilidades química e mecânica, sua porosidade, seu pH, toxicidade, preço, reprodutibilidade, capacidade de esterilização, biodegradabilidade, além da presença de cargas elétricas ou elementos que estimulem a adesão e migração celular. Matrizes

com macroporos altamente interconectados, apresentando grandes superfícies em relação aos seus volumes, facilitam a proliferação celular e oferecem maiores taxas de troca de O₂ e nutrientes. Por outro lado, a mesma porosidade pode influenciar a estabilidade mecânica da matriz, devendo-se, assim, buscar um balanço entre estas necessidades, conforme o tecido que se pretender reproduzir. *Scaffolds* com alta densidade de moléculas de adesão podem estimular o contato célula-matriz, mas dificultar a migração celular. Quando biodegradáveis, se absorvidos precocemente, podem reduzir o volume celular a ser regenerado, enquanto que, se degradados lentamente, acabam por inibir o desenvolvimento do tecido. Regular estes fatores, tendo como meta recriar uma MEC próxima da ideal, capaz de acolher as células em todas as suas necessidades, é atualmente um dos principais desafios a estimular inúmeras pesquisas no terreno da ET.^{17-19,21,27}

Há uma enorme variedade de biomateriais que podem ser classificados, de forma geral, em polímeros naturais/orgânicos, polímeros sintéticos e derivados de matrizes acelulares.²⁷

O colágeno e o alginato estão entre as matérias-primas orgânicas mais aplicadas como biomateriais de origem natural.^{26,27} O primeiro é encontrado abundantemente em tecidos animais e humanos. Pode ter sua taxa de degradação regulada pela sua densidade como também pela quantidade de reticulação intermolecular (*cross-linking*), a qual pode ser obtida por diferentes meios físicos e químicos. Além disso, o colágeno pode ser processado em uma ampla variedade de estruturas, como esponjas, fibras e filmes, já tendo, inclusive, sua aplicação clínica estabelecida através da engenharia de pele sintética.^{26,27} O alginato é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, biocompatível e acessível. Pode reticular-se pela adição de íons cálcio divalentes (Ca²⁺) em meio aquoso e tem sido aplicado como *scaffold* no desenvolvimento de tecidos como cartilagem.^{26,27} A celulose, e seus derivados, também faz parte dos

polissacarídeos citados entre as matérias-primas orgânicas usadas na confecção de *scaffolds*. Ela é a maior fonte de polímero renovável atualmente e caracteriza-se por uma conformação em microfibrilas que lhe confere propriedades únicas de força mecânica e estabilidade química. É fato que estas propriedades também implicam em uma biodegradabilidade limitada. Mesmo assim, elas podem ser alteradas quimicamente, e há relatos que seus derivados podem ser aplicados com sucesso na engenharia de tecidos como osso, miocárdio e vasos sanguíneos.^{26,60}

No grupo dos polímeros sintéticos, o polietileno glicol (PEG), o ácido poliglicólico (PGA), o ácido polilático (PLA) estão entre os biomateriais mais citados na literatura. As ligações de éster destes polímeros são lábeis e degradam-se por hidrólise não enzimática. Os produtos da degradação são atóxicos, podendo ser eliminados na forma de dióxido de carbono e água. São termoplásticos e podem ser confeccionados em diferentes formas, microtexturas e porosidade. Encontram ampla aplicação, principalmente na engenharia de cartilagem e osso.^{19,21,25,27}

As matrizes acelulares são estruturas orgânicas ricas em colágeno, mas resultantes de um processo químico e mecânico que remove os componentes celulares do tecido, preservando as propriedades protéicas extracelulares. A engenharia de tecidos em urologia já possui experiência com esse tipo de *scaffold* e utiliza, como exemplos de matéria-prima, a submucosa da bexiga ou do intestino delgado.²⁷

Matrizes de origem orgânica apresentam vantagens do ponto de vista da interação biológica. Por outro lado, polímeros sintéticos podem ser manufacturados em grande escala, reproduzindo de maneira controlada características como força, tempo de degradação e microestrutura.^{25,27} A grande variedade de materiais empregados demonstra que, mais do que desenvolver um *scaffold* de uso universal, pesquisadores procuram criar matrizes capazes de se adaptarem às diferentes propostas de regeneração tecidual.

Um outro fator que contribui para a multiplicidade de *scaffolds* são os métodos pelos quais eles são desenvolvidos. A sua fabricação pode ser feita, em termos gerais, de maneira acelular, através da fusão de agregados celulares, ou de híbridos de hidrogéis, já contendo células no seu interior durante sua confecção.²⁹

Scaffolds acelulares pressupõem submeter biomateriais a processos físicos, ou químicos, muitas vezes automatizados, produzindo, de maneira padronizada, estruturas com poros passíveis de serem colonizados pelas células. Entretanto, argumenta-se que as limitações deste método estão na falta de controle sobre a distribuição celular, que, muitas vezes, acaba por se dar de forma heterogênea.²⁹

A fusão de agregados celulares propõe reunir diretamente camadas de células em cultura de forma tridimensional. Até o momento a técnica encontra limitação na confecção de arquiteturas complexas.²⁹

Por sua vez, os híbridos de hidrogéis/células procuram conciliar uma distribuição celular mais homogênea com a adaptação destes biomateriais às mais diversas formas de tecidos a serem reconstruídas. A preservação da forma se dá, geralmente, por um processo de reticulação (sob efeito químico, de luz, ou pH), que mantém o gel em estado mais sólido, podendo assumir uma função estrutural mais complexa, ao mesmo tempo que as células distribuem-se por todos os seus espaços. A técnica de prototipagem, que, com a ajuda de um computador, padroniza a confecção de *scaffolds* em estruturas elaboradas e sob medida, aprimora ainda mais a aplicação dos hidrogéis híbridos.^{21,25,29,34,59-61}

2.5 HIDROGÉIS

Os hidrogéis são um tipo de biomaterial geralmente composto por polímeros sintéticos ou naturais, que têm se destacado entre as referências que versam sobre ET. Eles podem se adaptar aos diferentes formatos de defeitos teciduais que se busca

reconstruir e o fazem, conciliando a isso um adequado suporte estrutural. Permitem uma distribuição homogênea de células em seu meio, equilibrando adequadamente a relação que deve existir entre elas e a matriz. Além disso, apresentam características semelhantes aos microambientes que naturalmente circundam as células, propiciando a difusão de nutrientes entre o meio de cultura e elas.^{21,24,29} São fatores como o tamanho do polímero, além do grau de reticulação entre as fibrilas, que determinam a estrutura nanoporosa dos hidrogéis. Por consequência, a taxa de difusão de moléculas se dá pela relação entre o peso e o tamanho delas e o tamanho dos poros.²⁴ Ambientes à base de gel são capazes de acolher inúmeras funções biológicas, sendo inclusive citados nas hipóteses evolutivas sobre a origem da vida.²⁸

Hidrogéis podem não aparentar possuir propriedades mecânicas fortes o bastante para serem aplicados, por exemplo, na engenharia de tecido ósseo. No entanto, a sua conformação permite acelerar a formação tecidual, o que, por outro lado, oferece integridade mecânica precoce no sítio a ser reconstruído.^{21,25}

Ainda que hidrogéis apresentem uma série de características que os colocam entre os principais biomateriais utilizados como análogos da MEC, a maioria deles esbarra em uma condição fundamental para que eles exerçam a pleno esta função: adesão celular. Exceto o colágeno, os demais polímeros, sobretudo os sintéticos, não apresentam sítios de reconhecimento biológico que permitam que células possam aderir ao *scaffold*.^{24,27} Como bem visto, o contato entre células e MEC se dá através das integrinas presentes na membrana celular, as quais interagem, especificamente, com uma sequência tripeptídica (R-G-D), que compõe as fibronectinas e outras proteínas presentes na matriz. Esta interação desencadeia outras inúmeras funções vitais para as células.^{48,50,51,53,55}

Este fato tem levado à busca de diferentes estratégias que promovam adesão celular aos diferentes polímeros que compõem *scaffolds* à base de hidrogéis.^{21,27}

Inúmeros autores descrevem a incorporação da seqüência R-G-D, ou similares (R-G-D-S, R-E-D-V, Y-I-G-S-R, entre outros), através de ligações covalentes, aos mais variados tipos de hidrogéis.^{24,37,39-45} Deve-se destacar uma constatação descrita por Ruoslathi (1996) e Hersel e cols. (2003) a respeito do efeito oposto que ligantes, como a seqüência R-G-D, podem ter sobre as células. Imobilizados, eles atuam de forma agonista, promovendo efetivamente a adesão celular e, por conseguinte, a sobrevivência da célula através de outras ações. Porém, quando solubilizados, os ligantes, ao ocuparem os sítios de adesão na membrana celular, impedem que esta se conecte a uma superfície. Desta maneira, sem um contato fixo, as células assumem um formato esférico e entram em apoptose.^{36,51} Por esta razão, justifica-se a importância de se incorporarem peptídeos de adesão aos polímeros, de modo que as células os encontrem imobilizados na trama da matriz. Isto se faz através de ligações covalentes.

Ainda que a seqüência R-G-D seja o principal domínio de reconhecimento para a adesão celular e, portanto, o mais aplicado na elaboração de matrizes análogas, muitos outros elementos também costumam ser associados a hidrogéis, visando ao estímulo de funções celulares.^{21,24} Gobin e West (2002), além de R-G-D-S, incorporaram peptídeos degradáveis, sensíveis a enzimas específicas (colagenase, plasmina e elastase) envolvidas com a migração celular.³⁸ Schneider e cols. (2004) acrescentaram cargas iônicas e compararam a adesão de osteoblastos e fibroblastos em hidrogéis carregados positiva e negativamente com outros contendo R-G-D.⁶⁵ Outros autores descrevem a associação de fatores de crescimento (fator de crescimento fibroblasto-acídico [*FGF-1*], fator de crescimento transformador- β [*TGF- β*], fator de crescimento vascular endotelial [*VEGF*]), indutores de diferenciação (proteína morfogenética óssea-2 [*BMP-2*]) e mesmo minerais inorgânicos (grupos fosfatos, hidroxiapatita), a fim de estimular a interação dos hidrogéis com células de tecidos específicos (nervo periférico, músculo liso, vasos sanguíneos e osso).^{21,24,40,66,67}

Tão importante quanto a tecnologia que consegue aprimorar os hidrogéis, com vistas a ofertar melhores condições às células cultivadas em seus interiores, são os resultados apresentados pelos autores dos artigos acima mencionados. Em termos gerais eles apontam para um melhor desempenho de hidrogéis contendo peptídeos de adesão, ou outros estimuladores, quando comparados com hidrogéis puros, seja nas avaliações sobre fisiologia celular *in vitro*, seja nas observações sobre regeneração tecidual *in vivo*.^{36-38,40-42,66,67}

2.6 HIDROXIPROPILMETICELULOSE - HPMC

A HPMC é um polímero derivado da celulose, hidrossolúvel, gelificante, com consagrada aplicação na indústria farmacêutica e na medicina. Ela é amplamente empregada como retardante da liberação de fármacos em formulações orais, como também na implantação de lentes intraoculares na área da oftalmologia. Demonstra ser não tóxica e estável dentro de uma variável gama de temperaturas e pH, além de poder ser esterilizada em autoclave, sem sofrer grandes perdas em sua viscosidade.^{34,35}

A literatura cita a utilização da HPMC como matriz para a cultura em 3D de condrócitos e células osteogênicas, visando à sua aplicação clínica como *scaffold* na regeneração de tecidos.^{59,60,67} Para tanto, os autores utilizam a HPMC dotada de uma nova propriedade obtida através da inclusão química de silano à estrutura do polímero. O processo foi patenteado e publicado por Bourges e cols. em 2002 e permite que o gel se reticule em função do pH. Um sistema tampão (pH 3,6) catalisa a reação, fazendo com que o hidrogel, que é estável a um pH de 12,9, atinja o pH de 7,3. A acidificação da solução (transformação de silanolato $[\text{SiO-Na}^+]$ em silanol $[\text{SiOH}]$) provoca um aumento progressivo na viscosidade do hidrogel, o qual assume um estado de gelatina moldável, passível de adquirir a forma do defeito que se desejar preencher.^{34,59,60} Segundo as referências, há evidências de que células cultivadas em 3D, envolvidas

homogeneamente no hidrogel de HPMC silanizada (HPMC-Si), comportam-se diferentemente daquelas cultivadas em monocamada (2D). Os resultados sugerem que o meio tridimensional demonstra ser mais propenso a interagir com o potencial de diferenciação das células.^{59,60}

O passo adiante foi dado por Trojani e cols. (2006), que publicaram testes com HPMC-Si associada a fosfato de cálcio bifásico (*biphasic calcium phosphate [BCP]*), gerando um *scaffold* batizado de “substituto ósseo injetável 2” (*injectable bone substitute*, ou *IBS 2*). O trabalho analisou o comportamento de células estromais de medula óssea semeadas no *scaffold* e aplicadas nos planos subcutâneo e intramuscular de camundongos. A associação de *BCP* ao hidrogel de HPMC-Si visava a estimular adesão, proliferação e diferenciação celular, e o *IBS 2* com células foi comparado com HPMC-Si com células (sem *BCP*) e com o *IBS 2* sem células. Após 4 e 8 semanas a análise histológica demonstrou que os implantes de HPMC-Si com células e *IBS 2* sem células encontravam-se sem a presença de células em seus interiores. Por sua vez, o grupo que teve implantado *IBS 2* contendo células estromais evoluiu para uma colonização quase que completa de todas as peças, apresentando várias evidências de formação tecidual óssea.⁶⁷

Até o presente momento, não se verificou na literatura o relato da elaboração de um *scaffold* para a cultura de células em 3D e aplicação em ET, utilizando-se HPMC com peptídeos de adesão (R-G-D-S) incorporados a sua estrutura.

3 - OBJETIVOS

3.1 - GERAIS

Aprimorar o hidrogel de HPMC, agregando a ele duas funções características de *scaffolds*, isto é, ser moldável ou favorável à adesão celular tridimensional, para o uso em regeneração e engenharia de tecidos.

3.2 - ESPECÍFICOS

- Sintetizar o hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose silanizado (**HPMC-Si**), a partir da metodologia dos autores³⁴, e verificar sua reticulação em função do pH;
- Sintetizar o hidrogel de hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão arginina- glicina- ácido aspártico- serina (**HPMC-RGDS**) por reação direta de esterificação;
- Determinar a citotoxicidade dos hidrogéis de **HPMC pura**, **HPMC-Si** e **HPMC-RGDS** presentes em culturas 2D de células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh), comparando-os entre si e com grupos-controle negativo e positivo.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - ASPECTOS BIOÉTICOS

O presente estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96). Este estudo foi aprovado pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, conforme o ofício 651/06-PG, datado em 15 de setembro de 2006 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, sob o registro CEP 07/03668, conforme o ofício 0467/07-CEP, datado em 07 de maio de 2007.

4.2 - DESENHO DO ESTUDO

Experimental

4.3 - CONTEXTO

O hidrogel de HPMC-Si foi sintetizado nos laboratórios da Faculdade de Química da PUCRS, Campus Universitário Central, em Porto Alegre, sob a orientação do Prof. Dr. André Arigony Souto.

O hidrogel de HPMC-RGDS foi sintetizado no Laboratório de Catálise Molecular, no IQ-UFRGS, Campus do Vale, em Porto Alegre, sob a orientação do Prof. Dr. Brenno Amaro Dasilveira Neto.

As CAADh utilizadas no estudo são oriundas de culturas realizadas a partir do estudo de Lemos (2008), no Centro de Terapia Celular (CTC) do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), situado nas dependências do Hospital São Lucas da PUCRS em Porto Alegre.⁶⁸ Os testes de citotoxicidade e a análise em espectrofotometria foram, da

mesma forma, realizados no CTC, sob a orientação da Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado.

4.4 - PROCEDIMENTOS

4.4.1 - PREPARAÇÃO DOS HIDROGÉIS À BASE DE HPMC

4.4.1.1 – Síntese da HPMC silanizada (HPMC-Si)

a) Síntese do pó de HPMC-Si

Em um balão (tricol: 1 l), 316 ml de n-Heptano foram misturados com 70 ml de 1-Propanol. Dois gramas de hidróxido de sódio e 38,6 g de HPMC (METHOCEL E4M[®]; Colorcon Brasil- Dow Chemicals, Midland, MI, USA) foram adicionados à mistura sob agitação. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 45 min sob gás de nitrogênio. Seis mililitros de 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (3-GPTMS 97%; ACROS Organics, Geel, Bélgica) foram adicionados à solução e a temperatura foi aumentada até 100 °C. A síntese foi efetuada sob ebulição durante 3 h. Desligado o aquecimento, à temperatura de 40 °C, 5 ml de ácido acético foram adicionados para neutralizar a reação. A seguir, a mistura foi filtrada e enxaguada 2 vezes com 50 ml de acetona. O pó foi secado a 50 °C em vácuo por 1 h. O pó seco foi lavado 3 vezes, sucessivamente, com 500 ml de uma mistura de acetona e água (85:15 [v/v]) e o pó de HPMC-Si foi secado a 50 °C por uma noite.

b) Preparo da solução de HPMC-Si

Seis gramas do pó de HPMC-Si foram solubilizados em 200 ml de uma solução de NaOH a 0,2 M. Esta mistura foi agitada por 48 h e, em seguida, dialisada (membrana Spectrapor 1, 6-8 k; Bioagency, São Paulo, Brasil) durante 16 h em uma

solução de NaOH a 0,09 M. A seguir, uma segunda diálise foi realizada novamente em solução de NaOH a 0,09 por mais 2 h. Esta solução de HPMC-Si a 3% e com pH de 12,9 foi a seguir esterilizada em autoclave a uma temperatura de 121° C por 30 min.

c) Indução da reticulação do hidrogel de HPMC-Si em função do pH

O preparo da solução-tampão foi feito com Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Media* - D-MEM; Invitrogen, Carlsbad, USA) concentrado 1,4 vezes, suplementado com NaHCO₃ 0,26 mM e com HEPES 0,13 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). O pH foi ajustado para 3,6 com HCl. Como resultado obteve-se um meio de cultura tampão de coloração amarelo escuro.

Para se induzir a reticulação, o tampão (pH 3,6) foi adicionado à solução de HPMC-Si (pH 12,9) em uma relação 1/3 (v/v). A mistura foi agitada ao vortex por 15 segundos. O pH final do hidrogel foi monitorado diretamente através de pHmetro e ficou em 7,4. À medida que houve o tamponamento da solução, a sua coloração modificou-se do amarelo para o rosa claro.

4.4.1.2 – Síntese da HPMC contendo peptídeos de adesão R-G-D-S (HPMC-RGDS)

a) Síntese do polímero de HPMC-RGDS

Dois gramas de HPMC (METHOCEL E4M®; Colorcon Brasil- Dow Chemicals, Midland, MI, USA) foram pesados e dissolvidos em benzeno na temperatura de 80 °C. Ácido partolueno sulfônico em quantidade catalítica (10 mg) foi adicionado à solução. A seguir, 100 mg de peptídeos de adesão com 4 aminoácidos (R-G-D-S 90% de purificação; Invitrogen, Carlsbad, USA) foram adicionados à solução. A água formada durante a reação foi removida azeotropicamente com um aparelho de *Dean-Stark*. A reação foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance*

liquid chromatography – HPLC) para garantir o consumo total do peptídeo R-G-D-S. Uma análise por infravermelho também foi realizada para confirmar a formação da ligação éster entre o tetrapeptídeo e a HPMC.

Após a síntese, o polímero foi esterilizado em óxido de etileno pela empresa MIC Steriliza, em Porto Alegre.

b) Preparo da solução de HPMC-RGDS

Após a síntese o polímero assumiu a forma de gelatina sólida em finas membranas (**Figura 1**). Em ambiente estéril estas membranas foram fragmentadas em pequenos pedaços com tesoura, a fim de serem pesados para, a seguir, serem diluídos. Zero vírgula três gramas do polímero de HPMC-RGDS foram diluídos em 10 ml de solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), resultando em uma solução viscosa, transparente, concentrada a 3%.

4.4.1.3 – Preparo da solução de HPMC pura

Zero vírgula três gramas do pó de HPMC (METHOCEL E4M®; Colorcon Brasil-Dow Chemicals, Midland, MI, USA) foram diluídos em 10 ml de água destilada, resultando em uma solução viscosa, transparente, concentrada a 3%.

A solução foi esterilizada em autoclave a uma temperatura de 121° C por 30 min.

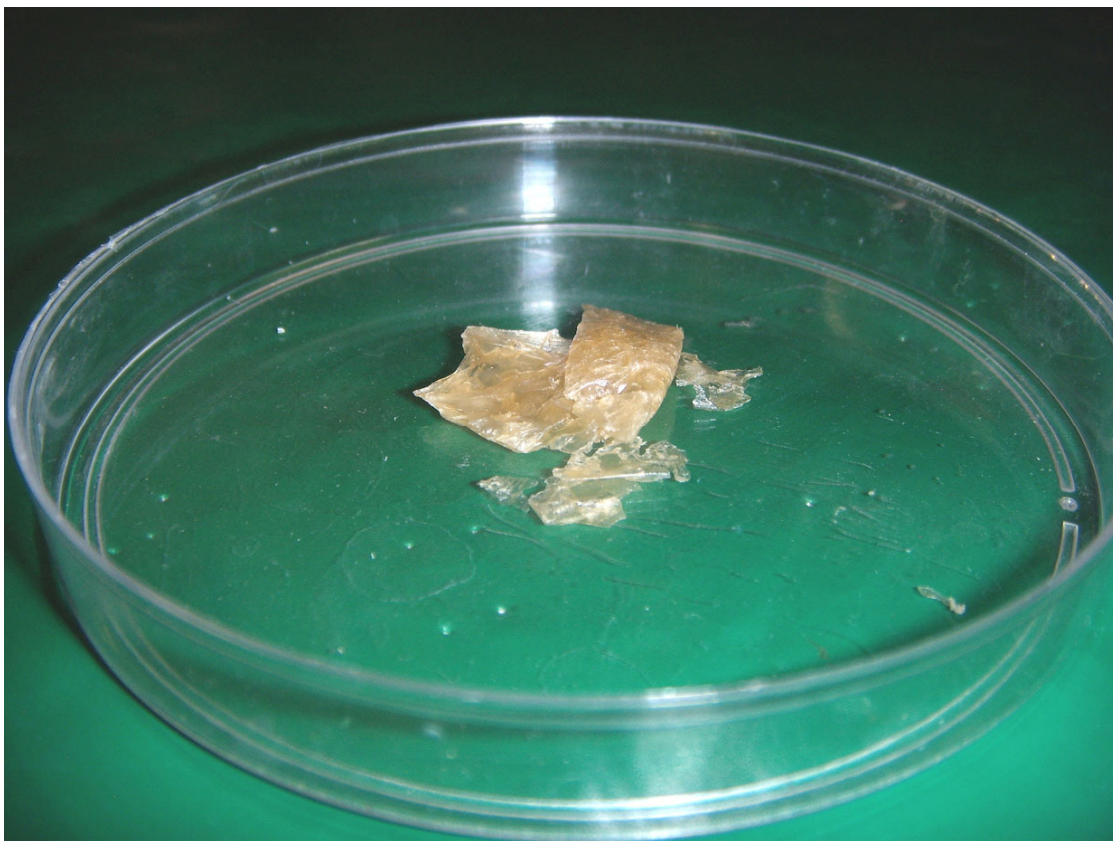


Figura 1: Aspecto macroscópico da gelatina (polímero), resultante da síntese de HPMC com peptídeos de adesão R-G-D-S.

4.4.2 - CULTURAS DE CÉLULAS ADERENTES ADIPOSEO-DERIVADAS HUMANAS (CAADh) EM MEIOS CONTENDO OS HIDROGÉIS DE HPMC

As CAADh foram cultivadas em triplicatas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por ml em 3 placas de 96 poços colocados em estufa a 37°C , contendo 5% de CO_2 . Cada placa correspondeu a um dos 3 tempos de avaliação, isto é, 24, 48, 72 h.

As placas foram divididas em 5 linhas (cada uma contendo uma triplicata) e identificadas por letras de A a E, correspondendo aos seguintes grupos:

- Linha A - CAADh em meio de cultura + HPMC pura;
- Linha B - CAADh em meio de cultura + HPMC-Si;
- Linha C - CAADh em meio de cultura + HPMC-RGDS;
- Linha D - CAADh em meio de cultura (controle negativo);
- Linha E - CAADh em meio de cultura + sulfato de cobre (controle positivo).

Na **linha A** as células foram cultivadas em presença de **50 µl de meio** contendo D-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (*fetal bovine serum* – FBS; Invitrogen, Carlsbad, USA), inativado durante 30 minutos a 56°C; 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/ml, 10.000 U/ml; Invitrogen, Carlsbad, USA) e 0,1% de gentamicina (10mg/ml; Invitrogen, Carlsbad, USA), misturados a **50 µl** de solução de **HPMC pura** preparada em uma proporção de **3/1** (v/v) com D-MEM (concentrado 1,4 vezes) em tubo Eppendorf® e agitado ao vórtex por 15 s.

Na **linha B** as células foram cultivadas em presença de **50 µl de meio** com as mesmas concentrações acima mencionadas, misturadas a **50 µl** de solução de **HPMC-Si** preparada em uma proporção de **3/1** (v/v) com **solução-tampão** em tubo Eppendorf® e agitado ao vórtex por 15 s.

Na **linha C** as células foram cultivadas em presença de **50 µl de meio** com as mesmas concentrações descritas na linha A, misturadas a **50 µl** de solução de **HPMC-RGDS** preparada em uma proporção de **3/1** (v/v) com D-MEM (concentrado 1,4 vezes) em tubo Eppendorf® e agitado ao vórtex por 15 s.

Na **linha D** as células foram cultivadas apenas em presença de **50 µl de meio** com as mesmas concentrações descritas na linha A, misturadas a **50 µl** de solução **PBS**

preparada em uma proporção de **3/1** (v/v) com D-MEM (concentrado 1,4 vezes) em tubo Eppendorf® e agitado ao vórtex por 15 s.

Na **linha E** as células foram cultivadas em presença de **50 µl meio** com as mesmas concentrações descritas na linha A, misturadas a **50 µl** de solução **PBS** preparada em uma proporção de **3/1** (v/v) com D-MEM (concentrado 1,4 vezes) em tubo Eppendorf® e agitado ao vórtex por 15 s, acrescido de **sulfato de cobre** (0,2 g/ml).

A distribuição dos grupos nas placas de cultura está representada na **Figura 2**.

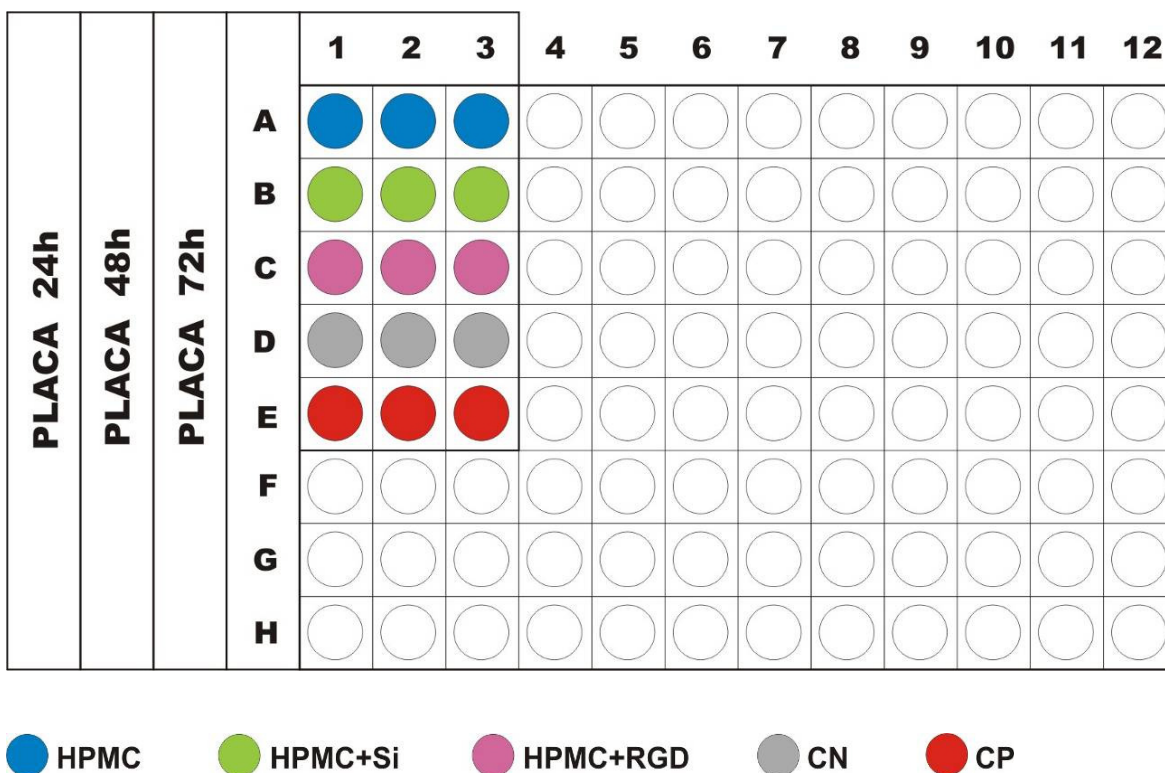


Figura 2: Esquema gráfico mostrando a distribuição das culturas em 3 placas de 96 poços. HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMC-Si: hidroxipropilmetilcelulose silanizada; HPMC-RGDS: hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

4.4.3 – DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS HIDROGÉIS ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

A determinação da citotoxicidade dos hidrogéis foi feita através da aplicação do teste de viabilidade celular com metiltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). O teste foi aplicado após 24, 48 e 72 horas de cultivo celular.

Este teste colorimétrico determina de maneira indireta e quantitativa a viabilidade das células em cultura. Um sal de tetrazolio é adicionado às culturas e as células viáveis convertem este sal em formazan. O produto colorido formado, que é proporcional à atividade desidrogenase das mitocôndrias, pode ter sua absorvância mensurada em 570 nm por espectrofotometria em leitora de ELISA (Benchmark, BIO-RAD, Hercules, USA). Os resultados são expressos em porcentagem em relação à condição controle (cultura convencional sem hidrogel).

A aplicação do teste cumpriu as seguintes etapas:

Após os respectivos tempos de incubação, nas condições anteriormente descritas, foram removidos os meios de cultura, com e sem os hidrogéis, e as células, aderidas ao fundo dos poços, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* – DPBS; Invitrogen, Carlsbad, USA) e incubadas por 4 horas a 37 °C, na presença de 50 µl de solução de MTT a 10% em D-MEM. A seguir ao tempo de reação, as placas foram colocadas no leitor ELISA para a determinação dos resultados.

4.5 - MÉTODOS ESTATÍSTICOS

O teste estatístico aplicado, de acordo com os resultados quantitativos, foi a Análise de Variância (*Analysis of Variance* - ANOVA).

5- RESULTADOS

5.1 - SOBRE A SÍNTESE DA HPMC-Si E SUA RETICULAÇÃO

O hidrogel de HPMC-Si a 3%, após sua síntese (com 6 ml de 3-GPTMS 97%), apresentava-se em um estado líquido viscoso e com pH de 12,9. O acréscimo do meio de cultura tampão (pH 3,6) na relação 3/1 (v/v) provocou a queda do pH para 7,4 e o hidrogel reticulou-se em 8 h, assumindo o estado de gelatina moldável, conforme demonstrado nas **Figuras 3, 4, 5 e 6**. À medida que houve o tamponamento da solução, a sua coloração modificou-se do amarelo para o rosa claro.



Figura 3: HPMC após sua síntese com silano (HPMC-Si). Verifica-se o aspecto viscoso do hidrogel antes de sua reticulação.

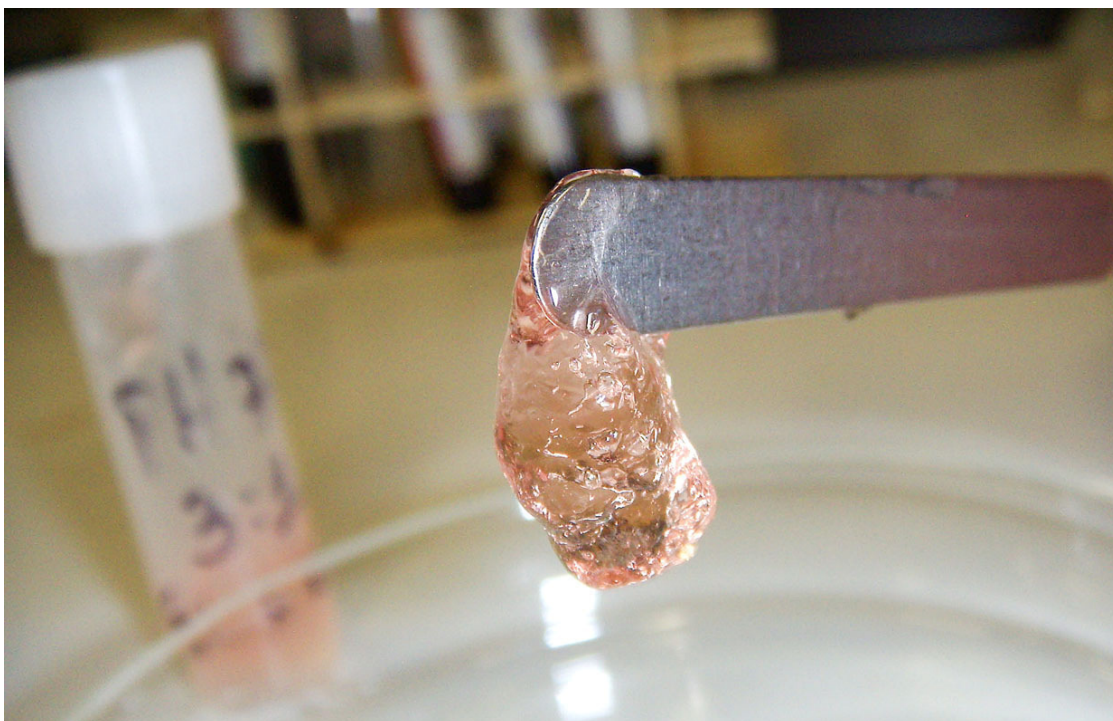


Figura 4: HPMC-Si. Verifica-se o aspecto gelatinoso do hidrogel após sua reticulação em função do pH.



Figura 5: Exemplo da capacidade moldável da HPMC-Si após sua reticulação (orelha).



Figura 6: Exemplo da capacidade moldável da HPMC-Si após sua reticulação (nervo periférico).

5.2 - SOBRE A SÍNTESE DA HPMC-RGDS

A cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography* – HPLC) demonstrou que houve consumo total do peptídeo R-G-D-S durante a reação química.

A análise por infravermelho confirmou a existência de ligações éster entre o tetrapeptídeo e o polímero de HPMC.

5.3 - SOBRE A VIABILIDADE DAS CAADh CULTIVADAS EM 2D NA PRESENÇA DOS HIDROGÉIS DE HPMC PURA, HPMC-Si E HPMC-RGDS E A DETERMINAÇÃO DE CITOTOXICIDADE DOS MESMOS

Os resultados descritos abaixo estão representados na **Tabela 1** e **Figura 7**.

- Os três hidrogéis presentes nas culturas não interferiram na viabilidade das células (% de atividade MTT), durante os 3 momentos observados, quando comparados com o grupo **CP** ($P < 0,001$);

- O grupo **CP**, por sua vez, através da presença do sulfato de cobre, apresentou uma baixa atividade MTT ($29,7\% \pm 2,9\%$);
- Os resultados quanto à viabilidade celular dos grupos contendo **HPMC pura** e **HPMC-RGDS** não apresentaram significância estatística em 24, 48 e 72 h, quando comparados com o grupo **CN** de acordo com as comparações múltiplas;
- O grupo contendo **HPMC-Si** interferiu mais na viabilidade celular em relação ao grupo **CN** após 72h, mas não demonstrou ser mais citotóxico quando comparado com os outros dois grupos contendo hidrogéis, de acordo com as comparações múltiplas.

Tabela 1: Viabilidade (% de atividade MTT) das CAADh Cultivadas na Presença de Hidrogéis de HPMC

Culturas	Tempo			P-valor
	24h	48h	72h	
HPMC	102,7 \pm 14,9 ^b	83 \pm 3,8 ^b	92,2 \pm 8,6 ^{bc}	0,138
HPMC-Si	90,9 \pm 6,5 ^b	82,8 \pm 8,8 ^b	81,8 \pm 4,9 ^b	0,282
HPMC-RGDS	98,2 \pm 3,3 ^b	103,4 \pm 11,7 ^c	95,4 \pm 3,7 ^{bc}	0,440
CN	99,6 \pm 0,3 ^b	100 \pm 2,4 ^{bc}	100 \pm 6,7 ^c	0,992
CP	33,2 \pm 2,2 ^a	27,8 \pm 0,1 ^a	28 \pm 1,1 ^a	0,008
P-valor	< 0,001	< 0,001	< 0,001	

MTT: ensaio colorimétrico com metiltetrazolio; CAADh: células aderentes adiposo-derivadas humanas; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose pura; HPMC-Si: hidroxipropilmetilcelulose silanizada; HPMC-RGDS: hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão; CN: controle negativo; CP: controle positivo. Os dados referem-se à média \pm o desvio padrão. Letras iguais indicam que as médias não diferem quanto à viabilidade em cada momento.

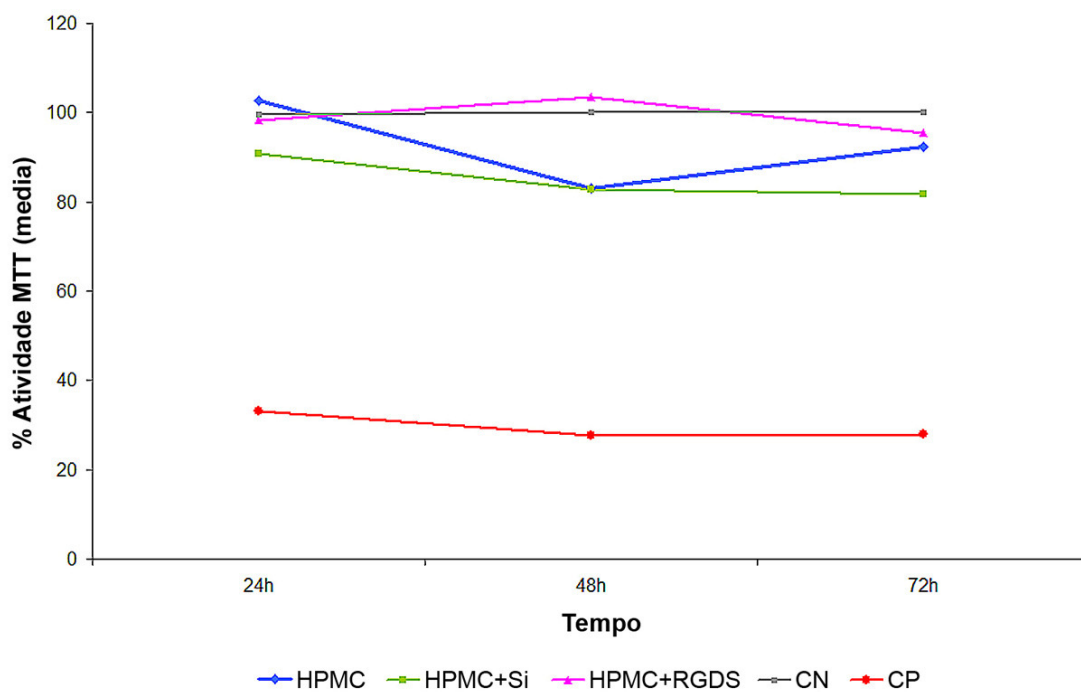


Figura 7: Viabilidade das células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh) cultivadas na presença de hidrogéis de HPMC em função do tempo. MTT: ensaio colorimétrico com metiltetrazolio; HPMC: hidroxipropilmetilcelulose; HPMC-Si: hidroxipropilmetilcelulose silanizada; HPMC-RGDS: hidroxipropilmetilcelulose com peptídeos de adesão; CN: controle negativo; CP: controle positivo.

6- DISCUSSÃO

Os estudos sobre regeneração de nervos periféricos, desenvolvidos pelo Prof. Dr. Jefferson Braga Silva, em conjunto com o Centro de Terapia Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas, partiram do princípio de se preencher a lacuna existente entre os dois cotos de um nervo lesado com células estromais mesenquimais multipotentes (CEMM).^{10,32} Estas células, primeiramente envolvidas em um gel viscoso, foram introduzidas no lúmen de um tubo de silicone, que, por sua vez, visava a orientar o crescimento axonal de um coto ao outro. O gel escolhido foi à base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), polímero derivado da celulose que tem seu uso consagrado nos campos da medicina e farmácia, sendo de fácil manipulação, disponibilidade e baixo custo. Naquele momento, sua função foi a de servir como um mero veículo de administração, que impedisse que as células extravasassem pelas bordas do tubo.

Hidrogéis, como a HPMC, estão entre os principais biomateriais utilizados na regeneração e engenharia de tecidos. Eles apresentam características favoráveis quando se idealiza um biomaterial que possa interagir com células precursoras, permitindo uma distribuição homogênea das mesmas e garantindo uma adequada difusão de nutrientes.^{21,24,29} Entretanto, paradoxalmente, a grande maioria dos hidrogéis carece de uma propriedade indispensável para o adequado funcionamento das células, quando estas se encontram circundadas por biomateriais desta natureza: adesão celular.^{24,27}

Partindo-se destes conceitos buscamos aprofundar os conhecimentos sobre o potencial oferecido pela HPMC como substrato análogo à matriz extracelular (*scaffold*), aplicável na regeneração e engenharia de tecidos.

Em um protocolo piloto, fibroblastos de camundongos (NIH3T3) foram cultivados no interior de um hidrogel de HPMC a 3%, associado a um meio de cultura (D-MEM). A observação do comportamento das células corroborou o princípio de que o polímero que as circundava, na sua forma pura, não oferecia nenhum substrato de adesão para elas. Após 5 dias verificamos, à microscopia ótica invertida (MOI), que as células assumiam um formato esférico, em conglomerados, sem apresentar a habitual característica de expansões citoplasmáticas indicativas de um funcionamento normal quando aderidas a alguma superfície (**Figura 8**).

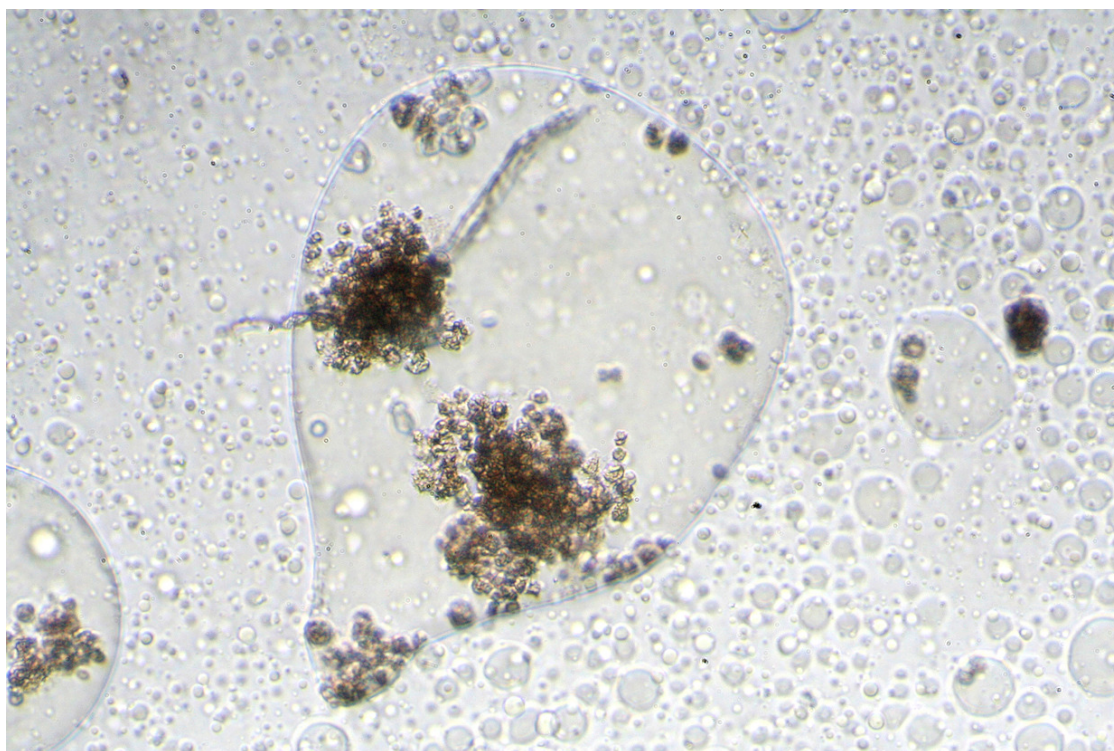


Figura 8: Fibroblastos de camundongos (NIH3T3) cultivados em 3D, no interior de hidrogel de HPMC pura a 3% (estudo piloto). Após 5 dias observa-se o conglomerado de células em formato esférico, englobadas pelo gel e sem as expansões citoplasmáticas características da adesão celular. MOI, aumento de 100 X.

A busca por relatos na literatura fez com que chegássemos aos trabalhos de Bourges e cols. (2002), Trojani e cols. (2005) e Vinatier e cols. (2005), os quais descrevem a síntese de um hidrogel à base de HPMC para ser aplicado em culturas

celulares tridimensionais e regeneração de tecidos como o osso e a cartilagem.^{34,59,60} A inovação trazida pelos autores explica-se pela associação de silano à estrutura do polímero (HPMC-Si), conferindo-lhe a capacidade de reticular-se e assumir, de maneira estável, a forma do defeito tecidual que se deseja corrigir. Em experimentos realizados *in vitro*, envolvendo a cultura tridimensional de células osteogênicas e condrócitos em meios contendo HPMC-Si, os autores relatam a propensão deste biomaterial para permitir a sobrevivência, proliferação e até mesmo diferenciação das células, inclusive com melhor desempenho, quando comparadas com culturas de células em monocamadas (2D).^{59,60} Três linhagens de osteossarcoma humano (CAL 72, MG-63 e SaOs-2) e células osteogênicas humanas normais (HOST) foram testadas no trabalho de Trojani, enquanto que duas linhagens de condrócitos humanos (SW 1353, C28/I2) e condrócitos primários isolados de articulação de coelho (RAC) foram as células testadas por Vinatier. As linhagens de osteossarcoma, assim como os condrócitos, quando cultivados no interior do hidrogel, assumiram uma conformação esferóide, organizadas em conglomerados que proliferaram a partir de uma célula. Os achados foram semelhantes aos observados em nosso protocolo piloto, mas isto não foi interpretado como problemático pelos autores.^{59,60} Trojani destaca, no entanto, que as células HOST, ainda que tenham permanecido viáveis por 3 semanas, não proliferaram, como foi visto com as demais.⁶⁰ Ciente da importância de se otimizar as interações entre hidrogel e células, Trojani chega a sugerir em seu artigo de 2005 a associação de moléculas específicas, fatores de crescimento ou enzimas ao polímero de HPMC-Si. Em 2006 ele publica um novo artigo, no qual a HPMC-Si, associada a fosfato de cálcio bifásico (*biphasic calcium phosphate [BCP]*), é aplicada como *scaffold* na formação ectópica de osso em camundongos.⁶⁷ Ele enfatiza a importância das partículas cerâmicas como estímulo à adesão, proliferação e diferenciação das células no interior do polímero. Inúmeros outros trabalhos, que aplicam hidrogéis como

scaffolds, também destacam a importância de se ofertarem propriedades que promovam a adesão celular aos polímeros. Segundo eles, a interação entre células e biomateriais através das integrinas é a chave para o desencadeamento das demais funções celulares.^{21,24,27,37,39-45}

A idéia de se aprimorar o hidrogel de HPMC (utilizado inicialmente como veículo para administração de células em sítios para se regenerar nervos), dando a ele características de *scaffolds*, partiu dos estudos acima mencionados. Ainda que a síntese de hidrogéis com peptídeos de adesão (R-G-D, R-G-D-S, entre outros) seja frequentemente citada pela literatura, a existência deste tipo de associação empregando-se a HPMC não foi verificada por nós até o presente momento.^{36,37,39-42,44,45} A partir da síntese desenvolvida por Bourges (HPMC-Si) e as observações descritas por Trojani, incluindo BCP ao biomaterial, sintetizamos, em uma primeira etapa, a **HPMC-Si** e, a seguir, a HPMC com a cadeia de peptídeos arginina- glicina- ácido aspártico- serina, resultando no polímero **HPMC-RGDS**. Desenvolver um *scaffold* contendo simultaneamente as propriedades resultantes das duas sínteses (HPMC-Si/ RGDS), isto é, moldável e munido de sítios aptos a interagir com integrinas, constou entre os nossos interesses iniciais, mas extrapolou as intenções do presente estudo.

A síntese da HPMC-Si realizada por nós seguiu as etapas detalhadas por Bourges e cols. em seu artigo publicado em 2002.³⁴ Entretanto, os autores descrevem inúmeros testes realizados para se avaliar a cinética da autorreticulação, através dos quais eles demonstram que o tempo de endurecimento do gel (viscosidade = 1×10^5 mPa s) depende de diferentes fatores como a concentração da solução-tampão e do pH final, da concentração de silano (3-GPTMS) no polímero, como também da temperatura. Seus resultados mostram que, conforme o tampão utilizado, quanto menor for o pH no final da reação, menor será a velocidade de reticulação do gel. Quanto maior for a concentração de silano no polímero, mais rápido será o endurecimento do

gel. Em relação à temperatura, esta, quando alta, catalisa a reticulação do polímero. A determinação de tais parâmetros contribui no ajuste das condições que envolvem a síntese do hidrogel, permitindo melhor controle sobre sua reticulação e sobre sua aplicação em testes *in vitro* ou *in vivo*. Nossa realidade não permitiu análise tão aprofundada sobre o comportamento da HPMC-Si por nós sintetizada. Cumpridas as etapas da síntese prevista pelos autores, pudemos nos ater a uma análise descritiva, através da qual constatamos a ocorrência de reticulação do hidrogel. Em nosso caso chegamos a uma solução viscosa e alcalina de HPMC-Si a 3%, sintetizada a partir de 6 ml de 3-GPTMS a 97%. Com o acréscimo de uma solução-tampão (pH 3,6), a reticulação se deu por completo após 8 h de observação, chegando-se a um pH de 7,4. Com parâmetros semelhantes, Bourges conseguiu a reticulação do seu gel em bem menos tempo (entre 15 e 20 minutos). Entretanto, as soluções-tampão e suas concentrações utilizadas foram diferentes. Uma análise mais aprimorada e a repetição dos experimentos certamente nos levaria a um controle melhor sobre o comportamento da reticulação do polímero. Mas o resultado obtido ainda assim é positivo em nossa opinião, visto termos chegado a um gel moldável, semelhante ao descrito por Bourges e mais versátil para a aplicação como *scaffold* do que a HPMC pura.

Em se tratando de se associar peptídeos de adesão a polímeros, Hersel e cols., em sua revisão de 2003, discorrem sobre alguns aspectos importantes que devem ser salientados quando se busca este tipo de síntese e suas interações envolvendo células.³⁶ Segundo eles, os primeiros estudos procuravam cobrir superfícies poliméricas com proteínas inteiras como fibronectina, colágeno ou laminina. O uso destas proteínas, entretanto, apresenta algumas desvantagens sob o ponto de vista da aplicação clínica. Elas precisam ser isoladas de outros organismos e purificadas. Com isso, respostas imunológicas indesejáveis, assim como infecções, podem se desencadear. Além disso, elas estão sujeitas à degradação proteolítica. Em

contrapartida, pequenas sequências de peptídeos sobressaem-se a proteínas inteiras quando o objetivo é enriquecer polímeros na busca por se criarem análogos da matriz extracelular. Peptídeos são estáveis frente a diferentes condições de esterilização e variações de pH e suas sequências curtas (de até 3 peptídeos) combinam-se com as integrinas, receptores responsáveis não só pela ancoragem das células, mas também por funções como diferenciação, respostas imunes e hemostasia. Proteínas inteiras apresentam diferentes sítios de reconhecimento celular, enquanto que o uso de peptídeos restringe estas combinações às integrinas, permitindo o estudo mais específico de determinadas funções celulares.

Ligações estáveis entre peptídeos e polímeros são essenciais para uma adesão celular forte. Do contrário, peptídeos acabam por inibir esta função primordial, levando a célula à apoptose.³⁶ A ocorrência destas ligações pode ser confirmada por análise direta sobre a reação química, como também pela avaliação indireta, através da análise *in vitro* de funções celulares, quando da presença dos polímeros modificados. A verificação de aspectos como adesão, proliferação e reorganização do citoesqueleto traduz a influência da presença de peptídeos nos hidrogéis, ao serem comparados com grupos-controle (hidrogéis não modificados, ou com peptídeos inativos).

Outro fato exposto por Hersel e outros pesquisadores é quanto à importância de se determinar o arranjo espacial da sequência peptídica, bem como a sua densidade e distribuição na trama polimérica.^{36,37,39,42} Segundo eles isto pode ser significativo na modulação de respostas celulares.

Em nível molecular, similar à apresentação de uma sequência R-G-D em uma alça de proteína, o tripeptídeo deve estar exposto, quando presente em uma cadeia molecular artificial, a fim de alcançar o componente ligante da integrina. Espaçadores moleculares de oligoglicinas (*spacers*) podem ser necessários e introduzidos na

sequência peptídica, facilitando sua exposição e permitindo que a célula tenha a resposta necessária.^{36,39,42}

A densidade e a distribuição de peptídeos em uma matriz análoga são, da mesma forma, determinantes na ancoragem celular e na formação de adesões focais. A análise da densidade de R-G-D em superfícies contendo células permitiu a Massia e Hubbell (1991) que encontrassem valores mínimos necessários para que elas exercessem tais funções (1 fmol peptídeo RGD/ cm² para ancoragem e 10 fmol/ cm² para adesões focais).³⁶ DeLong e cols. (2005) desenvolveram hidrogéis de polietileno glicol (PEG) com R-G-D-S distribuídos e imobilizados em diferentes gradientes. Fibroblastos postos em cultura na presença dos polímeros alinharam-se de acordo com o eixo do gradiente, migrando na direção das maiores concentrações de peptídeos.³⁷

Nossa realidade permitiu-nos dar um passo inicial, buscando a inovação na síntese de um polímero usado na regeneração de tecidos (HPMC) com peptídeos de adesão (R-G-D-S), com o intuito de aprimorá-lo funcionalmente. As reações químicas realizadas foram acompanhadas por testes que permitiram comprovar a ocorrência de síntese estável entre as moléculas (cromatografia líquida de alta eficiência e infravermelho). O aspecto final do experimento fez com que obtivéssemos um polímero sólido, em finas lâminas, que, misturado a uma solução de PBS, adquiriu, bem como as demais celulosas estudadas, um aspecto viscoso. A síntese obtida através de ligações covalentes corrobora um dos conceitos estabelecidos dentro do objetivo de se criarem *scaffolds* a partir de hidrogéis. Porém uma análise mais aprofundada, envolvendo outros aspectos acima mencionados, sobretudo no que diz respeito a uma real aplicabilidade do biomaterial (HPMC-RGDS) em culturas tridimensionais, excedeu as intenções do presente estudo.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization* - ISO 10993-5), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro

teste realizado para se avaliar a biocompatibilidade de qualquer material com aplicação biomédica, incluindo-se aqui, naturalmente, *scaffolds*.^{59,69} O parâmetro mais utilizado para se avaliar citotoxicidade é a viabilidade celular, a qual pode ser evidenciada através de corantes vitais, que, ao serem absorvidos ou metabolizados pelas células vivas, resultam em diferentes intensidades de cor que podem ser lidas de maneira objetiva por um espectrofotômetro.

A partir da síntese dos dois polímeros à base de HPMC, funcionalizados com silano e com R-G-D-S, partiu-se para o teste de citotoxicidade. O ensaio escolhido foi o MTT e seguiu protocolo semelhante ao descrito por Vinatier e cols. (2005).⁵⁹ As etapas estão detalhadas no item 4.4.3 da sessão “Materiais e Métodos”.

Acreditamos que, de acordo com a ênfase em se determinar a citotoxicidade dos polímeros, uma análise incluindo diferentes linhagens celulares poderia contribuir a esse fim, oferecendo um caráter mais abrangente para o teste. Entretanto, os biomateriais foram testados em contato com células aderentes adiposo-derivadas humanas (CAADh). Linhagens preestabelecidas podem apresentar baixa sensibilidade a alguns sinais citotóxicos e, neste caso, culturas primárias acabam sendo mais indicadas. Além disso, o tecido adiposo tem demonstrado ser um sítio rico em CEMM, e sua grande disponibilidade, a partir da obtenção por lipoaspirados, tem resultado em um aumento de seu emprego nos campos da regeneração e engenharia de tecidos.

Ainda que os hidrogéis tenham sido desenvolvidos com a intenção de interagir tridimensionalmente com as células, o teste de citotoxicidade foi realizado por contato direto dos biomateriais com as células cultivadas em monocamada, em placas de 96 poços. O protocolo descrito por Vinatier relata a necessidade de se removerem os hidrogéis misturados com meio de cultura dos poços, após os períodos estudados (24, 48 e 72 h), para então se acrescentar o reagente MTT sobre as células e, a partir daí, determinar sua leitura.⁵⁹ O autor chega a descrever também outro teste de viabilidade

celular, envolvendo condrócitos cultivados tridimensionalmente em contato com HPMC-Si. Porém a aplicação deste protocolo nos impôs limitações técnicas, visto que a leitura dos resultados deveria se dar por microscopia confocal, indisponível durante o período de realização da pesquisa.

Quanto aos resultados, pudemos constatar que as células cultivadas em contato com os hidrogéis de modo geral não sofreram interferências em sua viabilidade, apresentando resultados semelhantes ao grupo-controle negativo (CN), nos três momentos analisados. Mesmo que a viabilidade das células cultivadas na presença de HPMC-Si tenha sido menor que o CN, após 72 h, seu resultado foi significativamente superior, quando comparado com o controle positivo. Além do mais, Vinatier já demonstrara em seu artigo a incapacidade da HPMC-Si de interferir em culturas de condrócitos.⁵⁹ Para nós, a novidade ficou marcada pela HPMC-RGDS, a qual demonstrou ser atóxica, com um desempenho bastante regular ao longo de todo o período analisado.

7- CONCLUSÃO

A HPMC pôde ser sintetizada com silano (HPMC-Si), conforme proposto por Bourges e cols. (2002), o que conferiu ao polímero a propriedade de reticular-se em função de uma mudança de pH.³⁴ Esta propriedade permite que o hidrogel se modele à forma do defeito tecidual que se desejar corrigir, dando a ele uma característica de *scaffold*.

A HPMC pôde ser sintetizada com o tetrapeptídeo de adesão (HPMC-RGDS), permitindo que o polímero tivesse em sua estrutura sítios que favorecessem a adesão de células em seu interior. O efeito da presença dos peptídeos no hidrogel de HPMC sobre a adesão e outras funções celulares precisa ser confirmado com outros testes.

Os três polímeros à base de HPMC demonstraram ser atóxicos, quando colocados em contato com CAADh em culturas bidimensionais. Esta primeira etapa de testes permite que se siga adiante, aplicando-se os polímeros sintetizados com novos elementos em outros experimentos relacionados à engenharia de tecidos.

Em termos gerais foi possível realizar modificações no gel de HPMC, no intuito de agregar a sua estrutura funções características de *scaffolds*. Entretanto, ainda que sejam atóxicos em contato com culturas de células em monocamada, testes de citotoxicidade em 3D são imprescindíveis para se confirmar sua efetividade como *scaffolds* aplicáveis em regeneração e engenharia de tecidos.

8– REFERÊNCIAS/ FONTES CONSULTADAS

1. Saraf S. Sushruta: Rhinoplasty in 600 B.C. The Internet Journal of Plastic Surgery [serial on the Internet]. 2007; 3(2).
2. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, et al. Science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation* 2008 Sep 15;86(5):627-35.
3. Mélega JM, Freitas AG. Biologia da cicatrização. In: Mélega JM, editor. *Cirurgia plástica fundamentos e arte - princípios gerais*. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002. p. 9-14.
4. Stanworth SJ, Newland AC. Stem cells: progress in research and edging towards the clinical setting. *Clin Med* 2001 Sep-Oct;1(5):378-82.
5. Borelli P. Célula-tronco. In: Peres C, Curi R, editors. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 54-8.
6. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* 2006(174):249-82.
7. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001 Apr;7(2):211-28.
8. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002 Dec;13(12):4279-95.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
10. Paula S, Pedroso MF, Dalbem A, et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso *Scientia Medica* 2005;15(4):263-9.
11. Young HE, Duplaa C, Katz R, et al. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med* 2005 Jul-Sep;9(3):753-69.
12. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
13. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg* 2006 Sep;118(3 Suppl):108S-20S.
14. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007 Apr;211(1):27-35.
15. Rigotti G, Marchi A, Galie M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 2007 Apr 15;119(5):1409-22; discussion 23-4.
16. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* 2006 Nov;13(6):419-25.

17. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature* 2003 Aug 21;424(6951):870-2.
18. Ahsan T, Nerem RM. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthod Craniofac Res* 2005 Aug;8(3):134-40.
19. Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005 Aug;13(4):233-41.
20. Atala A, Nyberg LM. Tissue engineering. *World J Urol.* [Editorial]. 2000;18(1):Editorial.
21. Elisseeff J, Puleo C, Yang F, et al. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res* 2005 Aug;8(3):150-61.
22. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006 Jul-Sep;10(3):569-76.
23. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, et al. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991 Nov;88(5):753-9.
24. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 2003 Nov;24(24):4337-51.
25. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, et al. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng* 2007 Aug;13(8):1905-25.
26. Gomes M, Azevedo H, Malafaya P, et al. Natural polymers in tissue engineering applications. In: van Blitterswijk C, Lindhal A, Thomsem P, Williams DF, Hubbell J, Cancedda R, editors. *Tissue engineering*: Elsevier; 2008. p. 145-92.
27. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol* 2000 Feb;18(1):2-9.
28. Trevors JT, Pollack GH. Hypothesis: the origin of life in a hydrogel environment. *Prog Biophys Mol Biol* 2005 Sep;89(1):1-8.
29. Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 Sep 22;56(11):1635-47.
30. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008 Jul;29(20):2941-53.
31. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br]* 1999 Dec;24(6):703-6.
32. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, et al. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol* 2008 Aug;33(4):488-93.

33. Merle M, Dautel G, Dap F. Chirurgie secondaire des plaies des nerfs périphériques. In: Merle M, Dautel G, editors. *La main traumatique 2/ Chirurgie secondaire Le poignet traumatique*. Paris: Masson; 1995. p. 147-76.
34. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, et al. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci* 2002 Dec 2;99(3):215-28.
35. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005;41(2):143-54.
36. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003 Nov;24(24):4385-415.
37. DeLong SA, Gobin AS, West JL. Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. *J Control Release* 2005 Dec 5;109(1-3):139-48.
38. Gobin AS, West JL. Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. *Faseb J* 2002 May;16(7):751-3.
39. Hern DL, Hubbell JA. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res* 1998 Feb;39(2):266-76.
40. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability. *Matrix Biol* 2005 May;24(3):208-18.
41. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999 Jan;20(1):45-53.
42. Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2004 Feb 1;68(2):365-75.
43. Stile RA, Healy KE. Thermo-responsive peptide-modified hydrogels for tissue regeneration. *Biomacromolecules* 2001 Spring;2(1):185-94.
44. Woerly S, Pinet E, de Robertis L, et al. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials* 2001 May;22(10):1095-111.
45. Yang F, Williams CG, Wang DA, et al. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005 Oct;26(30):5991-8.
46. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007 May;28(5):219-26.
47. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7(5):393-5.

48. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: *Biologia molecular da célula*. 4a ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004. p. 1065-125.
49. Lai CF, Cheng SL. Alphavbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2005 Feb;20(2):330-40.
50. Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng* 2005 Nov;33(11):1469-90.
51. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.
52. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol* 1997 Apr 7;137(1):231-45.
53. Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res* 2003 Aug;36(8):959-66.
54. Zahir N, Weaver VM. Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev* 2004 Feb;14(1):71-80.
55. Ortega-Velazquez R, Diez-Marques ML, Ruiz-Torres MP, et al. Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide stimulates transforming growth factor beta1 transcription and secretion through integrin activation. *Faseb J* 2003 Aug;17(11):1529-31.
56. Martins AKA, Boaventura MFC, Lima MMR. Cultivo de Linhagens Permanentes. In: Peres C, Curi R, editors. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 41-9.
57. Marler JJ, Guha A, Rowley J, et al. Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2000 May;105(6):2049-58.
58. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997 Aug;100(2):297-302; discussion 3-4.
59. Vinatier C, Magne D, Weiss P, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005 Nov;26(33):6643-51.
60. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 2005 Sep;26(27):5509-17.
61. Wang X, Yan Y, Pan Y, et al. Generation of three-dimensional hepatocyte/gelatin structures with rapid prototyping system. *Tissue Eng* 2006 Jan;12(1):83-90.
62. Vallandro L. *Dicionário inglês-português, português- inglês*. 18 ed. São Paulo: Globo; 1995.

63. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004 Feb;22(2):80-6.
64. Mertsching H, Walles T, Hofmann M, et al. Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation. *Biomaterials* 2005 Nov;26(33):6610-7.
65. Schneider GB, English A, Abraham M, et al. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* 2004 Jul;25(15):3023-8.
66. Midha R, Munro CA, Dalton PD, et al. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 2003 Sep;99(3):555-65.
67. Trojani C, Boukhechba F, Scimeca JC, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006 Jun;27(17):3256-64.
68. Lemos MA. Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008. 47p.
69. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research* 2003;6(3):317-20.

9– ANEXOS

COVER LETTER

Dear Editor,

Please find attached an original article entitled “Citotoxicity of modified hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for use in tissue engineering and regeneration,” which we would like you to consider for publication in *Plastic and Reconstructive Surgery*.

The manuscript has not been submitted to any other journals, and will not be submitted elsewhere while under consideration by *Plastic and Reconstructive Surgery*. If the paper is accepted for publication in the journal, it will not be published elsewhere, either in similar form or verbatim, without permission of the publisher.

All authors declare that they have no conflicts of interest. In addition, all authors have read and approved the manuscript as submitted, are qualified for authorship, believe the submission represents honest work and take full responsibility for the reported findings.

We look forward to hearing from you regarding the status of our manuscript. In the meantime, please feel free to contact us if you need any additional information.

Sincerely,

Paulo Pereira de Souza Favalli
Corresponding author
Av. Lavras, 511/304, Petrópolis
Porto Alegre, RS – Brazil
CEP: 90460-040
Tel.: +55 51 3029-9858; + 55 51 3013-8837
Mobile: + 55 51 9865-8363
Fax: + 55 51 3019-5899
e-mail: plastica@paulofavalli.com.br

AUTHOR FORMS

Enkwell Corresponding Author Last Name (Please Print)

PRS-D- _____
Enkwell Number

AUTHOR FORMS

Please complete and sign all three forms.

Form 1. Prior Publication Certification

This manuscript contains original material. Neither the article nor any part of its essential substance, Tables or figures has been or will be published elsewhere before appearing in PRS.

Signed: [Signature] [Signature] [Signature]
Paulo Pereira de Souza FAVALLI

2. Some of the material in this paper has been, or is being published elsewhere. Details are in the appended letter.

Signed: _____

Form 2. Assignment of any and all copyright

In consideration of the American Society of Plastic Surgeons, Inc. (ASPS) taking action in reviewing and editing my (our) submission, the author(s) undersigned hereby transfer, assign and otherwise convey all copyright ownership to ASPS in the event that such work is published by the ASPS.

Must be signed by all Authors:

Signed: [Signature] [Signature] Date: 02-SET-2009

Signed: JEFFERSON BRAGA SILVA - [Signature] Date: 04-SET-2009

Signed: DENISE CANTARELLI MACHADO [Signature] Date: 04-SET-2009

Signed: PAULO PEREIRA DE SOUZA FAVALLI [Signature] Date: 04-SET-2009

Signed: _____ Date: _____

Signed: _____ Date: _____

Signed: _____ Date: _____

Form 3. Conflict of Interest Disclosure statement by an Author of a manuscript submitted to *Plastic and Reconstructive Surgery*®

I, (We) PAULO PEREIRA DE SOUZA FAVALLI, have submitted for publication in *Plastic and Reconstructive Surgery*® a manuscript entitled: "Citotoxicity of modified hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for use in tissue engineering and regeneration"

I, (We) hereby certify, that:


No financial support or benefits have been received by me or any co-author, by any member of my (our) immediate family or any individual or entity with whom or with which I (we) have a relationship from any commercial source which is related directly or indirectly to the scientific work which is reported on in the article except as described below.


{I (we) understand an example of such a financial interest would be a consulting relationship or stock interest in any business entity which is included in the subject matter of the manuscript or which sells a product relating to the subject matter of the manuscript.}

In addition to filling out and signing this declaration, *I acknowledge that I (we) also made complete disclosure in the manuscript itself*, stating all sources of funds that have supported this work and also a statement of financial interest, if any. Each author on the manuscript has disclosed any commercial association or financial disclosure that might pose a conflict of interest with information presented in this manuscript. *If the authors have no financial interest or commercial association with any of the subject matter or products mentioned in our manuscript, that too will be indicated.* I (we) hereby agree that such disclosures will be printed with the manuscript if it is accepted.

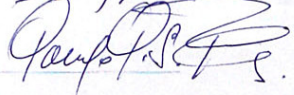
Furthermore, I (we) understand that potential sanctions may be imposed by *Plastic and Reconstructive Surgery* for violation of this complete disclosure policy. I (we) understand that potential disciplinary actions may include warning letters, refusal to publish an article in question, retraction of a published paper, notification to our primary institution, and/or exclusion from publication in *Plastic and Reconstructive Surgery* for a specified time frame.

The corresponding author has the obligation of having any and all co-authors sign this form and date his or her signature.

 01-SET-2009
Signature and Date

JACKSON BRAGA SILVA  04-SET-2009
Signature and Date

DENISE CANTARELLI MACHADO  04-SET-2009
Signature and Date

PAULO PEREIRA DE SOUZA FAVALLI  04-SET-2009
Signature and Date

"Plastic and Reconstructive Surgery" SUBMISSION CONFIRMATION

Author's Decision Thank you for approving "Citotoxicity of modified hydroxypropyl met hydrogels for use in tissue engineering and regenerat

http://www.editorialmanager.com/prs/process_submission_decision.asp?docid=14157&...

De: em.prs.0.1579fa.828e30db@editorialmanager.com em nome de Plastic and Reconstructive Surgery [PRS@Plasticsurgery.org]
Enviado em: sexta-feira, 4 de setembro de 2009 20:33
Para: plastica@paulofavalli.com.br
Assunto: PRS Submission Confirmation for Citotoxicity of modified hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for use in tissue engineering and regeneration

Dear Mr. Favalli,

Your submission entitled "Citotoxicity of modified hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for use in tissue engineering and regeneration" has been received by the journal editorial office.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to PRS' enkwel as an author.

<http://prs.edmgr.com/>

username: paulofavalli
password: Favalli342366

YOUR MANUSCRIPT WILL BE GIVEN A REFERENCE NUMBER ONCE AN EDITOR HAS BEEN ASSIGNED.

Thank you for submitting your work to this journal. We will notify you as soon as it is reviewed.

Kind Regards,

Rod J. Rohrich, M.D.
Editor
Plastic and Reconstructive Surgery

MANUSCRIPT

Cytotoxicity of modified hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogels for use in tissue engineering and regeneration¹

Paulo P. S. Favalli, M.D.

Denise C. Machado, Ph.D.

Brenno A. D. Neto, Ph.D.

Jefferson Braga-Silva, Ph.D.

PPSF – Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

DCM – Cell Therapy Center, Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

BADN – Laboratory of Medicinal and Technological Chemistry, Instituto de Química, Universidade de Brasília (IQ-UnB), Brasília, DF, Brazil. School of Pharmacy, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

JBS – Surgery Department, School of Medicine, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. Chief, Hand Surgery and Reconstructive Microsurgery, Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil.

Running head

HPMC hydrogels for use in tissue engineering

¹ This study was presented at the 2006 and 2007 Scientific Meetings held at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil, and at the 44th Brazilian Congress on Plastic Surgery, held in Curitiba, Brazil, from November 14 to 17, 2007.

CORRESPONDING AUTHOR CONTACT INFORMATION

Paulo Pereira de Souza Favalli

Av. Lavras, 511/304, Petrópolis

Porto Alegre, RS – Brazil

CEP: 90460-040

Tel.: +55 51 3029-9858; + 55 51 3013-8837

Mobile: + 55 51 9865-8363

Fax: + 55 51 3019-5899

e-mail: plastica@paulofavalli.com.br

FINANCIAL DISCLOSURE AND PRODUCTS

This study received a grant from the National Counsel of Technological and Scientific Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq).

None of the authors has a financial interest in any of the products, devices or drugs mentioned in this article.

Products used in the manuscript

- HPMC (METHOCEL E4M[®]; Colorcon Brasil/Dow Chemicals, Midland, MI, USA);
- 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (97% 3-GPTMS; ACROS Organics, Geel, Belgium);
- Spectra/Por membrane 1, 6-8 k (Bioagency, São Paulo, Brazil);
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Invitrogen, Carlsbad, USA);
- HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Adhesion peptides with four amino acids (90% pure RGDS; Invitrogen, Carlsbad, USA);
- Phosphate buffered saline solution (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, USA);
- Penicillin-streptomycin (10 000 g/mL, 10 000 U/mL; Invitrogen, Carlsbad, USA);
- Gentamicin (10 mg/mL; Invitrogen, Carlsbad, USA);
- Eppendorf[®] tubes;
- Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);
- ELISA reader spectrophotometer (Benchmark; BIO-RAD, Hercules, USA);
- Dulbecco's phosphate buffered saline solution (DPBS; Invitrogen, Carlsbad, USA).

ABSTRACT

Background: Tissue engineering and regeneration involves the use of multipotent precursor cells associated with biomaterials, which should provide a three-dimensional environment similar to the extracellular matrix found in living organisms. The objective of this study was to enhance a hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hydrogel with two scaffold properties, via independent processes, so as to produce a hydrogel capable of being molded or favorable for three-dimensional cell adhesion.

Methods: The moldable property was obtained with the synthesis of silane on HPMC (Si-HPMC), as previously reported. In a parallel experiment, HPMC was synthesized with RGDS adhesion peptides (RGDS-HPMC) through direct esterification, to allow the establishment of three-dimensional cell cultures. The three hydrogels (pure HPMC, Si-HPMC, and RGDS-HPMC) were cultured in contact with human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells and assessed for cytotoxicity using the MTT assay (ISO 10993-5). A comparison was performed between the groups and also with negative (NC) and positive controls (PC) after incubation for 24, 48, and 72 hours.

Results: Si-HPMC synthesis allowed pH-controlled auto-cross-linking, which caused the originally viscous hydrogel to acquire a gelatin state, moldable according to the defect to be corrected. Infrared analysis of the RGDS-HPMC hydrogel revealed the existence of ester bonds between the tetrapeptide and the HPMC polymer, confirming the presence of adhesion sites. No impact on cell viability (% MTT activity) was recorded at the three incubation times with any of the hydrogels when compared to PC ($P < 0.001$).

Conclusions: Our experiment allowed HPMC to be enhanced, and both Si-HPMC and RGDS-HPMC proved to be nontoxic when in contact with two-dimensional cell cultures. Three-dimensional cytotoxicity tests should be performed to confirm the effectiveness of Si-HPMC and RGDS-HPMC hydrogels as suitable scaffolds for use in tissue engineering and regeneration.

Man's search for the repair of damaged tissue has started several centuries ago. Among the earliest records of this quest, the compendium *Sushruta Samhita*, written in India and dating from approximately 600 BC, describes the bases of the "traditional Indian method of rhinoplasty."¹ The medieval painting of Fra Angelico, entitled "The miracle of Saint Cosmas and Damian," also illustrates this human interest, by showing the saints performing a leg transplant in a wounded deacon.

To date, nasal reconstruction follows many of the guidelines described in the ancient Indian report, and the transplant of composite tissues including hands and even facial regions is currently a reality thanks to the microsurgery techniques available and to a better control of immunosuppression in recipient patients.² Nevertheless, many diseases still depend on alternatives for tissue regeneration. The extensively studied scarring process is a limited repair mechanism in our organism: it replaces wounded tissue but is incapable of preserving the same functionalities of native, healthy tissues.³

In the last decades, a specific group of cells has become the focus of special attention among scientists due to the presence of some characteristics that meet the need for developing new tissue regeneration therapies. The generally called stem cells proliferate and differentiate into specialized tissues, and are therefore useful in the repair of tissues susceptible to wounds. Some therapeutic applications of stem cells are already well established, such as the use of hematopoietic cells in bone marrow transplants.⁴⁻⁵ Mesenchymal stem cells, in their turn, have lately been found to present some characteristics that reinforce the clinical applicability of these cells for tissue regeneration, such as their accessibility, plasticity, and capacity of being isolated *in vitro*.⁴⁻¹⁶

Tissue engineering involves the use of multipotent precursor cells associated with biomaterials, which should provide a three-dimensional environment similar to the extracellular matrix (ECM) found in living organisms (as a scaffold).^{6,17-24} Hydrogels stand out in the search

for these scaffolds, due to the presence of important biocompatibility properties. However, most hydrogels seem to lack an indispensable property for the adequate functioning of stem cells when surrounded by biomaterials, namely, cell adhesion.²⁵⁻³²

Contact between stem cells and ECM is mediated by integrins, which are present in cell membranes. Integrins interact specifically with the tripeptide sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid), which is found in fibronectins and other proteins present in the matrix, triggering numerous vital functions for cells. This has led to the search for different strategies aimed at promoting cell adhesion in different hydrogel scaffolds, including the incorporation of RGD sequences (or similar ones, such as RGDS and REDV) to several polymers.²⁵⁻³²

The authors' previous experience with the application of multipotent mesenchymal stromal cells to peripheral nerve regeneration through the use of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) has led to an interest in enhancing this polymer with two scaffold properties, via independent processes, so as to produce a hydrogel either capable of being molded or favorable for three-dimensional cell adhesion.^{10,33-37}

The development of a moldable property was obtained from the synthesis of silane on HPMC (Si-HPMC), as described by Bourges et al.,³⁶ which allows gel cross-linking as a result of the change in pH. In a parallel experiment, HPMC was synthesized with RGDS (arginine-glycine-aspartic acid-serine) adhesion peptides (RGDS-HPMC) through direct esterification.³⁸⁻⁵⁰

Even though a future goal of the authors is to test the effectiveness of modified hydrogels as scaffolds in three-dimensional cultures, the present study focused on assessing the cytotoxicity of three types of hydrogel, pure HPMC, Si-HPMC and RGDS-HPMC, in two-dimensional cultures of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells, comparing cytotoxicity results between the different hydrogels and also with negative and positive controls.

MATERIAL AND METHODS

Bioethical aspects

The present study is in accordance with sections III.3.i and III.3.t of the Brazilian Regulatory Norms and Guidelines for Research Involving Human Beings (Resolution CNS 196/96). The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil, under protocol no. CEP 07/03668.

HPMC hydrogel preparation

Pure HPMC solution preparation

A transparent viscous solution of 3% HPMC was obtained by dissolving 0.3 g of HPMC powder (METHOCEL E4M[®]; Colorcon Brasil/Dow Chemicals, Midland, MI, USA) in 10 mL of distilled water. The solution was sterilized in an autoclave at 121 °C for 30 minutes.

Synthesis of silane on HPMC (Si-HPMC)

a) Si-HPMC powder synthesis

A ball glass (tricol: 1L) was used to mix 316 mL of n-heptane with 70 mL of propanol-1. Two grams of sodium hydroxide and 38.6 grams of HPMC (METHOCEL E4M[®], Colorcon Brasil/Dow Chemicals, Midland, MI, USA) were added under constant agitation. The mixture was kept at room temperature under nitrogen gas. After 45 min, 6 mL of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (97% 3-GPTMS, ACROS Organics, Geel, Belgium) were added to the solution and heated to 100 °C. Synthesis occurred by ebullition during 3 hours. Subsequently, when the solution reached 40 °C, 5 mL of acetic acid were added to neutralize the reaction. Next, the mixture was filtered and washed two times with 50 mL of acetone. The

resulting powder was vacuum-dried at 50 °C for 1 hour, and then the dry powder was washed three times with a 500 mL mixture of acetone and water (85:15 v/v). Finally, the Si-HPMC powder was dried overnight at 50 °C.

b) Si-HPMC solution preparation

Six grams of Si-HPMC powder were dissolved in 200 mL of 0.2 M NaOH solution. This mixture was agitated for 48 hours and subsequently dialyzed (Spectra/Por membrane 1, 6-8 k; Bioagency, São Paulo, Brazil) for 16 hours in 0.09 M NaOH solution. A second dialysis was performed in 0.09 M NaOH solution for another 2 hours; the resulting 3% Si-HPMC solution (pH 12.9) was then sterilized in an autoclave at 121 °C for 30 minutes.

c) pH-controlled Si-HPMC hydrogel cross-linking

The buffer solution was prepared with Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Invitrogen, Carlsbad, USA) at a 1.4 concentration, supplemented with 0.26 mM NaHCO₃ and 0.13 M HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The pH was adjusted to 3.6 with HCl, resulting in a dark yellow buffer medium.

Cross-linking was induced by adding the buffer solution (pH 3.6) to the Si-HPMC solution (pH 12.9) at a 1:3 v/v ratio. The mixture was agitated by vortex for 15 seconds. The final pH of the hydrogel remained at 7.4, monitored by a pH meter. As the solution was buffered, its color changed from dark yellow to light pink.

Synthesis of RGDS adhesion peptides on HPMC (RGDS-HPMC)

a) RGDS-HPMC polymer synthesis

Two grams of HPMC (METHOCEL E4M[®]; Colorcon Brasil/Dow Chemicals, Midland, MI, USA) were dissolved in benzene at 80 °C. A catalytic amount of p-toluenesulfonic acid was added to the solution. Next, 100 mg of adhesion peptides with four amino acids (90% pure

RGDS, Invitrogen, Carlsbad, USA) were added to the solution, and the water formed during reaction was azeotropically removed with a Dean-Stark trap. The reaction was monitored using high performance liquid chromatography (HPLC) in order to ensure complete consumption of the RGDS peptide, and an infrared analysis was also performed to confirm the formation of ester bonds between the tetrapeptide and HPMC. After synthesis, the polymer was sterilized in ethylene oxide (standard procedure).

b) RGDS-HPMC solution preparation

After synthesis, the polymer acquired a solid gelatin aspect, formed by thin membranes (Figure 1). These membranes were cut into small portions weighing 0.3 g in a sterile environment and then dissolved in 10 mL of phosphate buffered saline solution (PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), resulting in a transparent, viscous solution at a 3% concentration.

hADAS cell culture in media containing HPMC hydrogels

The hADAS cells used in this study originated from cultures performed by Lemos⁵¹ in the Cell Therapy Center (CTC) at Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB), Hospital São Lucas, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. hADAS cells were cultured in triplicate at a concentration of 0.5×10^4 cells per mL using three 96-well plates incubated at 37 °C with 5% CO₂. Each plate was assessed at a different incubation time: 24, 48, or 72 hours.

Wells were divided into five groups (each group containing a triplicate), as follows:

- Group A – hADAS cells in culture medium + pure HPMC;
- Group B – hADAS cells in culture medium + Si-HPMC;
- Group C – hADAS cells in culture medium + RGDS-HPMC;
- Group D – hADAS cells in culture medium only (negative control);
- Group E – hADAS cells in culture medium + copper sulfate (positive control).

The five groups were cultured in the presence of 50 μ L of medium containing D-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, USA) inactivated during 30 minutes at 56 °C, 1% penicillin-streptomycin (10 000 g/mL, 10 000 U/mL, Invitrogen, Carlsbad, USA), and 0.1% gentamicin (10 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, USA).

Different solutions were added to each group, as follows:

- Group A – 50 μ L of pure HPMC solution prepared with D-MEM;
- Group B – 50 μ L of Si-HPMC solution prepared with buffer solution;
- Group C – 50 μ L of RGDS-HPMC solution prepared with D-MEM;
- Group D – 50 μ L of PBS solution prepared with D-MEM;
- Group E – 50 μ L of PBS solution prepared with D-MEM and copper sulfate (0.2 g/L).

All solutions added to the cultures were prepared with D-MEM at a 1.4 concentration or with buffer solution at 3:1 v/v in an Eppendorf[®] tube and agitated by vortex for 15 seconds.

Hydrogel cytotoxicity assessment using a cell viability test

Cytotoxicity assessment was carried out using a cell viability test with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) after incubation for 24, 48, and 72 hours.

This colorimetric test indirectly and quantitatively determines the viability of cell cultures. A tetrazolium salt is added to the cultures, and the viable cells convert this salt into formazan. Absorbance of the resulting solution is measured using an ELISA reader spectrophotometer (Benchmark, BIO-RAD, Hercules, USA). Results are expressed as percentages in relation to the control condition (negative control).

After incubation under the conditions previously described, culture media with or without hydrogels were removed, and the cells adhered to the bottom of the wells were washed with Dulbecco's phosphate buffered saline solution (DPBS; Invitrogen, Carlsbad, USA). Cells were reincubated for 4 hours at 37 °C with 50 μ L of 10% MTT solution in D-MEM, and plates were subsequently placed in an ELISA reader to assess cytotoxicity.

Statistical methods

Results were analyzed using ANOVA (analysis of variance). Significance was set at $P < 0.001$.

RESULTS

Si-HPMC synthesis and cross-linking

The 3% Si-HPMC hydrogel showed a viscous aspect after synthesis, with a pH of 12.9. Adding the buffer medium (pH 3.6) at a 3:1 v/v ratio caused the pH to drop to 7.4. Hydrogel cross-linking was observed within 8 hours, and the material acquired a moldable gelatin aspect, as shown in Figures 2 to 5.

RGDS-HPMC synthesis

HPLC showed complete consumption of the RGDS peptide during chemical reaction, and infrared analysis confirmed the existence of ester bonds between the tetrapeptide and the HPMC polymer.

Viability of two-dimensional hADAS cell cultures in the presence of pure HPMC, Si-HPMC, and RGDS-HPMC hydrogels and determination of cytotoxicity

Cell viability and cytotoxicity results are presented in Table 1 and Figure 6 and briefly commented on below:

- No impact on cell viability (% MTT activity) was recorded at the three incubation times with any of the hydrogels when compared to the positive control group ($P < 0.001$).

- Due to the presence of copper sulfate, the positive control group presented a low MTT activity ($29.7 \pm 2.9\%$).
- Cell viability results were similar in the groups containing pure HPMC and RGDS-HPMC, with no statistically significant differences at 24, 48, or 72-hour incubation times when compared to the negative control group, according to multiple comparisons.
- The Si-HPMC group showed a stronger effect on cell viability in relation to the negative control group after 72 hours, but did not present cytotoxicity differences when compared to the other two groups containing hydrogels, according to multiple comparisons.

DISCUSSION

Hydrogels such as HPMC are among the main biomaterials used in tissue engineering. They present extremely important characteristics that favor their interaction with precursor cells, allowing a more homogeneous cell distribution and ensuring an adequate diffusion of nutrients.^{21,25-31} However, most hydrogels also lack cell adhesion, an essential property for the adequate functioning of cells and biomaterials.^{25,28} The present study therefore aimed to expand our knowledge regarding the potential use of HPMC hydrogels as scaffolds in tissue engineering and regeneration.

In a pilot protocol, mouse fibroblasts (NIH3T3) were cultured on a 3% HPMC hydrogel associated with D-MEM culture medium. Cell behavior findings corroborated the principle that the polymer in its pure form did not offer any substrate for cell adhesion. Inverted optical microscopy (IOM) revealed that the cells acquired a spherical shape and formed clusters, without the usual cytoplasmic expansions that indicate normal functioning when cells are adhered to a surface (Figure 7).

The studies of Bourges et al.,³⁶ Trojani et al.,⁵² and Vinatier et al.⁵³ describe the synthesis of an HPMC hydrogel for use in three-dimensional cell cultures and tissue regeneration (bone and cartilage). The major contribution of those authors was the incorporation of silane into the polymer (Si-HPMC), which allowed the resulting hydrogel to cross-link and therefore to be molded according to the defect to be corrected. In vitro experiments involving three-dimensional cultures of osteogenic cells and chondrocytes in media containing Si-HPMC revealed a tendency of this biomaterial to allow the survival, proliferation, and even differentiation of cells with a better performance when compared to two-dimensional cell cultures. Osteosarcoma and normal human osteogenic (HOST) cell lineages were assessed by Trojani et al.,³⁸ whereas Vinatier et al.³⁹ tested human chondrocyte and rabbit primary chondrocyte lineages (RAC). When cultured on a hydrogel, osteosarcoma and chondrocyte lineages acquired a spherical shape and formed clusters – findings that are similar to the ones observed in our pilot protocol, but not considered as a limitation by those authors. Trojani et al.³⁸ nevertheless emphasize that even though HOST cells remained viable for 3 weeks, they did not proliferate, similarly to the other cell groups assessed. Aware of the importance of optimizing the interaction between hydrogels and cells, Trojani et al.³⁸ suggest the association of specific molecules or growth factors to the Si-HPMC polymer in their 2005 paper. In 2006, the authors publish a new paper, in which biphasic calcium phosphate (BCP) is incorporated into Si-HPMC and used as a scaffold in ectopic bone formation in mice.⁵⁰ Here, the authors underscore the importance of ceramic particles for the stimulation of cell adhesion, proliferation, and differentiation within the polymer. A number of other studies using hydrogels as scaffolds also highlight the importance of providing polymers with properties that promote cell adhesion. According to these studies, the interaction between cells and biomaterials through integrins is key to trigger other cell functions.^{17,21,25,28,38,40,42-47,54-63}

Although the synthesis of hydrogels with adhesion peptides (RGD, RGDS, among others) has been frequently reported,³⁸⁻⁵⁰ to the authors' knowledge this is the first study to test the association between adhesion peptides and HPMC. Based on the synthesis process developed by

Bourges et al.³⁶ (Si-HPMC) and on the incorporation of BCP into the biomaterial as described by Trojani et al.,⁵² we decided to synthesize Si-HPMC and also RGDS-HPMC. The development of a scaffold containing the properties resulting from both processes (Si-HPMC and RGDS-HPMC), i.e., moldable and able to interact with integrins, was among our initial interests, but extrapolated the scope of the present study.

Our Si-HPMC synthesis followed the steps detailed by Bourges et al.³⁶ The authors describe the performance of several tests to evaluate auto-cross-linking kinetics, and they demonstrate that the time necessary for the gel to harden (viscosity = 1×10^5 mPa s) depends on different factors, such as buffer solution concentration, final pH, silane (3-GPTMS) concentration in the polymer, and temperature. Those authors' results show that: according to the buffer used, a lower pH at the end of the reaction leads to slower cross-linking; a higher silane concentration in the polymer increases gel hardening speed; high temperatures catalyze polymer cross-linking. All these parameters allow to adjust the conditions involved in the synthesis of hydrogels, with a better control of the cross-linking process.

In our study, Si-HPMC synthesis was not assessed with objective parameters. Rather, a descriptive analysis of hydrogel cross-linking was performed. A viscous and alkaline solution of 3% Si-HPMC was obtained, and complete cross-linking was achieved 8 hours after the addition of a buffer solution (pH 3.6), with a final pH of 7.4. Using similar parameters, Bourges et al.³⁶ achieved gel cross-linking in a considerably shorter time (between 15 and 20 minutes), a difference that can be explained by the distinct buffer solutions and concentrations used by those authors. A more detailed analysis would certainly allow us to achieve a higher control over polymer cross-linking. Nevertheless, we believe that our results are relevant because our hydrogel presented adequate elastic properties, similarly to the one developed by Bourges et al., with more favorable characteristics for use as a scaffold when compared to pure HPMC.

With regard to the incorporation of adhesion peptides into polymers, Hersel et al.⁴¹ reviewed some of the important aspects that should be taken into consideration when using such

syntheses. According to those authors, early experiments aimed to cover polymeric surfaces with whole proteins such as fibronectin or laminin. The use of these proteins, however, has been shown to present a few disadvantages for clinical use, e.g., the need for the proteins to be isolated from other organisms and purified, possibly triggering undesirable immunological responses and infections, and the possibility of proteolytic degradation. Small peptide sequences, on the other hand, perform better than proteins in the modification of polymers for use as scaffolds. Peptides are stable under different sterilization conditions and pH variations, and their short sequences bind to integrins, which are the receptors responsible for cell anchorage and other vital functions.

According to Ruoslathi⁶⁰ and Hersel et al.,⁴¹ stable bonds between peptides and polymers are essential for strong cell adhesion. Peptides that are only dissolved in gels end up inhibiting this primary function, leading to apoptosis.^{41,60} The presence of bonds can be confirmed by direct analysis of the chemical reaction, as well as via indirect in vitro analysis of cell functions in the presence of modified polymers. The assessment of aspects such as adhesion, proliferation, and cytoskeletal reorganization reveals the positive effects of the synthesis of peptides on hydrogels when compared to unmodified hydrogels.

The present study represents a first step towards functionally enhancing HPMC, a polymer used in tissue regeneration, by the incorporation of RGDS adhesion peptides. Our chemical reactions were monitored by HPLC and infrared, which evidenced the occurrence of a stable synthesis process, resulting in a polymer formed by thin membranes that acquired a viscous aspect after mixture with a PBS solution, similarly to the other celluloses studied in the present study. Synthesis involving covalent bonds corroborates one of the already established principles in the development of hydrogel scaffolds, namely the presence of stable bonds between peptides and polymers.^{41,60} However, other aspects previously mentioned, especially the real applicability of RGDS-HPMC in three-dimensional cultures, need to be further investigated and confirmed.

According to the International Standard Organization (ISO) 10993-5 standard, *in vitro* cytotoxicity assays should be the first choice to evaluate the biocompatibility of any material intended for biomedical use.^{53,64} Cell viability is the parameter most commonly used when assessing cytotoxicity, and can be evidenced by changes in the color of vital dyes when these agents are metabolized by live cells; the different colors produced can then be objectively read by a spectrophotometer. In our study, use of the MTT assay followed a protocol similar to the one described by Vinatier et al.⁵³

In view of a recent trend to focus on the cytotoxicity of polymers, we believe that an assessment including different cell lineages could be advantageous and broaden the scope of analysis. In our study, however, biomaterials were tested in contact with hADAS cells only. Preestablished cell lineages may present low sensitivity to some cytotoxic signals; in these cases, primary cultures are more indicated.⁶⁴ Furthermore, adipose tissue has been shown to have a high number of multipotent mesenchymal stromal cells resulting from lipoaspirates, a characteristic that has broadened the use of these cells in tissue engineering and regeneration.^{6,13,15}

Although hydrogels have been designed to interact with cells in three-dimensional environments, the cytotoxicity test in our study was performed via direct contact between the biomaterials and two-dimensional cell cultures. This protocol required the hydrogels to be removed from the wells after incubation; subsequently, the MTT reagent was added to the cultures and results were analyzed in an ELISA reader.⁵³

According to our results, cells cultured in contact with hydrogels were generally not affected with regard to their viability, and presented results similar to those observed for the negative control group at the three incubation times assessed. The viability of cells cultured in the presence of Si-HPMC was smaller than that of the negative control group after 72 hours of incubation; however, the result associated with Si-HPMC hydrogel was significantly improved when compared to the positive control group.

One of the main contributions of this study is that the RGDS-HPMC hydrogel proved to be nontoxic and showed a regular performance throughout the study period. New studies are warranted to carry out three-dimensional cytotoxicity tests in order to confirm the effectiveness of Si-HPMC and RGDS-HPMC hydrogels as suitable scaffolds for use in tissue engineering and regeneration.

REFERENCES

1. Saraf S. Sushruta: Rhinoplasty in 600 B.C. *Internet J Plast Surg.* 2007;3.
2. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, et al. Science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation.* 2008;86:627-635.
3. Mélega JM, Freitas AG. Biologia da cicatrização. In: Mélega JM, Ed. *Cirurgia Plástica Fundamentos e Arte - Princípios Gerais.* Vol. 1. Rio de Janeiro: MEDSI; 2002:9-14.
4. Stanworth SJ, Newland AC. Stem cells: progress in research and edging towards the clinical setting. *Clin Med.* 2001;1:378-382.
5. Borelli P. Célula-tronco. In: Peres C, Curi R, Eds. *Como Cultivar Células.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005:54-58.
6. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;249-282.
7. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
8. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-4295.
9. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-147.
10. Paula S, Pedroso MF, Dalbem A, et al. O potencial terapêutico das células-tronco em doenças do sistema nervoso *Scientia Medica.* 2005;15:263-269.
11. Young HE, Duplaa C, Katz R, et al. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med.* 2005;9:753-769.
12. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-2213.
13. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118:108S-120S.

14. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007;211:27-35.
15. Rigotti G, Marchi A, Galie M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119:1409-1422; discussion 1423-1404.
16. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2006;13:419-425.
17. Abbott A. Cell culture: biology's new dimension. *Nature.* 2003;424:870-872.
18. Ahsan T, Nerem RM. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:134-140.
19. Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;13:233-241.
20. Atala A, Nyberg LM. Tissue engineering. *World J Urol.* 2000;18:Editorial.
21. Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:150-161.
22. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2006;10:569-576.
23. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg.* 1991;88:753-759.
24. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100:297-302; discussion 303-294.
25. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003;24:4337-4351.
26. Fedorovich NE, Alblas J, de Wijn JR, et al. Hydrogels as extracellular matrices for skeletal tissue engineering: state-of-the-art and novel application in organ printing. *Tissue Eng.* 2007;13:1905-1925.

27. Gomes M, Azevedo H, Malafaya P, Silva S. Natural polymers in tissue engineering applications. In: van Blitterswijk C, Lindhal A, Thomsem P, et al., Eds. *Tissue engineering*: Elsevier; 2008:145-192.
28. Kim BS, Baez CE, Atala A. Biomaterials for tissue engineering. *World J Urol.* 2000;18:2-9.
29. Trevors JT, Pollack GH. Hypothesis: the origin of life in a hydrogel environment. *Prog Biophys Mol Biol.* 2005;89:1-8.
30. Tsang VL, Bhatia SN. Three-dimensional tissue fabrication. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56:1635-1647.
31. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008;29:2941-2953.
32. Marler JJ, Guha A, Rowley J, et al. Soft-tissue augmentation with injectable alginate and syngeneic fibroblasts. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105:2049-2058.
33. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br].* 1999;24:703-706.
34. Braga-Silva J, Gehlen D, Padoin AV, et al. Can local supply of bone marrow mononuclear cells improve the outcome from late tubular repair of human median and ulnar nerves? *J Hand Surg Eur Vol.* 2008;33:488-493.
35. Merle M, Dautel G, Dap F. Chirurgie secondaire des plaies des nerfs périphériques. In: Merle M, Dautel G, Eds. *La main traumatique 2/ Chirurgie secondaire Le poignet traumatique.* Paris: Masson; 1995:147-176.
36. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv Colloid Interface Sci.* 2002;99:215-228.
37. Lopes CM, Lobo JMS, Costa P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 2005;41:143-154.

38. DeLong SA, Gobin AS, West JL. Covalent immobilization of RGDS on hydrogel surfaces to direct cell alignment and migration. *J Control Release*. 2005;109:139-148.
39. Gobin AS, West JL. Cell migration through defined, synthetic ECM analogs. *Faseb J*. 2002;16:751-753.
40. Hern DL, Hubbell JA. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:266-276.
41. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*. 2003;24:4385-4415.
42. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability. *Matrix Biol*. 2005;24:208-218.
43. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*. 1999;20:45-53.
44. Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A*. 2004;68:365-375.
45. Stile RA, Healy KE. Thermo-responsive peptide-modified hydrogels for tissue regeneration. *Biomacromolecules*. 2001;2:185-194.
46. Woerly S, Pinet E, de Robertis L, Van Diep D, Bousmina M. Spinal cord repair with PHPMA hydrogel containing RGD peptides (NeuroGel). *Biomaterials*. 2001;22:1095-1111.
47. Yang F, Williams CG, Wang DA, et al. The effect of incorporating RGD adhesive peptide in polyethylene glycol diacrylate hydrogel on osteogenesis of bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2005;26:5991-5998.
48. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Shoichet MS. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg*. 2003;99:555-565.

49. Schneider GB, English A, Abraham M, et al. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials*. 2004;25:3023-3028.
50. Trojani C, Boukhechba F, Scimeca JC, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2006;27:3256-3264.
51. Lemos MA. Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica. [thesis]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2008.
52. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, et al. Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials*. 2005;26:5509-5517.
53. Vinatier C, Magne D, Weiss P, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*. 2005;26:6643-6651.
54. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., Eds. *Biologia Molecular da Célula*, 4th Ed. Porto Alegre: ArtMed; 2004:1065-1125.
55. Jiang H, Grinnell F. Cell-matrix entanglement and mechanical anchorage of fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Mol Biol Cell*. 2005;16:5070-5076.
56. Lai CF, Cheng SL. Alphavbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2005;20:330-340.
57. Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell*. 2000;11:453-466.
58. Ortega-Velazquez R, Diez-Marques ML, Ruiz-Torres MP, et al. Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) peptide stimulates transforming growth factor beta1 transcription and secretion through integrin activation. *Faseb J*. 2003;17:1529-1531.

59. Pedersen JA, Swartz MA. Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng.* 2005;33:1469-1490.
60. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996;12:697-715.
61. Weaver VM, Petersen OW, Wang F, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol.* 1997;137:231-245.
62. Yamada KM, Pankov R, Cukierman E. Dimensions and dynamics in integrin function. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36:959-966.
63. Zahir N, Weaver VM. Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14:71-80.
64. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz ÁS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research.* 2003;6:317-320.

TABLE LEGEND

Table 1: Viability of hADAS cells cultured in the presence of HPMC hydrogels (% MTT activity)

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Macroscopic aspect of the gelatin (polymer) resulting from the synthesis of HPMC with RGDS adhesion peptides

Figure 2. Si-HPMC hydrogel. Note the viscous aspect of hydrogel prior to cross-linking

Figure 3. Si-HPMC: moldable gelatin aspect of the hydrogel after pH-controlled cross-linking

Figure 4. Example of the moldable capacity of Si-HPMC after cross-linking (ear)

Figure 5. Example of the moldable capacity of Si-HPMC after cross-linking (peripheral nerve)

Figure 6. Viability of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells cultured in the presence of HPMC hydrogels at different incubation times. MTT: colorimetric assay with methyl thiazolyl tetrazolium; HPMC: pure hydroxypropyl methylcellulose; Si-HPMC: silanized hydroxypropyl methylcellulose; RGDS-HPMC: hydroxypropyl methylcellulose with arginine-glycine-aspartic acid-serine adhesion peptides; NC: negative control; PC: positive control

Figure 7. Three-dimensional mouse fibroblast (NIH3T3) cultures on a 3% pure HPMC hydrogel (pilot study). After five days, clustering of spherical cells was observed, surrounded by gel and without cytoplasmic expansions characteristic of cell adhesion. Inverted optical microscopy, 100x magnification

Table 1: Viability of hADAS cells cultured in the presence of HPMC hydrogels (% MTT activity)

Group	Incubation time			P
	24 h	48 h	72 h	
HPMC	102.7 ± 14.9 ^b	83 ± 3.8 ^b	922 ± 8.6 ^{bc}	0.138
Si-HPMC	90.9 ± 6.5 ^b	82.8 ± 8.8 ^b	81.8 ± 4.9 ^b	0.282
RGDS-HPMC	98.2 ± 3.3 ^b	103.4 ± 11.7 ^c	95.4 ± 3.7 ^{bc}	0.440
NC	99.6 ± 0.3 ^b	100 ± 2.4 ^{bc}	100 ± 6.7 ^c	0.992
PC	33.2 ± 2.2 ^a	27.8 ± 0.1 ^a	28 ± 1.1 ^a	0.008
P	< 0.001	< 0.001	< 0.001	

MTT: colorimetric assay with methyl thiazolyl tetrazolium; hADAS: human adipose-derived adherent stromal; HPMC: pure hydroxypropyl methylcellulose; Si-HPMC: silanized hydroxypropyl methylcellulose; RGDS-HPMC: hydroxypropyl methylcellulose with arginine-glycine-aspartic acid-serine adhesion peptides; NC: negative control; PC: positive control. The presented as mean ± standard deviation. Same letters indicate nonsignificant differences in relation to cell viability.