



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL - PPGTAIR**

LETÍCYA LORRAYNE DA SILVA SOARES

**CITOGENÉTICA E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
ADIPODERIVADAS DE RATOS EM CULTIVO COM HIDROGEL DE GELATINA
METACRILATA (GELMA)**

Teresina

2023

LETÍCYA LORRAYNE DA SILVA SOARES

**CITOGENÉTICA E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
ADIPODERIVADAS DE RATOS EM CULTIVO COM HIDROGEL DE GELATINA
METACRILATA (GELMA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional – PPGTAIR/UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Linha de pesquisa: Biotecnologia, Reprodução e Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho

Teresina

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação Temática da Informação

S676c Soares, Leticya Lorryne da Silva.
Citogenética e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de ratos em cultivo com hidrogel de gelatina metacrilata (gelma) / Leticya Lorryne da Silva Soares. -- 2023.
59 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2023.

“Orientadora: Profa. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho.”

1. MSC. 2. GelMA. 3. Biomaterial. 4. Citotoxicidade. 5. Genotoxicidade. I. Carvalho, Maria Acelina Martins de. II. Título.

CDD 574.87

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

CITOGENÉTICA E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
ADIPODERIVADAS DE RATOS EM CULTIVO COM HIDROGEL DE GELATINA
METACRILATA (GELMA)

LETÍCYA LORRAYNE DA SILVA SOARES

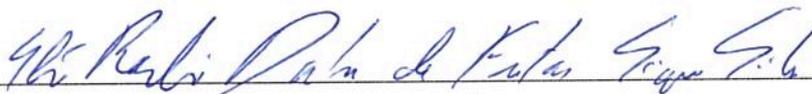
BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho
(Presidente / Orientadora) / DMV/ CCA / UFPI



Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto
(Examinador interno) / DCCV/ CCA / UFPI



Profa. Dra. Elis Rosélia Dutra Freitas Siqueira Silva
(Examinadora externa) / UNIFSA

Dedico,

A Deus, pelo dom da vida, por toda força e amparo nos momentos difíceis, e por não me deixar desistir.

*Aos meus pais, **Laís e Antonio**, e irmãs **Maria Clara e Antonya Beatryz**, por serem meus maiores incentivadores e meu maior exemplo na Terra, por todo amor, carinho e educação, em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu esposo, **Phylipe Guedes**, por sempre estar ao meu lado e acreditar no meu potencial, pelo seu amor e companheirismo.*

*Aos meus avós, **Maria do Rosário, Francisca Nonata e José Damião**, pelas orações, palavras de sabedoria e por todo amor.*

*Aos meus filhos de quatro patas, **Lagertha e Floki**, por me dedicar tanto amor e carinho incondicional.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado forças para superar todos os obstáculos que surgirão em meu caminho, por não me abandonar e me sustentar nos momentos mais difíceis. Tu és a minha força, sem Ti eu nada seria.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) por toda a minha formação acadêmica em Medicina Veterinária tanto na graduação quanto na pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional - PPGTAIR, pela oportunidade de realizar este Mestrado.

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pela orientação em toda a minha vida acadêmica, desde a monitoria, sempre acreditando no meu potencial e me incentivando com muito carinho. Agradeço por toda paciência, dedicação, ensinamentos, disponibilidade, confiança e amizade, a senhora é um grande exemplo profissional a ser seguido. Minha eterna gratidão!

Ao Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto por todo o conhecimento e experiência compartilhados durante a pesquisa.

Ao prof. Edson Cavalcanti da Silva Filho, a Pós-graduanda Danielle Beningno Andrade e ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV/UFPI pela parceria na caracterização do biomaterial.

A todos os Pós-graduandos do NUPCelt, especialmente a Louenny e Hermínio, que contribuíram com seus conhecimentos, amizade, incentivos diários e companheirismo durante todos esses anos. Vocês foram essenciais para suportar essa caminhada.

Aos Funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt), por fornecerem ambiente adequado para realização desta pesquisa e pelo apoio.

Aos meus pais, Antonio Soares de Sousa e Laís da Silva Costa Soares, por ser o meu maior exemplo e admiração. Agradeço por todos os ensinamentos e por terem me educado com tanto amor, dignidade e respeito ao próximo, pelos sacrifícios e abdições que fizeram para que eu pudesse conquistar os meus maiores sonhos. As minhas irmãs, Maria Clara da Silva Soares e Antonya Beatryz da Silva Soares, por serem minhas companheiras de vida e por todo apoio prestado a mim em todos os momentos.

Ao meu esposo, Phylipe Basílio Guedes por todo amor e ajuda dedicada a mim, pelo companheirismo, por sempre me incentivar a ser alguém melhor, seu apoio foi de extrema importância.

Por fim, aos meus familiares e amigos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

A associação de células-tronco mesenquimais (MSC) com biomateriais vem sendo investigada, com o objetivo de reduzir o tempo e melhorar a qualidade cicatricial de diversos tecidos do organismo. A regeneração óssea representa um importante desafio na ortopedia, ortodontia e traumatologia, humana e veterinária. A terapia com células-tronco mesenquimais vem complementar a utilização dos biomateriais, com a sua propriedade de osteogênese, transformando um biomaterial primariamente osteoindutor em um substituto ósseo completo, comparável a enxertia óssea autógena, porém sem as morbidades dessa cirurgia. Entretanto, é necessário avaliar a biocompatibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da associação dessas células com os biomateriais, sendo imprescindíveis testes *in vitro*, pois são muitos os fatores que podem causar danos no DNA. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar a cito e genotoxicidade, e a biocompatibilidade do Hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA) a 1% e 3% associado a cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC), mediante teste citogenético por Ensaio Cometa e viabilidade celular por MTT, além de analisar o potencial osteogênico desse biomaterial. As ADSCs foram isoladas de tecido adiposo de rato (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI-658/20) por digestão enzimática utilizando colagenase I e mantidas em cultivo em meio DMEM enriquecido com PBS (15%), incubadas a 37°C, 5% CO₂. As ADSCs foram caracterizadas por citometria de fluxo, apresentando marcação positiva para CD90 e CD105, e negativa para CD14 e CD45. A plasticidade dessas células foi comprovada por meio da diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. O GelMA foi preparado dissolvendo-se 0,1g em 5mL de PBS, usando Igarcure 2959 como fotoiniciador a 40°C, agitado mecanicamente e reticulado em luz UV para formação do hidrogel. O material foi caracterizado por FTIR, DRX, TG/DTG e MEV. O teste letalidade por *Artemia salina* foi realizado em quatro concentrações diferentes (5mg/mL; 1mg/mL; 0,5mg/mL e 0,1mg/mL) em 24h e 48h, apresentando leve toxicidade do GelMA na sua maior concentração (5mg/mL), porém, ainda acima da DL50 (dose letal média). No teste de MTT apenas o GelMA1% apresentou viabilidade celular acima de 70% em todos os tempos estudados, não apresentando potencial citotóxico para as ADSCs. No ensaio cometa o hidrogel de GelMA a 1% e 3% não demonstrou potencial genotóxico as ADSCs, não induzindo danos estatisticamente significativos no DNA dessas células. Na indução osteogênica das ADSCs com o GelMA 1% e 3%, verificou-se que o biomaterial não é capaz de promover a diferenciação celular na ausência de um fator indutor. Conclui-se que a associação do hidrogel de GelMA com ADSCs é promissora, pois é capaz de interagir positivamente e facilita a adesão celular. Biocompatível, não apresentando cito e genotoxicidade às células, permitindo futuros estudos *in vivo*.

Palavras-chave: MSC, GelMA, biomaterial, citotoxicidade, genotoxicidade.

ABSTRACT

The association of mesenchymal stem cells (MSC) with biomaterials has been investigated, with the aim of reducing time and improving the healing quality of various body tissues. Bone regeneration still represents a challenge in orthopedics, orthodontics and traumatology. Therapy with mesenchymal stem cells complements the use of biomaterials, with their osteogenesis property, transforming a primarily osteoinductive biomaterial into a complete bone substitute, comparable to autogenous bone grafting, but without the morbidities of this surgery. However, it is necessary to evaluate the biocompatibility and the possible toxic effects of the association of these cells with the biomaterials, being essential *in vitro* tests, since there are many factors that can cause DNA damage. Thus, this study aims to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity, and the biocompatibility of the 1% and 3% methacrylate gelatin hydrogel (GelMA) associated with the culture of adipoderivative mesenchymal stem cells (ADSC), through cytogenetic test by Comet Assay and cell viability by MTT, in addition to analyzing the osteogenic potential of this biomaterial. The ADSCs were isolated from rat adipose tissue (Commission for Ethics in Animal Use - CEUA/UFPI-658/20) by enzymatic digestion using collagenase I and maintained in culture in DMEM medium enriched with PBS (15%), incubated at 37°C, 5% CO₂. ADSCs were characterized by flow cytometry, showing positive staining for CD90 and CD105, and negative for CD14 and CD45. The plasticity of these cells was proven through adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation. GelMA was prepared by dissolving 0.1g in 5mL of PBS, using Irgacure 2959 as a photoinitiator at 40°C, mechanically stirred and cross-linked under UV light to form the hydrogel. The material was characterized by FTIR, XRD, TG/DTG and SEM. The lethality test for *Artemia salina* was performed at four different concentrations (5mg/mL; 1mg/mL; 0.5mg/mL and 0.1mg/mL) in 24h and 48h, showing mild toxicity of GelMA at its highest concentration (5mg/mL). mL), however, still above the LD₅₀ (mean lethal dose). In the MTT test, only GelMA1% showed cell viability above 70% at all times studied, not showing cytotoxic potential for ADSCs. In the comet assay, the 1% and 3% GelMA hydrogel did not demonstrate genotoxic potential for ADSCs, not inducing statistically significant damage to the DNA of these cells. In the osteogenic induction of ADSCs with GelMA 1% and 3%, it was verified that the biomaterial is not able to promote cell differentiation in the absence of an inducing factor. It is concluded that the association of GelMA hydrogel with ADSCs is promising, as it is capable of positively interacting and facilitates cell adhesion. Biocompatible, not showing cytotoxicity and genotoxicity to cells, allowing future *in vivo* studies.

Keywords: MSC, GelMA, biomaterial, cytotoxicity, genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1. Fotomicrografia de cultura homogênea de ADSC.....	44
Figura 2. Análise das ADSCs por citometria de fluxo.....	45
Figura 3. Ensaio de plasticidade celular da cultura de ADSC.....	46
Figura 4. Caracterização do hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA).....	47
Figura 5. Imagens da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do hidrogel de GelMA	47
Figura 6. Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	48
Figura 7. Efeito do hidrogel de GelMA (1% e 3%) sobre a viabilidade celular das ADSCs.....	48
Figura 8. Efeitos genotóxicos do hidrogel de GelMA (1% e 3%) em ADSCs através do bioensaio cometa versão alcalina	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

0c	Graus Celsius
ul	Microlitros
βGP	Beta-glicero-fosfato
AA	Ácido ascórbico
ADSC	Células-Tronco Mesenquimais Adipoderivadas
ALP	Marcador de diferenciação osteoblástica
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CD 14	Proteína presente em macrófagos, responsável por detectar lipopolissacarídeo de bactérias
CD 45	Proteína tirosina fosfatase presente em todos os leucócitos
CD 90	Marcador de células progenitoras multipotentes
CD 105	Glicoproteína de membrana expressa em células endoteliais, macrófagos ativados, fibroblastos e células músculo esqueléticas
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Gás Carbônico
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DMEM	Meio de cultivo celular - Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DL50	Dose Letal Média
DP	Desvio Padrão
DRX	Difração de raios-X
DSC	Differential Scanning Colorimetry
DTG	Termogavimetria derivada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F127DA	Diacrilato Pluronic F127
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
g	Gramas
GelMA	Gelatina Metacrilata
HNT	Haloisita

IM	Intramuscular
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia celular
Kg	Kilograma
LAPEGENIC	Laboratório de Genética Toxicológica
L	Litro
LIB	Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular
LIMAv	Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mm	Milimetro
mL	Militro
MSC	Células-Tronco Mesenquimais
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
nm	Nanometro
NUPCelt	Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco
P0	Passagem celular inicial
P3	Terceira passagem celular
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
PEGDA	Diacrilato de polietileno glicol
Ph	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Células processadas do lipoaspirado
PVP-I	Solução povidine-iodine
RGD	Arginina-Glicina-Aspartato
Rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SVF	Fração celular do estroma vascular
TG	Termogavimetria
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Radiação Ultravioleta
3D	Tridimensionais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Células-tronco Mesenquimais (MSC).....	16
2.2 Células-tronco Mesenquimais Adipoderivadas (ADSC).....	17
2.3 Hidrogéis.....	19
2.4 Hidrogel de Gelatina Metacrilata (GelMA).....	19
2.5 Biocompatibilidade.....	21
3. CAPÍTULO I - Citogenética e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de ratos em cultivo com hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA)	23
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO GERAL

O avanço na área da engenharia tecidual possibilitou o desenvolvimento e aprimoramento de novos biomateriais (XIAO *et al.*, 2019; RAJABI *et al.*, 2020). Estes devem ser capazes de estimular a adesão, diferenciação e proliferação celular, e ainda promover a produção de moléculas específicas do tecido-alvo (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Culturas celulares em modelo tridimensional têm sido usadas como métodos alternativos *in vitro* a fim de aprimorar a simulação no organismo vivo. Entre as diversas opções de matriz baseadas em *scaffold* disponíveis para a cultura de células 3D, os hidrogéis, que são redes macromoleculares formadas por polímeros hidrofílicos intumescidos em água ou fluidos biológicos, são altamente promissores devido a sua semelhança com o meio natural (CLEVERS, 2016). A gelatina metacrilata (GelMA), também conhecido como gelatina metacrilato ou gelatina metacrilamida, é um hidrogel fotopolimerizável com potencial para aplicações em engenharia de tecidos, em especial cultivo de células *in vitro*, pela possibilidade de ser modificada quimicamente, ser biodegradável e solúvel em água (KOLESKY *et al.*, 2014; YUE *et al.*, 2015). Diferentes pesquisas já demonstraram o potencial do GelMA como base para proporcionar a regeneração óssea (CHEN *et al.*, 2016; QIAO *et al.*, 2020; BORDINI, 2021).

A aplicabilidade da associação de células-tronco mesenquimais (MSC) com biomateriais, vem sendo cada vez mais pesquisada com o objetivo de reduzir o tempo e melhorar a qualidade cicatricial de diversos tecidos, tanto animais, quanto humanos (OLIVEIRA, 2008; SHANG *et al.*, 2021). As MSC tornaram-se uma opção terapêutica atrativa com amplo espectro de aplicações clínicas na terapia celular, pois possuem alta plasticidade (MONTEIRO *et al.*, 2010). Essas células são caracterizadas por possuir morfologia semelhante a fibroblastos; capacidade de proliferação e crescimento *in vitro* aderido ao plástico; e pelo seu potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica, adipogênica e condrogênica (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; YARAK e OKAMOTO, 2010). Ademais, possuem propriedades imunossupressoras e secretam moléculas bioativas, que exercem efeitos tróficos, ampliando as possibilidades de utilização terapêutica (SHERMAN *et al.*, 2011).

As MSC podem ser obtidas de diversos tipos de tecidos, porém o tecido adiposo é uma fonte atrativa, por ser relativamente fácil sua obtenção, através de métodos pouco invasivos, além disso, o organismo animal possui grande reserva desse tecido (ZUTTON *et al.*, 2013; KHOJASTEH *et al.*, 2019). As células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC)

constituem uma fonte promissora em aplicações terapêuticas, com grande potencial no reparo e regeneração de órgãos e tecidos lesados (MALAGUTTI-FERREIRA, 2016; KHOJASTEH *et al.*, 2019).

A regeneração óssea ainda representa um desafio na ortopedia, ortodontia e traumatologia, humana e veterinária. Culturas celulares tridimensionais, envolvendo a associação de diferentes materiais (hidrogéis, polímeros, poliésteres, etc.), têm sido usadas como métodos alternativos *in vitro* para melhorar a simulação de condições no organismo vivo. Um dos obstáculos da engenharia tecidual é descobrir os sinais que direcionam as etapas do desenvolvimento e da regeneração tecidual, buscando compreender o processo necessário à reprodução do tecido (OLIVEIRA, 2010). A terapia celular vem complementar o que falta na utilização dos biomateriais, ou seja, trazer a propriedade de osteogênese na sua aplicação, transformando um biomaterial primariamente osteoindutor em um substituto ósseo, com todas as propriedades e qualidades da enxertia óssea autógena, sem as complicações e morbidades (GROSSI *et al.*, 2017). Estudos apresentam resultados promissores no uso de biomateriais otimizados com ADSC em casos de regeneração tecidual óssea (KHOJASTEH *et al.*, 2019; BALDERRAMA *et al.*, 2021).

Associação dessas células aos biomateriais osteocondutores (arcabouço) e fatores de crescimento, pode potencializar a osteogênese e osteoindução para a formação óssea (PELEGRINE *et al.*, 2014; SHANG *et al.*, 2021) ou seja, otimizando as características desse enxerto. Devido a essas características as MSC são consideradas uma fonte atrativa de regeneração tecidual (KINGHAM *et al.*, 2007; ZUTTON *et al.*, 2013). No entanto, é necessário avaliar a biocompatibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da associação dessas células como hidrogel de GelMA.

Para uma análise adequada do potencial citotóxico e genotóxico de substâncias químicas, é imprescindível uma série de testes *in vitro* (RIBEIRO, 2008), uma vez que são muitos os fatores que podem causar danos no DNA (MALAGUTTI-FERREIRA, 2016). Estes testes são usados para averiguar o risco de diferentes materiais, independentemente da concentração e período de exposição. Dentre os diversos testes colorimétricos para determinação de citotoxicidade dos agentes químicos, o MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] é um dos mais utilizados, devido à sua sensibilidade de detecção de citotóxicos (PERES *et al.*, 2008). Para avaliação da instabilidade genética, o ensaio cometa é uma técnica amplamente empregada em estudos de mutagênese (BETTI, LOPRIENO e BARALE, 1994; TICE *et al.*, 2000; RIBEIRO, SALVATORI e MARQUES,

2003). Pois, possui metodologia rápida e relativamente simples, sendo cada vez mais usada para determinar os danos ocorridos no DNA de diversos organismos.

Em função desses aspectos, buscando promover segurança aos procedimentos de terapia celular em futuras pesquisas *in vivo*, este trabalho tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade, genotoxicidade e citotoxicidade do cultivo de ADSC associado ao hidrogel de GelMA, mediante teste citogenético por Ensaio Cometa e de viabilidade celular por MTT, além de analisar o potencial osteogênico desse biomaterial.

Este trabalho encontra-se estruturado da seguinte forma: Introdução Geral, Revisão de literatura, Capítulo I, Considerações Finais e Referências. O Capítulo I intitulado “Citogenética e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de ratos em cultivo com hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA)” foi submetido ao periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research*, CAPES-Qualis A4.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco mesenquimais (MSC)

As células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *Mesenchymal Stem Cells*) compõem um grupo que vem despertando particular interesse, devido sua elevada plasticidade (MONTEIRO *et al.*, 2010). Segundo a literatura as MSCs são consideradas excelentes candidatas para aplicação em terapia celular, por serem de fácil obtenção e manipulação; possuir alta taxa de proliferação celular *in vitro*; capacidade multipotente de diferenciação celular; possuírem habilidade quimiotática e migração para áreas de lesão ou inflamação (BARRY e MURPHY, 2004; AGGARWAL e PITTENGER, 2005; GIORDANO *et al.*, 2007; BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

Esse tipo celular foi nomeado por Arnold Caplan, em 1991, como “Células-tronco mesenquimais” devido ao seu potencial de diferenciação *in vitro*. Porém, tempos depois, o termo de célula-tronco começou a ser questionado, pois foi constatado que nem todas as células da população de MSC apresentavam potencial de autorrenovação, característica esta, própria às células-tronco (HORWITZ *et al.*, 2005). As MSCs atuam na regeneração de tecidos e possuem propriedades terapêuticas, mas o título “célula-tronco” estava criando algumas confusões sobre seu mecanismo e falsas expectativas. Em razão disso, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), em 2005, sugeriu a permanência do acrônimo MSC, mas a mudança do nome em inglês “Mesenchymal Stem Cell” por “Mesenchymal Stromal Cell”, um nome que remete à sua localização e origem (HORWITZ *et al.*, 2005).

Posteriormente, em 2017, Arnold Caplan sugeriu a alteração da nomenclatura para Células Sinalizadoras Mediciniais (do inglês, *Medicinal Signaling Cell*), mantendo o acrônimo MSC. A nova nomenclatura proposta por Caplan enfatiza o fato de que essas células se alojam em locais de lesão ou doença e secretam fatores bioativos, que são imunomoduladores e tróficos (regenerativos). Ou seja, sua principal funcionalidade *in vivo*, não é a multipotência, mas sim sua atividade parácrina, produzindo drogas terapêuticas *in situ* que são medicinais (CAPLAN, 2017).

As MSCs podem ser isoladas de diversos tecidos vascularizados, como a medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (KERN *et al.*, 2006; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; UDER *et al.*, 2018). Essas células exercem intensa atividade parácrina, pela liberação de

citocinas, fatores de crescimento e micro RNAs, que podem desempenhar um papel imunomodulador e regenerativo (PITTENGER *et al.*, 2019).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia celular (ISCT) algumas características são frequentes às MSCs, como a expressão de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência de CD45, CD34, CD14 ou CD11, CD79 α ou CD19 e HLA-DR, assim como, plasticidade positiva para diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica (DOMINICI *et al.*, 2006; SETHE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2011). No início do seu crescimento *in vitro*, apresentam unidades formadoras de colônia (UFC), com células fusiformes e formato semelhante a fibroblastos (LIU *et al.*, 2013).

As MSCs vêm se destacando nos estudos pré-clínicos e clínicos de terapia celular (OLIVEIRA, 2008; PESSOA *et al.*, 2014; SILVA FILHO *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2017; ARGOLO NETO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; BEZERRA *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2019; ROCHA *et al.*, 2019; KHOJASTEH *et al.*, 2019; SOARES *et al.*, 2019; BEZERRA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; BALDERRAMA, 2021; NEVES *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2021; MARODIN, 2022; LEITE *et al.*, 2023). As fontes celulares mais utilizadas são a medula óssea e o tecido adiposo (CORRADETTI *et al.*, 2013), mas independente da fonte de obtenção, as MSCs vem ganhando mais espaço na medicina regenerativa, sendo comprovado através de diversos estudos o seu potencial na reabilitação dos mais variados tecidos, tanto em humanos, quanto em animais (OLIVEIRA, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2010; LONGO, 2015; SIQUEIRA, 2018; COSTA *et al.*, 2019; SHANG *et al.*, 2021). Por esse motivo, se tornaram um objeto de estudo interessante desde a sua descoberta.

2.2 Células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC)

O tecido adiposo representa uma fonte importante e abundante de MSC, uma vez que pode ser obtido de forma relativamente fácil, por meio de procedimento menos invasivo que a punção da medula óssea, com baixa incidência de morbi-mortalidade e grande disponibilidade de material para pesquisas e aplicação em procedimentos de terapia celular (YARAK e OKAMOTO, 2010; ZUK, 2010; LOCKE *et al.*, 2011). Ainda não existe um consenso entre os pesquisadores quanto à nomenclatura dessas células que podem receber outras denominações como: células processadas do lipoaspirado (PLA), pré-adipócitos, fração celular do estroma

vascular (SVF), MSC do tecido adiposo ou ADSCs (*adipose-derived stem cells*) (BUNNEL *et al.*, 2008; ZUTTON *et al.*, 2013).

As análises comparativas de MSC derivadas da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical, demonstraram que as ADSCs não diferem quanto à morfologia e ao fenótipo imunológico (PRUNET-MARCASSUS *et al.*, 2006; MAZINI *et al.* 2019). Contudo, as ADSCs possuem uma melhor taxa de proliferação celular e o rendimento do tecido adiposo é maior que a medula óssea (LEE *et al.*, 2004; KERN *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2016). Portanto, o tecido adiposo tornou-se uma fonte de MSC muito atrativa para a medicina regenerativa.

As ADSCs apresentam grande capacidade de expansão *in vitro*, são plástico-aderentes, podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, osteogênicas, adipogênicas, condrogênicas e miogênicas. Demonstram características de auto-renovação, diferenciação e expressão de marcadores mesenquimais (CD34+, CD44+) (KERN *et al.*, 2006; KHOJASTEH e SADEGHI 2016; KHOJASTEH *et al.*, 2019). O uso dessas células é muito promissor nas pesquisas de regeneração tecidual, devido à praticidade de obtenção, além de não envolver questões éticas e imunogênicas (YARAK e OKAMOTO, 2010).

Cresce o interesse na utilização de ADSC em estudos sobre o desenvolvimento de neoplasias, doenças degenerativas e ainda aplicações terapêuticas na área de cirurgias de regeneração óssea (SCHÄFFLER e BÜCHLER, 2007; YARAK e OKAMOTO, 2010; SOUZA, 2021; BALDERRAMA *et al.*, 2021). Costa *et al.* (2019) obtiveram resultados fisiológicos positivos utilizando as ADSCs no reparo do tecido mamário com mastite crônica em caprinos. Longo (2015) observou em seu estudo que a associação de ADSC com conduto de fibrina na regeneração do nervo periférico de ratos, apresentou recuperação funcional e regeneração histológica estatisticamente significativa quando comparada à reconstrução somente com conduto de fibrina, potencializando o efeito regenerativo desse biomaterial.

As ADSCs vêm sendo descrita em diferentes pesquisas, na aplicação direta nos locais de reparo para reconstrução de tecidos e órgãos lesados (YAMAMOTO *et al.*, 2010; PAK, 2011; SIQUEIRA, 2018; COSTA *et al.*, 2019); associada com biomateriais para enxertia em casos de regeneração tecidual óssea, apresentando resultados promissores (ZANNETTINO *et al.*, 2008; AKHLAGHI *et al.*, 2019; KHOJASTEH *et al.*, 2019; BALDERRAMA, 2021).

2.3 Hidrogéis

Os hidrogéis são formados por polímeros sintéticos ou naturais, quimicamente ou fisicamente reticulados (SANTO *et al.*, 2022). Possuem capacidade de absorver e reter uma grande quantidade de água, sendo, esta característica atribuída à presença de grupos hidrofílicos, tais como -OH, CONH, -CONH₂, e -SO₃H (HAMIDI, AZADI e RAFIEI, 2008); são altamente porosos, favorecendo a infiltração e interconectividade celular, permitindo um excelente meio de crescimento para os tecidos (XIAO *et al.*, 2019).

Essa classe de materiais representa um excelente substrato para aplicações de cultura celulares, devido a sua semelhança estrutural com a matriz extracelular encontrada *in vivo*, biocompatibilidade e seu alto teor de água. Ademais, é frequentemente utilizada em aplicações biotecnológicas e biomédicas, podendo ser projetados para favorecer a proliferação, migração e diferenciação celular, permitir o transporte de oxigênio e nutrientes, e fornecer às células um ambiente 3D altamente hidratado que mimetizam os tecidos moles nativos (KIERSZENBAUM, 2012; CLEVERS, 2016).

Os hidrogéis se mostram promissores na área de regeneração óssea, uma vez que é possível modular suas propriedades químicas, físicas e biológicas, além de possibilitar procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos, podendo ser injetado no sítio da lesão (REHMAN *et al.*, 2019; ZIMINSKA *et al.*, 2020). É atóxico, apresentando consistência elastomérica, o que permite minimizar o atrito entre os tecidos e o hidrogel (KIERSZENBAUM, 2012). Os hidrogéis provenientes de polissacarídeos vêm despertando interesse crescente entre os pesquisadores, pois os polímeros naturais são biocompatíveis, abundantes, obtidos a partir de fontes renováveis e apresentam baixo custo de produção. Dentre os polissacarídeos mais utilizados para este fim, está a gelatina de metacrilato (GelMA) (MCCUSKEY, 2008; SOUZA, 2021).

2.4 Hidrogel de GelMA

A gelatina metacrilata (GelMA), também conhecida como gelatina metacrilamida, gelatina metacrilato ou gelatina metacrilada, é um hidrogel fotopolimerizável, biocompatível e biodegradável, obtida através da desnaturação do colágeno (NICHOL *et al.*, 2010; RAHALI *et al.*, 2017). Esse biomaterial é resultado da reação entre a gelatina e o anidro metacrílico, conferindo-lhe estabilidade mecânica. Este fato ocorre, devido às ligações moleculares insaturadas formadas com os grupamentos amina livres presentes na molécula do polímero

(XIAO *et al.*, 2019; DONG *et al.*, 2019; HUANG *et al.*, 2020). A reticulação do hidrogel ocorre por radiação sob exposição à luz UV na presença de fotoiniciador, produzindo radicais livres que se ligam aos grupos metacrilatos, e então o GelMA está polimerizado, tornando este material tridimensionalmente estável a temperatura ambiente (POMARI *et al.*, 2019).

O hidrogel de GelMA é amplamente utilizado em aplicações de biofabricação devido à sua facilidade de síntese, eficácia, biocompatibilidade e baixo custo (YUE *et al.*, 2015). Apresenta estrutura tridimensional porosa rica em colágeno e sequências RGD (arginina-glicina-aspartato), sua semelhança estrutural com a matriz extracelular encontrada *in vivo* os torna um excelente sítio para maior adesão e proliferação celular (KIERSZENBAUM, 2012; YUE *et al.*, 2015, THAKURI *et al.*, 2017; MONTEIRO *et al.*, 2018). Por ser solúvel em água e quimicamente reativo, a polimerização do GelMA permite que a microfabricação dos hidrogéis possua padrões únicos, morfologias e estruturas tridimensionais, funcionando como plataformas adequadas para as interações de biomateriais celulares (NICHOL *et al.*, 2010; AUBIN *et al.*, 2010). No entanto, algumas pesquisas indicam que quando altamente reticulados para aumentar sua rigidez mecânica, apresentam limitações quanto à degradabilidade, tamanho dos poros e manutenção da viabilidade celular (ZHOU *et al.*, 2015; DAS *et al.*, 2019; XIAO *et al.*, 2019).

Devido a sua facilidade de manipulação, molhabilidade, viscosidade, taxa de absorção de água e injetabilidade, permitem que o GelMA seja aplicado diretamente na área de defeitos pequenos e irregulares, como hidrogel injetável (ZIMINSKA *et al.*, 2020; RIEIRO, 2021). Esse biomaterial tem sido usado também para os sistemas de liberação de drogas, associado de forma satisfatória com diversos aditivos, tais como, nanofibras, nanotubos e nanopartículas, semelhante a outros hidrogéis (PAUL *et al.*, 2016; BORDINI, 2021) e estudado como matriz tridimensional para formação de organóides tumorais (SOUZA, 2021).

Estudos demonstraram o potencial do GelMA como estrutura adequada para proporcionar a regeneração de tecidos mineralizados vascularizados (ZHOU *et al.*, 2014; VISSER *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2017) e restauração óssea (CHEN *et al.*, 2016; QIAO *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2023). Já Bordini (2021), em co-cultura de células associada ao GelMA com nanotubos de haloisita (HNT) contendo dexametasona, mostrou que este biomaterial não causa reação inflamatória tecidual, e foi capaz de aumentar intensamente a deposição óssea *in vivo*.

2.5 Biocompatibilidade

É indispensável à verificação da compatibilidade de novos materiais por testes *in vitro* e *in vivo*, mediante avaliação morfológica das células em contato e testes de citotoxicidade, com objetivo de garantir segurança na sua utilização (JIMÉNEZ-GALLEGOS *et al.*, 2011; STEPANENKO e DMITRENKO, 2015).

Apesar de existir diversos testes para avaliação da citotoxicidade de agentes químicos, desde a descrição original do teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) por Mosmann (1983), este tem sido um dos mais utilizados em experimentos de culturas celulares devido a sua sensibilidade na detecção de citotóxicos (SOLEZ *et al.*, 2007). O teste consiste em avaliar a viabilidade celular quantificando o dano induzido por um agente através da atividade de enzimas mitocondriais (desidrogenases), o MTT incubado com células vivas, será reduzido a formazan por essas enzimas, transformando-se de um composto amarelo em azul escuro (formazan). A redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e conseqüentemente, à viabilidade celular (MOSMANN, 1983; RACUSEN *et al.*, 1999; PERES *et al.*, 2008).

Outro fator imprescindível para conferir segurança no uso de biomateriais, é a avaliação adequada do potencial genotóxico das substâncias químicas, por meio de testes *in vitro*, pois diversos fatores podem gerar danos no DNA (RIBEIRO, 2008; SACRAMENTO, 2012). A técnica “Ensaio do Cometa” (EC) ou “eletroforese em gel de célula única”, tem se destacado como técnica padrão para avaliar os danos e a reparação no DNA, devido a sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos desses danos (FAUST *et al.*, 2004; TICE *et al.*, 2000). Ademais, possui metodologia rápida, econômica e relativamente fácil (KLEINSASSER *et al.*, 2006). Consiste basicamente, em fazer passar uma corrente elétrica pelas células, proporcionando a migração dos fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentarem núcleo intacto com membrana bem delimitada, são consideradas sem danos, já as células identificadas visualmente com “cauda”, formadas pelos fragmentos de DNA, são células com danos detectáveis e serão classificadas quanto ao tamanho da cauda (BETTI; LOPRIENO; BARALE, 1994). Quanto maior for a cauda, maior é a fragmentação (KLEINSASSER *et al.*, 2006; SACRAMENTO, 2012).

Estes testes são utilizados para avaliar o risco de distintos materiais, independentemente da concentração e período de exposição, contudo, apresentam diferentes

sensibilidades de acordo com os tipos celulares utilizados (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Sendo assim, somente após a constatação *in vitro* de atoxicidade é que se deve prosseguir para ensaios em animais de laboratório.

CAPÍTULO I*

*Submetido ao periódico *Brazilian Journal of Veterinary Research*.

Citogenética e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de ratos em cultivo com hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA)¹

Letícia L. S. Soares^{2*}, Francisca L. A. Cardoso²,
Danielle B. Andrade³, Antonielly C. Reis⁴, Edson C. Silva-Filho³, Adalberto S. Silva⁵,
Napoleão M. Argôlo Neto²,
e Maria A. M. Carvalho²

ABSTRACT. Soares L.L.S., Cardoso F.L.A., Andrade D.B., Reis A.C., Silva-Filho E.C., Silva A.S., Argôlo Neto N.M., Carvalho M.A.M. 2023. **Cytogenetics and viability of adipoderived mesenchymal stem cells from rats in culture with methacrylate gelatin hydrogel (GelMA).** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 41:00, 2023. Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-tronco - NUPCelt, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Centro de Ciências Agrárias, Ininga s/n, Teresina, PI 64049-550, Brasil E-mail: leticyalorrayne-12@hotmail.com

The association of mesenchymal stem cells (MSC) with biomaterials has been investigated, with the aim of reducing time and improving the healing quality of various body tissues. Bone regeneration still represents a challenge in orthopedics, orthodontics and traumatology. Cell therapy complements the use of biomaterials, with their osteogenesis property, transforming a primarily osteoinductive biomaterial into a bone substitute with the properties and qualities of autogenous bone grafting, without complications and morbidities. Seeking to promote safety in cell therapy procedures in future in vivo research, this work aims to evaluate the biocompatibility, cytotoxicity and genotoxicity of 1% and 3% methacrylate gelatin hydrogel (GelMA) associated with adipoderivative mesenchymal stem cell culture (ADSC), by cytogenetic test by Comet Assay and cell viability by MTT, in addition to analyzing the osteogenic potential of this biomaterial. The ADSCs were isolated from adipose tissue of rats (Commission for Ethics in the Use of Animals - CEUA/UFPI-658/20) by enzymatic digestion with collagenase type I and maintained in culture in DMEM medium enriched with fetal bovine serum (15%) and incubated at 37°C, 5% CO₂. ADSCs were characterized by flow cytometry, showing positive staining for CD90 and CD105, and negative for CD14 and CD45. Its plasticity, proven, through adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation. GelMA was prepared by dissolving 0.1g in 5mL of PBS, using Irgacure 2959 as a photoinitiator at 40°C, mechanically stirred and cross-linked under UV light to form the hydrogel. The material was characterized by FTIR, XRD, TG/DTG and

SEM. The lethality test for *Artemia salina* was performed at four different concentrations (5mg/mL; 1mg/mL; 0.5mg/mL and 0.1mg/mL) in 24h and 48h, showing mild toxicity of GelMA at its highest concentration (5mg /mL) but still above the LD50 (mean lethal dose). In the MTT test, only GelMA1% showed cell viability above 70% in all studied periods, not demonstrating cytotoxic potential for ADSCs. In the osteogenic induction of ADSCs with GelMA 1% and 3%, it was verified that the biomaterial is not able to promote cell differentiation in the absence of an inducing factor. It is concluded that the association of GelMA hydrogel with ADSC is promising, as it is capable of positively interacting and facilitates cell adhesion. Biocompatible, not showing cytotoxicity and genotoxicity to cells, allowing future *in vivo* studies.

INDEX TERMS: MSC, GelMA, biomaterial, cytotoxicity, genotoxicity.

RESUMO. [Citogenética e viabilidade de células-tronco mesenquimais adipoderivadas de ratos em cultivo com hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA)]. A associação de células-tronco mesenquimais (MSC) com biomateriais vem sendo investigada, com o objetivo de reduzir o tempo e melhorar a qualidade cicatricial de diversos tecidos do organismo. A regeneração óssea ainda representa um desafio na ortopedia, ortodontia e traumatologia. A terapia celular vem complementar a utilização dos biomateriais, com a sua propriedade de osteogênese, transformando um biomaterial primariamente osteoindutor em um substituto ósseo com as propriedades e qualidades da enxertia óssea autógena, sem complicações e morbidades. Buscando promover segurança aos procedimentos de terapia celular em futuras pesquisas *in vivo*, este trabalho tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade, cito e genotoxicidade do Hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA) a 1% e 3% associado a cultura de células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC), mediante teste citogenético por Ensaio Cometa e viabilidade celular por MTT, além de analisar o potencial osteogênico desse biomaterial. As ADSCs foram isoladas de tecido adiposo de ratos (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI-658/20) por digestão enzimática com colagenase tipo I e mantidas em cultivo em meio DMEM enriquecido com soro fetal bovino (15%) e incubadas a 37°C, 5% CO₂. As ADSCs foram caracterizadas por citometria de fluxo, apresentando marcação positiva para CD90 e CD105, e negativa para CD14 e CD45. Sua plasticidade, comprovada, por meio de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica. O GelMA foi preparado dissolvendo-se 0,1g em 5mL de PBS, usando Igarcure 2959 como fotoiniciador a 40°C, agitado mecanicamente e reticulado em luz UV para formação do hidrogel. O material foi

caracterizado por FTIR, DRX, TG/DTG e MEV. O teste de letalidade por *Artemia salina* foi realizado em quatro concentrações diferentes (5mg/mL; 1mg/mL; 0,5mg/mL e 0,1mg/mL) em 24h e 48h, apresentando leve toxicidade do GelMA na sua maior concentração (5mg/mL) mas, ainda acima da DL50 (dose letal média). No teste de MTT, apenas o GelMA1% apresentou viabilidade celular acima de 70% em todos os períodos estudados, não demonstrando potencial citotóxico para as ADSCs. Na indução osteogênica das ADSCs com o GelMA 1% e 3%, verificou-se que o biomaterial não é capaz de promover a diferenciação celular na ausência de um fator indutor. Conclui-se que a associação do hidrogel de GelMA com ADSC é promissora, pois é capaz de interagir positivamente e facilita a adesão celular. Biocompatível, não apresentando cito e genotoxicidade às células, permitindo futuros estudos *in vivo*.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: MSC, GelMA, biomaterial, citotoxicidade, genotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A aplicabilidade da associação de células-tronco mesenquimais (MSC) com biomateriais vem sendo, cada vez mais, pesquisada com o objetivo de reduzir o tempo e melhorar a qualidade cicatricial de diversos tecidos, tanto animais, quanto humanos (Oliveira 2008, Shang et al. 2021). Essa associação tornou-se uma opção terapêutica atrativa com amplo espectro de aplicações clínicas na terapia celular, sendo caracterizada por seu potencial de diferenciação em linhagens celulares osteogênica, adipogênica, condrogênica; pela capacidade de proliferação e crescimento *in vitro* aderido ao plástico e por possuir morfologia semelhante a fibroblastos (Yarak & Okamoto 2010, Khojasteh & Sadeghi 2016, Khojasteh et al. 2019). Ademais, possuem propriedades imunossupressoras e secretam moléculas bioativas, que exercem efeitos tróficos, ampliando as possibilidades de utilização terapêutica (Sherman et al. 2011).

As MSCs podem ser obtidas de diversos tecidos vascularizados, porém o tecido adiposo é uma fonte atrativa, por ser relativamente fácil sua obtenção, por meio de métodos pouco invasivos, além de o organismo animal possuir grande reserva desse tecido (Zuttion et al. 2013, Khojasteh et al. 2019). As células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSCs) contituem uma fonte promissora em aplicações terapêuticas, com grande potencial no reparo e regeneração de órgãos e tecidos lesados (Malagutti-Ferreira 2016, Khojasteh et al. 2019).

Culturas celulares em modelo tridimensional têm sido usadas como método alternativo *in vitro*, a fim de aprimorar a simulação no organismo vivo. Entre as diversas opções de matriz baseadas em *scaffold* disponíveis para a cultura de células 3D, os hidrogéis, redes macromoleculares formadas por polímeros hidrofílicos intumescidos em água ou fluidos biológicos, são altamente promissores, por sua semelhança com o meio natural (Clevers 2016). A gelatina metacrilata (GelMA), também conhecida como gelatina metacrilada, gelatina metacrilóil ou gelatina metacrilamida, é um hidrogel fotopolimerizável com potencial para aplicações em engenharia de tecidos, e no cultivo de células *in vitro*, pela possibilidade de ser modificada quimicamente, biodegradável, biocompatível, solúvel em água e representar um adequado sítio para adesão celular (Kolesky et al. 2014, Yue et al. 2015). Diferentes pesquisas já demonstraram o potencial do GelMA como base para proporcionar a regeneração óssea (Chen et al. 2016a, Qiao et al. 2020, Bordini 2021).

A regeneração óssea ainda representa um desafio na ortopedia, ortodontia e traumatologia, humana e veterinária. Culturas celulares tridimensionais, envolvendo a associação de diferentes materiais (hidrogéis, polímeros, poliésteres, dentre outros), têm sido

usadas como métodos alternativos *in vitro* para simular as condições no organismo vivo. Um dos obstáculos da engenharia tecidual é encontrar os sinais que direcionam as etapas do desenvolvimento e da regeneração tecidual, buscando compreender o processo necessário à reprodução do tecido (Oliveira et al. 2010). A terapia celular vem complementar a utilização dos biomateriais, com sua propriedade de osteogênese transformando um biomaterial primariamente osteoindutor em um substituto ósseo, com todas as propriedades e qualidades da enxertia óssea autógena, sem complicações e morbidades (Grossi et al. 2017).

Possível associação de ADSCs com o hidrogel de GelMA, poderá resultar em um biomaterial potencialmente osteogênico, ativando no organismo a capacidade de neoformação óssea, de forma que, são criadas propriedades e características, comparáveis ao osso autógeno (Pelegri et al. 2011, Hernigou et al. 2014, Khojasteh et al. 2017, Khojasteh et al. 2019). No entanto, é necessário avaliar a biocompatibilidade e os possíveis efeitos tóxicos da associação dessas células com o hidrogel de GelMA. É imprescindível uma série de testes *in vitro* para uma análise adequada do potencial citotóxico e genotóxico de substâncias químicas (Ribeiro 2008), já que são muitos os fatores que podem causar danos no DNA (Malagutti-Ferreira 2016). Com base nesses aspectos, e em busca de promover segurança aos procedimentos de terapia celular em futuras pesquisas *in vivo*, este trabalho tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade, a citotoxicidade e genotoxicidade desse biomaterial associado ao cultivo de ADSCs, por meio do teste citogenético (ensaio cometa) e de viabilidade celular por MTT.

MATERIAL E METÓDOS

Animais. Foram utilizados seis ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) para coleta de tecido adiposo, com peso de 200g – 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA), alimentados com ração específica e água *ad libitum*.

Aspectos éticos. Todos os protocolos utilizados durante os procedimentos foram condizentes com as diretrizes para uso e experimentação animal, aprovados junto a Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFPI sob n°658/20.

Coleta do tecido adiposo subcutâneo. Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e midazolam (2mg/Kg), e analgesia com tramadol (5mg/Kg) e xilazina (3mg/Kg) por via intramuscular (IM). Na região ventral foi realizada a tricotomia e antisepsia com solução povidine-iodine (PVP-I). Foi feita a dissecação do tecido adiposo subcutâneo, nas regiões retroperitoneal, perirrenal e inguinal, coletado e acondicionado em tubos falcon de

15ml (TPP®, Trasadingen, Suíça) contendo solução salino-fosfato tamponante (PBS) enriquecida com 10% de antibiótico (Penicilina-Estreptomicina, Sigma-Aldrich®), para subsequente isolamento e expansão. Os ratos foram eutanasiados com lidocaína (10mg/kg) e após 10 min, administrado thiopental (150mg/kg), ambos intraperitoneal (Resolução Normativa nº37 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA).

Isolamento e expansão celular. Em câmara de fluxo laminar, as amostras do tecido adiposo foram lavadas em solução PBS com 10% de antibiótico (Penicilina- Estreptomicina, Sigma-Aldrich®) e dissociadas mecanicamente por 5 min com auxílio de lâminas de bisturi estéril nº24, em placa de Petri estéril. Para digestão enzimática foi adicionado 1mg/mL de colagenase tipo I (Sigma), previamente diluída na proporção de 1:3, em meio de cultivo DMEM. O material foi incubado em estufa (Thermo Scientific series II Water Jacket, USA) a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade durante 10 min. A reação enzimática foi neutralizada pela adição de meio de cultura basal completo DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de glutamina e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma® Nº M7145), com volume duas vezes superior ao da solução de digestão enzimática. As amostras foram transferidas para tubos falcon de 15mL (TPP®, Trasadingen, Suíça) e centrifugadas a 1000rpm por 10 min a 20°C. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento celular, ressuspendido, em 1mL de meio DMEM a 37°C e plaqueado em três garrafas de cultura de 25cm² (TPP®, Trasadigen, Suíça) mantidas em incubadora à 37°C e 5% de CO₂. O meio das culturas foi trocado a cada 72h, conforme o consumo dos seus nutrientes e a expansão feita após 80% de confluência da área da garrafa, por processo de tripsinização com taxa de repique de 1:2. As garrafas de cultura foram tripsinizadas adicionando 2mL de tripsina (Cultilab®, solução tripsina 2,500g/L e EDTA 250mg/L) e incubadas por 10 min. Decorrido esse período, a tripsina foi inativada com adição de 4mL de meio DMEM suplementado. A solução foi transferida para um tubo falcon de 15mL (TPP®, Trasadingen, Suíça) e centrifugada à temperatura de 20°C e 1000rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular (*pellet*), ressuspendido em 1mL de meio DMEM suplementado e replaqueado.

Ensaio de Unidade Formadora de Colônia (UFC). Foi alicotada uma amostra de ADSC, passagem 0 (P0), em placa de cultivo de 90x15mm (Kasvi, PR, Brasil), sendo realizadas trocas de meio conforme necessidade da cultura até a formação do máximo de colônias com mais de 20 células. As células foram fixadas em paraformaldeído (Vetec®) a 4% durante 30 min e coradas com Giemsa por 10 min à temperatura ambiente. As colônias

foram contadas sobre a superfície da placa utilizando microscópio invertido e foram mensuradas através do software Image J.

Ensaio de Plasticidade. Para a diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, as ADSCs em terceira passagem (P3) foram semeadas em placas de cultivo de 12 poços (TPP®) na concentração de $0,1 \times 10^6$ células por poço em triplicata com meio de cultivo DMEM até atingir 80% de confluência. Posteriormente, o meio de cultivo foi substituído pelo meio suplementado com fatores indutores de diferenciação (Gibco®) adipogênica (StemPro™ Adipogenes Differentiation Kit), condrogênica (StemPro™ Condrogenes Differentiation Kit) e osteogênica (StemPro™ Osteogenes Differentiation Kit). Os meios foram trocados a cada três dias conforme necessidade da cultura, sendo observada periodicamente, em microscópio invertido NIB 100 (Coleman®). Após 7, 14 e 21 dias do início do protocolo, os meios foram removidos e as células fixadas em paraformaldeído (Vetec®) a 4%, coradas com Oil Red, Alcian Blue e Alizarin Red para diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, respectivamente.

Caracterização Imunofenotípica. As células expandidas em 3ª passagem (P3) foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS, distribuídas em tubos para citometria de fluxo, concentração de 10^6 células, para cada um dos marcadores a serem analisados. Em cada tubo foi adicionado 1mL de PBS, centrifugados 2000rpm/10min para lavagem. Posteriormente, foi acrescentado anticorpo conjugado e as células incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida, lavadas uma vez com 1mL PBS para a retirada do excesso de anticorpo. As amostras foram analisadas utilizando-se citômetro de fluxo (FACS canto® II) e software BD FACS Diva Software (Version 6.1.3), obtendo-se 30.000 eventos por amostra testada. As populações foram estimadas pela porcentagem das células expressando cada um dos marcadores em relação ao total de células adquiridas por meio do software INFINICYT (version 5.1). Os resultados plotados em forma de histograma e dotplot em marcação dupla. Para realização deste procedimento, utilizou-se um painel de 4 anticorpos CD105 (Anti-CD105 FITC - Abcam Cambridge, USA); CD90 (Anti-CD90 APC - Abcam Cambridge, USA); CD14 (Anti-CD14 FITC-Sigma, USA); CD45 (Anti-CD45 FITC-Abcam Cambridge, USA) e uma amostra controle (branco) contendo apenas células.

Produção do hidrogel de GelMA. Para a preparação da solução de GelMA, adicionou-se 0,1g de GelMA em um tubo falcon contendo 5mL de PBS. A mistura foi levada a estufa à 70oC por 30 min (Sheikhi et al. 2018). Para o preparo do fotoiniciador, 0,5g de Irgacure 2959 foram colocadas em um Becker coberto com papel alumínio, contendo 2mL de

PBS, o qual foi para banho quente à 70°C por 30 min. Após este período, a solução do fotoiniciador foi agitada mecanicamente, por 20 min, transferida para a solução de GelMA, repetindo-se a agitação à 40°C durante 15 min ao abrigo da luz. Para a produção do hidrogel, a solução de GelMA/Igarcure 2959 foi adicionada em um tubo falcon e agitada de modo mecânico por 15 min, sendo levada a uma fonte de luz UV para reticulação. O recipiente contendo a mistura foi colocado a uma distância de 10cm da fonte de luz de intensidade 18,5mW/cm² por 2 min (Sheikhi et al. 2018).

Caracterização do hidrogel de GelMA. A caracterização química foi realizada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com um Perkin Elmer Spectrum 100, janela de KBr, resolução 4cm⁻¹, 16 varreduras. Para análise termogravimétrica (TG e DTG) foi utilizado equipamento SDT Q600-0883 (DSC-TGA) da TA Instruments, com taxa de aquecimento de 10°C min⁻¹, de fluxo 100mL min⁻¹, sob atmosfera de argônio, utilizando cadinho de alumina. Os dados de difração de raios – X (DRX) foram obtidos com o difratômetro Shimadzu XDR – 6000, variação angular de 5-100 °(2θ), radiação de CuKα (λ=1,5418Å) e voltagem de 40KV/30mA. As micrografias foram obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão a emissão por campo, marca FEI, modelo Quanta FEG250, tensão de aceleração de 1 a 30kV, equipado com EDS de SDD (silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX -1001, detector Apollo X-SDD.

Ensaio *Artemia salina*. A toxicidade do hidrogel de GelMA foi avaliada por ensaio de letalidade da *Artemia salina* (*Artemia* eggs DE RP33801, JQ GmbH&Co.KG Neuhofen, Germany) em quatro concentrações diferentes (5mg/mL; 1mg/mL; 0,5mg/mL e 0,1mg/mL). O experimento aconteceu em triplicata (10 náuplios em cada tubo), e após 24h e 48h, contou-se o número de náuplios ainda vivos. A relação entre a concentração do material e número de larvas vivas foi utilizada para calcular a DL50 (Meyer et al. 1982).

Avaliação da citotoxicidade (Teste MTT). A viabilidade celular associada ao cultivo com hidrogel de GelMA foi determinada pelo teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]. As células em P3 foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 poços, adicionados 100µL de meio DMEM suplementado e 0,01x10⁶ de ADSC por poço. Foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂, durante 24h para adesão celular. A seguir, retirou-se o meio de cultura das placas e adicionou-se 100ul do hidrogel de GelMA diluído no meio DMEM nas concentrações de 1% e 3% por poço, posteriormente, incubadas à 37°C com 5% de CO₂, pelo período de 24h, 48h e 72h. Os meios foram descartados, os poços lavados, cuidadosamente, com PBS, acrescentados 10ul de MTT por poço, e incubados por 4h.

Decorrido este período, o MTT foi descartado e adicionaram-se 100ul de dimetilsufóxido (DMSO) em cada poço por 30 min em temperatura ambiente, homogeneizado a cada 10 min. Foi realizada a leitura de absorbância da placa em espectrofotômetro de microplacas com filtro de 550nm, leitora de placa Biotek (modelo ELx 800). O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de viabilidade, sendo o grupo controle (contendo apenas células) considerado como 100%.

Análise de genotoxicidade (Ensaio Cometa). As culturas em P3 aderidas em garrafas de 25cm² (TPP®, Trasadigen, Suíça) foram submetidas ao cultivo com hidrogel de GelMA, diluído em meio DMEM, nas concentrações de 1% e 3%, durante 24h, 48h e 72h, em estufa a 37oC e 5% CO₂. A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Speit & Rothfuss (2012). Após os tempos de tratamentos concluídos, alíquotas de 10µL de suspensão de ADSCs de ratos foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90µL) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4oC. Após esse período, foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH>13) por 20 min; na sequência, expostas a uma corrente elétrica de 300mA e 25V (0,90V/cm) por 15 min em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4M e pH 7,5) e coradas com solução de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em triplicata por tratamento. O ID foi calculado por meio da fórmula: $ID = \Sigma$ (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula: $FD = 100 - n^{\circ}$ de células classe 0.

Indução osteogênica com hidrogel de GelMA. As ADSCs de ratos em contato com o hidrogel de GelMA foram incubadas em placas de 12 poços na densidade de $0,1 \times 10^6$ células para cada poço em triplicata. Após confluência de 80% foi removido o meio de cultivo DMEM e adicionado o meio basal (StemPro™ Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium) juntamente com o GelMA a 1% e com GelMA a 3%, no qual, o indutor (StemPro™ Osteogenesis Supplement) foi substituído pelo biomaterial (GelMA). Neste ensaio, também foram testados o GelMA em conjunto com o indutor para avaliar o potencial de indução do material com o kit de diferenciação (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit- Gibco®), nas duas concentrações (GelMa 1% e 3%). O grupo controle continha apenas as células com o

meio indutor do kit de diferenciação (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit- Gibco®). A troca de meio foi realizada a cada 72h e após 21 dias o meio foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS e as células fixadas com solução de formaldeído a 4% por 30 min. Após fixação, foram lavadas com água destilada e coradas com Alizarin Red a 2% (pH 4,2) por 10 min, para confirmação da diferenciação osteogênica.

Análise Estatística. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. As análises, realizadas no programa GraphPad Prism for Windows (versão 8.0) por meio da análise de variância (ANOVA) One-way com pós-teste de Turkey, considerando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Isolamento e expansão das ADSC

No processo de isolamento, as células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC) demonstraram adesão à superfície plástica e morfologia celular de fusiforme a fibroblastoíde. Aos 10 dias de cultivo, observaram-se as primeiras células plástico-aderentes com morfologia fibroblastoíde e aos 16 dias a cultura atingiu 80% de confluência da área da garrafa. As células cultivadas, expandidas até a 3ª passagem (P3), mostraram-se sempre com morfologia característica de fusiforme a fibroblastóide, núcleos esféricos e proliferação em monocamada, comprimento médio de $71,37 \pm 8,28\mu\text{m}$ e largura média de $19,89 \pm 2,55\mu\text{m}$.

Unidades formadoras de colônias (UFC) e Caracterização Imunofenotípica

Foi observada a formação de 134 colônias bem definidas. As ADSCs apresentaram cultura homogênea com formato fusiforme, núcleos bem definidos e forte interação celular (Fig.1). Quanto à imunofenotipagem as células expressaram marcação para o CD90 e CD105, ausência para o CD14 e CD45 (Fig.2-5).

Plasticidade Celular

Esta análise demonstrou diferenciação celular positiva para as três linhagens propostas (Fig.6-9). Na diferenciação osteogênica, a partir do 10º dia de cultivo observou-se alterações morfológicas das células, com mudança do seu formato de fusiforme para arredondado. Após 21 dias, as células apresentaram matriz óssea rica em cálcio, fortemente evidenciada pelo corante Alizarin Red e pontos redondos concentrados semelhantes aos osteoblastos (Fig.7). As ADSCs submetidas à diferenciação adipogênica modificaram seu fenótipo de fusiformes para arredondado e aumentaram o volume. Após os 14 dias de cultivo mostraram formato e

tamanho semelhantes à adipócitos com gotículas lipídicas no citoplasma, demonstrado pela coloração Oil Red (Fig.8). Já na diferenciação condrogênica, foi possível observar a partir do 6º dia as alterações morfológicas das células, que após a coloração com Alcian Blue, evidenciou-se uma matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos (Fig.9).

Caracterização do Hidrogel de GelMA

O FTIR confirmou a presença do GelMA no hidrogel, por meio de forte banda à 1650cm⁻¹ relacionada ao estiramento da banda referente à amida I-C=O. A banda à 1500-1570cm⁻¹ corresponde à flexão de C-N-H enquanto à 3200-3400cm⁻¹ indica a presença de ligações peptídicas, principalmente alongamento N-H; em 3062cm⁻¹ representa os grupos de alongamento C-H e em 1640cm⁻¹ indica dupla ligação de carbono no GelMA que aponta a interação entre gelatina e anidrido de metacrilato (Fig.10). Os dados obtidos por DRX mostraram um pico amplo em 2 θ =32° atribuído às redes de polímeros, característicos do GelMA (Fig.11). Na degradação térmica foram observados dois eventos sendo um a 56oC com perda de massa de 6,27% e o outro à 313oC de 37,5% (Fig.12-13). Quanto a morfologia do hidrogel de GelMA, as imagens obtidas por MEV mostraram uma estrutura de poros interconectados (Fig.14). O grau de substituição do metacrilato na gelatina influencia no tamanho dos poros no hidrogel, sendo que altos graus, tendem a reduzir o tamanho dos poros.

Toxicidade em *Artemia salina*

O teste de letalidade em *Artemia salina* do GelMA, apresentou leve toxicidade na maior concentração (5mg/mL), mas acima da DL 50 (Dose letal média). Estatisticamente quando comparados com o grupo controle, onde foram testados apenas resíduos salinos, os demais grupos não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$) em 24 e 48 horas, revelando assim, a não toxicidade do material (Fig.15).

Citotoxicidade *in vitro*

O teste do MTT mostrou que o GelMA a 1% apresentou maior viabilidade celular quando comparado ao GelMA a 3%, pois, o GelMA 1% obteve resultados de 67,7% e 88% e o GelMA 3% de 66% e 51%, em dois dos tempos avaliados, 48 e 72 horas, respectivamente. Demonstram assim, resultados iguais apenas, no período de 24 horas de exposição, onde ambos têm viabilidade celular de 83%, considerando o controle positivo de 100%. A partir do período de 48h foi observado redução na proliferação das células cultivadas com GelMA a

3%. Esta inibição, pode ter ocorrido pela maior sensibilidade das ADSCs à presença de maior concentração do GelMA. Os resultados demonstram a linearidade na relação dose/efeito, onde o aumento da concentração da amostra do biomaterial é inversamente proporcional a viabilidade celular. A análise estatística não indicou citotoxicidade do GelMA a 1% e 3% (teste amostral), não apresentando diferença significativa ($p \geq 0,05$) de viabilidade celular quando comparado ao grupo controle, nos tempos testados, indicando que o Hidrogel de GelMA é atóxico e biocompatível com as ADSCs em experimento *in vitro* (Fig.16).

Genotoxicidade

O Hidrogel de GelMA a 1% e 3% não induz danos estatisticamente significativos no DNA das ADSCs em todos os períodos experimentais quando comparados ao controle. No entanto, o GelMA a 3% apresentou maior frequência de danos, justificada pelo aumento da concentração do biomaterial e dos tempos avaliados (Fig.17-18). Os resultados obtidos pelo Ensaio Cometa demonstram que o biomaterial não tem potencial genotóxico.

Potencial osteogênico do hidrogel de GelMA

Quanto à diferenciação celular nas amostras de ADSCs associadas com GelMA, apenas as células junto com o meio indutor específico, apresentaram mudanças na morfologia de fusiforme para arredondado. Confirmada a diferenciação osteogênica, mediante coloração dos osteoblastos por Alizarin Red, evidenciando-se os depósitos de cálcio na matriz óssea. Este resultado demonstra que apenas o biomaterial não é capaz de induzir a diferenciação celular, necessitando de um fator indutor para osteogênese, sendo considerado um material osteocondutor (arcabouço).

DISCUSSÃO

O isolamento e expansão de ADSCs apresentaram resultados satisfatórios e condizentes com a literatura, com obtenção de grande população celular, por meio da associação entre o método de dissociação mecânica e enzimática com collagenase, isolando células plástiso-aderentes, com aspecto fusiforme e alongado (Yarak & Okamoto 2010, Longo 2015, Chen et al. 2016b). Estudos anteriores descreveram similiaridades morfológicas entre linhagens de MSCs adipoderivadas, do cordão umbilical e da medula óssea (Kern et al. 2006). As ADSCs expressaram marcação positiva para CD90 e CD105, antígenos comumente identificados em MSC, e ausência de expressão para CD14 e CD45, antígenos de linhagem hematopoiética

(Dominici et al. 2006). Apresentaram plasticidade positiva para três tipos de linhagem: osteogênica, condrogênica e adipogênica, confirmando sua multipotencialidade (Longo 2015, Alves et al. 2017, Khojasteh et al. 2019). A baixa expressão de CD105 pode estar associada à variação da composição antigênica conforme o sítio de coleta e baixa passagem, assim como, citada em outras pesquisas (Gronthos et al. 2001, Kaewkhaw & Haycook 2011).

O GelMA é derivado da reação do metacrilato anidro com gelatina, representada nos espectros do FTIR pela banda 1640cm^{-1} indicando uma dupla ligação de carbono (Figura 11), onde o anidrido metacrílico reage com os grupos amina primários na gelatina para levar à adição de grupos metacrilato nos macrômeros de gelatina (Bray et al. 2018). Ademais, para se tornar um hidrogel, sofre reticulação na presença de fotoiniciador, onde ele é exposto à radiação ultravioleta. Radicais livres são formados após absorção da luz ultravioleta e o GelMA sofre uma polimerização em cadeia $\text{C} = \text{C}$ (Krishnamoorthy et al. 2019). A caracterização química do hidrogel de GelMA foi compatível ao descrito por outros autores (Rajabi et al. 2019). No DRX o GelMA apresentou pico característico atribuído às redes de polímeros (Zhou et al. 2014, Rehman et al. 2019). As imagens de MEV apresentaram estrutura de poros interconectados, predominantemente, arredondados e abertos, como observado em outros trabalhos, ainda, para outros hidrogéis (Gu et al. 2020, Souza 2021). Esta característica é importante e desejável, pois poros interligados e a alta porosidade são favoráveis para a adesão e crescimento celular no biomaterial. No GelMA o grau de substituição do metacrilato na gelatina pode influenciar no tamanho dos poros no hidrogel, ou seja, altos graus de substituição tendem a reduzir o tamanho dos poros, dificultando a fixação celular (Maenhoudt et al. 2020).

O principal método empregado nos testes de *Artemia salina* foi proposto por Meyer et al. (1982), sendo considerado uma referência para estabelecer a correlação entre a atividade tóxica sobre a *Artemia salina* e o ensaio de atividade antitumoral (Nguta et al. 2011, Harada 2009). Meyer et al. (1982) definiram uma relação entre a dose letal média (DL50) e o grau de toxicidade, estabelecendo que amostras com valores acima de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas atóxicas e quando menores, são tóxicas. O ensaio de *Artemia salina* realizado no hidrogel de GelMA em quatro concentrações diferentes, apresentou leve toxicidade do GelMA na sua maior concentração (5mg/mL), mas ainda acima da DL50, confirmando o que Nguta et al. (2011) observaram, que o aumento da mortalidade das artemias era proporcional ao aumento da concentração da amostra.

Quanto à viabilidade celular, o MTT incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais (desidrogenases), transformando-se de um composto amarelo em um azul escuro, devido à redução do MTT a formazan. Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular (Mosmann 1983, Peres et al. 2008). Um biomaterial é classificado como um material com ausência de potencial citotóxico, quando apresenta viabilidade celular superior a 70% (Niamsap et al. 2019), o que pode ser verificado nos resultados do GelMA a 1%, período de 24h e 72h, porém em 48h obteve-se apenas 67,7% de viabilidade. Este fato não implica que esse material seja citotóxico, tendo em vista que a viabilidade celular aumenta nas 72h, fato semelhante ao descrito por Souza (2021), que observou que as células incorporadas no hidrogel revelam capacidade de proliferar e de começar a formar grupos maiores organizados após 48h. Essa adesão preferencial por hidrogéis sem nanocomponentes, pode estar associada, pelo fato, do GelMA possuir sequências bioativas de aminoácidos derivados da gelatina, podendo ser úteis para a fixação e proliferação celular. Gao et al. (2023) evidenciaram que a adição do GelMA aos polímeros sintéticos, diacrilato de polietileno glicol (PEGDA) e diacrilato Pluronic F127 (F127DA), facilitou significativamente a adesão e proliferação celular. Kulkarni et al. (2022) comprovaram a biocompatibilidade do hidrogel de GelMA com células renais humanas, por meio de ensaio de MTT, e verificaram viabilidade celular superior a 80%.

Os resultados por meio do teste ensaio cometa, nas condições experimentais utilizadas, não detectaram danos no DNA de ADSCs, após cultivo com o hidrogel de GelMA em todos os períodos avaliados. Estes dados indicam que o material não é genotóxico. O mesmo pode ser observado por outros autores que investigam a genotoxicidade *in vitro* de diferentes materiais promissores para enxertia óssea. Kido (2011) usando vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®), observou que esse material não apresenta efeitos genotóxicos quando cultivado com células de linhagem L929 (fibroblastos murinos). Dantas (2022) demonstrou que microesferas à base de hidroxiapatita nanoestruturada para aplicação na regeneração óssea cultivadas com CHO-K1 (células de ovário do hamster chinês), também não possuem potencial genotóxico, corroborando com os dados encontrados.

O hidrogel de GelMA não mostrou potencial osteogênico, promovendo diferenciação apenas na presença de meio indutor específico (StemPro™ Osteogenesis Differentiation Kit-Gibco®). Já, em outros estudos, foi observado que a associação do GelMA com moléculas empregadas na suplementação osteogênica *in vitro*, beta-glicero-fosfato (βGP) e

ácidoascórbico (AA), possibilita criar um *scaffold* biomimético capaz de promover um microambiente pró-osteogênese. Este fato leva a um aumento na diferenciação osteogênica e na deposição óssea *in vivo* (Hu et al. 2020, Li et al. 2018). Bordini (2021) também relatou que as células semeadas sobre a superfície do GelMA contendo nanotubos de haloisita e dexametasona em modelo de co-cultura apresentaram maiores valores de atividade de ALP (marcador de diferenciação osteoblástica) e deposição de matriz mineralizada, além disso, este biomaterial não provocou reação inflamatória tecidual e foi capaz de aumentar intensamente a deposição óssea *in vivo*. Gao et al. (2023) também demonstraram que o GelMA associado ao diacrilato de polietileno glicol (PEGDA) e diacrilatoPluronic F127 (F127DA), promove efetivamente a diferenciação osteogênica de MSCs em ambiente osteoindutor.

CONCLUSÃO

O hidrogel de GelMA é poroso, facilitando a adesão e proliferação das células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC). Biocompatível, não apresentando cito e genotoxicidade às células, permitindo futuros estudos *in vivo* com esse biomaterial.

Agradecimentos - Este trabalho foi apoiado pelo Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com células-tronco (NUPCelt), Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV), Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular (LIB), Laboratório de Genética Toxicológica (LAPGENIC) e Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Declaração de conflito de interesse - Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Alves E.G.L., Serakides R., Rosado I. R., Boeloni J.N., Ocarino N.M. & Rezende C.M.F. 2017. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciência Animal Brasileira*. 18:1-14.<<https://doi.org/10.1590/1089-6891v18e-34050>>
- Bordini E.A.F. 2021. Engenharia tecidual e biotecnologias aplicadas no desenvolvimento de *scaffolds* multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 115 p.

- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I., Siegel R.L., Torre L.A. & Jemal A. 2018. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers In 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 68(6):394–424. <<https://doi.org/10.3322/caac.21492>>
- Chen X., Bai S., Li B., Liu H., Wu G., Liu S. & Zhao Y. 2016 a. Fabrication of gelatin methacrylate/nanohydroxyapatite microgel arrays for periodontal tissue regeneration. *Int J Nanomedicine.* 11: 4707-18. 43. <<https://doi.org/10.2147/IJN.S111701>>
- Chen Y., Liu H., Chang Y., Cheng Y.H., Mersmann H.J., Kuo W. & Ding S. 2016 b. Isolation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Porcine Subcutaneous Adipose Tissues. *Journal of Visuallized Experiments.* 109: 1-10. <<https://doi.org/10.3791/53886>>
- Clevers H. 2016. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell.* 165(7):1586-97. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>>
- Dantas M.R.N. 2022. Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de microesferas à base de hidroxiapatita nanoestruturada para aplicação na regeneração óssea. Monografia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 42p.
- Gao J., Li M., Cheng J., Liu X., Liu Z., Liu J., Tang P. 2023. Estruturas GelMA/PEGDA/F127DA impressas em 3D para regeneração óssea. *Jornal de biomateriais funcionais.* 14(2):96. <<https://doi.org/10.3390/jfb14020096>>
- Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G. Storms R.W. & Gimble J.M. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology.* 89(1): 54-63. <<https://doi.org/10.1002/jcp.1138>>
- Grossi A., Ricardo J., Dalapria A., Deliberador T.M., Zielak J. C. & Giovanini A. F. 2017. The use of stem cells in bone regeneration in implant dentistry. *Journal of Clinical Dentistry & Research.* 14(2):34-39.
- Gu L., Li T., Song X., Yang X., Li S., Chen L., Liu P., Gong X., Chen C. & Sun L. 2020. Preparation and characterization of methacrylated gelatin/bacterial cellulose composite hydrogels for cartilage tissue engineering. *Regen Biomater.* 7(2): 195–202. <<https://doi.org/10.1093/rb/rbz050>>
- Harada T.N. 2009. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de

produtos naturais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande. 92 p.

- Hernigou P., Desroches A., Queinnec S., Flouzat, Lachaniette C. H., Poignard A. & Allain J. 2014. Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. *Int Orthop*. 38:1855. <<https://doi.org/10.1007/s00264-014-2318-x>>
- Hu D., Lian Z., Xian H., Jiang R., Wang N., Weng Y., Peng X., Wang S. & Ouyang X. 2020. Adsorption of Pb(II) from aqueous solution by polyacrylic acid grafted magnetic chitosan nanocomposite. *Int J Biol Macromol*. 154: 1537-47. <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.038>>
- Kaewkhaw R., Scutt A.M. & Haycock J.W. 2011. Anatomical Site Influences the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells for Schwann-Cell Phenotype and Function. *GLIA*. 59: 734-749. <<https://doi.org/10.1002/glia.21145>>
- Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H. & Bieback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 24:1294-301. <<https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>>
- Khojasteh A. & Sadeghi N. 2016. Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillamandibular atrophy: a preliminary human study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 45(7):864-71. <<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.01.003>>
- Khojasteh A., Kheiri L., Behnia H., Tehranchi A., Nazeman P., Nadjmi N. & Soleimani M. 2017. Lateral Ramus Cortical Bone Plate in Alveolar Cleft Osteoplasty with Concomitant Use of Buccal Fat Pad Derived Cells and Autogenous Bone: Phase I Clinical Trial. *Biomed Res Int*. 2017:6560234. <<https://doi.org/10.1155/2017/6560234>>
- Khojasteh A., Hosseinpour S., Rezai, Rad M., Alikhasi M. & Zadeh H. H. 2019. Buccal fat pad-derived stem cells with anorganic bovine bone mineral scaffold for augmentation of atrophic posterior mandible: An exploratory prospective clinical study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 21(2):292-300. <<https://doi.org/10.1111/cid.12729>>
- Kido, H.W. 2011. Biocompatibilidade da vitrocerâmica bioativa (Biosilicato®): análise in vitro e in vivo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 73f.

- Kolesky D.B., Truby R.L., Gladman A.S., Busbee T.A., Homan K.A. & Lewis J.A. 2014. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. *Adv. Mater.* 21;26(19):3124–30. <<https://doi.org/10.1002/adma.201305506>>
- Kraus K. H. & Kirker-Head C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary Surgery.* 32: 232-242. <<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2006.00142.x>>
- Krishnamoorthy S., Noorani B. & Xu C. 2019. Effects of encapsulated cells on the physical–mechanical properties and microstructure of gelatin methacrylate hydrogels. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 12;20(20):5061. <<https://doi.org/10.3390/ijms20205061>>
- Kulkarni N.S., Chauhan G., Goyal M., Sarvepalli S. & Gupta V. Development of gelatina methacrylate (GelMA) hydrogels for versatile intracavitary applications. *Biomater. Sci.* 2022, 10, 4492–4507. <<https://doi.org/10.1039/D2BM00022A>>
- Li D., Zhang K., Shi C., Liu L., Yan G., Liu C., Zhou Y., Hu Y., Sun H. & Yang B. 2018. Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation. *Int J Nanomedicine.*13: 7167-81. <<https://doi.org/10.2147/IJN.S174553>>
- Longo M.V.L. 2015. Influência da adição de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo associadas a conduto de fibrina na regeneração de nervo periférico em modelo experimental de ratos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 140 p.
- Maenhoudt N., Charlotte D., Boretto M., Jan Z., Heremans R., Boeckx B., Hermans F., Arijs I., Cox B., Nieuwenhuysen E.V., Vergote I., Rompuy A.S.V., Lambrechts D., Timmerman D. & Vankelecom H. 2020. Developing organoids from ovarian cancer as experimental and preclinical models. *Stem Cell Reports.* 14(4):717–29. <<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.03.004>>
- Malagutti-Ferreira M.J. 2016. Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis. 62 p.
- Meyer B.N., Ferrigni N.R., Putnam J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. & Mclaughlin J.L. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica.* 45(5):31-34. <<https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>>

- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1-2):55-63. <[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)>
- Niamsap T. & Lam N.T. & Sukyai P. 2019. Production of hydroxyapatite-bacterial nanocellulose scaffold with assist of cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.* 205:159–166. <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.034>>
- Nguta J.N., Mbaria J.M., Gakuya D.W., Gathumbi P.K., Kabasa J.D. & Kiama S.G. 2011. Biological screening of key medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacology on line*. 2:458-478. <<http://erepository.uonbi.ac.ke:8080/xmlui/handle/123456789/13906>>
- Oliveira G.K. 2008. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 50 p.
- Oliveira C.S., Nascimento M., Junior E.A., Crusoé M., Bahia P. & Rosa F. P. 2010. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. *R. Ci. méd. biol.* 9(Supl.1):28-36. <<https://doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4729>>
- Pelegrine A.A., Costa C.E.S., Sendyk W.R. & Gromatzky A. 2011. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank*. 12:171-184. <<https://doi.org/10.1007/s10561-010-9178-4>>
- Peres L.A.B., Delfino V.D.A., Mocelin A.J., Tutida L.A., Favero M.E. & Matsuo T. 2008. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. *J Bras Nefrol.* 30(1):48-53. <https://bjnephrology.org/wp-content/uploads/2019/08/jbn_v30n1a8.pdf>
- Qiao Y., Liu X., Zhou X., Zhang H., Zhang W., Xiao W., Pan G., Cui W., Santos H.A. & Shi Q. 2020. Gelatin templated polypeptide co-cross-linked hydrogel for bone regeneration. *Adv Health Mater.* 9(1): e1901239. <<https://doi.org/10.1002/adhm.201901239>>
- Rajabi N., Kharaziha M., Emadi R., Zarrabi A., Mokhtari H. & Salehi S. 2020. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/ gelatin methacrylate /Laponite® as a potential surgical sealant. *Journal of colloid and Interface Science*. 564 (22):155-169. <<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.12.048>>

- Rehman S.R., Augustine R., Zahid A.A., Ahmed R., Tariq M. & Hasan A. 2019. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. *International Journal of Nanomedicine*. 14:9603-9617. <<https://doi.org/10.2147/IJN.S218120>>
- Ribeiro D. 2008. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 105(2):251-6. <<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.07.045>>
- Shang F., Yu Y., Liu S., Ming L., Zhang Y., Zhou Z., Zhao J. & Jin Y. 2021. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. *Bioact Mater*. 6(3): 666-683. <<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.014>>
- Sheikhi A., Afewerki S., Oklu R., Gaharwar A.K. & Khademhosseini A. 2018. Effect of ionic strength on shear-thinning nanoclay-polymer composite hydrogels. *Biomaterials Science*. 8:116. <<https://doi.org/10.1039/C8BM00469B>>
- Sherman L.S., Munoz J., Patel Sa, Dave Ma, Paige L. & Rameshwar P. 2011. Moving from the Laboratory Bench to Patients' Bedside: Considerations for Effective Therapy with Stem Cells. *Clinical and Translational Science*. 4: 380-386. <<https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00283.x>>
- Souza S.O.L. 2021. Síntese e caracterização de hidrogéis de gelatina metacrilato com células incorporadas para organóides tumorais e hidrogéis baseados em biomacromoléculas contendo nanofibras obtidas por eletrospinning. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 94 p.
- Speit G. & Rothfuss A. 2012. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. In: Bjergbæk, L. (eds) *DNA Repair Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 920. Humana Press, Totowa, NJ. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-998-3_6>.
- Xiao S., Zhao T., Wang J., Wang C., Du J., Ying L., Lin J., Zhang C., Hu W., Wang L. & Xu K. 2019. Gelatin Methacrylate (GelMA) - Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*. 15:664-679. <<https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>>

- Yarak S. & Okamoto O. K.2010. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *AnBras Dermatol.* 85(5):647-56. <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000500008>>
- Yue K., Trujillo-de Santiago G., Alvarez M.M., Tamayol A., Annabi N. &Khademhosseini A.2015. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials.* 73:254–71. <<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>>
- Zhou, L., Tan G., Tan Y., Wang H., Liaob J. & Ning C. 2014. Biomimetic mineralization of anionic gelatin hydrogels: effect of degree of methacrylation. *RSC Adv.* 4:21997-22008. <<https://doi.org/10.1039/C4RA02271H>>
- Zuttion M.S.S.R., Wenceslau C.V., Lemos P.A., Takimura C. &Kerkis I. 2013. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. *Revista Brasileira De Cardiologia Invasiva.* 21(3):281-287. <https://doi.org/10.1590/S2179-83972013000300015>

Figuras e Legendas

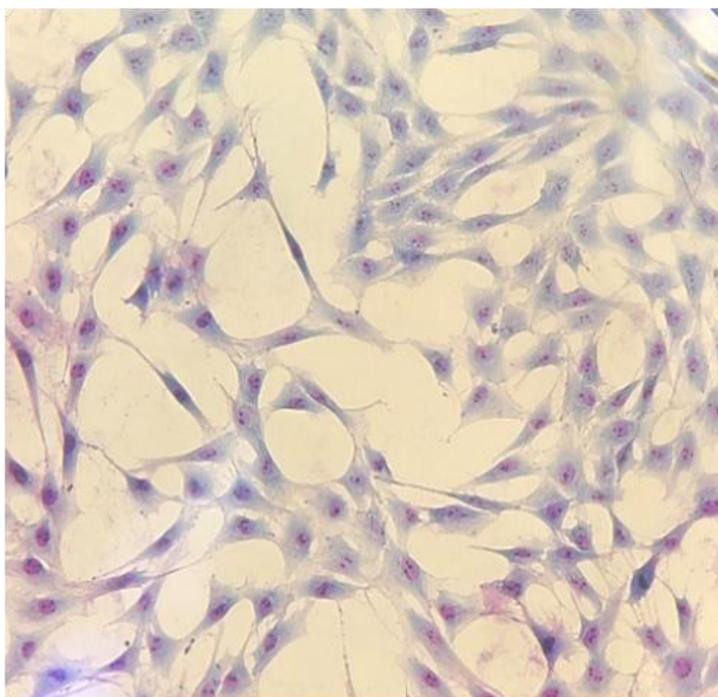


Fig.1. Fotomicrografia de cultura homogênea de ADSC de rato (*Rattus norvegicus*) apresentando formato fusiforme, com núcleos bem definidos e forte interação celular.

Giemsa, obj.20x.

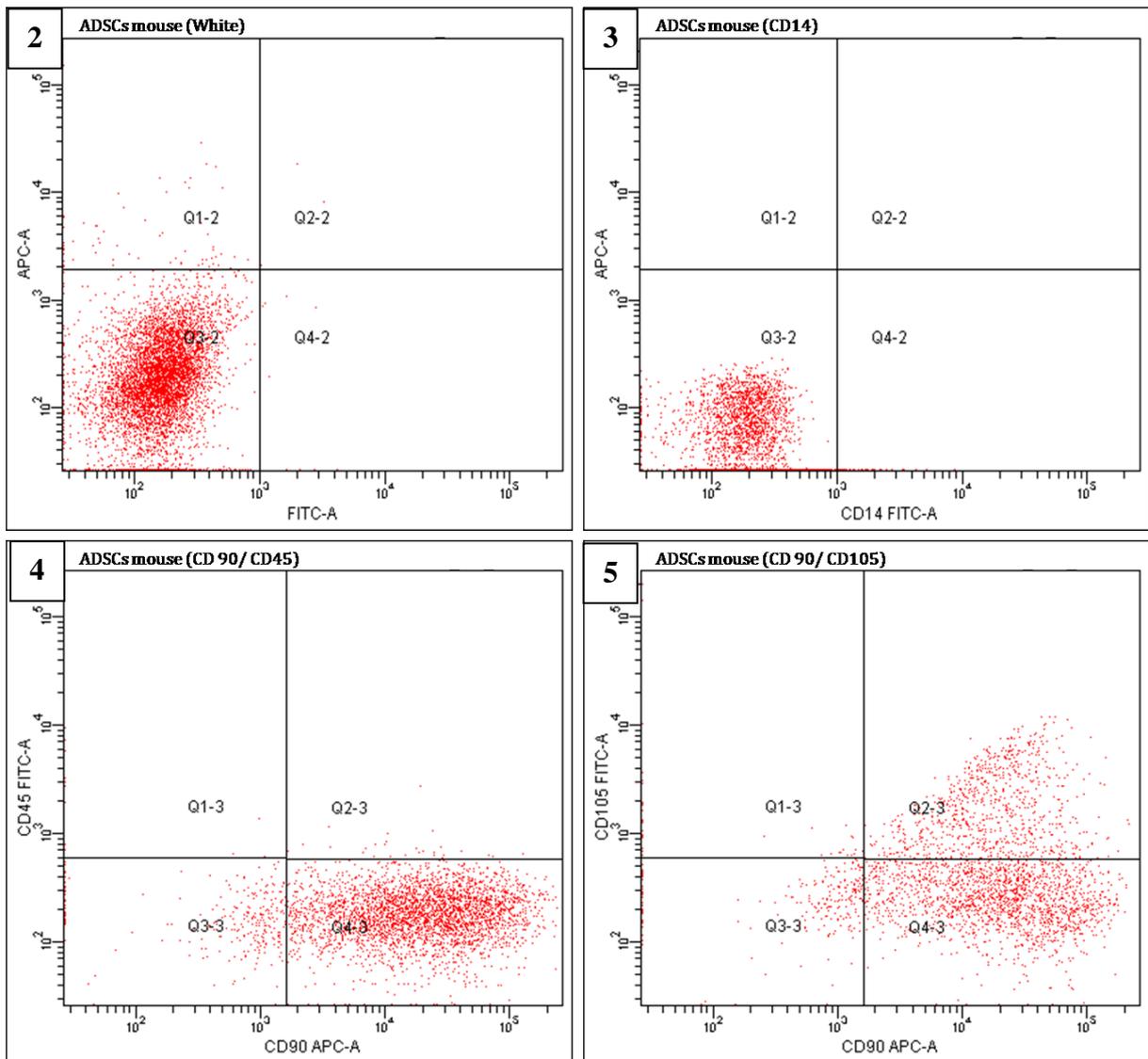


Fig.2-5. Gráficos obtidos a partir da análise das ADSCs por citometria de fluxo. **(2)** Branco para os fluorocromos APC e FITC. **(3)** Ausência de expressão para marcador CD14. **(4)** Alta expressão para marcador CD90 (APC) e ausência para CD45 (FITC). **(5)** Expressão positiva para CD90 (APC) e CD105 (FITC).

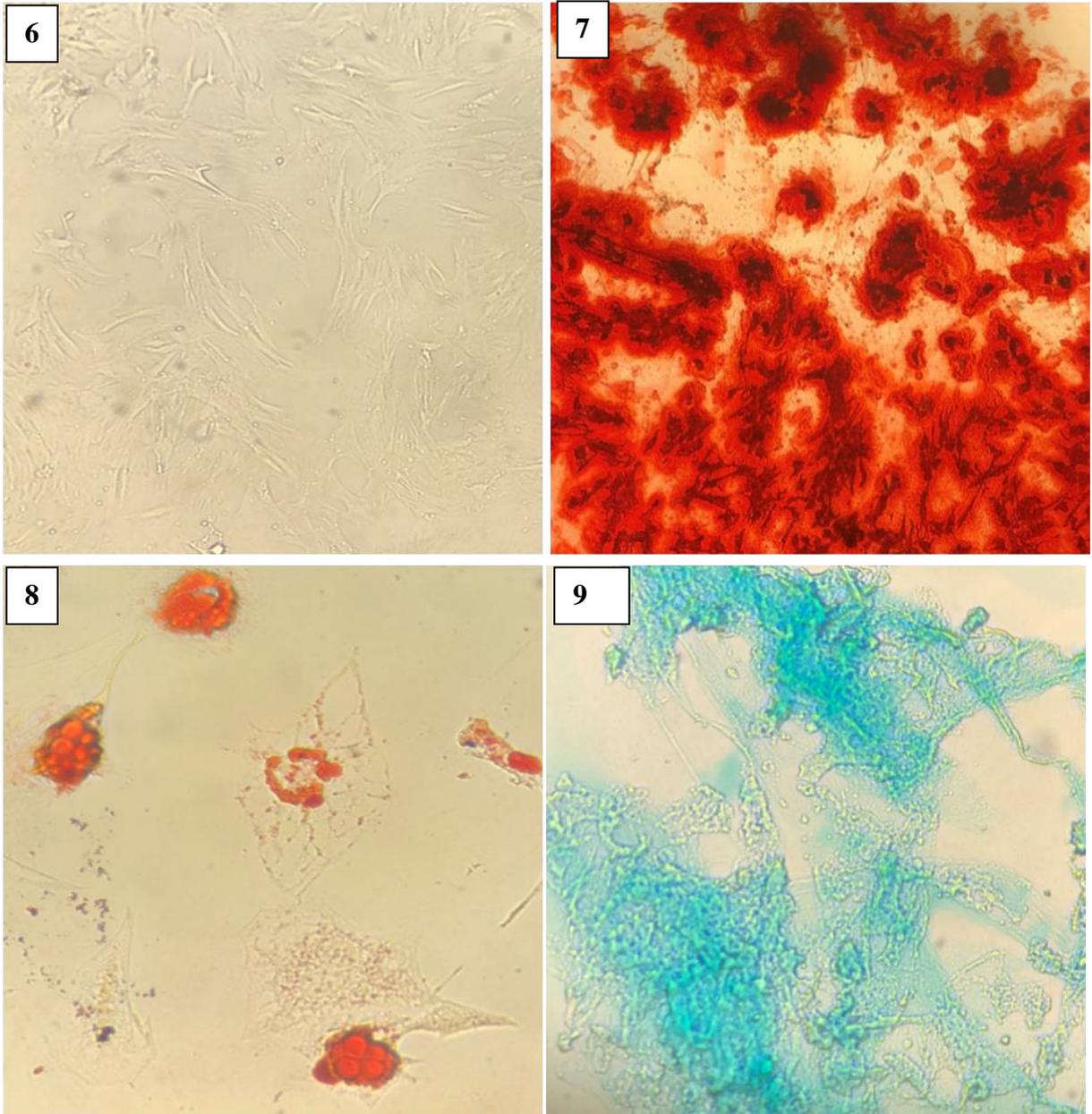


Fig.6-9. Ensaio de plasticidade celular da cultura de ADSCs. (6) Controle negativo, obj.40x. (7) Diferenciação osteogênica, células com matriz óssea rica em cálcio, corados com Alizarim Red, obj.40x. (8) Diferenciação adipogênica, presença de vacúolos lipídicos corados com Oil Red, obj.40x. (9) Diferenciação condrogênica, matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos evidenciada através da coloração com Alcian Blue, obj.40x.

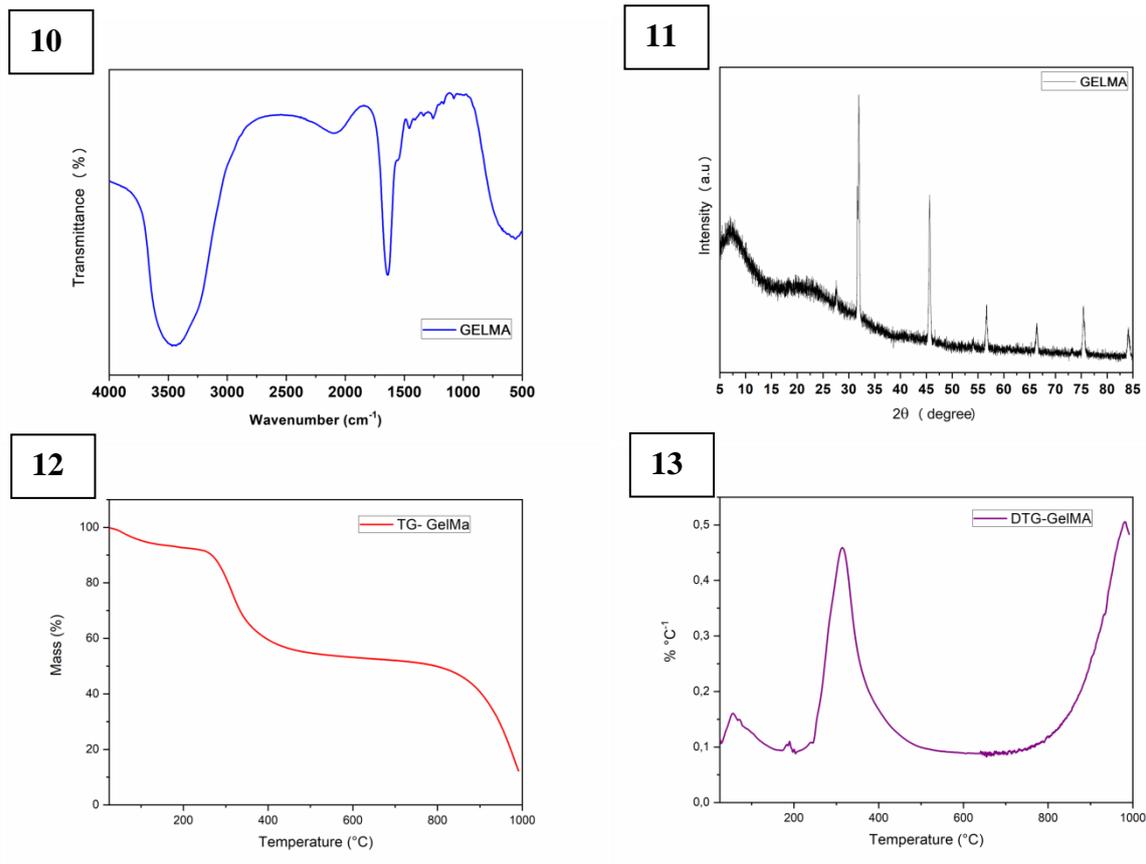


Fig.10-13. Caracterização do hidrogel de GelMA. (10) FTIR apresentando bandas características do GelMA. (11) DRX com picos correspondentes ao GelMA no hidrogel. (12) TG e (13) DTG mostrando o comportamento térmico do hidrogel de GelMA, observa-se dois eventos sendo um a 56oC com perda de massa de 6,27% e o outro à 313oC de 37,5% .

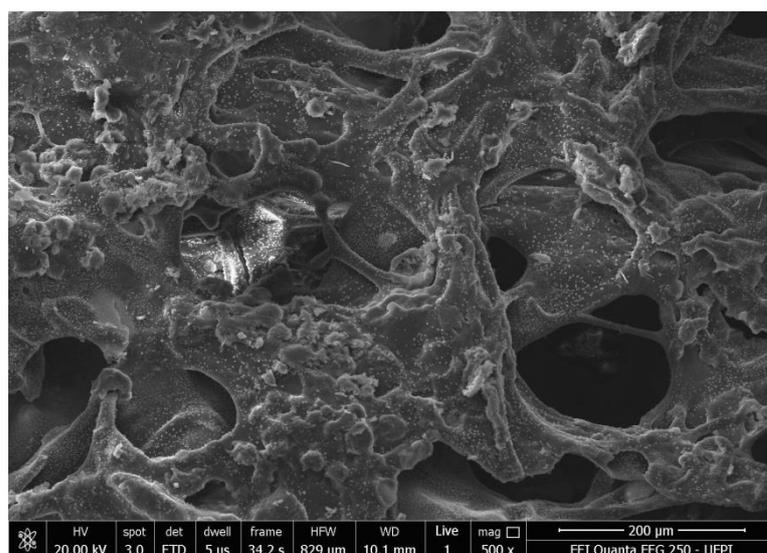


Fig.14. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrando a morfologia do hidrogel de GelMA com poros interconectados.

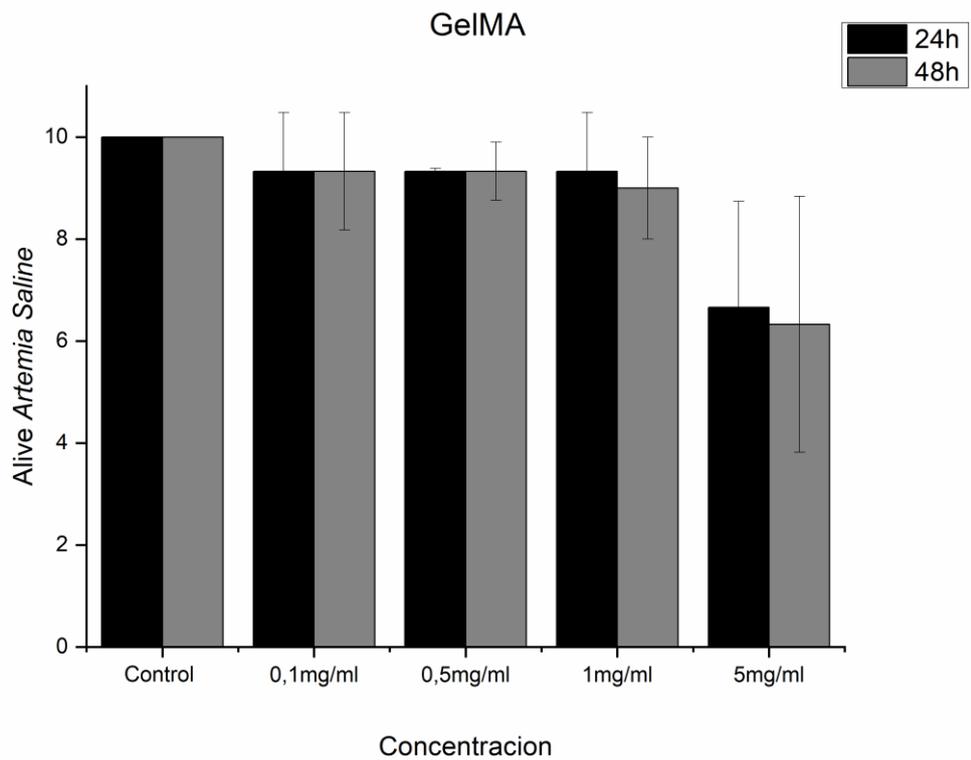


Fig.15. Ensaio de toxicidade em *Artemia salina*. O grupo controle foi comparado aos demais grupos, com diferença estatisticamente significativa para $p \leq 0,05$.

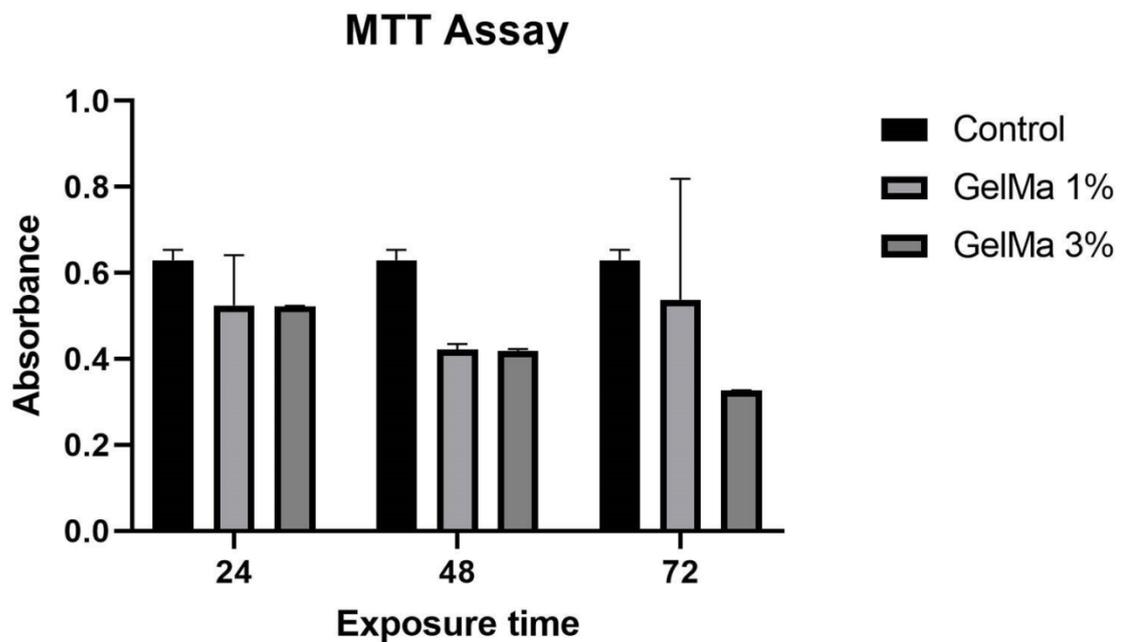


Fig. 16. Efeito do hidrogel de GelMA (1% e 3%) sobre a viabilidade celular das ADSCs, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. O grupo controle foi comparado aos demais grupos, não apresentando diferença significativa ($p \geq 0,05$) nos tempos testados.

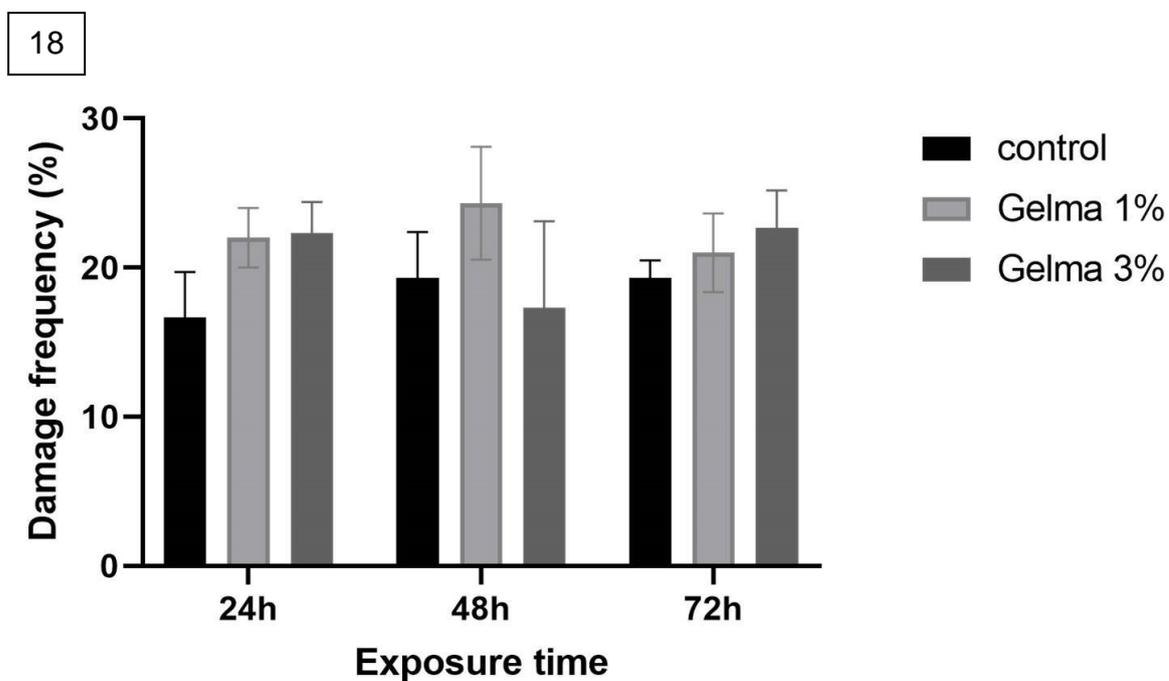
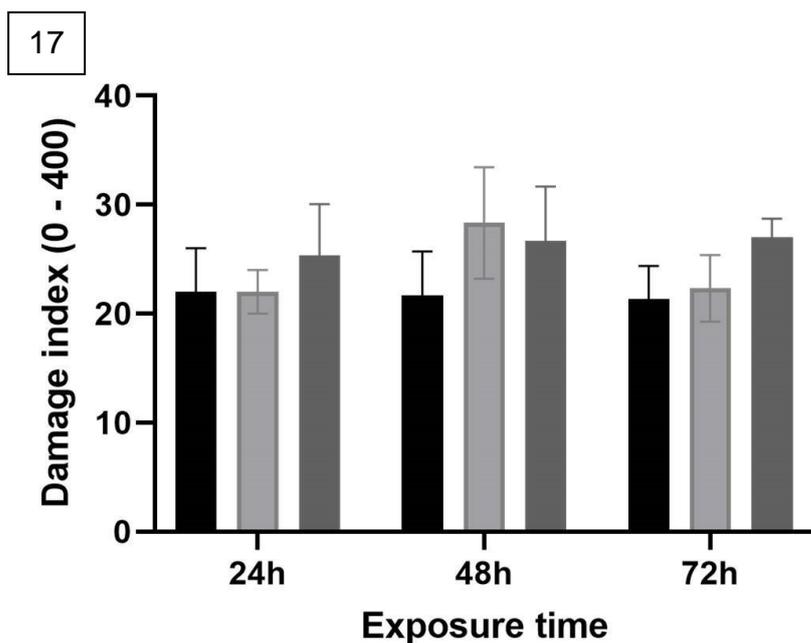


Fig. 17-18. Efeitos genotóxicos do hidrogel de GelMA (1% e 3%) em três diferentes tempos de tratamento (24, 48 e 72 horas) em ADSCs de ratos através do bioensaio cometa versão alcalina. Os valores foram expressos por média \pm desvio padrão usando anova one-way com teste de Tukey, tendo valores com $p < 0,05$. (17) Índice de danos. (18) Frequência de danos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no estudo desenvolvido, o hidrogel de gelatina metacrilata (GelMA) é poroso, possibilitando a adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais adipoderivadas (ADSC). É biocompatível, não apresenta efeitos cito e genotóxicos as células, permitindo futuros estudos *in vivo* com esse biomaterial.

As ADSCs apresentam alta capacidade de proliferação *in vitro* e boa plasticidade celular, com facilidade de obtenção e agilidade no cultivo. A associação dessas células com o hidrogel de GelMA, demonstra representar um biomaterial promissor em processos de regeneração tecidual óssea.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**.v.105, p.1815-1822. 2005.

AKHLAGHI, F.; HESAMI, N.; RAD, M. R.; NAZEMAN, P.; FAHIMIPOUR, F.; KHOJASTEH, A. Improved bone regeneration through amniotic membrane loaded with buccal fat pad-derived MSCs as an adjuvant in maxillomandibular reconstruction. **J Craniomaxillofac Surg**.Aug. 47(8):1266-1273. 2019.

ARGOLO NETO, N. M.; FEITOSA, M. L.T.; SOUSA, S.S.; FERNANDES, P.B.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; ALMEIDA, H.M.; CARVALHO, Y.K.P.; ROCHA, A.R.; SILVA, L.M.C.; CARVALHO, M.A.M. . Isolation, Expansion, Differentiation and Growth Kinetics Essay in Mesenchymal Stem Cells Culture from the Bone Marrow of Collared Peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**. 44:11. 2018.

AUBIN, H.; NICHOL, J.W.; HUTSON, C.B.; BAE, H.; SIEMINSKI, A.L.; CROPEK, D.M.; AKHYARI, P.; KHADEMHOSEINI, A. Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels. **Biomaterials**. Sep;31(27):6941-51. 2010.

BALDERRAMA, I.F.; FERREIRA, R.; LEÃO, M.P.; MARCANTONIO-JÚNIOR, E. Aplicabilidade clínica das células-tronco mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo para cirurgias de regeneração óssea de maxila e mandíbula atrófica. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, e48810616023, 2021.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 36:568-584, 2004.

BETTI C.; LOPRIENO, T. D. L. G.; BARALE R. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat.Res.** v. 307, p. 323-333, 1994.

BEZERRA, M.E.S.; MONTE, A.P.O.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.; OLIVEIRA JUNIOR, J.L.; SANTOS, J.M.S.; BEZERRA, D.O.; NEVES, C.A.; SILVA, G.C.; CARVALHO, M.A.M.; MATOS, N.H.T. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term in vitro culture. **Theriogenology**. 125: 56-63. 2019.

BEZERRA, D.O.; SILVA, E.R.D.F.S.; GOIS, M.L.; CARVALHO, Y.K.P.; VIEIRA, A.A.R.; FEITOSA, M.L.T.; ARGÔLO NETO, N.M.; SOUZA, N.K.G.; CARVALHO, M.A.M. Application of Mesenchymal and Renal Stem Cells in Kidney Diseases Treatment- A Exploration Technology. **Revista Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias**. 10:5415-5423. 2020.

BORDINI E.A.F. **Engenharia tecidual e biotecnologias aplicadas no desenvolvimento de scaffolds multifuncionais para estimular o reparo do complexo dentina-polpa**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 115 p. 2021.

BYDLOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

BUNNELL, B.A. et al. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods, San Diego**, v.45, n. 2, p. 115-120, 2008.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, 9:641–650, 1991.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Translational Medicine**, (6)6: 1445-1451, 2017.

CARVALHO, M.A.M; ARGÔLO-NETO, N.M.; SILVA, E.R.D.F.S.; LEITE, Y.K.C.; PESSOA, G.T.; BEZERRA, D.O.; FERRAZ, M.S.; CONDE JÚNIOR, A.M.; ROCHA, A.R. Structural plasticity and isolation of umbilical cord progenitor cells of agouti (*Dasyprocta prymnolopha*) raised in captivity. **Semina. Ciências Agrárias (Online)**. 40:225-237. 2019.

CHEN X.; BAI S.; LI B.; LIU H.; WU G.; LIU S.; ZHAO Y. Fabrication of gelatin methacrylate/nanohydroxyapatite microgel arrays for periodontal tissue regeneration. **Int J Nanomedicine**. 11: 4707-18. 43. 2016.

CORRADETTI, B. *et al.* Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. 391–400, 2013.

COSTA, C.R.M.; FEITOSA, M.L.T.; BEZERRA, D.O.; CARVALHO, Y.K.P.; OLIVINDO, R.F.G.; FERNANDO, P.B.; SILVA, G.C.; SILVA, M.L.G.; AMBRÓSIO, C.E.; CONDE JÚNIOR, A.M.; ARGÔLO NETO, N.M.; COSTA SILVA, L.M.; CARVALHO, M.A.M. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal (Online)**. 53:363-370. 2017.

COSTA, C. R. M.; FEITOSA, M. L. T.; ROCHA, A. R.; BEZERRA, D. O.; CARVALHO, Y. K. P.; ARGÔLO NETO, N. M.; RODRIGUES, H. W. S.; SOUSA JUNIOR, A.; SILVA, A. S.; SARMENTO, J. L. R.; SILVA, L. S.; CARVALHO, M.A.M. Adipose stem cells in reparative goat mastitis mammary gland. **PLoS One**, v. 14, p. e0223751-19, 2019.

CLEVERS, H. Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**. 16;165(7):1586-97. 2016.

DAS, S.S. *et al.* Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v.25, p.424-443, 2019.

DONG, Z.; YUAN, Q.; HUANG, K.; XU, W.; LIU, G.; GU, Z. Gelatin methacryloyl (GelMA)- based biomaterials for bone regeneration. **RSC Adv**. 2019 Jun 4;9(31):17737-44

FAN, L.J., *et al.* Comparison of endothelial differentiation capacity of adipose derived stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells from rats. **Journal of Southern Medical University**, 36(9):1247–54. 2016.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, RH. Mann M. MerschSundermann V The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat Res.** 566:209-29, 2004.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v.211, n.1, p.27–35, 2007.

GROSSI, A.; RICARDO, J.; DALAPRIA, A.; DELIBERADOR, T.M.; ZIELAK J. C.; GIOVANINI A. F. The use of stem cells in bone regeneration in implant dentistry. **Journal of Clinical Dentistry & Research.** 14(2):34-39. 2017.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv Drug Deliv Rev.** Dec 14;60(15):1638-49. 2008.

HUANG, J.; JIANG, Y.; REN, Y.; LIU, Y.; WU, X.; LI, Z.; REN, J. Biomaterials and biosensors in intestinal organoid culture, a progress review. **J Biomed Mater Res A.** May; 108(7):1501-8. 2020.

JIMÉNEZ-GALLEGOS, R.; TÉLLEZ-JURADO, L.; RODRÍGUEZ-LORENZO, L. M. Modulation of the hydrophilic character and influence on the biocompatibility of polyurethanesiloxane based hybrids. **Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr**, v. 50, n. 1, p. 1–8, 2011.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, 24:1294-301, 2006.

KHOJASTEH, A.; SADEGHI, N. Application of buccal fat pad-derived stem cells in combination with autogenous iliac bone graft in the treatment of maxillamandibular atrophy: a preliminary human study. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 45(7):864-71. 2016.

KHOJASTEH, A.; HOSSEINPOUR, S.; REZAI RAD, M.; ALIKHASI, M.; ZADEH, H. H. Buccal fat pad-derived stem cells with anorganic bovine bone mineral scaffold for augmentation of atrophic posterior mandible: An exploratory prospective clinical study. **Clin Implant Dent Relat Res.** 21(2):292-300. 2019.

KIERSZENBAUM, A.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia.** 3ª edição. São Paulo: Elsevier, 2012.

KINGHAM, P. J.; KALBERMATTEN, D. F.; MAHAY, D.; ARMSTRONG, S. J.; WIBERG, M.; TERENCEHI, G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.267–274, 2007.

KOLESKY, D.B.; TRUBY, R.L.; GLADMAN, A.S.; BUSBEE, T.A.; HOMAN, K.A.; LEWIS, J.A. 3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs. **Adv. Mater.** 21;26(19):3124–30. 2014.

KLEINSASSER, N.H.; SCHMID, K.; SASSEN, A.W.; HARRÉUS, U.A.; STAUDENMAIER, R.; FOLWACZNY, M.; GLAS, J.; REICHL, F.X. Cytotoxic and

genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. **Biomaterials**.27(9):1762-70. 2006.

LEE, R. H.; KIM, B.C.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H. S.; SUH, K.T., et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cell PhysiolBiochem**, 14:311-24, 2004.

LEITE, Y.K.P.C.; OLIVEIRA, A.C.J.; QUELEMES, P.V.; ARGOLO NETO, N.M.; CARVALHO, C.E.S.; RODRIGUES, H.W S.; ALVES, M.M.M.; CARVALHO, F.A.A.; ARCANJO, D.D.R.; CAVALCANTE FILHO, E.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; CARVALHO, M.A.M.; SILVA, D.A.; LEITE, J.R.S.A. Novel Scaffold Based on Chitosan Hydrogels/Phthalated Cashew Gum for Supporting Human Dental Pulp Stem Cells. **Pharmaceuticals**. 16:1-15. 2023.

LI, D.; ZHANG, K.; SHI, C.; LIU, L.; YAN, G.; LIU, C.; ZHOU, Y.; HU, Y.; SUN, H.; YANG B. Small molecules modified biomimetic gelatin/hydroxyapatite nanofibers constructing an ideal osteogenic microenvironment with significantly enhanced cranial bone formation. **Int J Nanomedicine**.13: 7167-81. 2018.

LIU, L. *et al.* Chromatin Modifications as Determinants of Muscle Stem Cell Quiescence and Chronological Aging. **Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 189–204, 2013.

LONGO, M.V.L. **Influência da adição de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo associadas a conduto de fibrina na regeneração de nervo periférico em modelo experimental de ratos.** Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. 140 p. 2015.

LOCKE, M.; FEISST, V.; DUNBAR, P.R. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. **Stem Cells**. 29:404–11. 2011.

MALAGUTTI-FERREIRA, M.J. **Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.** Dissertação Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis. 62 p. 2016.

MARODIN, M.S.J. **Avaliação do potencial oncogênico e imunomodulador de células estromais mesenquimais com trissomia 5.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo. 86p. 2022.

MAZINI, L.; ROCHETTE, L.; AMINE, M.; MALKA, G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). **Int. J. Mol. Sci.** 20, 2523. 2019.

MCCUSKEY, R.S. The Hepatic Microvascular system in health and its response to toxicants. **Anat. Rec (Hoboken)**. 291(6):661–71.2008.

MONTEIRO B.S.; ARGOLO NETO N.M.; DEL CARLO R.J. Células-tronco mesenquimais. **Cienc Rural**, 40(1):238-45, 2010.

MONTEIRO, N. *et al.* Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using adental curing light for regenerative dentistry. **Dental Materials**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 389– 399, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**. 65(1-2):55-63. 1983.

NEVES, C.A.; SILVA, L.S.; CARVALHO, C.E.S.; CARVALHO, M.S.; SARMENTO, J.L.R.; CAVALCANTE, T.V.; ARRIVABENE, M.; NEVES, T.A.; BEZERRA, M.E.S.; GOMES JUNIOR, A.L.; SILVA, C.M.G.; CARVALHO, M.A.M. Culture of goat preantral follicles in situ associated with mesenchymal stem cell from bone marrow. **Zygote**. 1:1-7. 2019.

NEVES, G.C.S.; ARGÔLO NETO, N.M.; FERRAZ, M.S.; COSTA, C.R.M; ROCHA, A.R.; RODRIGUES, H.W.S.; NUNES, F. C.; CARVALHO, C.E.S.; CAVALCANTE FILHO, M. F.; MENEZES, D.J.A.; CARVALHO, M.A.M. Characterization and plasticity of wharton's jelly mesenchymal stem cells of goat. **Bioscience Journal**. 37:e37002-9. 2021.

NICHOL, J.W.; KOSHY, S.T.; BAE, H.; HWANG, C.M.; YAMANLAR, S.; KHADEMHOSEINI, A. Cellladenmicroengineered gelatin methacrylate hydrogels. **Biomaterials**.31(21):5536-44. 2010.

POMARI, A.A.N.; MONTANHEIRO, T.L.A.; SIQUEIRA, C.P.; SILVA, R.S.; TADA, D.B.; LEMES, A.P. Chitosan hydrogels crosslinked by genipin and reinforced with cellulose nanocrystals: production and characterization. **J Compos Sci**. 3(84):1-12. 2019.

PRUNET-MARCASSUS, B.; COUSIN, B.; CATON, D.; ANDRÉ, M.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. **ExpCell Res**, 312:727-36, 2006.

OLIVEIRA, G.K. **Células–tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 50 p. 2008.

OLIVEIRA, C.S.; NASCIMENTO, M.; JUNIOR, E.A.; CRUSOÉ, M.; BAHIA, P.; ROSA F. P. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. **R. Ci. méd. biol**. 9(Supl.1):28-36. 2010.

PAK, J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. **Journal of Medical Case Reports**. 5: 296. 2011.

PAUL, A.; MANOHARAN, V.; KRAFFT, D.; ASSMANN, A.; UQUILLAS, J. A.; SHIN, S. R.; HASAN, A.; HUSSAIN, M. A.; MEMIC, A.; GAHARWAR, A. K.; KHADEMHOSEINI, A. Nanoengineered Biomimetic Hydrogels for Guiding Human Stem Cell Osteogenesis in Three Dimensional Microenvironments. **J. Mater. Chem. B**. 4, 3544– 3554. 2016.

PELEGRINE, A.A.; COSTA, C.E.S.; SENDYK, W.R.; GROMATZKY A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with

autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. **Cell Tissue Bank**. 12:171-184. 2011.

PERES, L.A.B.; DELFINO, V.D.A.; MOCELIN, A.J.; TUTIDA, L.A.; FAVERO, M.E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **J Bras Nefrol**. 30(1):48-53. 2008.

PESSOA, G. T.; ARGOLO NETO, N. M.; ROCHA, A. R.; COSTA, C. R. M.; SILVA, G. C.; BEZERRA, D. O.; COELHO, C. J. C.; SOUSA, S. S.; CARVALHO, MAM. Isolation, Culture and Differentiation Potential of Collared Peccary (*Tayassu tajacu*) Adipose-Derived Stem Cells. **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**. 42:1-10.2014.

HAUGEN, H. J.; LYGSTADAAS, S. P.; ROSSI, F.; PERALE, G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? **J Clin Periodontol**, 46: (21): 92-102. 2019.

QIAO, Y.; LIU, X.; ZHOU, X.; ZHANG, H.; ZHANG, W.; XIAO, W.; PAN, G.; CUI W.; SANTOS H.A.; SHI Q. Gelatin templated polypeptide co-cross-linked hydrogel for bone regeneration. **Adv Health Mater**. 9(1): e1901239. 2020.

RACUSEN, L.C.; SOLEZ, K.; COLVIN, R.B.; BONSIB, S.M.; CASTRO, M.C.; CAVALLO, T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. **Kidney Int**.55:713-23. 1999.

RAHALI, K.; BEN MESSAOUD, G.; KAHN, C. J. F.; SANCHEZ-GONZALEZ, L.; KACI, M.; CLEYMAND, F.; FLEUTOT, S.; LINDER, M.; DESOBRY, S.; ARAB-TEHRANY, E. Synthesis and Characterization of Nanofunctionalized Gelatin Methacrylate Hydrogels. **Int. J. Mol. Sci**. 18, E2675. 2017.

RAJABI, N.; KHARAZIHA, M.; EMADI, R.; ZARRABI, A.; MOKHTARI H.; SALEHI S. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/ gelatin methacrylate /Laponite® as a potential surgical sealant. **Journal of colloid and Interface Science**. 564 (22):155-169. 2020.

REHMAN, S.R.; AUGUSTINE, R.; ZAHID, A.A.; AHMED, R.; TARIQ, M.; HASAN A. Reduced Graphene Oxide Incorporated GelMA Hydrogel Promotes Angiogenesis For Wound Healing Applications. **International Journal of Nanomedicine**. 14:9603-9617. 2019.

RIBEIRO, D. Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**. 105(2):251-6. 2008.

RIBEIRO, J.S. **Novo sistema de entrega a base de um hidrogel injetável fotopolimerizável (GelMA) como estratégia de desinfecçãoendodôntica inteligente (on-demand) regeneração de tecidos orais**. Tese de doutorado, Faculdade de Odontologia de Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 99p. 2021.

RIBEIRO, V. L.; SALVATORI, M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. SACRAMENTO, A.R.B. **A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária**. Monografia.Mnografia, Faculdade de Medicina Dentária, Universidade do Porto, Porto, 32p. 2012.

ROCHA, M.A.C.; SILVA, L.M.C.; OLIVEIRA, W.A.; BEZERRA, D.O.; SILVA, G.C.; SILVA, L.S.; MEDEIROS, B.L.N.; BAÊTA, S.A.F.; CARVALHO, M.A.M.; ARGÔLO NETO, N.M. Allogeneic mesenchymal stem cells and xenogenic platelet rich plasma, associated or not, in the repair of bone failures in rabbits with secondary osteoporosis. **Acta Cirurgica Brasileira**. 32:767-780. 2017.

ROCHA, A.R.; LEITE, Y.K.C.; SILVA, A.S.; CONDE JÚNIOR, A.M.; COSTA, C.R.M.; SILVA, G.C.; BEZERRA, D.O.; CAVALCANTE, M.M.A.S.; ARGOLO NETO, N.M.; FEITOSA, M.L.T.; SERAKIDES, R.; CARVALHO, M.A.M. Immunophenotyping, plasticity tests and nanotagging of stem cells derived from adipose tissue of wild rodent agouti (*Dasyprocta prymnolopha*). **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia (Online)**. 71:1571-1581. 2019.

RODRIGUES, H.W.S.; SILVA, L.S.; CARVALHO, M.A.M.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with Mesenchymal Stem Cells. **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**. 46:1553. 2018.

SANTO, K.F.; DÁVILA, J.L.; D'ÁVILA, M.A.; RODAS, A.C.D.; SILVA, J.V.L.; DAGUANO, J.K.M.B. Rheological study of PEG-Laponite-alginate composite hydrogels aiming 3D extrusion-based printing. **Matéria (Rio J.)** 27 (2). 2022.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: adipose tissue derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. **Stem Cells**. 2007;25 818-27.

SETHE, S. et al. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Research Reviews**, v. 5, p. 91-116, 2006.

SHANG, F.; YU, Y.; LIU, S.; MING, L.; ZHANG, Y.; ZHOU, Z.; ZHAO, J.; JIN, Y. Advancing application of mesenchymal stem cell-based bone tissue regeneration. **Bioact Mater**. 6(3): 666-683. 2021.

SHERMAN, L.S.; MUNOZ, J.; PATEL, S.A.; DAVE, M.A.; PAIGE, L.; RAMESHWAR, P. Moving from the Laboratory Bench to Patients' Bedside: Considerations for Effective Therapy with Stem Cells. **Clinical and Translational Science**. 4: 380-386. 2011.

SILVA FILHO, O.F.; ARGOLO NETO, N.M.; CARVALHO, M.A.M.; CARVALHO, Y.K.P.; DINIZ, A.N.; MOURA, L.S.; AMBRÓSIO, C.E.; ALMEIDA, H.M.; MIGLINO, M.A.; ALVES, J.J.R.PR; MACEDO, K.V.; ROCHA, A.R.; FEITOSA, M.L.T.; ALVES, F.R.. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira (Online)**. 29: 478-484. 2014.

SILVA, L. M. C.; ROCHA, M. A. C.; NUNES, M. H. V.; MEDEIROS, B.L.N.; LEITE, Y.K.C.; RODRIGUES, H.W.S.; RODRIGUES, M.C.; ROCHA NETO, H.J.; CARVALHO, M.A.M.; ARGOLO NETO, N.M. Xenogeneic Mesenchymal Stem Cells in the Formation of Hyaline Cartilage in Osteochondral Goat Failure. **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**. 46:1555. 2018.

SILVA, E.R.D.F.S.; ARGÔLO NETO, N.M.; BEZERRA, D.O.; SILVA, L.S.; MOURA, C.R.C.; GOMES JUNIOR, A.L.; BRAZ, D.C.; COSTA, J.R.F.; LEITE, Y.K.P.C.; SILVA, A.A.; DANTAS, S.M.M.M.; CARVALHO, M.A.M. Renal Progenitor Cells have higher genetic stability and lower oxidative stress than Mesenchymal Stem Cells during in vitro expansion. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity (Online)**. 2020:1-10. 2020.

SMITH, E.E.; ZHANG, W.; SCHIELE, N.R.; KHADEMHOSEINI, A.; KUO, C.K.; YELICK, P.C. Developing a biomimetic tooth bud model. **J Tissue Eng Regen Med**. 11(12): 3326-36. 2017.

SOARES, I.M.V.; CAVALCANTE, L.C.; CARVALHO, Y.K.P.; BEZERRA, D.O.; FERNANDES, G.; CARVALHO, M.A.M.; CARVALHO, C.M.R.S. The influence of Aloe vera with mesenchymal stem cells from dental pulp on bone regeneration: characterization and treatment of non-critical defects of the tibia in rats. **Journal Of Applied Oral Science (Online)**. 27:1-11. 2019.

SOLEZ, K.; AXELSEN, R.A.; BENEDIKTSSON, H.; BURDICK, JF, COHEN AH, COLVIN RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. **Kidney Int**. 44:411-22. 1993.

SOUZA, S.O.L. **Síntese e caracterização de hidrogéis de gelatina metacrilóil com células incorporadas para organóides tumorais e hidrogéis baseados em biomacromoléculas contendo nanofibras obtidas por eletrofiação**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 94 p. 2021.

SOUSA, R.P.; DUARTE, A.B.G.; PINTO, Y.; SÁ, N.A.R.; ALVES, B.G.; CIBIN, F.W.S.; SILVA, G.C.; CARVALHO, C.E.S.; ARGÔLO NETO, N.M.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEIREDO, J.R.; CARVALHO, M.A.M. In Vitro Activation and Development of Goat Preantral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue Co-cultured with Mesenchymal Stem Cells. **Reproductive Sciences**. 1:1-9. 2021.

SINHORETI, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras Biomaterials in Dentistry: currentviewand future perspectives. **Rev assocpaulcir dent**, v. 67, n. 3, p. 178–86, 2013.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193–203. 2015.

THAKURI, P.S.; LIU, C.; LUKER, G.D.; TAVANA, H. Biomaterials-based approaches to tumor spheroid and organoid modeling. **Adv. Healthc Mater**. 7(6):e1700980. 2017.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 35, p. 206 - 221, 2000.

VISSER, J.; GAWLITTA, D.; BENDERS, K.E.; TOMA, S.M.; POURAN, B.; VAN WEEREN, P.R.; DHERT, W.J.; MALDA, J. Endochondral bone formation in gelatin

methacrylamide hydrogel with embedded cartilage-derived matrix particles. **Biomaterials**. 37: 174-82. 2015.

XIAO, S.; ZHAO, T.; WANG, J.; WANG, C.; DU, J.; YING, L.; LIN, J.; ZHANG, C.; HU, W.; WANG, L.; XU, K. Gelatin Methacrylate (GelMA) - Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. **Stem Cell Reviews and Reports**.15:664-679. 2019.

YAMAMOTO T, GOTOH M, HATTORI R, TORIYAMA K, KAMEI Y, et al. Periurethral injection of autologous adipose-derived stem cells for the treatment of stress urinary incontinence in patients undergoing radical prostatectomy: Report of two initial cases. **International Journal of Urology**, 17: 75–82. 2010.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **An Bras Dermatol**. 85(5):647-56. 2010.

YUE K.; TRUJILLO-DE SANTIAGO, G.; ALVAREZ, M.M.; TAMAYOL, A.; ANNABI, N.; KHADEMHOSEINI, A. Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. **Biomaterials**. 73:254–71. 2015.

ZIMINSKA, M. *et al.* Synthesis and Evaluation of a Thermoresponsive Degradable Chitosan-Grafted PNIPAAm Hydrogel as a “Smart” Gene Delivery System. **Materials**, v.13,n.2530, p. 1-22, 2020.

ZHOU, L.; TAN, G.; TAN, Y.; WANG, H.; LIAO, J.; NING, C. Biomimetic mineralization of anionic gelatin hydrogels: effect of degree of methacrylation. **RSC Adv**. 4:21997-22008. 2014.

ZUTTON, M.S.S.R.; WENCESLAU, C.V.; LEMOS, P.A.; TAKIMURA C.; KERKIS I. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. **Revista Brasileira De Cardiologia Invasiva**. 21(3):281-287. 2013.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.