

FLÁVIA FREDDI RODRIGUEZ

**Estabelecimento de um processo de bioimpressão de um gel a partir da associação
de alginato e células estromais mesenquimais de tecido adiposo**

ASSIS

2022

FLÁVIA FREDDI RODRIGUEZ

**Estabelecimento de um processo de bioimpressão de um gel a partir da associação
de alginato e células estromais mesenquimais de tecido adiposo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências e Letras de Assis, para
a obtenção do diploma no curso de Engenharia
Biotecnológica

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

ASSIS

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, aos meus pais e minha família por me incentivarem sempre e fazer com que a realização da graduação fosse possível.

Ao meu orientador, Dr. João Tadeu minha gratidão especial pela oportunidade de participar do laboratório e me apresentar o meio acadêmico.

Aos meus colegas de laboratório GenTeCel, especialmente a Maria Malagutti por me ajudar em todas as horas e pela amizade.

A todos meus professores pelo conhecimento e a Unesp, por incentivar a ciência e levar os cursos a diversos lugares aumentando as oportunidades para todos os alunos.

*“There are more things in heaven and earth, Horatio,
than are dreamt of in your philosophy”.*

(Shakespeare)

RODRÍGUEZ, Flávia Freddi. **Estabelecimento de um processo de bioimpressão de um gel a partir da associação de alginato e células estromais mesenquimais de tecido adiposo.** 2022. 33 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Biotecnológica, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2022.

RESUMO

No contexto da medicina regenerativa (RM) a associação de diferentes tipos celulares e biomateriais, como o alginato, tem sido empregada como alternativa terapêutica em várias condições patológicas. Há, no entanto, um número restrito de publicações sobre a associação de alginato com células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) e bioimpressão 3D. Considerando, portanto, as propriedades do alginato e o papel regenerativo e anti-inflamatório das ADSC, formulou-se a hipótese que essa associação poderá resultar num efeito aditivo ou sinérgico na regeneração tecidual, particularmente, em úlceras cutâneas e que o estabelecimento de um processo de bioimpressão 3D poderá otimizar a obtenção de um biogel/biocurativo resultante dessa associação. Assim, realizou-se a adequação de uma metodologia para obtenção das ADSC por meio de um processo semiautomatizado e, em seguida, a impressão e análise do biogel. A análise comparativa entre os métodos convencional e semiautomatizado evidencia um rendimento celular equivalente, mantendo os atributos celulares das ADSC, como diferenciação multipotencial e antígenos de superfície. Dessa forma, permite concluir que as metodologias propostas neste estudo representam um processo biotecnológico reprodutivo e com potencial de aplicação em medicina regenerativa. Entretanto, faz-se necessário avaliar a viabilidade translacional do processo como uma nova abordagem terapêutica em úlceras cutâneas.

Palavras Chave: Bioimpressão 3D, Células – tronco, Fração Estromal Vascular, Método Semiautomatizado.

RODRÍGUEZ, Flávia Freddi. **Estabelecimento de um processo de bioimpressão de um gel a partir da associação de alginato e células estromais mesenquimais de tecido adiposo.** 2022. 33 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Biotecnológica, Universidade Estadual Paulista, Assis, 2022.

ABSTRACT

In the field of regenerative medicine (RM) the association of different types of cells and biomaterials, such as alginate, has been applied as a therapeutical alternative in various pathological conditions. However. There are a restricted number of publications regarding the association of alginate and adipose derived stem cells (ADSC) and bioprinting. Thus, considering the properties of alginate and the regenerative and anti-inflammatory paper of the ADSC, we hypothesized that this association could result in an additive effect or synergic in tissue regeneration, particularly in difficult wound healing scars and that using a bioprinting process would optimize the process. Therefore, a methodology for the isolation of ADSC in a semiautomatic process has been proposed, followed by the bioprinting and analysis of the scaffold. The comparative analysis between the conventional and semiautomatic demonstrated an equivalent cell viability, maintaining ADSC features, such as multipotential differentiation and antigens. In conclusion, the methodologies proposed in this study represent a biotechnological and reproducible process with the potential for application in the RM field. Although, in the future, it is still necessary to study the translational process from bench to bedside for difficult wound healing scars.

Key Words: 3D Bioprinting, Stem Cells, Stromal Vascular Fraction, Semiautomatic Method.

Lista de figuras

FIGURA 1. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA CONVENCIONAL E SEMIAUTOMATIZADA.	17
FIGURA 2. COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR NA EXTRAÇÃO DE ADSC ENTRE OS MÉTODOS CONVENCIONAL E SEMIAUTOMATIZADO PARA A PACIENTE 3.	18
FIGURA 3. COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO CELULAR NA EXTRAÇÃO DE ADSC ENTRE OS MÉTODOS CONVENCIONAL E SEMIAUTOMATIZADO PARA A PACIENTE 4.	18
FIGURA 4. ANÁLISE DAS ADSC DA PACIENTE 4 POR CITOMETRIA DE FLUXO A PARTIR DO ISOLAMENTO DAS CÉLULAS PELO MÉTODO CONVENCIONAL.	19
FIGURA 5. ANÁLISE DAS ADSC DA PACIENTE 4 POR CITOMETRIA DE FLUXO A PARTIR DO ISOLAMENTO DAS CÉLULAS PELO MÉTODO SEMIAUTOMATIZADO	19
FIGURA 6. CULTIVO CELULAR DAS ADSC COM 14 DIAS PELO MÉTODO CONV.	20
FIGURA 7. CULTIVO CELULAR DAS ADSC COM 14 DIAS PELO MÉTODO SEMI.	20
FIGURA 8. DIFERENCIAÇÃO DAS ADSC PELO MÉTODO SEMI.	20
FIGURA 9. PADRONIZAÇÃO DA IMPRESSÃO 3D DE GEL (ALG/GEL).	21

Lista de tabelas

TABELA I. PACIENTES SUBMETIDOS À ABDOMINOPLASTIA QUANTO AO GÊNERO E IDADE.	22
---	----

Lista de abreviações

ADSC – Células-tronco estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo

Alg – Alginato

CONV – Metodologia convencional

EC – Células endoteliais

EPC – Células precursoras endoteliais

Gel – Gelatina

ISCT – Sociedade Internacional de Terapia Celular

MEC – Matriz extracelular

MSC – Células-tronco mesenquimais

PBS – Tampão fosfato

RM – Medicina regenerativa

SEMI – Metodologia semiautomatizada

SVF – Fração estromal vascular

TE – Engenharia de tecidos

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas da revista Anais da Academia Brasileira de Ciências (AABC).

Sumário

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	3
OBTENÇÃO DA FRAÇÃO ESTROMAL VASCULAR (SVF).....	3
ISOLAMENTO E CULTIVO DAS ADSC PELO MÉTODO CONVENCIONAL	4
ISOLAMENTO E CULTIVO DAS ADSC PELO MÉTODO SEMIAUTOMATIZADO	4
VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS ADSC.....	5
CITOMETRIA DE FLUXO	6
PREPARAÇÃO DO GEL DE ALGINATO E GELATINA COM ADSC PARA BIOIMPRESSÃO.....	6
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	7
CONCLUSÃO.....	10
REFERÊNCIAS	11

Estabelecimento de um processo de bioimpressão de um gel a partir da associação de alginato e células estromais mesenquimais de tecido adiposo

Flávia Freddi Rodríguez ¹, Maria José Malagutti-Ferreira ², Marta Aparecida Souza Santos ³, João Tadeu Ribeiro-Paes ^{4*}.

¹Graduação em Engenharia Biotecnológica, Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia, Avenida Dom Antônio, 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

²Programa de Mestrado em Biociências, Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia, Avenida Dom Antônio, 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

³Programa de Mestrado em Biociências, Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia, Avenida Dom Antônio, 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

^{4*}João Tadeu Ribeiro-Paes. jtrpaes@yahoo.com.br. Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTeCel), Universidade Estadual Paulista, Departamento de Biotecnologia. Avenida Dom Antônio, 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

Palavras Chave: Bioimpressão 3D, Células – tronco, Fração Estromal Vascular, Método Semiautomatizado.

Bioimpressão do hidrogel de alginato com ADSCs

Index Medicus Medline

Autor para correspondência: João Tadeu Ribeiro-Paes, Avenida Dom Antônio, 2100, 19806-900, 011986453163.

Introdução

Segundo Dieckmann *et al.* (2010), a medicina regenerativa (RM) tem por objetivo a reparação ou substituição de células, tecidos ou órgãos a fim de restaurar funções comprometidas devido a defeitos congênitos, doenças, traumas e envelhecimento. A interação do conjunto de conhecimentos e técnicas específicas da RM e engenharia de tecidos (TE), referida atualmente pelo acrônimo TERM (Fischer & Mauk 2013), tem permitido otimizar o desenvolvimento de materiais sintéticos ou biológicos, denominados de biomateriais. Os biomateriais são substâncias ou suas combinações, de origem natural ou sintética, capaz de substituir, tratar ou aumentar tecidos, órgãos ou funções do corpo e que são implantados no corpo permanentemente ou por um determinado período de tempo (Helmus & Tweden 1995, Montoya *et al.* 2021). Frequentemente são usados para sustentar células, originando os arcabouços ou em inglês *scaffolds*, no qual as células depositadas encontram um local para adesão e não se dispersam pelo tecido alvo (Levin *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2021). Um biomaterial de destaque é o alginato, polímero natural, que devido as suas propriedades, como biocompatibilidade e não toxicidade, se torna uma escolha atraente para aplicações em feridas cutâneas de difícil cicatrização (Aderibigbe & Buyana, 2017, Fatimi *et al.* 2022).

Além disso, como um campo eminentemente interdisciplinar a RM mobiliza e vale-se, portanto, de conhecimentos de diferentes áreas e tecnologias, onde junto aos biomateriais, as terapias baseadas em células (cell-based therapies) ocupam um papel de destaque com enfoque em células, especialmente as células-tronco estromais mesenquimais (MSC) (Arrighi 2018, Mannino *et al.* 2022). As MSC são células que apresentam morfologia alongada, fibroblastóide e potencial de diferenciação (NIH 2001, Salemi *et al.* 2022). As MSC foram inicialmente descritas por Friedenstein *et al.* (1974), a partir de culturas de medula óssea. Desde então, tem sido obtidas de vários tecidos e

órgãos, como medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, placenta, músculo, tecido adiposo (Simão *et al.* 2019, Maacha *et al.* 2020, Chen *et al.* 2020). Posteriormente, com os trabalhos de Zuk e colaboradores (Zuk *et al.* 2001), estabeleceu-se uma metodologia eficiente e reprodutível para o isolamento das células – tronco estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) oriundas da fração estromal vascular (SVF) de tecido adiposo. O tecido adiposo destaca-se como uma importante fonte de obtenção de MSC devido a sua obtenção por procedimentos poucos invasivos e grande disponibilidade de material.

Dentre as abordagens metodológicas da RM, a associação de células e biomateriais têm sido usada em aplicações terapêuticas e mais recentemente, em manufatura aditiva, na área de bioimpressão 3D, que pode ser definida como uma tecnologia que emprega componentes vivos para construção de materiais camada a camada (Panja *et al.* 2022). Os trabalhos até hoje desenvolvidos com alginato e MSC são associações de culturas convencionais em placas de Petri ou materiais correlatos. Há, no entanto, poucos relatos na literatura de tal combinação obtida por bioimpressão 3D. Em vista disso, a biocompatibilidade, alta viscosidade e semelhança com a matriz extracelular (MEC) do alginato (Alg), ao ser associado à gelatina (Gel), que possui composição quase idêntica ao colágeno da MEC, fornece um gel de Alg/Gel como forte candidato para aplicações em bioimpressão (Hurtado *et al.* 2022). Neste contexto de bioimpressão, utiliza-se a biotinta que pode ser estabelecida como uma formulação de tinta que permite a impressão de células (Wang *et al.* 2021). A biotinta é composta de células, biomateriais e substâncias biológicas adicionais a fim de proporcionar e sustentar a formação de tecidos por meio da constituição de um ambiente adequado à migração celular, proliferação, diferenciação e garantir a secreção da MEC (Kacarevic *et al.* 2018, Freeman *et al.* 2022).

Dessa maneira, busca-se com este projeto estabelecer um bioprocesso com impressão 3D de gel de alginato e gelatina associado a ADSC, considerando a possibilidade de emprego deste como uma nova alternativa para o tratamento de úlceras cutâneas de difícil cicatrização. Assim, faz-se importante não só analisar a viabilidade das ADSC, mas também dar início à caracterização de alguns parâmetros físico-químicos da associação. Estes, bem como outras análises complementares, quanto à caracterização das células, diferentes citocinas e fatores de crescimento inseridos no gel, deverão ser objeto de análises futuras na continuidade e ampliação deste projeto.

Materiais e Métodos

Para realizar a análise comparativa quanto à eficiência de obtenção, capacidade proliferativa e manutenção dos atributos celulares de ADSC, utilizou-se a metodologia convencional (CONV) e semiautomatizada (SEMI) com o aparato KisoProcessor (Keai Bioresearch Inc., Vancouver, Canadá).

Obtenção da fração estromal vascular (SVF)

A SVF foi isolada do tecido adiposo humano oriundo de procedimentos cirúrgicos estéticos de lipoaspiração, fornecidos pela clínica Maison das Flores da cidade de Assis. O material biológico foi utilizado mediante autorização e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proveniente de pacientes de ambos os sexos com idade máxima até 50 anos.

Isolamento e cultivo das ADSC pelo Método Convencional

Logo após à coleta, as amostras de tecido adiposo foram submetidas a digestão enzimática. Para isso, foram fracionados cerca de 20 g de tecido adiposo, acondicionados em tubo Falcon 50 ml (BD, Nova Jersey, EUA), contendo Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2 (LCG®, São Paulo, Brasil), suplementado com 2% penicilina, estreptomicina e fungizona (Gibco®, Nova York, EUA), permanecendo em repouso por 2 horas para desinfecção. Posteriormente o tecido foi fragmentado e submetido a digestão enzimática com collagenase tipo I a 0,075% (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA).

O tubo foi mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos, em constante agitação. Após a digestão enzimática, a collagenase foi neutralizada com adição de meio de cultura Mem/Alpha, (LCG®, São Paulo, Brasil), suplementado. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 400g por 10 minutos.

Após esse período, foi retirado o sobrenadante preservando o pellet contido no tubo. O pellet foi ressuspenso em 2ml de meio de cultura Mem/Alpha suplementado. As células foram plaqueadas em frascos de cultura T25 (BD, Nova Jersey, EUA) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48 horas até a primeira troca do meio de cultura. As trocas posteriores foram realizadas a cada 72 horas.

Isolamento e cultivo das ADSC pelo Método Semiautomatizado

O isolamento da SVF foi realizado usando Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá) com base no protocolo proposto em estudos anteriores (Santos – Souza 2020, Mbiine *et al.* 2022). A amostra de lipoaspirado foi separada em dois tubos Falcon de 50 ml. Cerca de 60 ml do tecido foi aspirado por uma seringa modelo cateter

(BD, Nova Jersey, EUA) e reservada. Em seguida, conectou-se uma Solução de Ringer Lactato (Solução de cloreto de cálcio 2H₂O a 0,02%, cloreto de potássio a 0,03%, cloreto de sódio a 0,6%, JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, Brasil) de 500 ml na Bandeja Buffer, o compartimento superior da máquina que aloja a bolsa.

Posteriormente, a bolsa processadora Kiso (Keai Bioreserarch) foi conectada ao aparato. Duas seringas foram encaixadas em seus respectivos lugares, uma com 6 ml da enzima collagenase tipo I a 0,15% (Gibco, Nova Iorque, EUA) e uma outra para sucção da solução de Ringer Lactato durante o processamento. A amostra de 50 ml de tecido adiposo, previamente reservada, foi injetada na bolsa de processamento, lentamente. A extração da SVF teve a duração de aproximadamente 50 minutos. Após término do processo, o volume final de cerca de 60 ml de SVF, foi dividido em dois tubos Falcon de 50 ml.

A suspensão de células foi centrifugada por 10 min a 900g para separar os adipócitos (flutuantes) da SVF. Após, a SVF foi incubada em gelo (10 min) com 1 ml de tampão de lise, lavada com solução salina tamponada – PBS (LGC Biotecnológica, São Paulo, Brasil) e centrifugada. Logo em seguida, o pellet formado foi homogeneizado, em 1 ml de meio Alpha MEM (LGC Biotecnológica, São Paulo, Brasil).

Para o cultivo celular, as células foram semeadas em frascos de cultura T25 (BD, New Jersey, EUA) com 5 ml de meio Alpha MEM. Após 48 horas foi realizada a primeira troca de meio de cultura e, devido a característica de adesão ao fundo do frasco de cultivo celular, apenas as ADSC foram selecionadas para cultura e os demais tipos celulares provenientes da SVF foram descartados com a troca de meio.

Verificação do potencial de diferenciação das ADSC

Com o propósito de averiguar a potencial de diferenciação das ADSC, foi realizada a diferenciação adipogênica, verificada pela coloração Oil Red StemPro® (Gibco®, Nova York, USA). A diferenciação condrogênica verificada pela coloração Alcian Blue StemPro® (Gibco®, Nova York, USA), e osteogênica pela coloração Alizarin Red S StemPro® (Gibco®, Nova York, USA), sendo que foram utilizados os Kits StemPro® específicos (Gibco®, Nova York, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Citometria de fluxo

A imunofenotipagem foi conduzida através da citometria de fluxo utilizando o citômetro FACSCalibur (BD, New Jersey, USA) e foram analisados 10.000 eventos para cada amostra. As ADSC cultivadas foram marcadas com anticorpos de alta expressão CD90, CD73, CD105 e de baixa expressão CD34, CD45, HLA-DR (BD, New Jersey, USA).

Preparação do gel de alginato e gelatina com ADSC para bioimpressão

A definição do protocolo teve como referencial o trabalho de Celestino *et al.* (2017). Após experimentos prévios definiu-se o seguinte protocolo: o gel de alginato (Alg) e gelatina (Gel) foi preparado em uma proporção de 10% (Alg/Gel) em solução de tampão fosfato (PBS) estéril de pH 7.4, para uma concentração final de 8% ao associar com ADSC. As ADSC na concentração 1×10^6 foram adicionadas ao gel (Chae *et al.* 2017). Após a associação, o gel foi introduzido na seringa de forma cuidadosa para não formar bolsas de ar e conectado à impressora 3D para a produção do *scaffold* de Alg/Gel

com morfologia oval programada na impressora (4 cm x 2 cm) sobre uma placa de Petri por um bico de extrusão utilizando a impressora ZMorph 2.0 VX (ZMorph S.A, Vroclaw, Polônia).

Resultados e Discussão

As ADSC podem ser isoladas da SVF do tecido adiposo lipoaspirado. A SVF é composta por ADSC, células precursoras endoteliais (EPC), células endoteliais (EC), macrófagos, células musculares lisas, linfócitos, pericitos e pré-adipócitos, entre outros (Lee *et al.* 2021, Stachura *et al.* 2021, Bellei *et al.* 2022).

O isolamento de SVF a partir de lipoaspirado é realizado por digestão da porção gordurosa com collagenase, separando, após centrifugação ou decantação, o conteúdo em duas fases distintas: a fração de adipócitos maduros do sobrenadante e os outros tipos celulares situados na fase inferior (Zuk *et al.* 2001, Orgun & Mizuno 2017, Ong *et al.* 2021). Esta separação é mais eficiente por centrifugação, porém todas as células sofrerão sedimentação.

No início do trabalho buscou-se adaptar o uso do aparelho semiautomatizado Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver – Canadá) para realizar o isolamento das ADSC. Alguns parâmetros tiveram que ser adequados para que se obtivesse reprodutibilidade e eficiência dos resultados. Dentre esses parâmetros vale citar, sobretudo, a temperatura ideal para maior eficiência de ação da collagenase e maior rendimento celular a partir da SVF.

Para comprovar, a eficiência de extração pelo processador Kiso, realizou-se a extração celular do material de descarte lipoaspirado de quatro pacientes do sexo feminino com idade entre 30 e 60 anos (Tabela I).

As células em cultivo apresentaram aderência à superfície plástica das garrafas de cultura e morfologia fibroblastóide, conforme apresentado nas (Fig. 6) e (Fig. 7). Conforme apresentado na (Fig. 6), para metodologia convencional no 14º dia de cultivo, foram observadas células com morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos e uma confluência de 80% a 90%. Na (Fig. 7), que apresenta células cultivadas após o processamento pelo método semiautomatizado, pode-se verificar que as células no 14º dia de cultivo, em A, apresentam aspecto fibroblastóide e uma área de confluência de, aproximadamente 70 a 80 %.

O teste de diferenciação das ADSC apresentou os requisitos básicos descritos na metodologia, quanto ao potencial de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Conforme demonstrado na (Fig. 8), a diferenciação adipogênica foi confirmada por presença de vacúolos lipídicos indicados pela coloração Oil Red O (8A). A diferenciação condrogênica com coloração Alcian Blue (8B), onde o azul indica a síntese de proteoglicanos e a diferenciação osteogênica foi verificada mediante a coloração da matriz óssea com Alizarin Red S (8C).

A análise de citometria de fluxo confirmou a caracterização da população celular composta por células mesenquimais. Para metodologia convencional, foi confirmada nas amostras 8marA (001, 002, 003) a caracterização da população celular composta por células mesenquimais, apresentando marcadores de superfície positivos para CD 73 (96.58%), CD 90 (88.96%) /e CD 105 (37.42%) e negativos para CD 34 (0.27%), CD 45 (11.94%) e HLA classe II (0.31%), conforme a (Fig. 4).

Para a metodologia semiautomatizada, amostras 8marC (001, 002, 003), os marcadores de superfície (CD) apresentaram valores positivos acima de 90% para CD 73 (99.58%), CD 90 (99.98%) e CD 105 (92.96%) e negativos para CD 34 (0.06%), CD 45 (3.33%) e HLA classe II (0.27%), conforme apresentado na (Fig. 5). Estes dados são compatíveis com os critérios de validação para células estromais mesenquimais, conforme preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT (Dominici *et al.* 2006).

A análise comparativa entre os métodos CONV e SEMI, evidencia um rendimento celular equivalente, mantendo os atributos celulares das ADSC, como diferenciação multipotencial (Fig. 6) e antígenos de superfície (Fig. 4 e 5). O tempo médio para isolamento da SVF foi de 90 minutos para o método CONV e de 60 minutos para o método SEMI. Os resultados obtidos permitem concluir que o aparato Kiso Processor representa uma alternativa eficiente para isolamento da SVF, tendo como vantagens: menor manipulação, tempo de isolamento da SVF e menor risco de contaminação das culturas de ADSC.

Em relação ao processo de adequação da bioimpressão do gel resultante da associação de alginato e ADSC., foi realizada a padronização da impressão 3D de gel (Alg/Gel) obtido com diferentes concentrações. A associação foi testada na concentração de 8%, de acordo com a metodologia proposta e, nas concentrações de 4% até 10% para avaliar a capacidade do gel para bioimpressão (Freeman *et al.* 2017, Liu *et al.* 2019, Böttcher *et al.* 2022). À medida que a concentração era reduzida, observou-se que o gel resultante perdia fidelidade da forma ao passo que com o aumento da concentração a consistência era mantida. Entretanto em concentrações acima de 8% o processo de impressão era dificultado, pois a força necessária para a extrusão excedia a força que a

bioimpressora era capaz de exercer, como também foi relatado por Freeman *et al* (2017) e Zhang *et al* (2019; 2021).

Foram realizados também diferentes testes para padronização dos parâmetros da impressora variando os valores de preenchimento das camadas do gel de 100% e 50% e análise da quantidade de camadas, duas ou quatro camadas. Assim, observou-se que o preenchimento de 100% em duas camadas viabilizou a obtenção de um hidrogel, demonstrado na (Fig.9), reproduzível com as características desejadas para bioimpressão como printabilidade, fidelidade da forma, biocompatibilidade, viscosidade e biodegradabilidade (Valot *et al.* 2019).

Conclusão

Os resultados obtidos permitem concluir que a metodologia proposta neste estudo, tanto para isolamento de ADSC pelo método semiautomatizado, quanto para obtenção de um biogel por meio de impressão 3D, representa um processo biotecnológico reproduzível e com grande potencial de aplicabilidade em medicina regenerativa, particularmente como uma nova abordagem terapêutica em úlceras cutâneas de difícil cicatrização.

Deve-se, no entanto, enfatizar que serão necessários estudos adicionais e introdução de novas metodologias que permitam refinar e confirmar a reprodutibilidade dos resultados, bem como avaliar a viabilidade translacional do processo de emprego do biogel resultante da associação de alginato e ADSC como uma nova abordagem terapêutica em úlceras cutâneas.

Referências

ADERIBIGBE BA, BUYANA B. 2018. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics* 10: 1- 19.

ARRIGHI, N. 2018. Stem Cells at the Core of cell therapy. In: *Stem Cells: Therapeutic Innovations under Control*. ISTE Press Elsevier, 1: 73 - 100.

BELLEI, B.; MIGLIANO, E.; PICARDO, M. 2022. Therapeutic potential of adipose tissue-derivatives in modern dermatology. *Experimental Dermatology*, 00: 1 – 16.

BÖTTCHER, B.; PFLIEGER, A.; SCHUMACHER, J.; JUNGnickel, B.; FELLER, K. H. 2022. 3D Bioprinting of Prevascularized Full-Thickness Gelatin-Alginate Structures with Embedded Co-Cultures. *Bioengineering*, 9: 1 - 25.

CHEN Q, TIAN X, FAN J, TONG H, AO Q, WANG X. 2020. An interpenetrating alginate/gelatin network for three-dimensional (3D) cell cultures and organ bioprinting. *Molecules*, 25: 756.

DIECKMANN C, RENNER R, MILKOVA L, SIMON JC. 2010. Regenerative medicine in dermatology: biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental Dermatology* 19: 697 – 706.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; LAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J. HORWITZ, E. M. 2010. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8: 315 - 317.

FATIMI, A.; OKORO, O.V.; PODSTAWCZYK, D.; SIMINSKA-STANNY, J.; SHAVANDI, A. 2022. Natural Hydrogel-Based Bio-Inks for 3D Bioprinting in Tissue Engineering: A Review. *Gels*, 8 (3): 179.

FISCHER, M.B.; MAUK, R.L. 2013. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19 (1): 1 – 13.

FREEMAN, F.; KELLY, D. J. 2017. Tuning Alginate Bioink Stiffness and Composition for Controlled Growth Factor Delivery and to Spatially Direct MSC Fate within Bioprinted Tissues. *Scientific Reports*, 7: 1 – 12.

FREEMAN, S.; CALABRO, S.; WILLIAMS, R.; JIN, S.; YE, K. 2022. Bioink Formulation and Machine Learning-Empowered Bioprinting Optimization. *Frontiers Bioengineering and Biotechnology*, 10: 1 – 16.

FRIEDENSTEIN, A.; CHAILAKHYAN, R.; LATSINIK, N. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17 (4): 33.

HELMUS, M. N.; TWEDEN, K. 1995. Materials Selection. Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, 1: 27 – 59.

HURTADO, A.; ALJABALI, A. A. A.; MISHRA, V.; TAMB UWALA, M. M.; SERRANO-AROCA, Á. 2022. Alginate: Enhancement Strategies for Advanced Applications. International Journal of Molecular Sciences 23: 1 – 45.

KACAREVIC, Z. P.; RIDER, P. M.; ALKILDANI, S.; RETNASINGH, S.; SMEETS, R.; JUNG, O.; IVANISEVIC, Z.; BARBECK, M. 2018. An introduction to 3D bioprinting: possibilities, challenges and future aspects. Materials, 11 (11): 1 - 21.

LEE, M. H.; KANG, B. Y.; WONG, C. C.; LI, A. W.; NASEER, N.; IBRAHIM, S. A.; KEIMIG, E. L.; POON, E.; ALAM, M. 2021. A systematic review of autologous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) for the treatment of acute cutaneous wounds. Archives of Dermatological Research 314: 417 – 425.

LEVIN, G.; BELCHIOR, G.G.; SOGAYAR, M.C.; CARREIRA, A.C. 2019. Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos. Genética na Escola, 14 (1): 1 – 8.

LIU, P.; SHEN, H.; ZHI, Y.; SI, J.; SHI, J.; GUO, L.; SHEN, S. G. 2019. 3D bioprinting and in vitro study of bilayered membranous construct with human cells-laden alginate/gelatin composite hydrogels. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 181: 1026 – 1034.

MAACHA S.; SIDAHMED, H.; JACOB, S.; GENTILCORE, G.; CALZONE, R.; GRIVEL, J. C.; CUGNO, C. 2020. Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stromal Cells

in Angiogenesis. Stem Cells International, 2020: 1 – 12.

MANNINO, G., RUSSO, C., MAUGERI, G., MUSUMECI, G., VICARIO, N., TIBULLO, D., GIUFFRIDA, R., PARENTI, R., & LO FURNO, D. 2022. Adult stem cell niches for tissue homeostasis. Journal of Cellular Physiology, 237: 239 – 257.

MBIINE, R.; WAYEBGERA, M.; OCAN, M.; KIWANUKA, N.; MUNABI, I.; MUWONGE, H.; LEKUYA, H. M.; KAWOONYA, I.; NAKANWAGI, C.; KINENGYERE, A. A.; JOBOLA, M.; GALUKANDE, M.. 2022. Adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) in scar treatment: a systematic review protocol. Journal of Stem Cells 4: 56 – 63.

MONTOYA, C.; DU, Y. GIANFORCARO, A. L.; ORREGO, S.; YANG, M.; LELKES, P. I. 2021. On the road to smart biomaterials for bone research: definitions, concepts, advances, and outlook. Bone Research, 9 (1): 1 - 16.

National Institute of Health (NIH). 2021. Stem Cells: scientific progress and future research direction. Bethesda.

ONG, W. K.; CHAKRABORTY, S.; SUGIL, S. 2021. Adipose Tissue: Understanding the Heterogeneity of Stem Cells for Regenerative Medicine. Biomolecules, 7: 1 -13.

ORGUN, D.; MIZUNO, H. 2017. Multipotency and secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of adipose-derived stem cells. Plastic and Aesthetic Research, 4: 32 – 40.

PANJA¹, N.; MAJI¹, S.; CHOUDHURI¹, S.; ALI¹, K. A.; HOSSAIN¹, C. M. 2022. 3D Bioprinting of Human Hollow Organs. *AAPS PharmSciTech*, 23: 139.

SALEMI, S.; PRANGE, A. J.; BAUMGARTNER, V.; MOHR-HARALAMPIEVA, D.; EBERLI, D. 2022. Adult stem cell sources for skeletal and smooth muscle tissue engineering. *Stem Cell Research & Therapy*, 13, 156.

SANTOS – SOUZA, M. A. 2020. Emprego de um Sistema semiautomatizado para o isolamento e proliferação de Células Estromais Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de São Paulo, Assis. (Unpublished).

SIMÃO, V. A.; EVANGELISTA-RIBEIRO, C. P.; BRAND, H.; LAGASS-PEREIRA, L.; MARQUES, L. F.; AOKI, P. H. B.; ANTUNES, R. N. S.; TONSO, A.; RIBEIRO-PAES, J. T. 2019. Metabolic and proliferation evaluation of human adipose-derived mesenchymal stromal cells (ASC) in different culture medium volumes: standardization of static culture. *Biologicals*, 62: 93 – 101.

STACHURA, A.; PASKAL, W.; PAWLIK, W.; MAZUREK, M. J.; JAWOROWSKI, J. 2021. The Use of Adipose – Derived Stem Cells (ADSCs) and Stromal Vascular Fraction (SVF) in Skin Scar Treatment – A Systematic Review of Clinical Studies. *Journal of Clinical Medicine*, 10: 1 – 17.

VALOT, L.; MARTINEZ, J.; MEHDI, A.; SUBRA, G. 2019. Chemical insights into bioinks for 3D printing. *Chemical Society Reviews*, 48: 4049 – 4086.

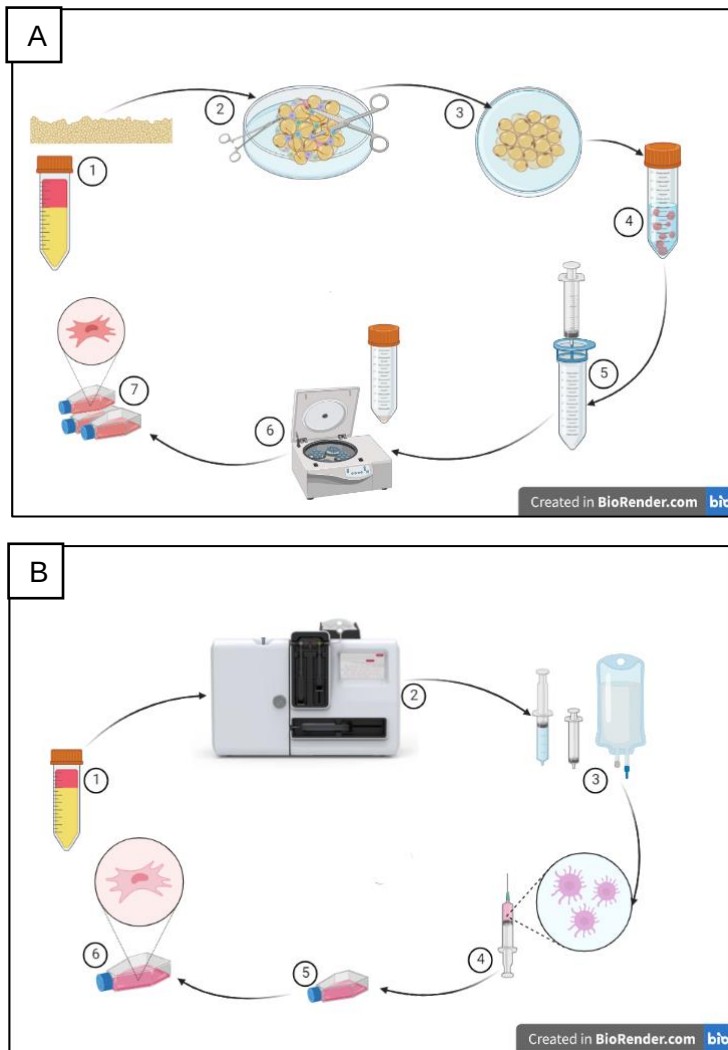
WANG, Z.; WANG, L.; LI , T.; LI, S.; GUO, B.; HUANG, W.; WU, Y. 2021. 3D bioprinting in cardiac tissue engineering Theranostics, 11 (16): 1 - 22.

ZHANG J, WEHRLE E, VETSCH JR, PAUL GR, RUBERT M, MÜLLER R. 2019. Alginate dependent changes of physical properties in 3D bioprinted cell-laden porous scaffolds affect cell viability and cell morphology. Biomedic Materials, 14: 1 – 16.

ZHANG J, WEHRLE E, RUBERT M, MÜLLER R. 2021. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. International Journal of Molecular Sciences, 22: 1 – 21.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE-UGARTE, D. A. HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, K. K.; BENHAİM, P.; HENDRICK, M. H. 2001. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular Biology of the Cell, 13: 42 – 79.

Figura 1. Esquematização da metodologia convencional e semiautomatizada.



A: (A) Tecido adiposo ou lipoaspirado de tecido adiposo; (2) Fragmentação e limpeza do tecido adiposo; (3) Tecido fragmentado; (4) Digestão enzimática do tecido com collagenase; (5) Filtração; (6) Centrifugação e formação do precipitado; (7) Proliferação celular. **B:** (1) Lipoaspirado de tecido adiposo; (2) Processador Kiso (Keai Bioresearch Inc., do Canadá); (3) Collagenase e solução de ringer lactato; (4) SVF; (5) Seleção de ADSC em cultivo; (6) Proliferação celular.

Figura 2. Comparação do rendimento celular na extração de ADSC entre os métodos convencional e semiautomatizado para a Paciente 3.

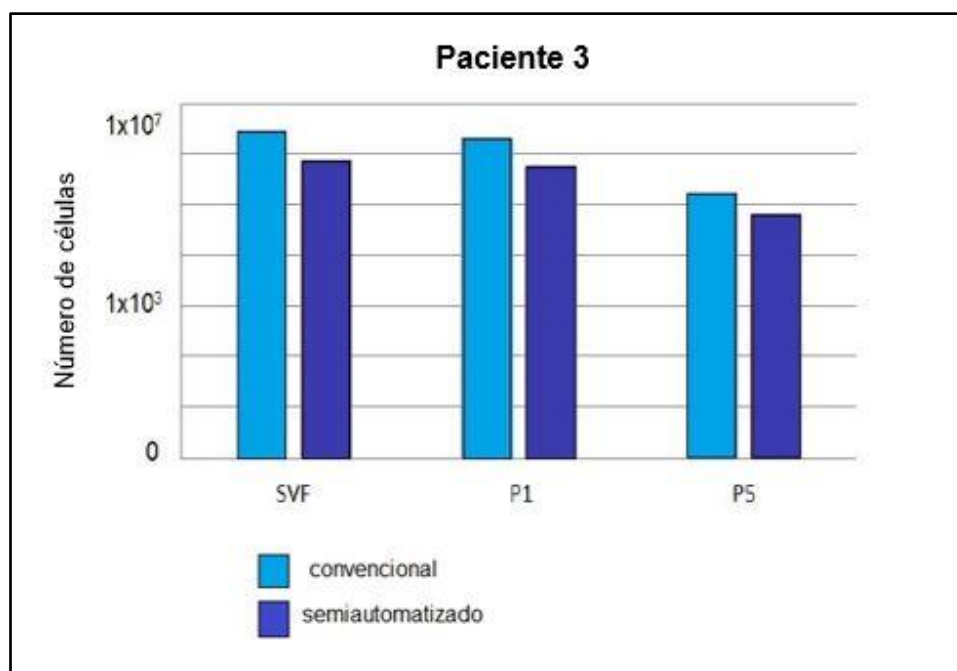


Figura 3. Comparação do rendimento celular na extração de ADSC entre os métodos convencional e semiautomatizado para a Paciente 4.

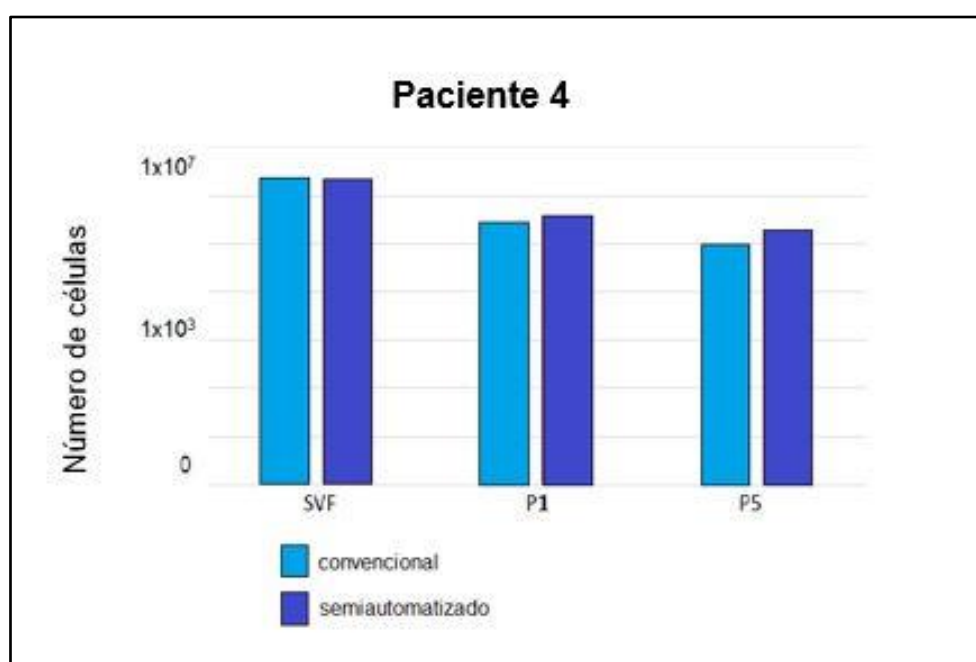


Figura 4. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método convencional.

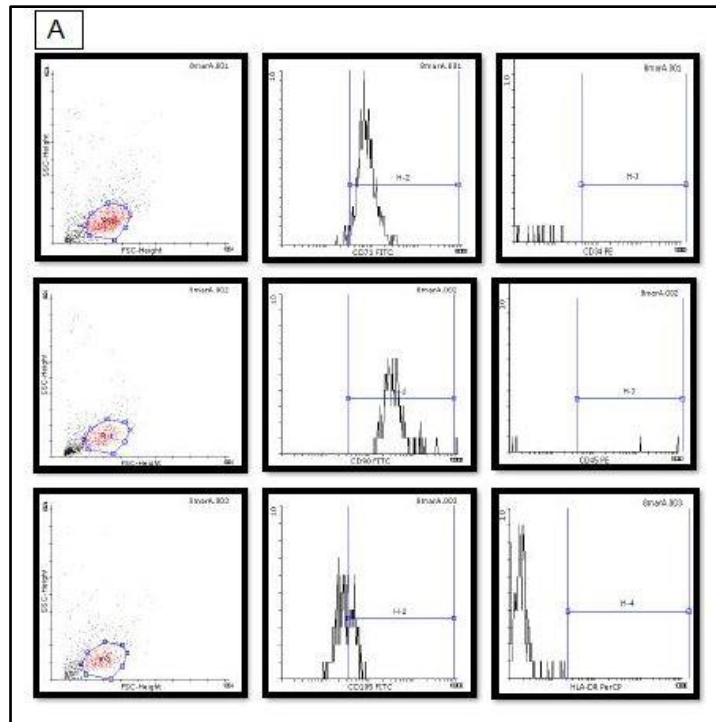


Figura 5. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método semiautomatizado.

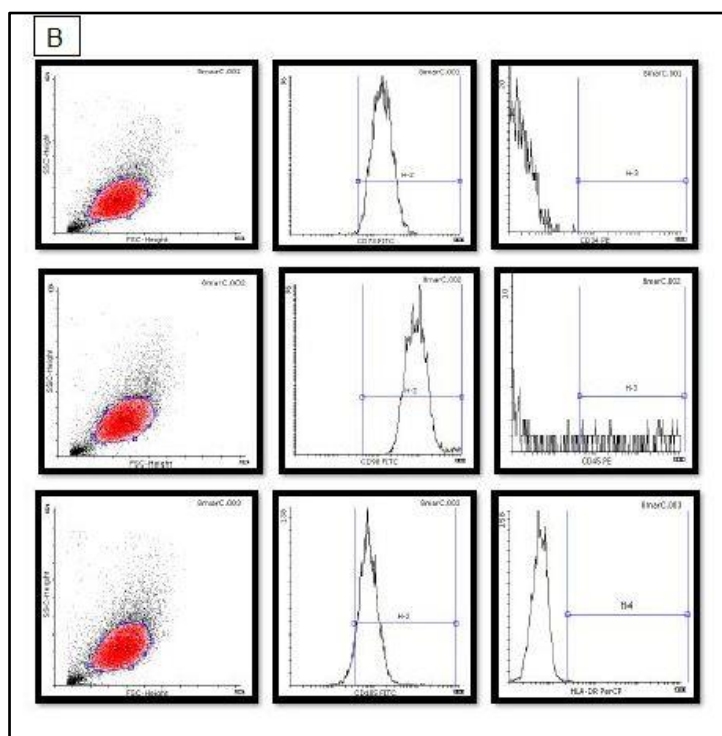


Figura 6. Cultivo celular das ADSC com 14 dias pelo método CONV.

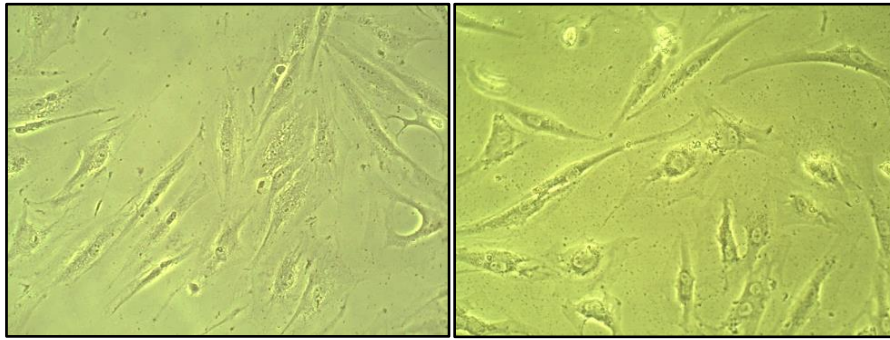


Figura 7. Cultivo celular das ADSC com 14 dias pelo método SEMI.

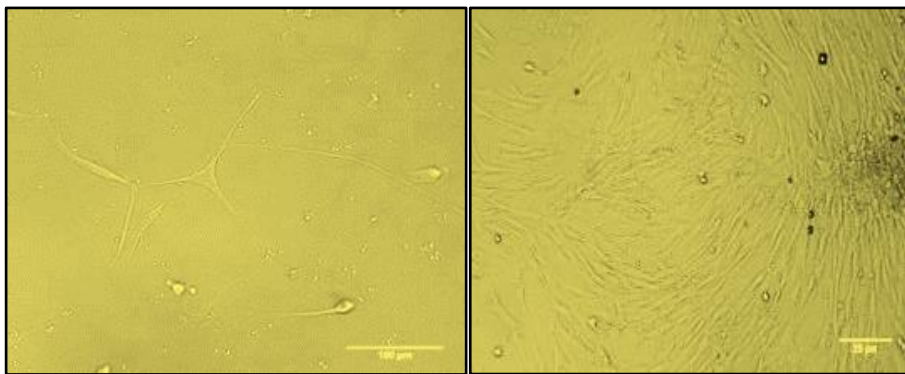
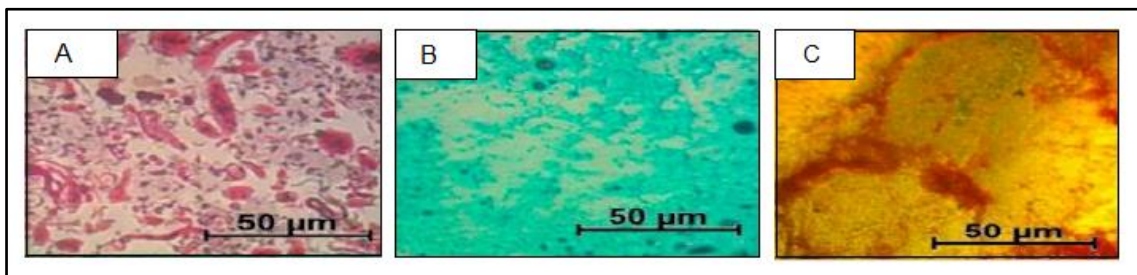


Figura 8. Diferenciação das ADSC pelo método SEMI.



(A) Diferenciação adipogênica corada com Oil Red O, aumento de 400 x; (B) Diferenciação condrogênica, corada com Alcian Blue, aumento de 400x; (C) Diferenciação osteogênica, corada com Alizarin Red S, aumento de 400 x.

Figura 9. Padronização da impressão 3D de gel (Alg/Gel).



(A), (B) e (C) são impressões consecutivas com a mesma concentração de gel (Alg/Gel) a 8%.

Tabela I. Pacientes submetidos à abdominoplastia quanto ao gênero e idade.

Paciente	Gênero	Idade (Anos)	Doença Crônica	Uso de medicamento Crônico
1	Feminino	51	-	-
2	Feminino	38	Hipertensão Hipotireoidismo	Antidepressivo Hipotireoidismo
3	Feminino	57	-	-
4	Feminino	50	-	-