

CAMILA ERNANDA SOUSA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE DE *SCAFFOLD* DE BURITI
(*Mauritia flexuosa*) PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
ASSOCIADAS A FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

TERESINA-PI
2019

CAMILA ERNANDA SOUSA DE CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE DE *SCAFFOLD* DE BURITI
(*Mauritia flexuosa*) PARA CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS
ASSOCIADAS A FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

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

TERESINA- PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

C331c Carvalho, Camila Ernanda Sousa de
Caracterização e bicompartibilidade de *scaffold* de buriti (*Mauritia flexuosa*) para co-cultivo de células-tronco mesenquimais associadas à foliculos ovarianos pré-antrais caprinos. / Camila Ernanda Sousa de Carvalho - 2019.
74 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa
grama de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho

1. Reprodução animal 2. Ovários 3. Co-cultivo 4. Citotoxicidade 5. Poliuretana I. Título.

CDD 636.089 26

**CARACTERIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE DE SCAFFOLD DE BURITI
(MAURITIA FLEXUOSA) PARA CO-CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ASSOCIADAS A FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

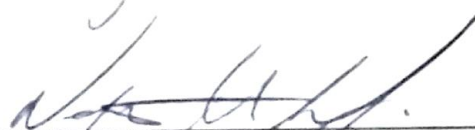
CAMILA ERNANDA SOUSA DE CARVALHO

Tese aprovada em: 08/03/2019

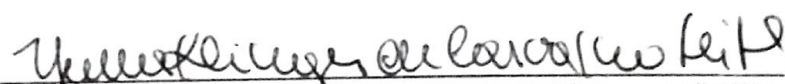
Banca Examinadora:



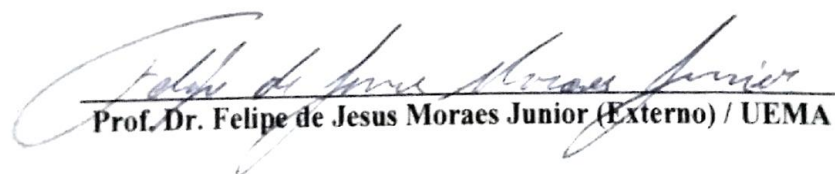
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



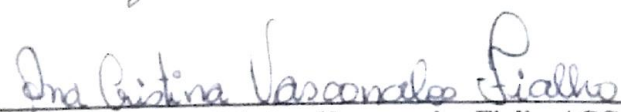
Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Yulla Klinger de Carvalho Leite (Externa) / UNIP



Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior (Externo) / UEMA



Profa. Dra. Ana Cristina Vasconcelos Fialho / CCS/UFPI

“Eu asseguro que, se vocês tiverem fé do tamanho de um grão de mostarda, poderão dizer a este monte: 'Vá daqui para lá', e ele irá. Nada será impossível para vocês. ”

Mateus 17:20- Bíblia Sagrada

Dedico,

A Deus, pela companhia, amparo e força para concretizar meus sonhos.

Aos meus pais Carmosina Alves Sousa Carvalho e Pedro Paulo Quaresma de Carvalho pela educação, carinho e amor em todos os momentos.

Ao meu querido Darlington Leonel Silva pela paciência, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, por minha família, por todos os percalços e dificuldades e pela ajuda para superá-los, por iluminar meus passos e por não me deixar só em momento algum.

À Universidade Federal do Piauí pelas oportunidades que me foram concedidas, pelas estrutura e qualificação fundamentais para minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho pela orientação, confiança, incentivo e pelas críticas construtivas que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto pela partilha de conhecimento e ensinamentos para a vida.

À Professora Dr. Ana Cristina Vasconcelos Fialho por ter cedido o material para o desenvolvimento desta pesquisa, por toda a confiança, incentivo e apoio.

Ao prof. Dr. José Milton Elias de Matos e ao Pós-graduando Fernando da Silva Reis pela disponibilidade e atenção na sintetização dos *scaffolds* de buriti.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio Amorim Carvalho, Enoque Pereira Costa sobrinho Neto e ao Laboratório de Atividade Antileishmania pela disponibilidade e auxílio para os ensaios de atividade fagocítica e expressão de óxido nítrico.

À prof. Dra. Yulla Klinger de Carvalho Leite pela amizade, ajuda e pelos ensinamentos teóricos e práticos.

Ao prof. Edson Cavalcanti da Silva Filho, ao Pós-graduando Marcus Vinicius Beserra dos Santos e ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada – LMMA – UFPI pela parceria nas análises físicas e microscopia eletrônica

Ao senhor José Alves, proprietário do abatedouro de coleta, pela disponibilidade.

Aos Pós-graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) por contribuírem com seus conhecimentos específicos Dayseanne, Renata, Lorena,

Lucilene, Charles, Gustavo, Huanna, Iago, Ronielle, Thais e aos alunos de iniciação científica Wanderson, Marina e Larisy.

Aos funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt): Fabiana, Leiliane, Janete, Hermínio, Flávia e Luciana por fornecerem ambiente adequado para realização desta pesquisa.

Às amigas da turma de graduação em medicina veterinária Elis, Juliana, Julliet e Emanuela pela amizade, conforto e ânimo.

Ao meu amor, Darlington pelo cuidado, apoio, amparo, por me fazer encarar os desafios com humor, por ser meu companheiro e me inspirar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, pela intensa dedicação, esforço, paciência, compreensão e amor que me alicerçaram em todos os passos dessa caminhada.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	14
CAPÍTULO I: BIOCOMPATIBILIDADE DO <i>SCAFFOLD</i> DE ÓLEO DE BURITI (<i>Mauritia flexuosa</i>) BRASILEIRO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	25
RESUMO	26
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	42
CAPÍTULO II: CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOB <i>SCAFFOLD</i> DE BURITI	48
RESUMO	49
INTRODUÇÃO	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
CONCLUSÕES GERAIS	65
REFERÊNCIAS	66

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. Plasticidade de células-tronco de acordo com o grau de especialização 18
- Figura 2. Representação genérica da síntese de poliuretanos 21

CAPÍTULO I: BIOCMPATIBILIDADE DO *SCAFFOLD* DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) BRASILEIRO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

- Figura 1. Fotografia da secção do *scaffold* do óleo do buriti 33
- Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do *scaffold* do óleo do buriti cultivado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton 38
- Figura 3. Fotomicrografia do *scaffold* do óleo de buriti cultivado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton 39

CAPÍTULO II: CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOB *SCAFFOLD* DE BURITI

- Figura 1. Fotomicrografia de fragmentos de ovário cultivados com *scaffold* de buriti incorporado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton. 56

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO I: BIOCMPATIBILIDADE DO *SCAFFOLD* DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) BRASILEIRO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS

Gráfico 1.	Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do <i>scaffold</i> do óleo do buriti	34
Gráfico 2.	Curvas termogravimétricas TG e DTG de decomposição térmica do <i>scaffold</i> do óleo de buriti	35
Gráfico 3.	Difratograma de Raio X do <i>scaffold</i> do óleo de buriti	36
Gráfico 4.	Efeito do <i>scaffold</i> do óleo de buriti na viabilidade de células de mamíferos	40
Gráfico 5.	Efeito do <i>scaffold</i> do óleo de buriti sobre a ativação de macrófagos	41

CAPÍTULO II: CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIAS CAPRINOS ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS SOB *SCAFFOLD* DE BURITI

Gráfico 1.	Porcentagem (média \pm erro padrão) de folículos ovarianos pré-antrais morfológicamente normais no controle fresco e após cultivo <i>in vitro</i> por 1 ou 7 dias sem ou com <i>scaffold</i> de buriti com células-tronco.	55
Gráfico 2	Porcentagem (média \pm erro padrão) de folículos ovarianos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) no controle fresco e após cultivo <i>in vitro</i> por 1 e 7 dias sem ou com <i>scaffold</i> de buriti e células-tronco.	58

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II: CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOB *SCAFFOLD* DE BURITI

Tabela 1. Diâmetros foliculares em controle fresco e após cultivo *in vitro* por 1 e 7 dias sem ou com *scaffold* de buriti com células-tronco 59

RESUMO

O desenvolvimento de sistemas de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) com células-tronco pode reduzir o estresse oxidativo, por meio dos secretomas liberados por essas células, que são pequenas moléculas constituídas por agentes antioxidantes, fatores de crescimento e quimiocinas o que pode favorecer o desenvolvimento desses folículos. Os FOPA poderiam ser beneficiadas por serem estruturas celulares de elevada exigência metabólica, que se desenvolvem mediante interação com radicais oxidativos e peptídeos bioativos, tornando seu cultivo *in vitro* complexo e oneroso. O óleo do buriti, palmeira típica da região norte-nordeste, apresenta baixo custo de extração e relevantes propriedades antioxidantes, denotando potencial para a utilização em cultivo celular. Este trabalho tem como objetivo caracterizar física e quimicamente o *scaffold* de óleo de buriti (SB), avaliar a bioincorporação com células-tronco mesenquimais e o efeito em sistema de co-cultivo com folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) caprinos. Para caracterização do SB foram realizadas a espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR) e Análise Termogravimétrica (TG e DTG). Analisadas a morfologia e adesão celular por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e técnicas histológicas. Para avaliar a biocompatibilidade foram empregados os testes de MTT e atividade hemolítica. A capacidade de ativação de células do sistema imune foi mensurada pelos testes de capacidade fagocítica e síntese de óxido nítrico. Os FOPA caprinos foram cultivados a partir de fragmentos do córtex ovariano, dos quais um deles foi imediatamente fixado em carnoy (controle fresco). Os demais fragmentos, foram cultivados por 1 e 7 dias em placas de cultura na presença ou ausência do *scaffold* de buriti com células-tronco da geleia de Wharton (SB-CTMGW). Após o cultivo os fragmentos ovarianos foram fixados em carnoy para exame histológico. Quanto à caracterização, o SB apresenta composição amorfa, alta estabilidade térmica e alta capacidade de expansão em água. Em relação à morfologia, demonstra superfície com micro e macroporos e boa adesão de CTMGW. Foi observada a ausência de citotoxicidade e atividade hemolítica, e o SB não estimulou a ativação de macrófagos. Os folículos pré-antrais foram morfologicamente classificados em primordiais ou folículos em desenvolvimento. O grupo cultivado tratamento apresenta a maior redução das porcentagens de folículos primordiais ($p < 0,05$), e as porcentagens de folículos em desenvolvimento, aumentaram ($p < 0,05$), comparando-os, ao grupo controle. Em conclusão o co-cultivo de células-tronco da geleia de Wharton sob *scaffold* de buriti mantém a estrutura e promove a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais caprinos, apesar de reduzir a viabilidade folicular.

Palavras-chaves: reprodução animal; ovários; co-cultivo; citotoxicidade; poliuretanas.

ABSTRACT

The development of preantral ovarian follicular (POF) culture systems with stem cells can reduce oxidative stress by means of the secretasomes released by these cells, which are small molecules composed of antioxidants, growth factors and chemokines. may favor the development of these follicles. POF could benefit from being highly metabolic cellular structures that develop through interaction with oxidative radicals and bioactive peptides, making their in vitro culture complex and costly. Buriti oil, a typical palm of the north-northeast region, presents low extraction costs and relevant antioxidant properties, denoting potential for use in cell culture. The aim of this work was to characterize the scaffold of buriti oil (SB), to evaluate the bioincorporation with mesenchymal stem cells and the effect on co-culture with preantral ovarian follicles (goat's POF). To characterize the SB were the Infrared Spectroscopy (FTIR) and Thermogravimetric Analysis (TG and DTG). The morphology and cellular adhesion were analyzed through scanning electron microscopy (SEM) and histological techniques. MTT tests and hemolytic activity were used to evaluate the biocompatibility. The activation capacity of cells of the immune system was measured by tests of phagocytic capacity and synthesis of nitric oxide. Goat POF were cultured from fragments of the ovarian cortex, one of which was immediately fixed in carnoy (fresh control). The remaining fragments were cultured for 1 and 7 days in culture plates in the presence or absence of buriti scaffold with Wharton jelly mesenquimal stem cells (SB-CTMGW). After culture the ovarian fragments were fixed in carnoy for histological examination. Regarding the characterization, the SB has amorphous composition, high thermal stability and high water expansion capacity. In relation to the morphology, it shows micro and macropore surfaces and good adhesion of CTMGW. The absence of cytotoxicity and hemolytic activity was observed, and SB did not stimulate the activation of macrophages. Preantral ovarian follicles were morphologically classified into primordial or developing follicles. The cultivated treatment group showed the greatest reduction in the percentages of primordial follicles ($p < 0.05$), and the percentages of developing follicles increased ($p < 0.05$), comparing them to the control group. In conclusion, the co-cultivation of mesenquimal stem cells from Wharton jelly under buriti scaffold maintains the structure and promotes the activation and in vitro growth of preantral follicles of goat preantral, although reducing follicular viability.

Keywords: animal reproduction; ovaries; co-cultivation; cytotoxicity; polyurethanes.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) são estruturas celulares de elevada sensibilidade, tornando seu cultivo *in vitro* complexo e oneroso. No desenvolvimento reprodutivo natural aproximadamente 99,9% desses folículos não chegam ao processo ovulatório, entrando em atresia, por via degenerativa e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 2007). O número de folículos pré-antrais por ovário varia entre espécies, segundo Lucci et al., (1999) na cabra essa população compreende cerca de 35.000 folículos.

O ovário é o órgão responsável pela produção de fatores de crescimento, hormônios e gametas femininos (oócitos), estes últimos, localizam-se nos folículos. Nos mamíferos, o ovário é composto por duas regiões principais: uma interna (medular), responsável pela sustentação desse órgão, e uma mais externa (cortical), na qual podem ser encontrados folículos e corpos lúteos em diferentes estágios de desenvolvimento (SAMUELSON, 2007).

O folículo ovariano constitui-se de oócito circundado por células somáticas, granulosa e teca. Durante a foliculogênese, o oócito se desenvolve, as células da granulosa circundantes se multiplicam e se diferenciam, adquirindo capacidade esteroidogênica, e alterando a morfologia folicular (URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2015).

A população de folículos no ovário pode ser influenciada por vários fatores como espécie, etnia, genética, e idade e estado reprodutivo e nutricional. Na época do nascimento, a depender da espécie de mamífero, o ovário contém sua quota máxima de folículos primordiais, os quais estão quiescentes e contêm todos os oócitos, disponíveis para fertilização durante toda a vida fértil (FILIPIAK; VIQUEIRA; BIELLI, 2016). Embora muitos cientistas acreditem que o estoque de folículos ovarianos seja finito e não renovável, estudos apresentam evidências de que pode ocorrer uma pequena renovação na população folicular por meio da diferenciação das células-tronco presentes no ovário, a neofoliculogênese (JOHNSON et al., 2005; SILVA-SANTOS et al., 2013).

A foliculogênese é definida como processo de formação, crescimento e maturação folicular, que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório. Durante o processo da foliculogênese, a morfologia folicular é alterada devido à proliferação, à diferenciação das células da granulosa, o crescimento oocitário, o aparecimento das células da teca, à zona pelúcida e uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). De acordo com o aspecto morfológico, os folículos

ovarianos podem ser classificados em dois grandes grupos: pré-antrais (FOPA) ou não cavitários, e antrais (FOA) ou cavitários (FIGUEIREDO et al., 2007).

Grande parte dos oócitos presentes nos ovários dos mamíferos é armazenada em FOPA. Entretanto, muitos desses folículos se tornam atrésicos durante a fase de crescimento e desenvolvimento (MAGALHÃES et al., 2011; DUARTE et al., 2011).

As biotécnicas da reprodução estão em constante aperfeiçoamento, e seus resultados tem elevado à eficiência reprodutiva (NOCITI; TAIRA, 2015). As variadas tecnologias reprodutivas, incluindo a criopreservação de gametas, inseminação artificial, transferência de embriões e a fertilização *in vitro* têm sido empregadas com êxito em várias espécies (FAUSTINO et al., 2011; FIGUEIREDO et al., 2011; CAVALIERI et al., 2015; SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016). Contudo, para execução dessas biotécnicas é necessário uma grande quantidade de complexos *cumulus-oophorus* competentes, capazes de produzir embriões e, conseqüentemente, maximizar a produção (MATOS et al., 2011). A presença de fatores de crescimentos e algumas citocinas podem intensificar o crescimento e a qualidade folicular (MAGALHÃES et al., 2012; MARTINS et al., 2014).

Os FOPA podem ser crescidos e maturados *in vitro*, visando a obtenção posterior de oócitos maduros e competentes, os quais poderão ser utilizados nas diversas biotécnicas da reprodução aplicadas aos animais domésticos. Os estudos relacionados com a foliculogênese podem ser feitos *in vivo*, através da análise de expressão de genes ou proteínas que estão presentes no ovário, e ainda *in vitro* com a utilização de diferentes sistemas, onde os folículos podem ser cultivados *in situ* ou isolados (ROSSETTO et al., 2011).

O sucesso do cultivo *in vitro* de FOPA depende do emprego de métodos eficientes que possibilitem seu adequado isolamento, diminuindo ou evitando danos estruturais, assegurando a sobrevivência folicular. Além disso, para que estes folículos cresçam e se desenvolvam *in vitro* é de extrema importância a utilização de sistemas de cultivo capazes de manter a sobrevivência e suportar o crescimento dos oócitos inclusos nos folículos pré-antrais até sua completa maturação (FAUSTINO et al., 2011). Associando adequadamente essas etapas, torna-se possível potencializar a reprodução assistida de animais geneticamente superiores através do fornecimento de milhares de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, bem como para as demais biotécnicas reprodutivas (ROSSETTO et al., 2011).

Sabe-se que durante o cultivo *in vitro* de fragmentos de tecido ovariano ou ainda de estruturas isoladas como folículos ovarianos, a síntese de radicais livres é elevada, por meio de mecanismos ainda não elucidados, que podem provocar apoptose e morte em vários tipos celulares (FIGUEIREDO et al., 2011). Entretanto, essas espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ter valor significativo como marcadores da remodelação dos tecidos, sinalização hormonal da esteroidogênese e da função das células germinativas, envolvidas ainda, em uma série de funções fisiológicas reprodutivas, como a maturação oocitária, a esteroidogênese ovariana, a ovulação, a implantação, a formação de blastocisto, a manutenção do corpo lúteo na gestação e a luteólise (FIGUEIREDO et al., 2007).

Por conseguinte, intencionando equilibrar a formação das ROS e manter suas funções fisiológicas normais as células contêm em seu citoplasma substâncias antioxidantes, as quais podem ser de natureza enzimática ou não enzimática (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GOMES et al., 2013). As disfunções no balanço oxidante/antioxidante em prol do pró-oxidante desencadeiam danos celulares, os quais são designados como danos oxidativos, que podem resultar em adaptação ou injúria celular. O estresse oxidativo pode ocorrer em função da redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou pela produção elevada de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (MACHADO et al., 2015).

Os danos ocasionados pelas ROS são visíveis em todos os tipos de biomoléculas, incluindo o DNA, proteínas e lipídios. A peroxidação lipídica é compreendida como a degradação oxidativa de lipídios poli-insaturados. Os ácidos graxos poli-insaturados são os principais alvos para os ataques dos radicais livres, devido as duas ou mais duplas ligações carbono-carbono e, suas múltiplas ligações (BRANDL et al., 2011).

A membrana que rodeia as células e as organelas celulares é constituída em grande parte de ácidos graxos poli-insaturados, assim sendo, é um dos componentes celulares mais agredidos por essas moléculas reativas. Resultando em modificações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, reduzindo a seletividade iônica, e propiciando a liberação do conteúdo de organelas e formação de artefatos tóxicos, culminando com a morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O desenvolvimento de sistemas de co-cultivo com células-tronco mesenquimais (CTM) pode beneficiar o crescimento folicular. Pois, as CTM destacam-se por expressar diversas moléculas bioativas como moléculas de adesão, antioxidantes, proteínas de matriz extracelular,

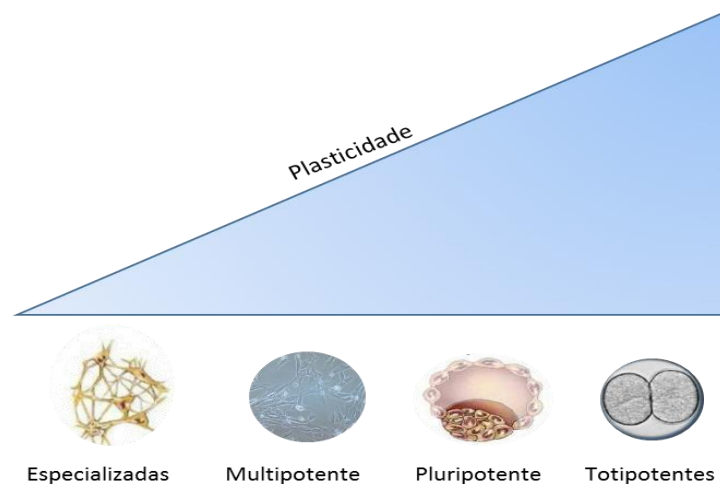
citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010). Assim, a utilização das CTM surge como uma importante ferramenta para a realização de técnicas de cultivo associadas aos FOPA. É altamente desejado um sistema de cultivo que mantenha a viabilidade e eleve a taxa de crescimento e competência de maturação desses folículos, aumentando a eficiência de produção de gametas femininos. Sistemas de cultivo de folículos pré-antrais ovarianos são importantes para estudar o desenvolvimento dos oócitos, especialmente por representarem fonte potencial para utilização *in vitro* na produção de embriões.

As CTM são amplamente estudadas por suas propriedades reparadoras, anti-inflamatórias e antioxidantes. Estes atributos têm sido largamente atribuídos ao conjunto de biomoléculas (secretoma) produzido por essas células. Os secretomas que são vesículas liberadas por essas células que contêm várias biomoléculas, em função de seu pequeno tamanho e elevada mobilidade, fornecem um mecanismo estável para fornecer sinais biológicos, como o aumento da atividade do elemento de resposta antioxidante, responsável por ativar a transcrição de enzimas antioxidantes, reduzindo o efeitos nocivos das ROS (BARRETO et al., 2017; PHELPS et al., 2018).

Além disso, as CTM são descritas como células com habilidade de gerar cópias idênticas a si, se auto renovando e que podem através de estímulos específicos dá origem a células diferenciadas, de vários tipos celulares de diversos tecidos tais como cardiomiócitos, hepatócitos e outras linhagens (CARVALHO et al., 2013; PENTEADO, et al., 2007).

Quanto ao potencial de diferenciação e plasticidade as células-tronco são classificadas em multipotentes, pluripotentes e totipotentes (Figura 1). As células multipotentes possuem a capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos celulares não restritos a uma única camada germinativa (VISINTIN et al., 2013). Uma célula é dita pluripotente quando se diferencia em todos os tipos celulares encontrados no organismo. Já as células totipotente podem dar origem a um organismo inteiro, incluindo membranas extraembrionárias e placenta (DEL CARLO; MONTEIRO; ARGOLO NETO, 2008; MORSCZECK et al., 2008).

Figura 1. Plasticidade de células-tronco de acordo com o grau de especialização



Adaptado de NOGUEIRA, 2009.

De acordo com a fonte de origem e com suas propriedades biológicas, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias (CTE) e adultas (CTA) (FRAGA; BORGES; CALVET, 2014). As CTE são oriundas da camada interna do embrião, na fase de desenvolvimento do blastocisto e possuem capacidade de originar mais de 200 tipos celulares (MUMMERY et al., 2012).

Já as CTA podem localizar-se em tecidos diferenciados como, medula óssea, polpa dentária, vasos sanguíneos e outros, sendo estas, as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos (SOUZA et al., 2003; SNYKERS et al., 2009). Neste grupo estão incluídas as CTM, que compreendem uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar em vários tecidos específicos e que produzem fatores de crescimento e citocinas que promovem a expansão e diferenciação celular (DE SOUZA et al., 2010).

As CTM são células indiferenciadas encontradas em tecidos diferenciados do organismo, responsáveis pela auto renovação e homeostase do tecido durante o ciclo vital (ELLEN et al., 2015). A facilidade de aderência em superfícies plásticas ou vidro e a capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo*, tem atraído pesquisadores (DING et al., 2015). Tanto em humanos, quanto em animais, as CTM têm sido isoladas com sucesso em vários tipos de tecidos. As fontes celulares mais utilizadas são a medula óssea e o tecido adiposo, entretanto, os procedimentos utilizados para isolar esses tipos de tecido são invasivos (CORRADETTI et al., 2013). Devido a estas limitações outras fontes de CTM são identificadas, como os anexos fetais, que são uma

fonte não invasiva de obtenção, são de tecidos normalmente descartados e com possibilidade de colheita ao nascimento (CREMONESI et al., 2011).

Esse tipo celular tem sido isoladas do cordão umbilical, onde é possível se obter células da veia do cordão umbilical, sangue de cordão umbilical (DING et al., 2015; KULDEEP et al., 2016) e da gelatina de Wharton (GAUTHAMAN et al., 2012; MULLER, 2013; MUSIALEK et al., 2015; SILVA, 2016; XIE et al., 2018). A utilização dessas fontes de células é atrativa por ser de fácil acesso, e utilizar materiais que geralmente são descartados, no pós-parto (GAUTHAMAN et al., 2012). Essas células, são consideradas imuno-privilegiadas, em função de suas características imunossupressora e ainda, possuem potencial de diferenciação multipotente e pluripotente, sendo uma fonte importante para a terapia celular (TAGHIZADEH; CETRULO; CETRULO, 2011).

Além disso, destacam-se em virtude de sua expansibilidade *in vitro*, obtenção inócua, possibilidade de transplantes autólogos, e pela inexistência de conflitos éticos em sua utilização (SIPOLI et al., 2005; ACERO, 2010; WESTPHAL et al., 2014). São células fusiformes com formato semelhante a fibroblastos, e no início do seu crescimento *in vitro*, apresentam unidades formadoras de colônia (CFU) (LIU et al., 2013). A Sociedade Internacional de Terapia celular (ISCT) listou alguns marcadores de superfície que elas devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11, CD79 α ou CD19 e HLA-DR.

Essas características são adotadas como critério mínimo para a caracterização das CTM, o que concede agilidade no uso dessas células em estudos pré-clínicos e, conseqüentemente, aplicações terapêuticas (MOSLEM et al., 2015). Nas últimas décadas essas pesquisas têm se intensificado de tal forma que o avanço, propiciou uma nova abordagem, compreendendo a regeneração e reparação das células/tecidos/órgãos, com principal objetivo de restaurar a função prejudicada. Contudo, o conhecimento acumulado com as terapias celulares, tem sido aplicado apenas quando outras terapias demonstram resultados insatisfatórios (MONTI et al., 2012; COLOM; JONES, 2016).

A aplicação terapêutica das CTM é uma alternativa promissora, em função do potencial de diferenciação dessas células em tecidos mesodermis e não mesodermis, ampliando a possibilidade de utilização clínica, tanto em humanos quanto em animais (DING et al., 2015). Aliado a isso, essas células são capazes também de produzir um secretoma composto de um pool heterogêneo de moléculas bioativas (CRIVELLI et al., 2017), como citocinas e fatores de

crescimento (MCP-1, VEGF-A, EGF, FGF-2, IL-6, LIF, TGF- β), agindo como moduladores parácrinos (NAZAROV et al., 2012). Assim, as CTM atraem atenção não apenas para aplicações *in vivo*, mas também, para uso em sistemas de co-cultivo *in vitro*.

O uso de materiais porosos como arcabouço de integração e suporte para essas células tem se destacado na regeneração de tecido e no desenvolvimento de sistemas *in vitro* de cultivo. Contudo, é necessário que essas matrizes tridimensionais porosas ou *scaffolds*, equilibrem a função mecânica e transporte de substâncias (HOLLISTER, 2005). As poliuretanas (PU) a base de óleo vegetal apresentam grandes potencialidades na indústria biomédica e na engenharia de tecidos. No Brasil o óleo extraído do buriti é conhecido por sua alta qualidade devido aos elevados teores de carotenoides e tocoferóis, sendo β -caroteno e β -tocoferol os principais de suas classes e os ácidos graxos monoinsaturados com ácido oleico como os principais constituintes (CANDIDO; SILVA; AGOSTINI-COSTA, 2015; FREITAS et al., 2017). Considerando essas características o óleo do fruto do buritizeiro, fornece uma excelente plataforma para síntese de biomateriais poliméricos (ALMEIDA et al., 2016).

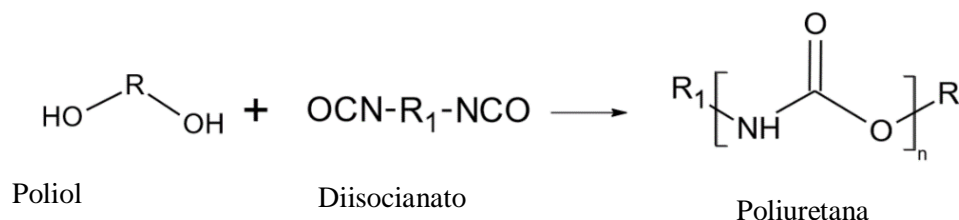
O termo biomaterial é definido de forma geral como elemento que entra em contato com sistemas biológicos (SILVA, 2017), sendo amplamente estudados para a evolução de dispositivos biomédicos voltados para inúmeras aplicações (MANOUKIAN et al., 2018). Os polímeros podem ter origem sintética, natural ou de materiais naturais quimicamente modificados e apresentam-se tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos (ANDERSON, 2018).

Os polímeros sintéticos podem ser flexíveis ou rígidos, em consequência às inúmeras possibilidades de modificações estruturais. Além disso, podem ainda ser materiais bioativos, biocompatíveis e favorecer a formação de tecidos (MEDEIROS et al., 2017), ou bioinertes, biocompatíveis, mas não beneficia o tratamento e o desenvolvimento de tecidos (SOUZA et al., 2011). Ademais, são biodegradáveis e bioabsorvíveis, por isso, têm atraído cada vez mais a atenção na área médica, tendo sido aplicados em liberação controlada de fármacos, implantes e suturas e outros (LIU et al., 2015; SALIBA et al., 2018).

Esses polímeros compreendem uma classe de compostos químicos de elevada massa molecular, formados por unidades estruturais menores (monômeros) que se repetem inúmeras vezes (FARIAS et al., 2016). Os primeiros polímeros sintéticos foram produzidos em 1947 por Bayer, a partir desse momento, a quantidade de materiais fundamentados neste tipo de

polimerização (Figura 2) ampliou a ponto de abranger diferentes segmentos de aplicação, nos heterogêneos ramos das indústrias (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2009). A versatilidade em se obter materiais com características diversas fez com que os PU se tornassem um dos principais polímeros do século vinte (MARCILIO et al., 2016; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Figura 2. Representação genérica da síntese de poliuretanos



Adaptado de Cangemi; Santos; Claro Neto (2009).

A maioria dos óleos vegetais constituem-se principalmente de triacilgliceróis (TAG) de cadeias longas variando de 14 a 22 átomos de carbono, saturados ou insaturados (MOREIRA, 2016). Esses TAG fornecem uma excelente plataforma para síntese de materiais poliméricos (ALMEIDA et al., 2016), que têm se destacado, cada vez mais, importante, principalmente, por serem provenientes de fontes renováveis (KLOSS; MORITA, 2017).

Vários tipos de óleos vegetais estão sendo utilizados para síntese de polímeros, tais como: soja, canola, girassol e linhaça e outros, em função de suas excelentes propriedades, como baixa toxicidade, baixo custo de produção e processamento e por serem geralmente biodegradáveis (GOMES; MELO; VELLOSO, 2017; SPONTÓN et al., 2013).

As espumas flexíveis de PU têm diversas aplicações, do simples uso para a fabricação de colchões, até fins mais nobres que são alvo de muitas pesquisas da comunidade científica (RAYMUNDO et al., 2017; COSTA et al., 2017). Na síntese de polímeros podem ser incorporados variadas classes de aditivos como os plastificantes, agentes reticulantes e outros que tem a função de otimizar a flexibilidade e resistência (COICO; SUNSHINE, 2015; SOTHORNVIT; KROCHTA, 2005). Os agentes reticulantes como o polietilenoglicol (PEG), podem ser empregados, com função de promover ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, consequentemente, melhorando as características mecânicas e a solubilidade (PACHECO, 2016).

De acordo com os preceitos da ISO 9001:2000, o PEG possui baixa toxicidade, estabilidade e não é metabolizado por sistemas biológicos (AZAMBUJA et al., 2006). Em relação ao meio

ambiente, é hidrossolúvel e biodegradável (NASCIMENTO, 2018). Morral-Ruíz et al., (2013) sintetizaram nanopartículas de PU a partir de óleo de rícino-PEG, os ensaios de citotoxicidade em células sanguíneas evidenciaram a biocompatibilidade, potencial para aplicações biomédicas.

Estudos relatam ainda que a adição de PEG reduz o comportamento elástico e viscoso e melhora as propriedades de cristalização para aumentar a densidade de poros abertos (CHEN et al., 2015; SCAFFARO et al., 2016). Bhaskar et al., (2018) relataram que a inclusão de PEG em poliuretanas promove a formação de poros e o crescimento celular.

O Brasil tem grande diversidade florística e apresenta diversas pontecialidades a serem exploradas. O buritizeiro (*Mauritia flexuosa*) é um dos mais valiosos patrimônios do ponto de vista ecológico, social e econômico, geralmente cresce em áreas permanentemente ou periodicamente inundadas ao longo de rios, florestas e savanas (SILVA, et al., 2009). Dessa palmeira, podem ser aproveitadas folhas, inflorescências, cachos de frutas, sementes e até raízes. Ademais, o buritizeiro é um verdadeiro estoque de carbono, conferindo a essa árvore poderoso papel na redução do aquecimento global. Em função de suas valiosas características o explorador Alexander Von Humboldt a apelidou de “a árvore da vida” (KOOLEN et al., 2018). Seu fruto, buriti, tem uma casca rígida, vermelha e escamosa que cobre uma polpa aveludada e oleosa, com variações de cor variando de amarelo escuro a avermelhado (ALBUQUERQUE et al., 2005). Segundo Ferreira (2005), é possível extrair cerca de 45 kg de óleo de buriti de 1.000 kg de frutos maduros.

O buriti é largamente consumido nas regiões norte e nordeste do Brasil e possui propriedades associadas à proteção contra o desenvolvimento de doenças crônicas, contudo há poucos dados na literatura sobre as propriedades desta fruta em experimentos (RIBEIRO et al., 2010).

O óleo extraído do fruto possui perfil químico de alta qualidade devido aos elevados teores de carotenoides e tocoferóis, sendo β -caroteno e β -tocoferol os principais de suas classes e os ácidos graxos monoinsaturados com ácido oleico como os principais constituintes (CANDIDO; SILVA; AGOSTINI-COSTA, 2015; FREITAS et al., 2017). Os óleos vegetais podem ser fontes renováveis úteis para a síntese de polióis, possíveis de uso, como precursores para obtenção de PU (GOMES; MELO; VELLOSO, 2017; NASCIMENTO et al., 2016).

Contudo, óleos ricos em ácido graxos insaturados requerem a derivatização, para que sejam apropriados à utilização de seus polióis, pois de forma geral não possuem hidroxilas no seu

esqueleto carbônico que é premissa para a síntese de um PU. Essas modificações químicas geralmente são conduzidas com a quebra das insaturações presentes nos triacilgliceróis como epoxidação, transesterificação, hidroformilação e ozonólise etc. (AQUINO et al., 2014; CAVALCANTE et al., 2016; FERRARO, 2017; NASCIMENTO et al., 2016).

Existem diversas possibilidades de aplicações biomédicas das PU como fios de sutura reabsorvíveis (SCAFFARO et al., 2013) ou *scaffolds* para engenharia de tecidos, em especial estes últimos, são estruturas porosas e complexas (LI et al., 2013). Estudos demonstram que a porosidade e o tamanho dos poros dos *scaffolds* estão fortemente ligados a capacidade regenerativa (SCAFFARO et al., 2013; TANG et al., 2016). Dessa forma os *scaffolds* devem ter duas classes de poros, os microporos com diâmetro menor que 20 µm, útil para acionar nutrientes e metabólitos, e os macro-poros com diâmetro maior que 100 µm, necessários à proliferação e migração celular (YAN et al., 2015).

Para garantir a segurança do uso desses *scaffolds*, deve-se confirmar a biocompatibilidade por meio de análises morfológicas das células em contato e testes de citotoxicidade (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Jiménez-Gallegos et al., (2011) ressaltam que é indispensável a verificação da biocompatibilidade de novos materiais, por meio, de testes *in vitro* e *in vivo*. Todavia, evidencia-se que os testes apresentam diferentes sensibilidades de acordo com os tipos celulares utilizados (SINHORETI; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Segundo o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), (ISO 10993-5, 1998), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* deve ser o primeiro teste para avaliar a compatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos. Após comprovação *in vitro* de sua atóxicidade é que se devem realizar ensaios em animais de laboratório.

Os ensaios *in vitro* são vantajosos, pois podem ser utilizadas células humanas e animais, de diferentes tecidos, podendo ter a mesma origem das células ou tecidos atingidos pelos produtos quando testados *in vivo*. Atualmente numerosos testes foram padronizados *in vitro* para detectar a toxicidade de biomateriais, principalmente aqueles de aplicação clínica (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; MENDES; SOUZA, 2017; ROGERO et al., 2003).

O teste de citotoxicidade consiste em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais, a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO et al., 2003). Os ensaios mais utilizados para avaliar a toxicidade e

a viabilidade celular, por meio de corantes vitais, que permitem distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, mediante atividade metabólica das células pela medida de intensidade de cor da cultura (MILLER et al., 2017; PASCUA-MAESTRO et al., 2018).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo*, tais como a limitação do número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente, além do período de teste ser mais curto, em muitos casos. (KUMARAVEL; BEGUM, 2015). Estudos com esses métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro* (VAJRABHAYA; KORSUWANNAWONG, 2018). O uso de *scaffolds* em sistemas de cultivo ou aplicação terapêutica tem vários desafios que justificam uma avaliação cuidadosa desta tecnologia.

Diversos estudos têm sido realizados pelo grupo de pesquisadores do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com células-tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí, com células-tronco, e ainda, associando estas células com matrizes porosas, para o seu crescimento. (ARGÔLO NETO et al., 2016; COSTA et al., 2017a; FERREIRA et al., 2007; LEITE, 2017; SILVA, 2016). O objetivo deste estudo é avaliar o *scaffold* de buriti com polietilenoglicol quanto as suas características físico-químicas, a biocompatibilidade e o seu potencial, sob um sistema de co-cultivo de células-tronco mesenquimais associadas com folículos ovarianos pré-antrais caprinos.

Este trabalho encontra-se estruturado da seguinte forma: Introdução e Revisão de Literatura do assunto pesquisado, seguida de 2 capítulos, conforme a Resolução 001/03-CCMCA de 22.05.2003, que estabelece as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. O capítulo I trata da **Biocompatibilidade do *scaffold* de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) brasileiro para o crescimento de células-tronco mesenquimais** e o capítulo II se refere ao **Cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos associados às células-tronco mesenquimais sob *scaffold* de buriti**, ambos elaborados na forma de artigos científicos.

CAPÍTULO I

*Apresentado segundo normas do periódico ACS Applied Material & Interfaces (print)

BIOCOMPATIBILIDADE DO SCAFFOLD DE ÓLEO DE BURITI (*Mauritia flexuosa*) BRASILEIRO PARA O CRESCIMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Camila E. S. de Carvalho¹ Maria A. M. de Carvalho^{2}*

¹ Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

² Professora Titular, Departamento de Morfofisiológica Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: poliuretanas; biointegração; biomateriais; citotoxicidade; *scaffold*

RESUMO

O óleo de buriti brasileiro apresenta baixo custo de extração e propriedades antioxidantes relevantes, sua constituição o torna importante ferramenta para síntese de poliuretanas. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade e caracterização físico-química da matriz tridimensional, *scaffold*, sintetizado a partir do óleo de buriti (SB) para crescimento de células-tronco. Para caracterização realizou-se espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e análise termogravimétrica (TG e DTG). A biointegração foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e técnica histológica. Para avaliar a biocompatibilidade, foram utilizados testes de MTT e atividade hemolítica. A capacidade de ativação das células do sistema imune foi investigada por testes de capacidade fagocitária e síntese de óxido nítrico. O SB exibe composição amorfa, com resistência térmica e flexibilidade, superfície com micro e macroporos, e não apresenta efeitos tóxicos às células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton e eritrócitos, demonstrando, assim, suas propriedades biocompatíveis e elevada capacidade de adesão celular. Concluindo, a matriz tridimensional sintetizada a partir do óleo de buriti mostra ser um material seguro para o cultivo direto e também para fabricação de compostos utilizados em aplicações *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

O buritizeiro (*Mauritia flexuosa*) é um dos mais valiosos patrimônios amazônicos, do ponto de vista ecológico, social e econômico. Geralmente cresce em áreas permanentemente ou periodicamente inundadas ao longo de rios, florestas e savana (Silva et al., 2009). O óleo extraído do fruto possui perfil químico de alta qualidade devido aos elevados teores de carotenoides e tocoferóis, sendo β -caroteno e β -tocoferol os principais de suas classes e os ácidos graxos monoinsaturados com ácido oleico como os principais constituintes, que podem ser usados como precursores para os poliuretanos (Candido, Silva & Agostini-Costa, 2015; Freitas et al., 2017).

A utilização de óleos vegetais na produção de materiais poliméricos tem crescido considerando à sua biodegradabilidade, renovabilidade e arranjo estrutural passíveis de modificações químicas estratégicas, além do baixo custo, para a síntese (Azevedo, Claro Neto, Chierice & Lepienski, 2009; Spontón et al., 2013). A adição de polietilenoglicol (plastificante e atóxico) à síntese de polímero auxilia na melhoria das qualidades físicas do material, aumentando a densidade dos poros (Bhaskar et al., 2018; Chen et al., 2015; Lo Re, Lopresti, Petrucci & Scaffaro, 2015; Scaffaro, Lopresti, Botta, Rigogliuso & Gheresi, 2016).

Os polímeros sintéticos são materiais promissores, uma vez, que apresentam ampla gama de aplicações, incluindo regeneração tecidual e engenharia de tecidos (Gabriel et al., 2016). No entanto, há pouca disponibilidade de biomateriais nacionais, o que induz a uma subordinação de tecnologia externa, conseqüentemente, desvalorizando o mercado nacional (Rosa, 2017).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são amplamente investigadas por suas propriedades reparadoras, anti-inflamatórias e antioxidantes. Estas características são atreladas aos secretomas, vesículas liberadas pelas CTM que contêm várias biomoléculas com elevada mobilidade, fornecendo um mecanismo estável para sinais biológicos (Barreto et al., 2017;

Phelps, Sanati-nezhad et al., 2018). Assim, a utilização de matrizes tridimensional porosas como base para o desenvolvimento e expansão dessas células tem demonstrado sucesso, aumentando sua eficiência terapêutica (Carmagnola, Ranzato & Chiono, 2018).

Este trabalho teve como objetivo analisar o *scaffold* do óleo de buriti, com relação as suas propriedades físico-químicas, biocompatibilidade e integração celular, com vistas ao uso como matriz de crescimento para células-tronco mesenquimais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Síntese do *scaffold* do óleo de buriti

Foram produzidos matrizes (*scaffolds*) a partir de polímero derivado do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*), no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI. Inicialmente, o monoglicerídeo do óleo de buriti foi colocado em agitação à temperatura constante, adicionou-se polietilenoglicol (PEG) e a agitação foi mantida até que uma mistura homogênea fosse formada. Em seguida, o agente polimerizante, hexametileno diisocianato (HDI) (52649 Sigma-Aldrich) foi adicionado à mistura. Verificadas essas características, o polímero foi deixado por 24h à temperatura inicial de reação para a cura completa, a fim de sua utilização neste experimento, e assim, os *scaffolds* foram cortados em 10x10x3, e autoclavados a 121°C (1 atm; pressão relativa) durante 15 minutos.

2.2 Caracterização físico-química do *scaffold* do óleo do buriti

A caracterização físico-química foi realizada por meio das seguintes especificações: difração de raios, DRX, realizada em um LABX – XDR 600, Shimadzu, Cu – K α ($\lambda = 1,5406\text{\AA}$) com 2θ no intervalo de 5° a 75°, com taxa de varredura de 2° min⁻¹ e tempo de exposição de 40 minutos; espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, por meio de um espectrômetro FTIR modelo Vertex 70 do fabricante Bruker Optics com bomba de purga,

comprimento de onda entre 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} em modulo de transmitância com 128 scans para cada amostra, feitas por pastilhas de KBR; análise térmica, utilizando o SDT Q 600, TA INSTRUMENTS, com razão de aquecimento de 10°C/min, na faixa de 25 a 600° C, atmosfera de N_2 , com massa da amostra de aproximadamente 10 mg; o intumescimento do *scaffold* foi determinado pela percentagem de absorção de água de acordo com (Pal & Pal, 2006). Foram obtidos os pesos dos *scaffolds* (P_1), em seguida, foram imersos em PBS (pH 7,4) a 37 °C durante 24 horas, e logo após este período, foram, novamente pesados (P_2). A taxa de intumescimento foi calculada utilizando a seguinte fórmula: Intumescimento (%) = $(P_2 - P_1) / P_2 \times 100$.

A porosidade total (P%) do *scaffold* foi determinada utilizando um método de deslocamento de líquido (Serra et al., 2015; Torres et al., 2013). Os *scaffolds*, com peso conhecido (P_1), foram incubados em etanol absoluto (EtOH) durante 48h, após esse período os *scaffolds* foram novamente pesados (P_2). A porosidade foi determinada pela equação:

$$P (\%) = \frac{P_2 - P_1}{d_{\text{etanol}} \times V_{\text{scaffold}}} \times 100.$$

O d_{etanol} representa a densidade do etanol e o V_{scaffold} é o volume do *scaffold* molhado.

2.3 Cultura de células-tronco caprinas e macrófagos murinos

Foram utilizadas células-tronco da geleia de Wharton de caprinos (CTMGW), previamente caracterizadas e criopreservadas no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com células-tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí. As células apresentaram aderência ao plástico, crescimento celular com fases bem definidas, capacidade de diferenciação celular em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Além disso, com os marcadores de superfície, apresentaram expressão de CD90 e CD105, e ausência de expressão de CD14, (Silva, 2016). As CTM foram descongeladas em banho-maria à 37°C, adicionou-se o dobro do volume de meio de cultivo DMEM F12 (12500062 Gibco®). As células foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e seu cultivo foi realizado utilizando meio

DMEM F12 suplementado (20% de soro fetal bovino [10437028 Gibco™], 1% de penicilina e estreptomicina [10.000µg/mL] [15140122 Gibco™], 1% de L-glutamina [2µM] [25030081 Gibco™] e 1% de aminoácidos não essenciais [11140050 Gibco™]). Averiguou-se a viabilidade celular por meio do método do azul de Trypan.

Os macrófagos murinos foram coletados das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c machos e fêmeas com idade entre 4-5 semanas do Centro de Pesquisa de Plantas Mediciniais (NPPM/CCS/UFPI), localizado em Teresina, PI, Brasil. Os animais foram mantidos a 24±1 °C, ciclo claro/escuro de 12 h. Todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA / UFPI nº 00117/2015).

2.4 Biointegração das CTMGW com SB

A adesão das CTMGW sobre o SB foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e histologia. Para tanto, foram cultivadas 1×10^5 CTMGW em 6 *scaffolds* de 10x10x6 mm, após três dias de cultivo, as amostras foram retiradas da placa de cultivo, e foi dividido 3 amostras fixadas com 2,5% de glutaraldeído por 24 horas e 3 amostras foram embebidas em meio de inclusão (Eadypath, Erviegas, Brasil) e resfriadas até a temperatura de -40 °C e seccionadas em criostato (HYRAX C 25, Zeiss, Alemanha) com espessura de 5 µm e coradas com eosina e hematoxilina. Logo após a fixação as amostras destinadas à MEV foram lavadas com PBS e submetidas à desidratação, com a troca lenta de água, usando uma série de diluições de etanol (30%, 55%, 70%, 88%, 96% e 100%) por 20 minutos em cada concentração. Após secagem, as amostras foram depositadas em fitas de carbono sobre suportes de alumínio e metalizadas com ouro, as micrografias foram coletadas a partir de elétrons secundários, usando um microscópio eletrônico de varredura (QUANTA FEG 250). As dimensões dos poros, como aparecem nas imagens de MEV, foram determinadas individualmente através do processamento das imagens utilizando o programa ImageJ.

2.5 Citotoxicidade

A citotoxicidade do SB foi avaliada usando o teste de MTT. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 500 μ L de meio DMEM F12 suplementado e cerca de 1×10^5 células-tronco por poço. Essas células foram incubadas a 37 °C e 5 % de CO₂ por 24 h, e em cada poço, foi adicionado SB. Foram incubadas por 24, 48 e 72 h e, a cada período, foi adicionado 10% de MTT (4,5dimetiltiazol-zil]-2,5-difeniltetrazolio) (M2003 Sigma-Aldrich) diluído em meio DMEM F12 a 5 mg/mL. Foram incubados por mais 5 h em estufa, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 500 μ L de DMSO em todos os poços. Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa Biotek (modelo ELx800). Os resultados foram expressos porcentagem de viabilidade sendo o grupo controle (sem a presença do SB) considerado como 100 % (Nogueira et al. 2007).

2.6 Atividade hemolítica

Após a coleta, os eritrócitos caprinos foram diluídos em 100 μ L de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5 % de hemácias. Em seguida foram adicionados os SB em contato direto com os eritrócitos. Foram incubados durante 1 h a 37 °C e, a reação foi interrompida pela adição de 200 μ L de PBS. As suspensões foram centrifugadas a 1000 G, por 10 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 540 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência (controle negativo) e 100 % de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade considerando o controle positivo como 100 % de hemólise.

2.7 Atividade fagocítica

Os macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço em placas de 24 poços e incubados com SB. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5 % de CO₂,

acrescentou-se 500 μ L de solução de zimosan (Z4250 Sigma-Aldrich) corado com vermelho neutro (N4638 Sigma-Aldrich), concentração final de 0,02%, e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 500 μ L de fixador de Baker fixador de Baker (formaldeído a 4% v/v, cloreto de sódio a 2% m/v e acetato de cálcio a 1% m/v em água destilada) para paralisar o processo de fagocitose e após 30 min, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan corado não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 1000 μ L de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline as absorvâncias foram medidas a 550 nm.

2.8 Síntese de óxido nítrico

Foram plaqueados 2×10^5 macrófagos por poço e incubados com SB. Após 24 horas de incubação a 37 °C e 5% de CO₂, foi transferido os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em água Milli-Q® às concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μ M diluídos nos respectivos meios de cultivo. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1 % Sulfanilamida em H₃PO₄ 10 % (v: v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e procedeu-se a leitura das absorvâncias a 550 nm. O procedimento foi realizado em triplicata e como controle positivo utilizou-se Lipopolissacarídeo (LPS).

2.9 Análise estatística

Foi utilizado o Teste T para análise de hemólise e capacidade fagocítica, e ANOVA seguida de teste de Tukey para os testes de MTT e síntese de óxido nítrico. Todos os dados foram analisados no programa GraphPad Prism versão 7.0, tomando-se o valor de o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

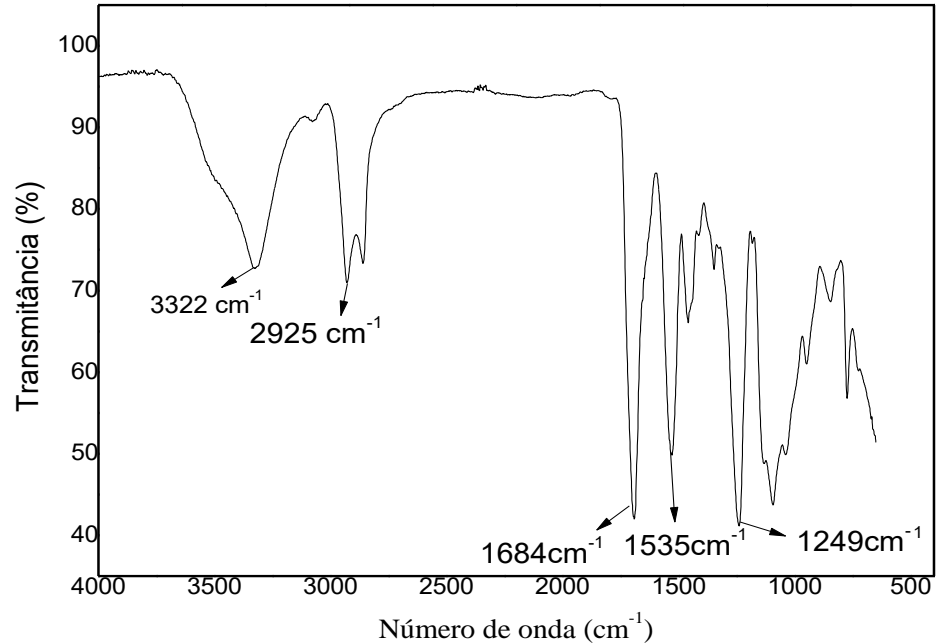
Foi obtido um *scaffold*, matriz tridimensional porosa, de cor amarelo claro e consistência elástica (Figura 1), com elevada resistência, demonstrando eficiência a partir dos materiais utilizados.

Figura 1. Fotografia da secção do *scaffold* do óleo do buriti



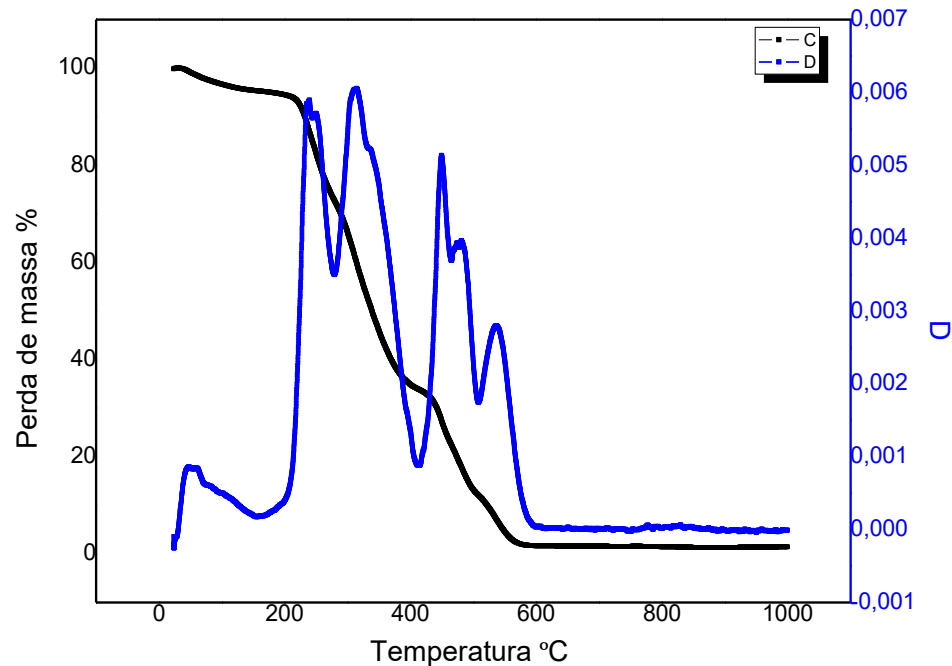
No espectro FTIR do polímero do óleo de buriti e PEG (gráfico 1), observam-se os grupos funcionais de poliuretanas. A banda em torno de 3322 cm^{-1} referente ao estiramento do agrupamento OH e NH; o pico em torno de 2925 cm^{-1} , que se relaciona ao estiramento C-H; a banda em torno de 1684 cm^{-1} , que representa o estiramento C=O do grupo éster, assim como a banda em 1535 cm^{-1} de estiramento NH e outra banda em 1249 vincula-se ao grupo C-N-H. A ausência de bandas na região $2000\text{-}2300\text{ cm}$, confirma a participação dos grupos isocianatos na reação, portanto, não se verifica os grupos isocianatos no SB. Este fato, também, foi verificado por Carvalho et al., (2009).

Gráfico 1. Espectros no infravermelho com transformada de Fourier do *scaffold* do óleo do buriti



No Gráfico 2 estão representadas as curvas de TG e DTG do SB. Verifica-se cinco estágios de degradação térmica, o primeiro evento, está relacionado com componentes estruturais da molécula de PU com perda de massa 18,6% em torno de 80° C; o segundo se refere ao rompimento das ligações uretanas proveniente do HDI, utilizado para a obtenção do PU, com perda de massa 10% na temperatura de 180° C; no terceiro, quarto e quinto eventos, após 220° C, ocorre o rompimento de ligações ésteres provenientes do PEG, com perda de massa de 71%, semelhantemente, os fornecidos por Cangemi (2006), em análise de poliuretana de óleo vegetal.

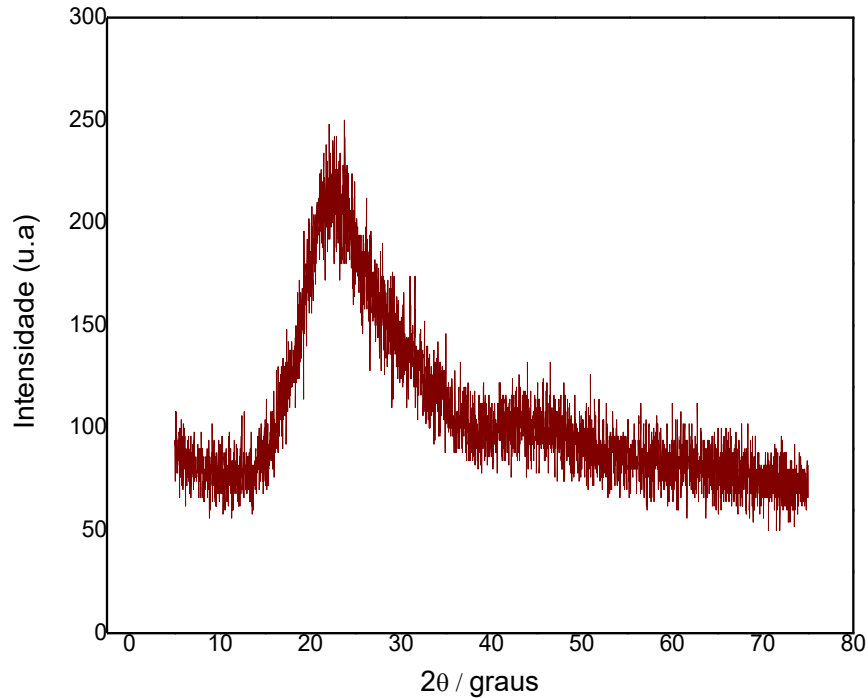
Gráfico 2. Curvas termogravimétricas TG e DTG de decomposição térmica do *scaffold* do óleo de buriti



Esses resultados demonstram resistência térmica do SB. Geralmente, os materiais porosos têm imagem desfavorável, pois estão associados a contaminação devido sua difícil esterilização (Osorio et al., 2017). Os dados deste estudo demonstram que o SB tem elevada estabilidade térmica e pode ser esterilizado por processo de autoclavagem, diminuindo assim, as chances de contaminação tanto no cultivo *in vitro* quanto no uso em terapias.

No gráfico 3 é exibido o difratograma de raio X do *scaffold*. Observa-se que o mesmo possui uma banda larga, aproximadamente entre os ângulos 2θ de 15° e 30° , sem picos bem definidos, característica de polímeros não cristalinos. Esses dados se assemelham aos observados por Pollo et al., (2012).

Gráfico 3. Difratoograma de Raio X do *scaffold* do óleo de buriti



Nos materiais amorfos não existe ordenamento periódico de átomos, incluindo a maioria dos poliuretanos. Segundo Araújo; Vieira; Zawadzki (2011) em poliuretanos com elevadas quantidade de segmentos rígidos é possível observar pico 2θ próximo de 12° . Para Rodrigues et al., (2010) as poliuretanos com estruturas amorfas degradam mais rapidamente do que aqueles com segmentos semicristalinos.

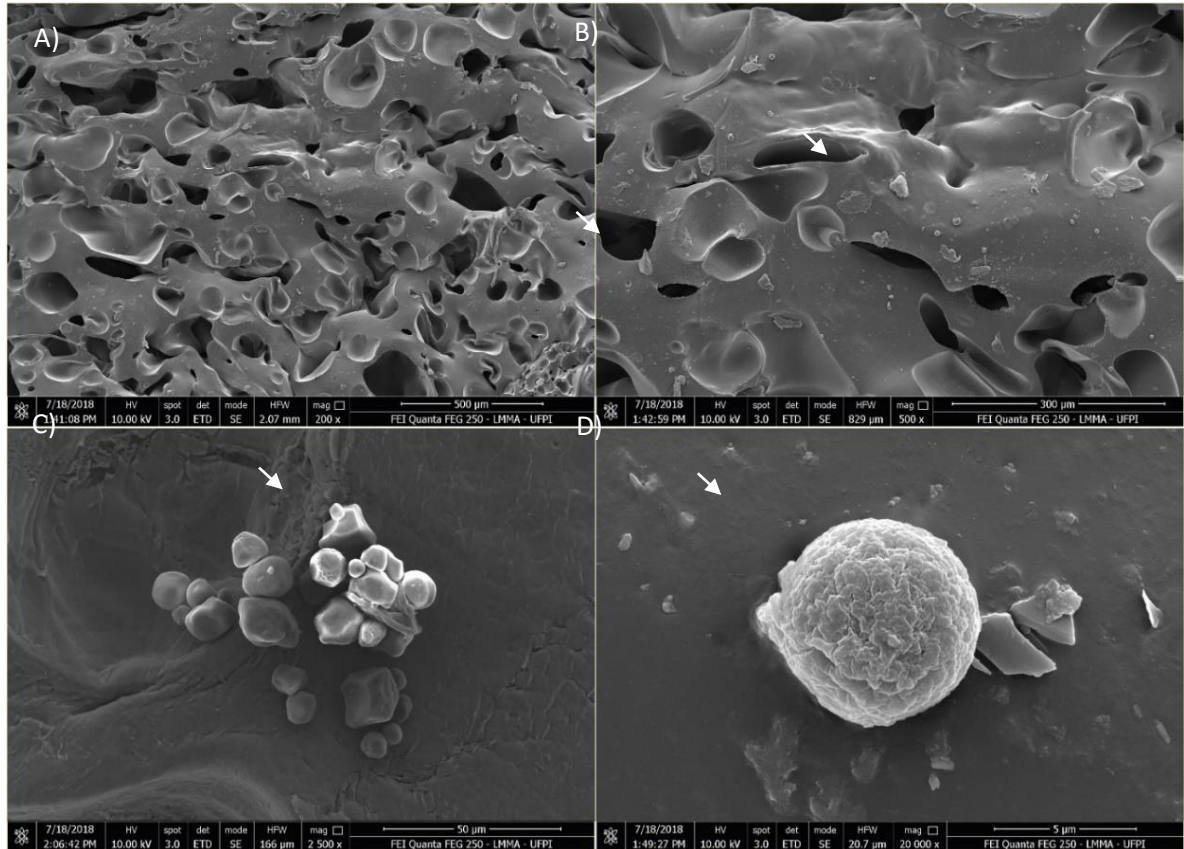
O SB apresenta porosidade em torno de 67%, corroborando com os resultados encontrados por Leite; Marinho; Fook (2016). Para Paula e Talim (2018), a porosidade é característica fundamental, uma vez que, influência nas interações celulares, o resultado demonstrou elevada presença de poros. Quanto à taxa de intumescimento do SB foi observada, em média, 50%. Para Wattanutchariya e Changkowchai (2014), quanto maior e mais rápida a capacidade de expansão e

inchaço do *scaffold*, mais benéfico ao sistema. Apesar do caráter hidrofóbico da matriz de poliuretana, houve uma grande absorção de água, que se deve a estrutura porosa da matriz que possibilita a difusão da água para o interior da estrutura

A análise da MEV demonstrou que o *scaffold* tem em sua estrutura micro e macro poros (figura 2A), com dimensões variando entre 10 μm à 178 μm , tamanho médio de 78 μm . O crescimento e adesão celular são alterados em função dessas características, segundo Yan et al., 2015 a presença dos poros com diâmetro menor que 20 μm é útil para acionar nutrientes e metabólitos e os poros com diâmetro maior que 100 μm , necessários à proliferação e migração celular. Essas características assemelham-se as encontradas por Bhaskar et al., (2018) na análise de poliuretanas com adição de PEG. Já Bellincanta et al., (2011), obtiveram dimensões de poros variando de 5 a 7 μm de suas poliuretanas, enquanto, Macedo et al., (2017), relataram diâmetros de 50 a 350 μm .

A grande variação nos diâmetros dos poros de poliuretanos ocorre, por pelos fatores referentes a reagentes e temperatura, que podem alterar as características dos materiais. Nas figuras 2B, 2C e 2D evidenciam-se a adesão das CTMGW cultivadas com o SB, as células apresentaram íntimo contato com a matriz em diversos pontos, mantendo-se íntegras, fato este, evidenciado principalmente pela presença de células por todo o SB.

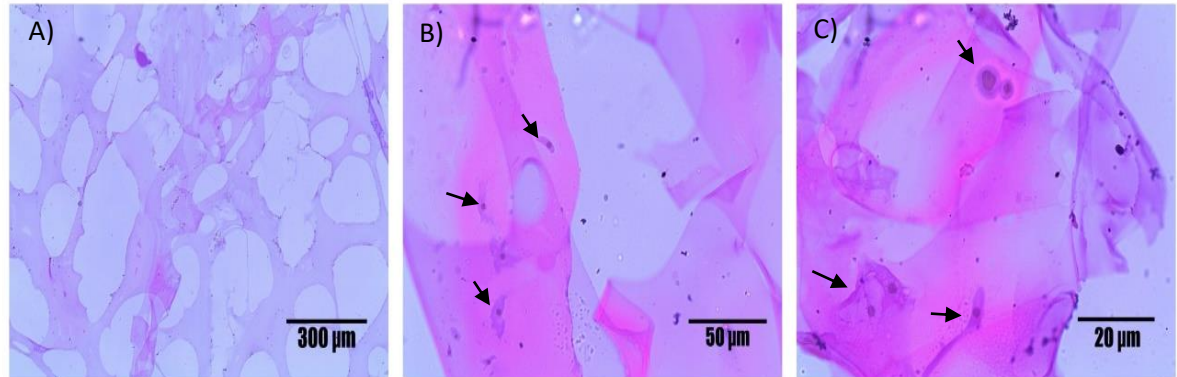
Figura 2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do *scaffold* do óleo do buriti cultivado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton.



Em (A) evidencia a estrutura porosa do *scaffold*, (B) observam-se CTMGW arredondadas ou fibroblastóide (C) e (D) MEV evidenciando as CTMGW com morfologia arredondada fixadas a matriz (setas). Análise após 3 dias de cultivo.

As fotomicrografias (Figura 3) demonstram que o SB após 72 horas de cultivo, apresentava diversas células aderidas com formatos fibroblastóide e arredondadas. Destaca-se a presença das células-tronco em diversas camadas do *scaffold*.

Figura 3. Fotomicrografia do *scaffold* do óleo de buriti cultivado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton



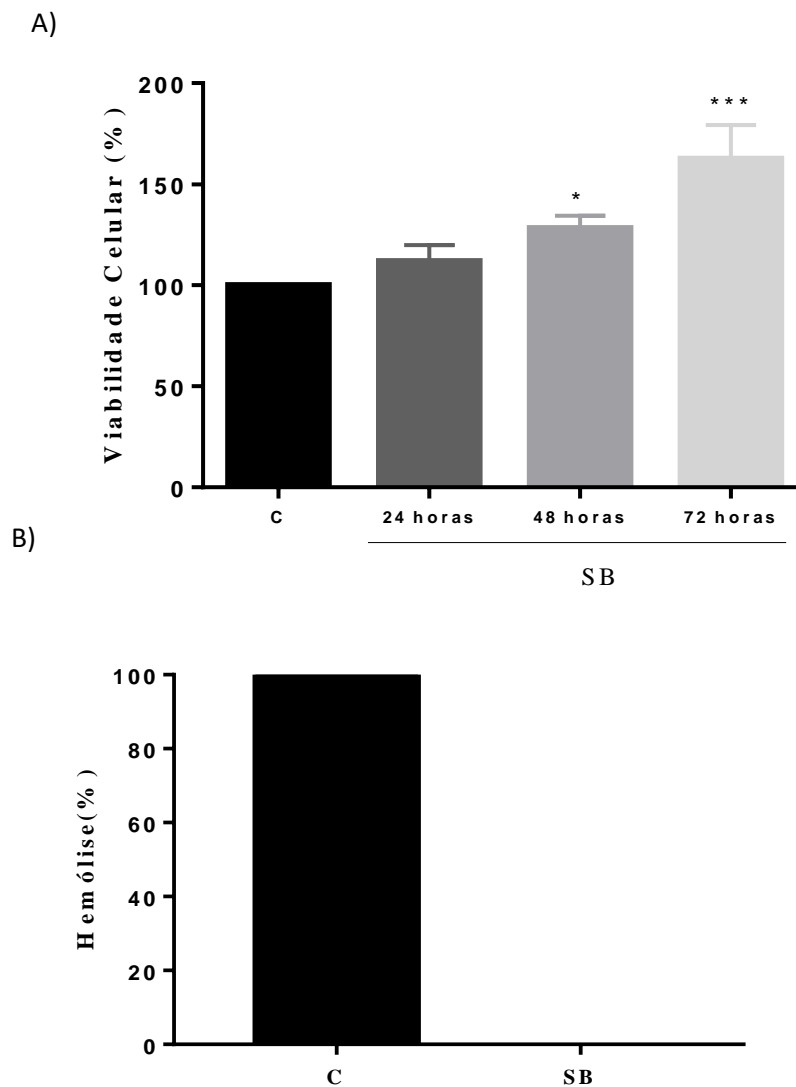
Em (A) é observada a estrutura porosa da matriz tridimensional, o *scaffold* do óleo do buriti. Em (B) e (C) observam-se células-tronco arredondadas ou fibroblastóides, após três dias de cultivo. A seta aponta as células-tronco da geleia de Wharton.

Esses resultados revelam a eficácia do SB no funcionamento como um arcabouço para crescimento celular, e o tamanho e interconectividade dos poros estão adequados, já que houve adesão e integração das células.

Na avaliação da viabilidade celular o SB não exibe atividade citotóxica sobre CTM e aumentou de forma progressiva a viabilidade celular (Gráfico 4A). As avaliações realizadas em 24, 48 e 72 horas aumentaram o metabolismo das células, em 12%, 28% ($p < 0,05$) e 62% ($p < 0,001$). Sugere-se que esse aumento seja em consequência da expansão das células sobre o *scaffold*, o que comprova que promove um ambiente propício ao crescimento e multiplicação dessas células. Esses resultados corroboram com Barrioni et al., (2014) e Gabriel et al., (2016). Ambos os trabalhos, usando poliuretanas, demonstraram não haver citotoxicidade, no entanto, o SB incrementou a viabilidade das células em função da capacidade de expansão dessas células sob o SB.

A matriz quando em contato com células sanguíneas não apresenta atividade hemolítica (Gráfico 4B), resultado semelhante ao descrito por Jaganathan; mani, 2018; Yuan; lin; shen, 2008. Já Peng et al. (2018) trabalhando com poliuretanas comerciais, Tecoflex®, demonstraram atividade hemolítica, enquanto o SB neste estudo, apresenta resultado satisfatório, com atividade hemolítica inferior.

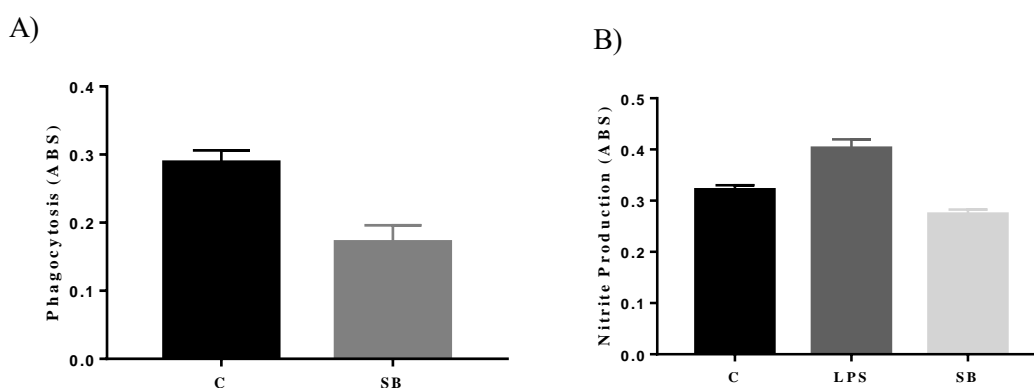
Gráfico 4. Efeito do *scaffold* do óleo de buriti na viabilidade de células de mamíferos



A) Viabilidade das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton na presença do *scaffold* do óleo de buriti. B) Atividade hemolítica do *scaffold* do óleo de buriti. Cada ponto representa média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata, com limite de confiança de 95 %. Sendo $*p < 0,05$, C – Controle.

Em relação à capacidade de ativação dos macrófagos, o SB não interferiu nos parâmetros avaliados de forma significativa. Observa-se no gráfico 5A que houve uma leve redução da capacidade fagocítica, o mesmo ocorreu, na síntese de óxido nítrico exibida no gráfico 5B. De acordo com esses resultados infere-se que o SB não ativa os macrófagos, devido à biocompatibilidade do SB com as células, característica desejável em polímeros e dispositivos sólidos. Os ensaios celulares *in vitro* são relevantes, pois fornecem respostas similares às dos tecidos e são bastante utilizados na descoberta de novos materiais (Costa Victal, Brisighello Valério, Cardoso Oshiro, Costa Baptista & Pinheiro, 2015).

Gráfico 5. Efeito do *scaffold* do óleo de buriti sobre a ativação de macrófagos



A) Análise da fagocitose do *scaffold* do óleo de buriti por macrófagos B) Avaliação da síntese de óxido nítrico induzida pela presença do *scaffold* do óleo de buriti. O gráfico representa a média \pm erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. $*p < 0,05$, ABS – Absorbância e C – Controle.

4. CONCLUSÃO

O *scaffold* formado pela poliuretana do óleo de buriti com polietilenoglicol apresenta arranjo estrutural amorfo, com micro e macroporos, possível de auto-clavagem, com resistência térmica e flexibilidade, não demonstrando efeitos tóxicos às células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton e eritrócitos. Do mesmo modo, não apresenta alterações sobre células do sistema imune, evidenciando-se, assim, suas propriedades biocompatíveis e sua elevada capacidade de adesão celular. A matriz porosa do óleo de buriti demonstra ser um material seguro para o cultivo direto e também para fabricação de compostos utilizados para aplicações *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Araújo, M. V. G. De, Vieira, J. V. F., & Zawadzki, S. F. (2011). Inclusão de poliuretanos de derivados de ciclodestrinas e poli(etileno) Glicol. In *11º Congresso Brasileiro de Polímeros* (pp. 2137–2142).
- Azevedo, E. C., Claro Neto, S., Chierice, G. O., & Lepienski, C. M. (2009). *Polímeros, ciência e tecnologia. Polímeros: Ciência e Tecnologia* (Vol. 19). ABPol. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/470/47020179014/>
- Barreto, L. C., Sacramento, L. O., Andrade, J. A., & Quintanilha, L. F. (2017). Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de cirrose hepática. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, *16*(2), 230. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v16i2.22543>
- Barrioni, B. R., De Oliveira, A. A. R., Oréfice, R. L., & Pereira, M. D. M. (2014). Biodegradable Polyurethane Films Based on Hexamethylene Diisocyanate and ... In *8º Congresso Latinoamericano de Órgãos Artificiais, Biomateriais e Engenharia de Tecidos, At Rosário - Argentina*.
- Bellincanta, T., Poletto, P., Thürmer, M. B., Duarte, J., Toscan, A., & Zeni, M. (2011).

Preparação e caracterização de membranas poliméricas a partir da blenda polisulfona/poliuretano.

Polímeros, 21(3), 229–232. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282011005000045>

Bhaskar, B., Owen, R., Bahmaee, H., Wally, Z., Sreenivasa Rao, P., & Reilly, G. C. (2018).

Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 106(5),

1334–1340. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36336>

Candido, T. L. N., Silva, M. R., & Agostini-Costa, T. S. (2015). Bioactive compounds and antioxidant capacity of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes.

Food Chemistry, 177, 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.041>

Cangemi, J. M. (2006). *Biodegradação de Poliuretano Derivado do Óleo de Mamona*. (Tese de Doutorado) Universidade de São Paulo.

Carmagnola, I., Ranzato, E., & Chiono, V. (2018). *Scaffold functionalization to support a tissue biocompatibility. Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds* (Vol. 1). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00011-2>

Carvalho, S. M., Weber, V., Silva, T., & Barreto, P. L. M. (2009). Caracterização de poliuretano baseado em polioliol sintetizado a partir de glicerol e hexametileno diisocianato. In *Congresso Brasileiro de Polímeros*. Foz do Iguaçu, Paraná: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros.

Chen, B., Jing, X., Mi, H.-Y., Zhao, H., Zhang, W.-H., Peng, X.-F., & Turng, L.-S. (2015).

Fabrication of Polylactic Acid/Polyethylene Glycol (PLA/PEG) Porous Scaffold by Supercritical CO₂ Foaming and Particle Leaching. *Polymer Engineering and Science*, 57(3–4), 147–151.

<https://doi.org/10.1002/pen>

Costa Victal, J., Brisighelo Valério, L., Cardoso Oshiro, M., Costa Baptista, S., & Pinheiro, F.

(2015). Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à

experimentação animal. *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 7(2), 36–57. <https://doi.org/10.22280/revintervol7ed2.172>

De Macedo, V., Zimmermann, M. V. G., Koester, L. S., Scienza, L. C., & Zattera, A. J. (2017). Flexible polyurethane foams filled with *Pinnus elliotti* cellulose. *Polimeros*, 27, 27–34. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2212>

Freitas, M. L. F., Chisté, R. C., Polachini, T. C., Sardella, L. A. C. Z., Aranha, C. P. M., Ribeiro, A. P. B., & Nicoletti, V. R. (2017). Quality characteristics and thermal behavior of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil ; Parámetros de calidad y comportamiento térmico del aceite de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.). *Grasas Y Aceites*, 68(4), 9. <https://doi.org/10.3989/gya.0557171>

Gabriel, L., A., B., Bastos, G., P., K., Dias, P., & Maciel, R. (2016). Synthesis and Characterization of Bio-Based Polyurethane for Tissue Engineering Applications. *Chemical Engineering Transactions*, 49(11), 1682–1690. <https://doi.org/10.1039/c6bm00588h>

Grando, F. C. C., Felício, C. A., Twardowschy, A., Paula, F. M., Batista, V. G., Fernandes, L. C., ... Nishiyama, A. (2009). Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(7), 599–605. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009005000003>

Jaganathan, S. K., & Mani, M. P. (2018). Single-stage synthesis of electrospun polyurethane scaffold impregnated with zinc nitrate nano fibers for wound healing applications, 46942, 1–9. <https://doi.org/10.1002/app.46942>

Leite, M. D. R., Marinho, T. M. A., & Fook, M. V. L. (2016). Obtenção e caracterização de scaffolds de policaprolactona produzidos a partir do sistema BioExtruder. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 11(1), 30–33.

Lo Re, G., Lopresti, F., Petrucci, G., & Scaffaro, R. (2015). A facile method to determine pore size distribution in porous scaffold by using image processing. *Micron*, 76, 37–45.

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2015.05.001>

Osorio, M., Henao, L., Velasquez, J., Cañas, A., Restrepo, L., Gañan, P., ... Castro, C. (2017).

Biomedical applications of polymeric biomaterials. *Dyna*, 84(201), 241–252.

<https://doi.org/10.15446/dyna.v84n201.60466>

Pal, K., & Pal, S. (2006). Development of Porous Hydroxyapatite Scaffolds. *Materials and*

Manufacturing Processes, 21(3), 325–328. <https://doi.org/10.1080/10426910500464826>

Phelps, J., Sanati-nezhad, A., Ungrin, M., Duncan, N. A., & Sen, A. (2018). Review Article

Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives: Toward Cell-Free

Therapeutics. *Stem Cells International*, 2018(iii).

<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/9415367>

Pollo, L. D., Duarte, L. T., Anacleto, M., Habert, A. C., & Borges, C. P. (2012). Polymeric

membranes containing silver salts for propylene / propane separation. *Brazilian Journal of*

Chemical Engineering, 29(02), 307–314.

Rodrigues, G., Jr, S., Behar-cohen, F., Ayres, E., & Oré, R. L. (2010). Biodegradation of

polyurethanes and nanocomposites to non-cytotoxic degradation products, 95, 491–499.

<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.01.001>

Rosa, L. C. da. (2017). *Engenharia Tecidual: Desenvolvimento de um novo Scaffold injetável*

para aplicação na área da saúde. Dissertação (mestrado), Programa de Pós graduação em Saúde

e Compostamento-Universidade Católica de Pelotas.

Scaffaro, R., Lopresti, F., Botta, L., Rigogliuso, S., & Ghersi, G. (2016). Preparation of three-

layered porous PLA/PEG scaffold: Relationship between morphology, mechanical behavior and

cell permeability. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 54, 8–20.

<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.033>

Serra, I. R., Fradique, R., Vallejo, M. C. S., Correia, T. R., Miguel, S. P., & Correia, I. J. (2015).

Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 55, 592–604.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.072>

Silva, G. C. (2016). *Células-tronco da geléia de wharton do cordão umbilical de caprinos (capra hircus): protocolos de isolamento e caracterização*. (Dissertação de Mestrado) Universidade

Federal do Piauí, Teresina, Piauí. Retrieved from

[https://www.sigaa.ufpi.br/sigaa/SBlic/programa/noticias_desc.jsf?lc=pt_BR&id=368¬icia=13](https://www.sigaa.ufpi.br/sigaa/SBlic/programa/noticias_desc.jsf?lc=pt_BR&id=368¬icia=132308683)

2308683

Silva, S. M., Sampaio, K. A., Taham, T., Rocco, S. A., Ceriani, R., & Meirelles, A. J. A. (2009).

Characterization of oil extracted from Buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon Region. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(7), 611–616.

<https://doi.org/10.1007/s11746-009-1400-9>

Spontón, M., Casis, N., Mazo, P., Raud, B., Simonetta, A., Ríos, L., & Estenoz, D. (2013).

Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil.

International Biodeterioration and Biodegradation, 85, 85–94.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.05.019>

Torres, A. L., Gaspar, V. M., Serra, I. R., Diogo, G. S., Fradique, R., Silva, A. P., & Correia, I. J.

(2013). Bioactive polymeric-ceramic hybrid 3D scaffold for application in bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*, 33(7), 4460–4469.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.003>

Wattanuchariya, W., & Changkowchai, W. (2014). Characterization of Porous Scaffold from Chitosan - Gelatin / Hydroxyapatite for Bone Grafting, *II*.

Yan, L. P., Oliveira, J. M., Oliveira, A. L., & Reis, R. L. (2015). In vitro evaluation of the biological performance of macro/micro-porous silk fibroin and silk-nano calcium phosphate

scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 103(4), 888–898. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33267>

Yuan, J., Lin, S., & Shen, J. (2008). Enhanced blood compatibility of polyurethane functionalized with sulfobetaine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.05.020>

CAPÍTULO II

*Apresentado segundo normas do periódico *Animal Reproduction Science*

CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS ASSOCIADOS ÀS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOB *SCAFFOLD* DE ÓLEO DE BURITI

Camila Ernanda Sousa de Carvalho^a Maria Acelina Martins de Carvalho^{b*}

^a Aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

^b Professora Titular, Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Brasil

RESUMO

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) são estruturas celulares de elevada exigência metabólica, tornando seu cultivo *in vitro* complexo e oneroso. O uso de um sistema alternativo com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTMGW) incorporadas em *scaffold* de buriti (SB) pode favorecer o desenvolvimento folicular ovariano. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito de um sistema de cultivo alternativo para FOPA realizado com SB associado à CTMGW caprinas. Os FOPA caprinos foram cultivados *in situ* na presença ou na ausência do SB com CTMGW. O experimento teve duração de 7 dias, com avaliações realizadas nos dias 1 e 7. Para avaliações os fragmentos ovarianos fixados em carnoy, e processados histologicamente, analisados, classificados em primordiais ou em desenvolvimento e ainda quanto à viabilidade celular. O grupo cultivado com SB-CTMGW apresentou a maior redução nos percentuais de folículos primordiais, e os percentuais de folículos em desenvolvimento aumentaram, comparando-os ao grupo controle. Assim, houve maior ativação de folículos no grupo tratamento, apesar da redução da viabilidade folicular no dia 7.

Palavras-chave: Desenvolvimento folicular; ovário; co-cultivo; reprodução

1. Introdução

A evolução de técnicas reprodutivas requer grandes quantidades de complexos *cumulus-oophorus* competentes, capazes de produzir embriões e, conseqüentemente, otimizar as taxas de reprodução (Matos et al., 2011). Contudo, essas células apresentam elevada sensibilidade, tornando o cultivo *in vitro* bastante complexo.

Morfologicamente, os folículos ovarianos podem ser classificados em dois grandes grupos: pré-antrais (FOPA) e antrais (FOA) (Figueiredo, Celestino, Rodrigues & Silva, 2007). A maior população desses folículos é representada pelos FOPA, porém, grande parte, sofre atresia por apoptose ou necrose, e pequena quantidade alcança a ovulação, em consequência, o ovário apresenta rendimento muito baixo (Chaves, Duarte, Matos & Figueiredo, 2010; Duarte et al., 2011).

A presença de fatores de crescimento e algumas citocinas podem intensificar o crescimento e a qualidade folicular (Magalhães et al., 2012; Martins et al., 2014). A utilização das células-tronco mesenquimais (CTM) surge como uma importante ferramenta para a realização de técnicas de cultivo associadas aos FOPA, por seu potencial de induzir a proliferação e a taxa de sobrevivência de vários tipos de células bem como a sua facilidade de obtenção e expansibilidade *in vitro* (Silva et al., 2018). Além disso, as CTM destacam-se, por expressarem diversas moléculas bioativas (secretomas), de adesão, proteínas da matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com as demais células (Barreto, Sacramento, Andrade & Quintanilha, 2017; Monteiro, Argolo Neto & Del Carlo, 2010; Phelps, Sanati-nezhad, Ungrin, Duncan & Sen, 2018). O uso de materiais porosos, arcabouço de integração e suporte para CTM, tem se destacado na regeneração de tecidos e no desenvolvimento de sistemas *in vitro* de cultivo (Manoukian et al., 2018).

Acredita-se que a adição de um *scaffold* com CTM poderá proporcionar a difusão de secretomas para o meio de cultivo de forma rápida e sem o contato direto entre as células (Raeisdasteh Hokmabad, Davaran, Ramazani & Salehi, 2017). Assim, esta pesquisa tem por objetivo avaliar o desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais caprinos em um sistema alternativo de cultivo com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTMGW) incorporadas a *scaffold* de buriti (SB).

2. Material e Métodos

2.1 Síntese do *scaffold* de buriti e cultivo associado às CTMGW

O *scaffold* foi produzido no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados (LIMAV) da Universidade Federal do Piauí, a partir de polímero derivado do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*). O monoglicerídeo foi agitado à temperatura constante, e adicionado o Polietilenoglicol (PEG), com manutenção da agitação até a formação de uma mistura homogênea, sendo adicionado o agente polimerizante, hexametileno diisocianato (HDI). A reação foi observada a fim de se verificar a formação do *scaffold*. Este, foi cortado em 10x10x3 e autoclavado a 121°C (1 atm; pressão relativa) durante 15 minutos, para utilização em experimentos.

Foram utilizadas células-tronco da geleia de Wharton de caprinos (CTMGW), previamente caracterizadas e criopreservadas no Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí. As células apresentaram boa aderência ao plástico, crescimento celular com fases bem definidas, capacidade de diferenciação celular em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e, com relação aos marcadores de superfície apresentaram expressão CD90 e CD105, e ausência de expressão de CD14, (Silva, 2016).

As células foram descongeladas em banho-maria à 37°C, adicionando-se o dobro do volume de meio de cultivo DMEM F12 (12500062 Gibco®). As CTMGW foram centrifugadas a 1000 G por 10 minutos, o sobrenadante desprezado, e o cultivo foi realizado utilizando meio

DMEM F12 suplementado (20% de soro fetal bovino [10437028 Gibco™], 1% de penicilina e estreptomicina [10.000µg/mL] [15140122 Gibco™], 1% de L-glutamina [2µM] [25030081 Gibco™] e 1% de aminoácidos não essenciais [11140050 Gibco™]). Foi verificada a viabilidade celular por meio do método do azul de Trypan, contabilizada a concentração, e semeadas 1×10^5 de CTMGW em cada *scaffold* em placa de cultivo de 24 poços, com meio de cultura suplementado (DMEM F12 [12500062 Gibco®] suplementado, 20% de soro fetal bovino [10437028 Gibco™], 1% de penicilina e estreptomicina [10.000µg/mL] [15140122 Gibco™], 1% de L-glutamina [2µM] [25030081 Gibco™] e 1% de aminoácidos não essenciais [11140050 Gibco™]). O cultivo do *scaffold* foi realizado por 24 horas, após esse período o SB foi transferido para uma placa de cultivo de 24 poços contendo meio de foliculo ovariano α -MEM (pH 7,2-7,4) (11900024 Gibco™) suplementado com insulina 6,25µg/mL, transferrina 6,25mg/ml e selênio (6,25ng/mL) (ITS) (41400045 Gibco®), 0,23 mM de piruvato (11360039 Gibco®), 2 mM de glutamina (25030081 Gibco™), 2 mM de hipoxantina (11067030 Gibco™), 50 µg/mL ácido ascórbico (PHR1008 Sigma-Aldrich) e 1,25 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA) (05470 Sigma), em seguida, adicionado o fragmento ovariano.

2.2 Coleta de ovários caprinos

Os ovários (n = 10) de cinco cabras cíclicas adultas sem padrão de raça definido com escores de condição corporal entre 3 e 4, foram coletados em um abatedouro local (Teresina, Piauí, Brasil). Imediatamente após a remoção, os órgãos foram lavados em álcool a 70%, seguido de lavagens em Meio Essencial (MEM) (41500018 Gibco™) suplementado com HEPES (H4034 Sigma-Aldrich), penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg / mL (15140122 Gibco™). Os ovários foram transportados para o laboratório a 4 ° C no mesmo meio, no período de até 1 h. Os procedimentos com a utilização dos animais desta pesquisa, foram aprovados pela

Comissão de Ética no Uso de Animais, Universidade Federal do Piauí (CEUA-UFPI 00117/2015).

2.3 Protocolo experimental

O córtex de cada par ovariano foi dividido em 12 fragmentos de $4 \times 4 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ em condições estéreis. Dos fragmentos ovarianos, uma amostra foi retirada aleatoriamente, e imediatamente fixada, para avaliação histológica (controle fresco). Os demais fragmentos foram cultivados em placas de 24 com o SB-CTMGW, cada poço continha 1 mL de meio. Foi utilizado meio de cultura para folículos ovarianos, em cultivo durante 7 dias, e avaliado o desenvolvimento folicular, nos dias 1 e 7. O meio de cultura foi substituído por meio fresco a cada 2 dias. O tratamento foi repetido cinco vezes utilizando os ovários de cinco animais diferentes.

2.4 Análise morfológica e avaliação do crescimento folicular

Para a análise morfológica, os fragmentos de tecido ovariano foram fixados em solução de Carnoy por 4 h, após 1 e 7 dias, desidratados em concentrações crescentes de etanol. Após a inclusão em parafina (Synth, São Paulo, Brasil), foram cortados em seções de 5 μm , montadas em lâminas de vidro e coradas por eosina e hematoxilina. Os folículos foram classificados em normais e atresicos. Normais, quando havia um oócito intacto circundado por células granulosas organizadas em uma ou mais camadas, e não possuíam núcleo picnótico. Folículos atresicos, aqueles com um oócito retraído, núcleo picnótico e/ou células granulosas desorganizadas, destacadas da membrana basal.

A avaliação do estágio e sobrevivência dos folículos ovarianos foi realizada por meio de microscopia de luz, em seções seriadas com lâminas randomizadas codificadas. Foram considerados os estágios de folículos primordiais, os que apresentavam uma única camada de células granulosas achatadas ao redor do oócito; folículos em desenvolvimento, os que continham

uma camada de células granulosas achatadas e cuboidais, os que apresentavam uma ou mais camada de células da granulosa cuboidais, em torno do oócito.

Em cada tratamento foram avaliados 30 folículos. Para análise da ativação folicular, as porcentagens de folículos saudáveis primordiais e em crescimento, foram calculadas antes (controle fresco) e após a cultura em cada meio. Foi mensurado o eixo principal e médio de cada folículo, com o auxílio do programa Image J.

2.5 Análise estatística

Foram aplicados os testes de Smirnov-Kolmogorov e Barlett a fim de confirmar a distribuição normal e homogeneidade, respectivamente. Análise de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o teste de Tukey para a comparação de cada tratamento testado com os grupos controle (ovários cultivados dia 1 e dia 7). O teste de Student Newman Keuls (SNK), para avaliar os efeitos dos tratamentos sobre os diâmetros dos folículos, sendo, os resultados expressos como média \pm desvio padrão (SD). Diferenças entre os grupos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

As porcentagens de folículos pré-antrais morfológicamente normais no controle fresco (tecido fresco) e após 1 e 7 dias de cultura nos diferentes tratamentos, são evidenciadas no gráfico 1. Após 1 dia de cultura não houve redução significativa do número de FOPA tanto no grupo controle cultivado, quanto no grupo cultivado com SB-CTMGW. Resultados, semelhantes aos de Neves (2017) realizando co-cultivo *in situ* com células-tronco mesenquimais de medula óssea caprina.

Durante o período de cultura de 7 dias, foi constatado redução significativa de 25% no grupo controle tratado ($p < 0,01$), e 33% no grupo SB-CTMGW ($p < 0,001$), no percentual de folículos normais, o que demonstrou a redução a viabilidade em todos os tratamentos,

corroborando com os resultados de Almeida et al., (2015) e Da Silva et al., (2017) utilizando fatores de crescimentos fibroblastóide e hormônio foliculo estimulante.

Para Katsuda et al., (2013) os secretomas produzidos por CTM tem potente ação sobre o crescimento celular e antioxidante, entretanto, para sobrevivência folicular é necessário níveis controlados de espécies reativas de oxigênio (Lima-Verde, 2011). Acredita-se que a redução desses radicais pode ser fator desencadeador da morte celular precoce. Contudo, segundo Zhao et al., (2000) a baixa taxa de sobrevivência de folículos cultivados, pode estar associada, também, ao crescimento excessivo das células da teca em folículos pré-antrais, em resposta aos fatores de crescimento liberados pelas CTMGW.

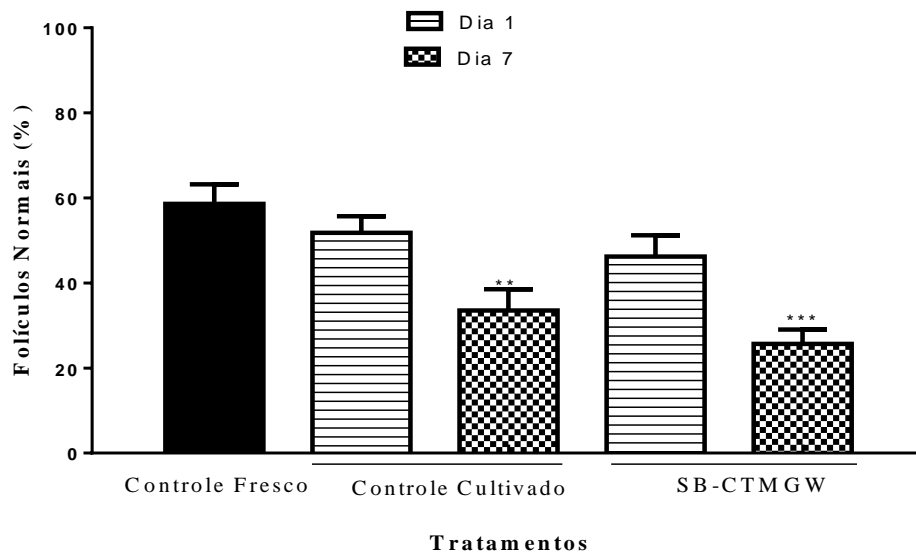


Gráfico 1. Porcentagem (média \pm erro padrão) de folículos ovarianos pré-antrais morfologicamente normais no controle fresco e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias sem ou com *scaffold* de buriti com células-tronco. Foi realizado ANOVA *one-way* e Teste de Tukey, sendo ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Na figura 1A e 1B observam-se folículos primários no controle fresco. Nas figuras 1C e 1D, folículos ovarianos degenerados após o cultivo por sete dias no grupo controle, e nas figuras

1E e 1F evidencia-se a presença de folículos degenerados e folículos viáveis após sete dias de cultivo com *scaffolds* de buriti com CTM.

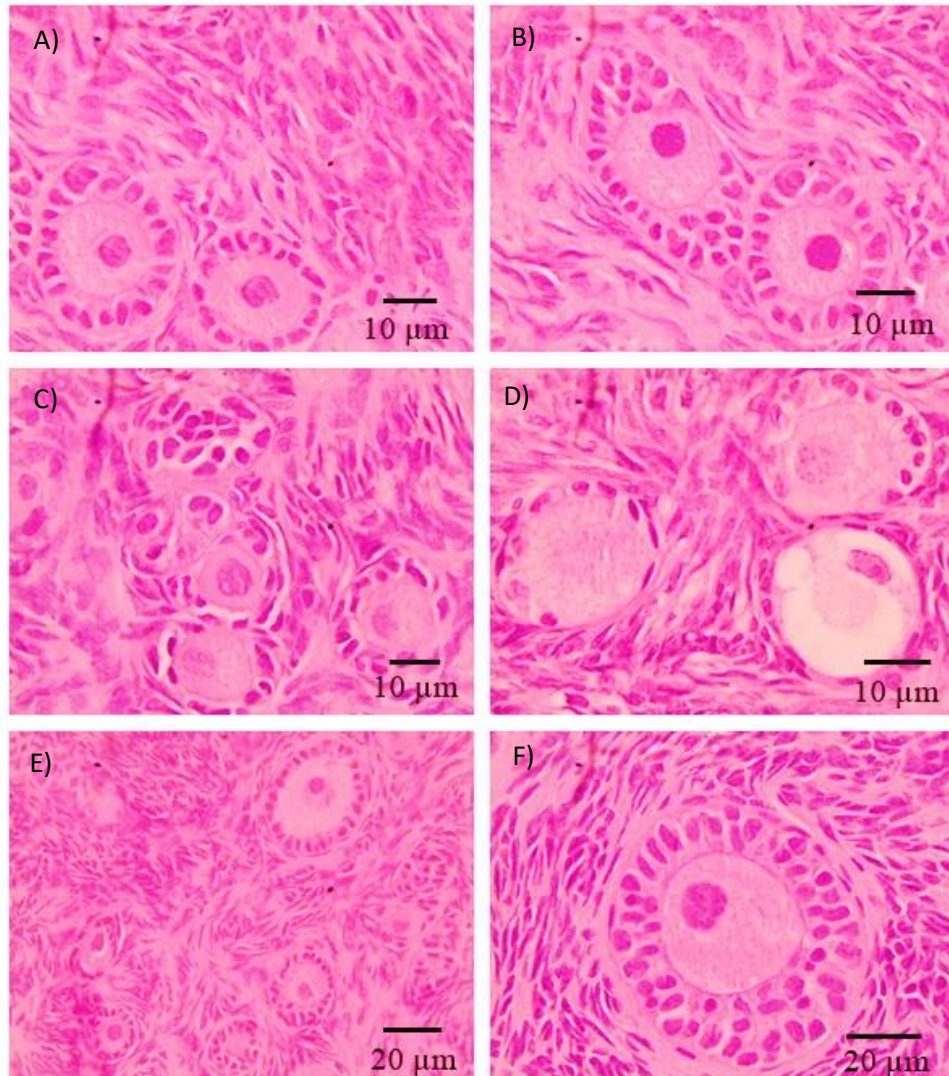


Figura 1. Fotomicrografia de fragmentos de ovário cultivados com *scaffold* de buriti incorporado com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton. Em A e B observam-se folículos primários no controle fresco. Em C e D, folículos ovarianos degenerados após o cultivo por sete dias no grupo controle. Em E e F demonstra-se presença de folículos degenerados e folículos viáveis após sete dias de cultivo com SB-CTMGW

Neste estudo, foi verificado que a redução da viabilidade celular, está associada aos folículos em estágio de desenvolvimento. Martins et al., (2014) explicitam que a estimulação da proliferação celular do estroma, pode atuar como uma barreira, impedindo que os nutrientes cheguem às células da granulosa e oócitos, ou que o aumento do consumo de nutrientes pelas células da teca, leve à insuficiência metabólica do meio de cultura.

A eficiência do cultivo de folículos ovarianos pode ser afetada por outros fatores, como o tipo de sistema de cultivo, composição do meio-base, concentração e associação de fatores adicionados ao meio de cultivo (Rossetto et al., 2011). Estudos em pequenos ruminantes relatam redução na viabilidade folicular pré-antral, após o cultivo *in vitro* (Matos et al., 2007; Rabelo et al., 2005; Saraiva et al., 2008).

A ativação dos FOPA primordiais e porcentagens de folículos em desenvolvimento, durante o cultivo, são demonstradas nos gráficos 2A e 2B, respectivamente. Após 1 e 7 dias de cultura, houve redução na porcentagem de folículos primordiais do grupo SB-CTMGW, significativa ($p < 0,05$), apenas no dia 7, concomitante ao aumento na porcentagem de folículos em desenvolvimento, principalmente, quanto ao controle fresco e ao cultivado ($p < 0,05$). Estes resultados se assemelham aos obtidos por Saraiva et al., (2008). Ainda, com os estudos realizados por Almeida et al., (2015) e Jimenez et al., (2016), utilizando FSH, fatores de crescimento fibroblastóide, e hormônio do crescimento, que demonstraram efeitos semelhantes. Já para Neves (2017) os tratamentos realizados com células-tronco da medula óssea, não influenciaram a ativação de folículos caprinos.

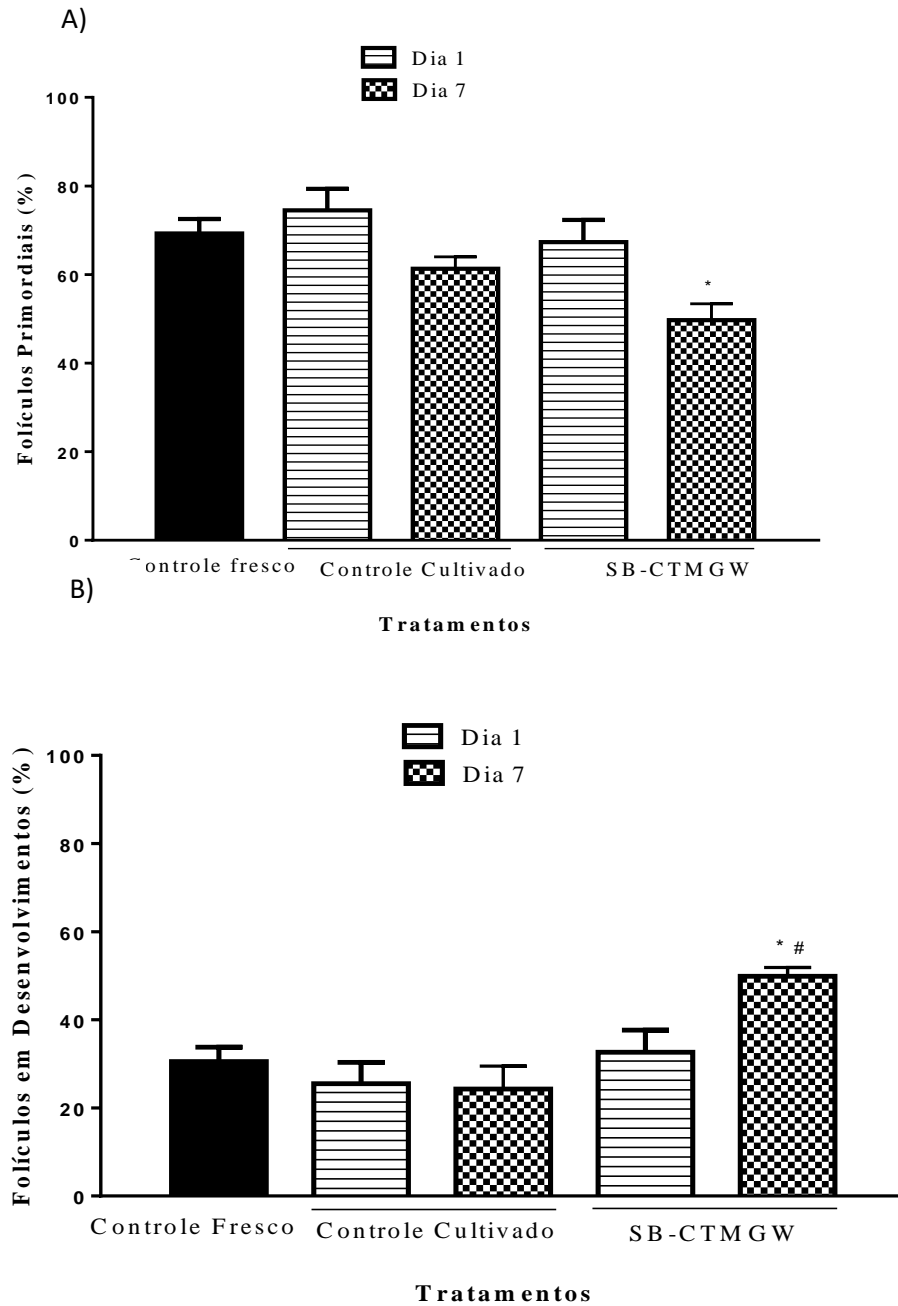


Gráfico 2 Porcentagem (média \pm erro padrão) de folículos ovarianos primordiais (A) e em desenvolvimento (B) no controle fresco e após cultivo *in vitro* por 1 e 7 dias sem ou com *scaffold* de buriti e células. Utilizou-se ANOVA one-way e Teste de Tukey, sendo * $p < 0,05$ versus controle e # $p < 0,05$ versus controle tratado dia 7.

Os diâmetros dos folículos no controle (tecido não cultivado), após 1 e 7 dias de cultura em diferentes tratamentos, estão expostos na tabela 1. Com relação ao diâmetro folicular, após 1 dia de cultura, foram observados diâmetros maiores no grupo controle cultivado, enquanto que no SB-CTMGW os folículos apresentam com dimensões semelhantes aos do controle fresco. Após 7 dias os maiores diâmetros foliculares ($p < 0,05$) foram observados no grupo SB-CTMGW quando comparados ao controle fresco e ao cultivado ($p < 0,05$). Esses achados corroboram com os dados encontrados por Martins et al., (2014) e contrapõem-se aos verificados por Neves (2017):

Tabela 1. Diâmetros foliculares em controle fresco (não cultivado) e após cultura por 1 e 7 dias sem ou com *scaffold* de buriti com células-tronco

	Diâmetro folicular (μm)	
	Dia 1	Dia 7
Controle Fresco	25.75 \pm 4.34	
Cultivados		
Controle	30 \pm 4.08	26 \pm 4.54
SB-CTMGW	26,25 \pm 4.78	36 \pm 2.78* ⁺

*Diferença significativa com o controle fresco. ⁺Diferença significativa com o controle cultivado no dia 7. Teste de Student Newman Keuls (SNK), resultados expressos como média \pm desvio padrão (SD). *⁺Diferenças significativas entre os grupos $p < 0,05$.

As CTMGW participam de forma ativa no crescimento e manutenção dos folículos viáveis, ademais, o SB-CTMGW promove um ambiente propício para que as células se multipliquem e produzam fatores de crescimentos, citocinas e substâncias citoprotetoras.

4. CONCLUSÃO

O co-cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano com células-tronco da geleia de Wharton sob o *scaffold* de buriti mantém a estrutura e promove a ativação e o

crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais caprinos, apesar de reduzir a viabilidade folicular após 7 dias de cultivo.

Referências

Almeida, A. P., Magalhães-Padilha, D. M., Araújo, V. R., Costa, S. L., Chaves, R. N., Lopes, C. A. P., ... Figueiredo, J. R. (2015). Effect of sequential medium with fibroblast growth factor-10 and follicle stimulating hormone on *in vitro* development of goat preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 152, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.010>

Barreto, L. C., Sacramento, L. O., Andrade, J. A., & Quintanilha, L. F. (2017). Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de cirrose hepática. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 16(2), 230. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v16i2.22543>

Chaves, R. N., Duarte, A. B. G., Matos, M. H. T., & Figueiredo, J. R. (2010). Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 34, 37–49.

da Silva, R. F., Brito, I. R., de Lima, L. F., de Aguiar, F. L. N., Rodrigues, G. Q., do Nascimento, I. L. C., ... de Figueiredo, J. R. (2017). Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) improves follicular survival, oocyte and follicular diameters, in a dose-dependent manner, after the *in vitro* culture of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue fragments. *Animal Reproduction*, 14(4). <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR935>

Duarte, A. B. G., Chaves, R. N., Araújo, V. R., Celestino, J. J., Silva, G. M., Lopes, C. A. P., ... de Figueiredo, J. R. (2011). Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Zygote (Cambridge, England)*, 19(3), 215–227. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000237>

Figueiredo, J., Celestino, J., Rodrigues, A., & Silva, J. (2007). Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(2), 143–152. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Import?ncia+da+biot?cnica+de+MOIFOPA+para+o+estudo+da+foliculog?nese+e+produ??o+in+vitro+de+embri?es+em+larga+escala#0>

Jimenez, C. R., de Azevedo, J. L., Silveira, R. G., Penitente-Filho, J., Carrascal-Triana, E. L., Zolini, A. M., ... Torres, C. (2016). Effects of Growth Hormone on In Situ Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose Dependent. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 51(4), 575–584. <https://doi.org/10.1111/rda.12722>

Katsuda, T., Kosaka, N., Takeshita, F., & Ochiya, T. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics*, 13(10–11), 1637–1653. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200373>

Lima-Verde, I. (2011). Implicações do estresse oxidativo no ovário e embrião mamífero. *Medicina Veterinária*, 1(1), 81–88. Retrieved from <http://www.revista.dmv.ufrpe.br/index.php/rdmv/article/view/15>

Magalhães, D. M., Sales, E. T., Padilha, R. T., Silva, T. F. P., Tonioli, R., & Figueiredo, J. R. (2012). Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 36(1), 32–38. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000400013>

Manoukian, O. S., Sardashti, N., Stedman, T., Gailiunas, K., Ojha, A., Penalosa, A., ... Kumbar, S. G. (2018). Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Encyclopedia of Biomedical Engineering, 462–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64098-9>

Martins, F. S., Saraiva, M. V. A., Magalhães-Padilha, D. M., Almeida, A. P., Celestino, J. J. H., Padilha, R. T., ... Figueiredo, J. R. (2014). Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of invitro preantral follicle survival and development with GH. *Theriogenology*, 82(1), 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.019>

Matos, M. H. T., Bruno, J. B., Rocha, R. M. P., Lima-Verde, I. B., Santos, K. D. B., Saraiva, M. V. A., ... Figueiredo, J. R. (2011). In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Research in Veterinary Science*, 90(3), 404–411.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.007>

Matos, M. H. T., Luque, M. C. A., Jr, J. E. M., Silva, J. R. V, Celestino, J. J. H., & Martins, F. S. (2007). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, 15, 173–182.
<https://doi.org/10.1017/S0967199407004169>

Monteiro, B. S., Argolo Neto, N. M., & Del Carlo, R. J. (2010). Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, 40(1), 238–245. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000100040>

Neves, C. A. (2017). *Avaliação do desenvolvimento de Folículos Pré-antrais caprinos in situ co-cultivados com células-tronco mesenquimais da medula óssea*. Universidade Federal Piauí.

Phelps, J., Sanati-nezhad, A., Ungrin, M., Duncan, N. A., & Sen, A. (2018). Review Article

Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives : Toward Cell-Free Therapeutics. *Stem Cells International*, 2018(iii).

<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2018/9415367>

Rabelo, E., Marcondes, M., Paula, A., Rodrigues, F., Bracarense, L., Figueiredo, R., & Toniolli, R. (2005). Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles, *64*, 1104–1113. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.001>

Raeisdasteh Hokmabad, V., Davaran, S., Ramazani, A., & Salehi, R. (2017). Design and fabrication of porous biodegradable scaffolds: a strategy for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *28*(16), 1797–1825.

<https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1354674>

Rossetto, R., Lima, I. M. T., Saraiva, M. V. A., Lima-Verde, I. B., Sales, E. T., & De Figueiredo, J. R. (2011). Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. *Acta Veterinaria Brasilica*, *5*(1), 15–23.

Saraiva, M. V. A., Celestino, J. J. H., Chaves, R. N., Martins, F. S., Bruno, J. B., Verde, I. B. L., ... Figueiredo, J. R. (2008). Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development, *78*, 87–95.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.05.008>

Silva, G. C. (2016). *Células-tronco da geléia de wharton do cordão umbilical de caprinos (capra hircus): protocolos de isolamento e caracterização*. (Dissertação de Mestrado)

Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí. Retrieved from

https://www.sigaa.ufpi.br/sigaa/SBlic/programa/noticias_desc.jsf?lc=pt_BR&id=368¬icia=132308683

Silva, M. A., Carvalho, Y. K., Carvalho, C. E. S., Feitosa, M. L., Carvalho, F. A. A., Viana, B. C., ... Carvalho, M. A. M. (2018). Behavior and Biocompatibility of rabbits bone marrow Mesenchymal Stem Cells with bacterial cellulosic membrane. *PeerJ*, (April).

Zhao, J., Van Tol, H. T. A., Taverne, M. A. M., Van Der Weijden, G. C., Bevers, M. M., & Van Den Hurk, R. (2000). The effect of growth hormone on rat pre-antral follicles in vitro. *Zygote*, 8(3), 275–283. <https://doi.org/10.1017/S0967199400001076>

CONCLUSÕES GERAIS

A matriz tridimensional, *scaffold*, formado pela poliuretana do óleo de buriti com polietilenoglicol apresenta arranjo estrutural amorfo, com micro e macroporos, possível de autoclavagem, com resistência térmica e flexibilidade, não demonstrando efeitos tóxicos às células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton e eritrócitos. Do mesmo modo, não apresenta alterações sobre células do sistema imune, evidenciando-se, assim, suas propriedades biocompatíveis e elevada capacidade de adesão celular.

O *scaffold* de buriti indica grande potencial para aplicação na área clínica, visto que, atesta ser um material seguro para o cultivo direto e também para fabricação de compostos utilizados para aplicações *in vivo* e *in vitro*.

A aplicação deste polímero em um sistema de co-cultivo com CTMGW e FOPA demonstra sucesso, pois promove a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais caprinos, apesar de reduzir a viabilidade folicular, o sistema de cultivo promove o recrutamento de folículos primordiais, para o *pool* de folículos em crescimento.

Este estudo é pioneiro na aplicação *in vitro* da poliuretana, com resultados promissores para o fomento de outras investigações, com vistas ao desenvolvimento de outras aplicações para este biomaterial.

REFERÊNCIAS

- ACERO, L. Ciência, políticas públicas e inclusão social: debates sobre células-tronco no Brasil e no Reino Unido. **Dados**, v. 53, n. 4, p. 855–887, 2010.
- ALBUQUERQUE, M. L. S. et al. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6 A, p. 1113–1117, 2005.
- ALMEIDA, E. L. DE et al. Preparação e caracterização de poliuretanos contendo diferentes quantidades de óleo de baru. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 176–184, 2016.
- ANDERSON, J. M. Biocompatibility and Bioresponse to Biomaterials. **Principles of Regenerative Medicine**, p. 675–694, 1 jan. 2018.
- AQUINO, J. DE S. et al. Refining of Buriti Oil (*Mauritia flexuosa*) Originated from the Brazilian Cerrado: Physicochemical, Thermal-Oxidative and Nutritional Implications. **Journal Brazilian Chemicals Society**, v. 25, n. 4, p. 20140054, 2014.
- ARGÔLO NETO, N. M. et al. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 1–11, 2016.
- AZAMBUJA, M. S. DE et al. **Estudo in vitro da toxicidade do paracetamol (par), do polietilenoglicol 400 (peg) e a ação da frutose-1, 6-bisfosfato (fbp) em cultura de células mononucleares de sangue periférico humano**. Salão de iniciação Científica. **Anais...Porto Alegre: Livro de resumos**. Porto Alegre: UFRGS, 2006, 2006
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARRETO, L. C. et al. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no tratamento de cirrose hepática. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 230, 2017.
- BHASKAR, B. et al. Composite porous scaffold of PEG/PLA support improved bone matrix deposition in vitro compared to PLA-only scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 106, n. 5, p. 1334–1340, 2018.
- BRANDL, A. et al. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 7, p. 1114–1120, 2011.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5–13, 2006.
- CANDIDO, T. L. N.; SILVA, M. R.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Bioactive compounds and antioxidant capacity of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.) from the Cerrado and Amazon biomes. **Food Chemistry**, v. 177, p. 313–319, 2015.

CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M. DOS; CLARO NETO, S. Poliuretano: de traveseiros a preservativos, um polímero versátil. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 3, p. 159–164, 2009.

CARVALHO, P. H. et al. Diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em cardiomiócitos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, p. 82–89, 2013.

CAVALCANTE, G. H. R. et al. Artigo Estudo Viscosimétrico de Polióis a Base do Óleo de Andiroba (Carapa guianensis Aubl .) Estudo Viscosimétrico de Polióis a Base do Óleo de Andiroba (Carapa guianensis Aubl .). **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 926–944, 2016.

CAVALIERI, F. L. B. et al. Estudo Sobre O Cultivo in Vitro De Embriões Bovinos Durante O Transporte. **Ars Veterinaria**, v. 31, n. 1, p. 07-11, 2015.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289–299, 2004.

CHEN, B. et al. Fabrication of Polylactic Acid/Polyethylene Glycol (PLA/PEG) Porous Scaffold by Supercritical CO₂ Foaming and Particle Leaching. **Polymer engineering and science**, v. 57, n. 3–4, p. 147–151, 2015.

COICO, R.; SUNSHINE, G. **Immunology : a short course**. 7^o ed. Nova York: John Wiley & Sons., 2015.

COLOM, B.; JONES, P. H. Clonal analysis of stem cells in differentiation and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 43, p. 14–21, 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. et al. 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**, v. 53, n. 4, p. 363–370, 30 abr. 2017a.

COSTA, B. C. A. DA et al. Espuma expansiva de PU: Principais características e aplicações na construção civil. **Ciências exatas e tecnológicas**, v. 4, n. 2, p. 55–64, 2017b.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1400–1415, 2011.

CRIVELLI, B. et al. Mesenchymal stem / stromal cell extracellular vesicles : From active principle to next generation drug delivery system. **Journal of Controlled Release**, v. 262, n. June, p. 104–117, 2017.

DE SOUZA, C. F. et al. Células-tronco mesenquimais: Células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 18, n. 3, p. 344–53, 2010.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A. Células-Tronco e Fatores de Crescimento na Reparação Tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, n. 1, p. 167–169, 2008.

DING, D.-C. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. **Cell transplantation**, v. 24, n. 3, p. 339–47, 2015.

DUARTE, A. B. G. et al. Follicular interactions affect the in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 19, n. 3, p. 215–227, 2011.

ELLEN, C. et al. Células-Tronco De Origem Dental : Características E Aplicações Na Medicina E Odontologia Stem Cells of Dental Origin : Features and Applications in. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 36, n. 1, p. 36–40, 2015.

FARIAS, S. S. et al. Biopolímeros: Uma Alternativa Para Promoção Do Desenvolvimento Sustentável. **Revista Geonorte**, v. 7, n. 26, p. 61–77, 2016.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 3–15, 2011.

FERRARO, L. G. **Avaliação das propriedades de inflamabilidade e mecânica de espumas rígidas de poliuretano obtidas a partir de óleo residual de fritura**. [s.l.] Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2017.

FERREIRA, E. D. C. et al. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary parasitology**, v. 146, n. 3–4, p. 235–41, 31 maio 2007.

FERREIRA, E. L. **Manual das palmeiras do Acre, Brasil**. Rio Branco: Instituto Nacional de Pesquisas do Acre/ Universidade Federal do Acre, 2005.

FIGUEIREDO, J. R. DE et al. In vitro culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1–3, p. 192–195, 2011.

FIGUEIREDO, J. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FILIPIAK, Y.; VIQUEIRA, M.; BIELLI, A. preSBeral en bovinos Development and follicular dynamics from fetal life until SBerty in cattle Resumen Introducción. **Veterinária (Montevideo)**, v. 52, n. 202, p. 14–22, 2016.

FRAGA, J.; BORGES, P.; CALVET, C. D. O. A aplicação de células-tronco na odontologia The stem cells application in dentistry periodontais pode resultar em diversas regeneração de tecidos e órgãos , facilmente e já foi demonstrado que de embrião , quando possui de oito a. **Revista Investigação biomédica**, v. 6, p. 103–113, 2014.

FREITAS, M. L. F. et al. Quality characteristics and thermal behavior of Buriti (Mauritia

flexuosa L.) oil ; Parámetros de calidad y comportamiento térmico del aceite de Buriti (*Mauritia flexuosa* L.). **Grasas Y Aceites**, v. 68, n. 4, p. 9, 2017.

GAUTHAMAN, K. et al. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hCTMGW) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 6, p. 2027–2039, 2012.

GOMES, G. et al. Methods of the Antioxidant Defense : A Literature Review. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 15, n. 3, p. 231–238, 2013.

GOMES, R. DA V.; MELO, B. N. DE; VELLOSO, M. H. R. Síntese e caracterização de bioplásticos a partir de glicerol e óleo de mamona Synthesis and characterization of bioplastics from glycerol and castor oil. **Latin American Journal of Energy Research**, v. 4, n. 1, p. 41–51, 2017.

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature**, v. 4, n. July, p. 1–8, 2005.

ISO 10993-5. **A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity Medical Device & Diagnostic Industry Magazine**, 1998.

ISO 9001:2000. Quality management systems-Requirements. **(ISO 9001: 2000)**, 2000.

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

JOHNSON, J. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 303–315, 2005.

KLOSS, J.; MORITA, R. **Espumas de poliuretano biodegradáveis: Uma revisão**. 8º Fórum Internacional de resíduos sólidos. **Anais...Curitiba, Paraná: Anais do 8º Fórum Internacional de resíduos sólidos**, 2017

KOOLEN, H. H. F. et al. Buriti fruit—*Mauritia flexuosa*. **Exotic Fruits**, p. 61–67, 1 jan. 2018.

KULDEEP, K. et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells isolated from caprine umbilical cord matrix. **Tissue and Cell**, p. 367–372, 2016.

KUMARAVEL, R. S.; BEGUM, S. F. M. Evaluation of cytotoxicity effect in drug coated intravascular catheter. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 11, p. 2023–2030, 2015.

LEITE, Y. K. DE C. **Desenvolvimento de um produto biotecnológico à base de goma do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) e Quitosana como suporte para cultivo de Células-Tronco Mesenquimais**. [s.l.] Tese(doutorado)- Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em biotecnologia-RENORBIO, Teresina, 2017., 2017.

- LI, X. et al. Nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 101 A, n. 8, p. 2424–2435, 2013.
- 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.
- LIU, X. et al. In vitro investigation of ultra-pure Zn and its mini-tube as potential bioabsorbable stent material. **Materials Letters**, v. 161, p. 53–56, 2015.
- LUCCI, C. M. et al. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 39–49, 1999.
- MACHADO, A. K. et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves the proliferation and oxidative metabolism of senescent adipocyte stem cells derived from human lipoaspirates. **Food Research International**, v. 67, p. 426–433, 2015.
- MAGALHÃES, D. M. et al. Effect of the Medium Replacement Interval on the Viability, Growth and In Vitro Maturation of Isolated Caprine and Ovine Pre-Antral Follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 134–140, 2011.
- MAGALHÃES, D. M. et al. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 36, n. 1, p. 32–38, 2012.
- MANOUKIAN, O. S. et al. Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Encyclopedia of Biomedical Engineering**, p. 462–482, 1 jan. 2018.
- MARCILIO, A. F. et al. Avaliação da adição de resina MDI em termoformagem de poliuretano linear. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 17, n. 2, p. 84–91, 2016.
- MARTINS, F. S. et al. Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of invitro preantral follicle survival and development with GH. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 27–35, 2014.
- MATOS, M. H. T. et al. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Research in Veterinary Science**, v. 90, n. 3, p. 404–411, 2011.
- MEDEIROS, E. L. G. et al. Scaffolds de Vidros Bioativos : Desenvolvimento de Estruturas Bioativas Nanoestruturadas. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, n. 3, p. 152–167, 2017.
- MENDES, M. P. G.; SOUZA, C. A. DE J. Aplicação de modelos animais na pesquisa biomédica experimental. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 2, p. 41–58, 2017.
- MILLER, F. et al. Validation of eGFP fluorescence intensity for testing in vitro cytotoxicity according to ISO 10993-5. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 105, n. 4, p. 715–722, 2017.

- MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, 2010.
- MONTI, M. et al. Stem cells: Sources and therapies. **Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 207–214, 2012.
- MOREIRA, D. C. Uso de óleos vegetais puros como combustíveis para motores diesel. **Revista interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 2, n. 2, p. 240–251, 2016.
- MORRAL-RUÍZ, G. et al. Multifunctional polyurethane-urea nanoparticles to target and arrest inflamed vascular environment: A potential tool for cancer therapy and diagnosis. **Journal of Controlled Release**, v. 171, n. 2, p. 163–171, 2013.
- MORSCZECK, C. et al. Somatic stem cells for regenerative dentistry. **Clinical Oral Investigations**, v. 12, n. 2, p. 113–118, 2008.
- MOSLEM, M. et al. Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Support CD34 pos Hematopoietic Stem Cell Propagation and Suppress Inflammatory Reaction. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.
- MULLER, V. S. **Células-Tronco Na Regeneração Muscular E Nervosa Células-Tronco Na Regeneração**. [s.l.] (Monografia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.
- MUMMERY, C. L. et al. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: A methods overview. **Circulation Research**, v. 111, n. 3, p. 344–358, 2012.
- MUSIALEK, P. et al. Myocardial regeneration strategy using Wharton’s jelly mesenchymal stem cells as an off-the-shelf “unlimited” therapeutic agent: Results from the acute myocardial infarction first-in-man study. **Postępy w Kardiologii Interwencyjnej**, v. 11, n. 2, p. 100–107, 2015.
- NASCIMENTO, B. Z. et al. Estudo Da Obtenção De Poliál Vegetal a Partir Da Espécie Crambe Abyssinica S Tudy of Obtaining Vegetable Polyol From the Species. **BJPE**, v. 3, n. 1, p. 27–34, 2016.
- NASCIMENTO, L. G. **Estudo da Liberação controlada do polímero PEG 4000 modificado e incorporado ao Ácido Acetilsalicílico**. [s.l.] Monografia. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto., 2018.
- NAZAROV, I. et al. Multipotent Stromal Stem Cells from Human Placenta Demonstrate High Therapeutic Potential. **Stem cells translational medicine**, v. 1, p. 359–372, 2012.
- NOCITI, P.; TAIRA, A. R. Aspiraço Folicular Em Ruminantes –. **Revista Investigaço**, v. 14, n. 6, p. 46–53, 2015.
- NOGUEIRA, R. C. **Isolamento, caracterizaço e análise da estabilidade citogenética após**

expansão Teresina, 2009.

PACHECO, L. R. E. **Obtenção e caracterização de uma matriz polimérica a base de alginato com diferentes agentes reticulantes**. [s.l.] Dissertação (Mestrado). Pós graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2016.

PASCUA-MAESTRO, R. et al. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 3, p. 179–186, 2018.

PENTEADO, F. C. L. et al. Diferenciação hepatocítica de células-tronco mesenquimais da medula óssea humana. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 325–334, 2007.

PHELPS, J. et al. Review Article Bioprocessing of Mesenchymal Stem Cells and Their Derivatives : Toward Cell-Free Therapeutics. **Stem Cells International**, v. 2018, n. iii, 2018.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957–971, 2015.

RAYMUNDO, A. J. DE V. et al. Obtenção de scaffolds por electrospinning para uso em engenharia de Tecidos. **Disciplinarum Scientia**, v. 18, n. 2, p. 329–339, 2017.

RIBEIRO, J. et al. Buriti (*Mauritia flexuosa*) oil: Evaluation of the mutagenic and antimutagenic potential by the micronucleus test in vivo. **Toxicology Letters**, v. 196, p. S163–S164, 17 jul. 2010.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

ROMERO, A. B. DA R. et al. La actividad antioxidante in vitro e in vivo de la fruta buriti (*Mauritia Flexuosa* L.F). **Nutricion Hospitalaria**, v. 32, n. 5, p. 2153–2161, 2015.

ROSSETTO, R. et al. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2011.

SALIBA, J. B. et al. Anti-Inflammatory Effect of Dexamethasone Controlled Released From Anterior Suprachoroidal Polyurethane Implants on Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. p. 1–4, 2018.

SAMUELSON, D. A. **Tratado de Histologia Veterinária - Paul Samuelson - Google Livros**. 1º ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda, 2007.

SCAFFARO, R. et al. Combining in the melt physical and biological properties of poly(caprolactone) and chlorhexidine to obtain antimicrobial surgical monofilaments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 1, p. 99–109, 2013.

SCAFFARO, R. et al. Preparation of three-layered porous PLA/PEG scaffold: Relationship between morphology, mechanical behavior and cell permeability. **Journal of the Mechanical**

Behavior of Biomedical Materials, v. 54, p. 8–20, 2016.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. **Animal Reproduction Science**, v. 10, n. 3, p. 180–186, 2013.

SILVA, G. C. **Células-tronco da geléia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (capra hircus): Protocolos de isolamento e caracterização**. [s.l.] (Dissertação de mestrado) Programa de pós graduação em Ciência Animal Universidade Federal do Piauí, 2016.

SILVA, S. M. et al. Characterization of oil extracted from Buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon Region. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 7, p. 611–616, 2009.

SILVA, V. V. Aplicação de biomateriais em ortopedia e engenharia de tecido ósseo. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 5, n. 2, p. 14–27, 2017.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123–135, 2016.

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

SIPOLI, A. L. et al. A (in)constitucionalidade do uso de células-tronco originárias para fins de pesquisa e terapia. **Revista Juridica**, v. 6, n. 2012, p. 1–12, 2005.

SNYKERS, S. et al. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 3, p. 577–605, 2009.

SOTHORNVIT, R.; KROCHTA, J. M. Plasticizers in edible films and coatings. **Innovations in Food Packaging**, p. 403–433, 2005.

SOUZA, V. F. DE et al. Células-tronco : uma breve revisão. **R. Ci. méd. biol.**, v. 2, n. 2, p. 251–256, 2003.

SOUZA, T. et al. Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia Bone Graft Materials and their Application in Dentistry. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 12, n. 2, p. 131–135, 2011.

SPONTÓN, M. et al. Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 85, p. 85–94, 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.

TAGHIZADEH, R. R.; CETRULO, K. J.; CETRULO, C. L. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. **Placenta**, v. 32, n. SUPPL. 4, p. S311–S315, 2011.

TANG, W. et al. Bioinspired trimodal macro/micro/nano-porous scaffolds loading rhBMP-2 for complete regeneration of critical size bone defect. **Acta Biomaterialia**, v. 32, p. 309–323, 2016.

URIBE-VELÁSQUEZ, L. F. et al. Follicular development in Alpine goats during the mating season □ Desenvolvimento folicular em cabras Alpinas durante a estação reprodutiva. **Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 10, n. 1, p. 38–44, 2015.

VAJRABHAYA, L.; KORSUWANNAWONG, S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. 2018.

VISINTIN, J. A. et al. Diferenciação de gametas in vitro a partir de células-tronco. **Revista brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 140–144, 2013.

WESTPHAL, R. J. et al. Autologous transplantation of bone marrow adult stem cells for the treatment of idiopathic dilated cardiomyopathy. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 6, p. 521–529, 2014.

XIE, J. et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells alleviated inflammation and inhibited apoptosis in interstitial cystitis via AKT/mTOR signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 495, n. 1, p. 546–552, 1 jan. 2018.

YAN, L. P. et al. In vitro evaluation of the biological performance of macro/micro-porous silk fibroin and silk-nano calcium phosphate scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 103, n. 4, p. 888–898, 2015.