

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
Programa de pós-graduação em biotecnologia
em medicina regenerativa e química medicinal

Lucas Henrique Domingos da Silva

CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO DE SÓDIO CARREGADOS
COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E POTENCIAL TERAPÊUTICO

Araraquara
2025

Lucas Henrique Domingos da Silva

**CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO DE SÓDIO CARREGADOS COM
VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E POTENCIAL TERAPÊUTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Ap. Resende Nogueira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Ferreira Floriano

Araraquara
2025

FICHA CATALOGRÁFICA

S581c Silva, Lucas Henrique Domingos da.
Caracterização de hidrógeis de alginato de sódio carregados com vesículas extracelulares derivados de células-tronco mesenquimais e potencial terapêutico/Lucas Henrique Domingos da Silva. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2025.
128f.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

1. Hidrogéis. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Exossomos. 4. Medicina regenerativa. 5. Melanoma. I. Título.

CDU 60

LUCAS HENRIQUE DOMINGOS DA SILVA

Tese apresentada a Universidade de Araraquara - UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br FLAVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA
Data: 11/03/2025 14:49:00-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof^a Dr^a FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientador)
Universidade de Araraquara – UNIARA

Documento assinado digitalmente
gov.br MARLUS CHORILLI
Data: 26/02/2025 16:03:47-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Documento assinado digitalmente
gov.br CAUE BENITO SCARIM
Data: 27/02/2025 13:56:21-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof. Dr. CAUÊ BENITO SCARIM
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Documento assinado digitalmente
gov.br DENISE CRISPIM TAVARES BARBOSA
Data: 03/03/2025 09:28:06-0300
Verifique em <https://validar.itu.gov.br>

Prof^a Dr^a DENISE CRISPIM TAVARES
Universidade de Franca - UNIFRAN

Prof. Dr. PEDRO FARDIM
Unniversidade em Leuven - Bélgica

Esta tese intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE ALGINATO DE SÓDIO CARREGADOS COM VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E POTENCIAL TERAPÊUTICO**” foi realizada com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 - Número do Processo: 88882.365795/2019-01 e com o apoio do Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior (PDSE – CAPES) – Número do Processo: 88881.934624/2024-01.

Dedico esse trabalho para minha falecida vó Cida que me ensinou sempre sorrir mesmo nos momentos mais difíceis

Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente minha família em especial minha mãe Elaine, meu pai Paulo e meu irmão Rafael por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e por nunca me deixar desistir dos meus sonhos. Esse trabalho só foi possível graças a vocês

Agradeço todos os dias na minha vida por ter encontrado o amor da minha vida, minha noiva Vanessa que com seu companheirismo e amor sempre me apoiou, me incentivou e acreditou em mim, com ela meus dias ficaram mais leves e melhores.

Agradeço também pelo incrível apoio recebido pela minha sogra Edna, meu sogro Levi e minha cunhada Daniele, e por terem também me recebido como um membro da família.

Agradeço minha orientadora Flávia por toda paciência e todo empenho comigo e com meu trabalho, também, a minha coorientadora Juliana que com muita disponibilidade e gentileza foi essencial para o trabalho.

Agradeço também meus melhores amigos Murilo e Fred por todo companheirismo durante mais de 15 anos de amizade e por todo apoio e torcida em minha trajetória.

Aos meus amigos que a graduação me deu para a vida inteira Felipe e Lucas Melo por toda risada e companheirismo, sendo essencial para que os dias ruins sejam melhores.

Aos meus amigos do laboratório, por sempre me ajudarem, também, por todo companheirismo durante esse trabalho. Agradeço principalmente ao José, ao Igor e a Jessica, por terem tornado os meus dias mais leves e me ajudado tanto na realização deste trabalho. A Universidade de Araraquara, professores e funcionários que proporcionaram todas as ferramentas para minha formação.

Agradeço imensamente ao Professor Pedro e a todos os alunos do seu laboratório, em especial à Femke, por me receberem na Bélgica com tanta gentileza e por todo o apoio durante minha estadia. A acolhida calorosa e a generosidade de vocês tornaram meu tempo na KU Leuven uma experiência verdadeiramente incrível e inesquecível.

*Aos meus amigos Celmo, Vira, Gabriel, Thamiris, Guilherme e Hongzhen, que tive a alegria de encontrar na Bélgica e que levarei para a vida toda, meu mais sincero obrigado. Vocês fizeram dos meus dias nesse país momentos únicos e inesquecíveis, repletos de alegria, amizade e, claro, muitos *cheers!**

Agradeço também ao laboratório de equipamentos multiusuários pelo uso do microscópio de fluorescência (processo nº 2019-25318-0 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)).

A CAPES, FAPESP e CNPq que sem o suporte financeiro, a realização deste trabalho não seria possível.

A banca examinadora pelo aceite e por toda consideração com o trabalho.

*“Tudo que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”
(Gandalf – A sociedade do Anel, O senhor dos Anéis)*

*“É perigoso sair porta afora, Frodo, você pisa na estrada, e se não controlar seus pés,
não há como saber até onde você pode ser levado...”*

(Frodo, citando Bilbo - A Sociedade do Anel, O Senhor dos Anéis).

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	13
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	19
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.2. <i>Linhagem e condições de cultivo celular</i>	20
3.3. <i>Preparo dos hidrogéis</i>	21
3.4. <i>Ensaio de citotoxicidade in vitro</i>	21
3.5. <i>Mutagenicidade</i>	22
3.6. <i>Determinação do Índice de Intumescimento (%) e da taxa de degradação</i>	23
3.7. <i>Incorporação celular e teste de liberação</i>	24
3.8. <i>Análise estatística</i>	24
4. RESULTADOS	25
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2	44
RESUMO.....	45
ABSTRACT	46
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	47
LISTA DE FIGURAS	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. OBJETIVOS.....	51
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	51
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 <i>Hidrogéis de alginato com exossomos</i>	52
3.2 <i>Linhagem celular e condições de cultura</i>	53
3.3 <i>Viabilidade celular - Ensaio de redução de resazurina</i>	53
3.4 <i>Ensaio de sobrevivência clonogênica</i>	54
4. RESULTADOS	55
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO 3	70
RESUMO.....	71
ABSTRACT	72
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	73
LISTA DE TABELAS	75
LISTA DE FIGURAS	76
1. INTRODUÇÃO	78
2. OBJETIVOS.....	80
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	80
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	81
3. MATERIAIS E MÉTODOS	82
3.1. <i>Isolamento e Caracterização de MSCs-EVs</i>	82

3.2. Caracterização das CTMS-VEs	82
3.3. Preparação e caracterização de hidrogéis de alginato de sódio com CTMS-VEs	83
3.4. Células HaCaT.....	84
3.5. Ensaio de migração celular	84
3.6. Culturas de células 2D	85
3.7. Culturas de esferoides	86
3.8. Ensaio de sobrevivência clonogênica	86
3.9. Ensaio de Micronúcleo (MN).....	87
3.10. Ensaio de mutação genética reversa com <i>Salmonella Typhimurium</i> (teste de Ames)	88
3.11. Ensaio de membrana corioalantóide de ovo de galinha (HET-CAM).....	88
3.12. Análise Estatística	89
4. RESULTADOS	90
4.1. Isolamento e caracterização de CTMS-VEs.....	90
4.2. Caracterização de hidrogéis de alginato de sódio com CTMS-VEs	92
4.3. Ensaio biológicos com células HaCaT	95
4.4. Testes de segurança	98
5. DISCUSSÃO	100
6. CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	105
CAPÍTULO 4	114
RESUMO.....	115
ABSTRACT	116
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	117
LISTA DE FIGURAS	118
1. INTRODUÇÃO	119
2.OBJETIVOS	121
3.MATERIAL E METÓDOS	121
3.1 Preparação do Hidrogel de STMP-Pululano	121
3.2 Caracterização do Hidrogel de STMP-Pululano.....	122
3.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	122
3.3.3 Reologia	122
4. RESULTADOS	122
4.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	122
4.2 Reologia	123
REFERÊNCIAS	125

Capítulo 1

Hidrogéis de Alginato de Sódio: Viabilidade, Perfil de Liberação e Segurança Biológica em Queratinócitos de Pele Humana para Engenharia de Tecidos

RESUMO

O alginato, um polímero aniônico natural, pertence à família dos polissacarídeos, como o ácido algínico e os sais de alginato. É composto por resíduos de ácido β -D-manurônico (M) ligado ao ácido α -L-gulurônico, resultando em hidrogéis por meio de reticulação com cloreto de cálcio (CaCl_2). O hidrogel de alginato de sódio (HAS) tem sido amplamente aplicado na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e baixa resposta imunológica. Produzido por meio de gelificação ionotrópica, o HAS proporciona vantagens, preservando a integridade celular, a viabilidade e garantindo a funcionalidade celular, mantendo a eficiência terapêutica. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a incorporação e liberação de queratinócitos imortais da pele humana (HaCaT) em HAS, além de avaliar sua taxa de degradação e garantir a segurança quanto aos aspectos citogenotóxicológicos. No estudo, os HAS foram preparados com concentrações variadas de alginato (1,5%, 3,3% e 5%) e 0,1% de CaCl_2 . Os resultados mostram o efeito citotóxico, dose dependente, de CaCl_2 , enquanto o alginato não induziu alterações na viabilidade das células HaCaT nas concentrações avaliadas. Tanto o CaCl_2 quanto o alginato foram não mutagênicos no teste de Ames nas condições experimentais. A concentração de alginato nos hidrogéis influenciou a taxa de degradação e o perfil de liberação celular. As concentrações mais altas de alginato estão correlacionadas à degradação mais lenta e à liberação celular, provavelmente devido à erosão do hidrogel e à difusão celular. Em conclusão, este estudo demonstra que os HAS podem atuar como matrizes, confinando fisicamente os queratinócitos, mantendo a viabilidade e a morfologia celular, tornando-os promissores para aplicações biomédicas em engenharia de tecidos, particularmente envolvendo queratinócitos.

Palavras-chave: Citotoxicidade, avaliação de segurança, aplicações biomédicas.

ABSTRACT

Alginate, a natural anionic polymer, belongs to the family of polysaccharides, such as alginic acid and alginate salts. It is composed of residues of β -D-mannuronic acid (M) linked to α -L-guluronic acid, resulting in hydrogels through crosslinking with calcium chloride (CaCl_2). Sodium alginate hydrogel (SAH) has been widely applied in tissue engineering due to its biocompatibility and low immunological response. Produced through ionotropic gelation, SAH provides advantages, preserving cellular integrity, viability and ensuring cellular functionality, maintaining therapeutic efficiency. Therefore, the objective of the present study was to investigate the incorporation and release of human skin immortal keratinocytes (HaCaT) in SAH, in addition to evaluating their degradation rate and ensuring safety regarding cytogenotoxicological aspects. In the study, SAH were prepared with varying concentrations of alginate (1.5%, 3.3% and 5%) and 0.1% CaCl_2 . The results show the dose-dependent cytotoxic effect of CaCl_2 , while alginate did not induce changes in the viability of HaCaT cells at the concentrations evaluated. Both CaCl_2 and alginate were non-mutagenic in the Ames test under experimental conditions. The alginate concentration in the hydrogels influenced the degradation rate and cellular release profile. Higher alginate concentrations correlate with slower degradation and cellular release, likely due to hydrogel erosion and cellular diffusion. In conclusion, this study demonstrates that SAH can act as matrices, physically confining keratinocytes, maintaining cell viability and morphology, making them promise for biomedical applications in tissue engineering, particularly involving keratinocytes.

Keywords: Alginate hydrogels, cytotoxicity, safety assessment, biomedical applications.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2AA - 2-antramine;

2AF - 2-aminofluoreno;

CaCl₂ - Cloreto de cálcio;

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado de Dulbecco);

DMSO – Dimetilsulfóxido;

HaCaT - Queratinócitos imortais de pele humana;

HAS - Hidrogel de alginato de sódio;

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura;

MMC – Mitomicina C;

MMS – Metilmetanossulfonato;

NaN₃ - Azida sódica;

NPD - 4-nitro-o-fenilenodiamina;

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato);

SFB – Soro Fetal Bovino.

	Pág.
LISTA DE TABELAS	
Tabela 1 - Resultados dos ensaios de mutagenicidade em linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium na presença (+S9) e ausência (-S9) da mistura S9.....	25
Tabela 2 - Valores do grau de intumescimento dos hidrogéis sintetizados com diferentes concentrações de alginato de sódio reticulados com CaCl ₂ em PBS e meio DMEM.....	29

LISTA DE FIGURAS	Pág.
Figura 1 - Efeito do alginato e cloreto de cálcio (CaCl ₂) na viabilidade de células HaCaT.....	23
Figura 2 - Resultados dos testes de reologia em hidrogéis de alginato de sódio (HAS).....	26
Figura 3 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de hidrogéis de alginato de sódio (HAS) com diferentes concentrações de sal alginato de sódio.....	27
Figura 4 – Perfil de degradação dos hidrogéis de alginato 1,5%, 3,3% e 5% em PBS (A) e meio DMEM (B).....	30
Figura 5 – Perfil de liberação de células HaCaT aprisionadas em hidrogéis de alginato com 1,5%, 3,3% e 5%.....	32

1. INTRODUÇÃO

Os hidrogéis, derivados de polímeros naturais, sintéticos ou híbridos, são plataformas versáteis e atualmente, vem sendo explorados e utilizados em diversas aplicações biomédicas (Cao et al., 2021). A combinação de propriedades que resultam em semelhanças com matrizes extracelulares naturais, como alto teor de água, biodegradabilidade, porosidade e biocompatibilidade os tornam atraentes, principalmente, para engenharia de tecidos e terapia celular. Além disso, sua composição, estrutura, propriedades mecânicas e bioquímicas podem ser ajustadas para controlar ou modular o crescimento, proliferação e diferenciação celular, bem como facilitar a difusão das células, solutos e nutrientes, a fim de melhorar seu uso no reparo tecidual (Yang et al., 2017; Vega et al., 2017).

O alginato, um polímero aniônico natural, pertence à família dos polissacarídeos como ácido algínico e sais de alginato e são compostos por resíduos de ácido β -D-manurônico (M) ligados ao ácido α -L-gulurônico (Reig-Vano et al., 2021), podendo ser extraído de algas marrons como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, entre outras (Sosnik 2014; Gonzalez-Pujana et al., 2018) ou ser biossintetizado por espécies dos gêneros bacterianos *Pseudomonas* e *Azotobacter* (Reig-Vano et al., 2021).

Dentre as várias vantagens associadas ao uso de polímeros naturais, destacam-se sua biodegradabilidade e suas propriedades, frequentemente caracterizadas por baixa inflamação e ausência de toxicidade, tornando tanto os materiais quanto seus produtos de degradação adequados para induzir a regeneração tecidual. Além disso, o potencial de indução da regeneração de

tecidos é fortemente influenciado pela biocompatibilidade dos polímeros, incluindo sua capacidade de reduzir respostas imunológicas e pela hidrofiliabilidade dos materiais empregados (Hama et al., 2023).

Os hidrogéis de alginato de sódio (HAS) têm sido amplamente aplicados na engenharia de tecidos devido à sua biocompatibilidade e resposta imune (Su et al., 2021). Eles podem ser usados como portadores para a entrega precisa de fármacos, células, genes ou proteínas para melhorar o efeito terapêutico (Bidarra et al., 2014; Sheng et al., 2021; Reig-Vano et al., 2021; Bogdanova et al., 2022). Devido seu potencial anti-inflamatório e com capacidade de estimular o crescimento celular, os HAS tem sido materiais preferenciais para o tratamento de danos na pele, sendo considerados excelentes biocurativos (Aderibigbe et al., 2018; Zhang et al., 2020; Fayyazbakhsh et al., 2022).

A necessidade de materiais promissores na engenharia de tecidos é decorrente do difícil tratamento em casos de complicações graves após lesões cutâneas significativas como queimaduras ou em certas patologias dermatológicas que resultam em feridas crônicas, onde o processo de cicatrização, uma função importante da pele, pode ser desregulado ou perdido (Liang et al., 2021). Os materiais biológicos utilizados para a engenharia de tecidos são baseados praticamente em fibroblastos e queratinócitos (Goodarzi et al., 2018; Sierra-Sánchez et al., 2021).

No encapsulamento celular, o alginato atua como uma membrana semipermeável que permite a passagem bidirecional de moléculas, nutrientes e oxigênio, enquanto resíduos celulares são removidos do ambiente celular (Lee et al., 2012; Thomas et al., 2021). Por serem produzidos por gelificação ionotrópica, os HAS oferecem vantagens, como, condições para preservar a

integridade e viabilidade celular, além de garantir a funcionalidade celular mantendo sua a eficiência terapêutica (Thomas et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a incorporação e liberação de queratinócitos imortais de pele humana (células HaCaT) em HAS, bem como sua taxa de intumescimento e degradação, além de garantir a segurança de uso dos materiais utilizados na preparação dos HAS por meio de testes citogenotóxicológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Preparar os HAS com diferentes concentrações de alginato;
- Avaliar a morfologia do hidrogel por microscopia eletrônica de varredura, a viscosidade por reologia, o tempo de degradação e intumescimento dos HAS;
- Avaliar a viabilidade celular das linhagens HaCaT, após o tratamento com diferentes concentrações dos materiais de partida alginato e cloreto de cálcio (CaCl_2) usados no preparo dos HAS;
- Avaliar a atividade mutagênica de diferentes concentrações do alginato e CaCl_2 , em nível e gênico, por meio do ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella Typhimurium* (teste de Ames);
- Investigar o potencial citotóxico e mutagênico dos materiais de partida alginato e cloreto de cálcio (CaCl_2) usados no preparo dos HAS;
- Incorporar e avaliar o perfil de liberação das células HaCaT dos HAS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Alginato (Synth® Diadema, SP, Brasil), Cloreto de Cálcio (CaCl_2 - Synth® Diadema, SP, Brasil), Dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), azida sódica (NaN_3 - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), mitomicina C (MMC - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), 2-antramine (2AA- Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA) e 2-aminofluoreno (2AF - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), 4-nitro-o-fenilenodiamina (NPD - Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), Nutriente Oxoid (Oxoid, England). Resazurina (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, EUA), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM - Gibco Waltham, Massachusetts, EUA), Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco Waltham, Massachusetts, EUA).

3.2. Linhagem e condições de cultivo celular

A linhagem celular de queratinócitos epidérmicos humanos (HaCaT, ATCC® PCS-200-011™) foi cultivada em DMEM, suplementado com 10% de FBS e submetida a condições padronizadas de incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de dióxido de carbono (CO_2) e 95% de saturação por umidade. HaCaTs são células espontaneamente imortalizadas com a capacidade de se diferenciar e formar uma estrutura *in vitro* semelhante à epiderme. Além disso, elas retêm queratinas epidérmicas características das camadas celulares mais diferenciadas da epiderme humana *in vivo*, bem como outros marcadores como involucrina e filagrina (Boukemp et al., 1988, Wilson et al., 2013).

3.3. Preparo dos hidrogéis

Os HAS foram preparados seguindo o protocolo descrito por Shafei et al. (2020). O alginato de sódio foi dissolvido em água nas concentrações de 1,5%, 3,3% e 5% (m/v) e reticulado fisicamente com cátions divalentes, utilizando uma solução de CaCl_2 a 0,1%, à temperatura ambiente. Essas concentrações foram selecionadas com base em estudos prévios que evidenciaram sua eficácia na formação de hidrogéis com diferentes propriedades viscoelásticas, fundamentais para avaliar o impacto na migração celular e na difusão de nutrientes. A viscosidade dos hidrogéis foi determinada utilizando um reômetro Anton Paar MCR92, equipado com placa de geometria paralela de 25 mm, intervalo de 0,20 mm, a 25°C e 0,01 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ por 240 segundos e sua morfologia foi analisada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV JSM-6610LV JEOL Ltd., Akishima, Tóquio, Japão) da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, SP, Brasil. As amostras foram preparadas, submetidas à liofilização a -50°C para eliminar a água residual, seccionados e revestidas com uma camada de ouro. As microestruturas das amostras foram examinadas a uma tensão de aceleração de 3,0 kV.

3.4. Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Para avaliar a viabilidade celular, células HaCaT foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade inicial de $1,5 \times 10^4$ células/poço e incubadas por 24 horas para adesão celular. Os tratamentos consistiram em 0,15% a 5% (m/v) de alginato e CaCl_2 . Também foram incluídos controle negativo (sem tratamento) e positivo (metilmetanossulfonato, MMS, $300 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os resultados foram avaliados após 24 horas de tratamento com resazurina

(0,01% m/v) (Page et al., 1993). As análises foram realizadas utilizando valores unitários de fluorescência (UF) obtidos com o equipamento Cytation (Biotek®), com filtros de excitação (530 nm) e emissão (590 nm). A porcentagem de inibição da proliferação celular para células tratadas foi calculada de acordo com a equação (1):

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{\text{UF do poço tratado}}{\text{UF do poço controle}} \times 100 \quad (1)$$

3.5. Mutagenicidade

Os materiais de partida usados no preparo dos hidrogéis foram avaliados quanto ao seu potencial para induzir mutações reversas nas cepas TA98, TA100, TA97a e TA102 de *Salmonella* Typhimurium. O teste de Ames (método de pré-incubação) foi utilizado nesta avaliação (Maron; Ames 1983), em experimentos com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica. As cepas bacterianas foram gentilmente cedidas pelo Dr. B.N. Ames (Berkeley, CA, EUA) e a fração S9 foi adquirida da Molecular Toxicology Inc.

As culturas foram obtidas pela inoculação das cepas em caldo nutriente (Oxoid nº 2) e incubação por 16 horas a 37 °C para atingir a fase exponencial tardia ou estacionaria inicial de crescimento (densidade de aproximadamente 10⁹ bactérias/ mL). As amostras-teste (alginato e CaCl₂) foram testadas em concentrações que variaram de 0,62 a 5 mg/placa, como recomendado pela OECD471 (2020), para substâncias não tóxicas, ou seja, maior concentração testada de 5 mg/ placa. Os ensaios foram validados usando os mutágenos diretos NPD (10 µg/placa), NaN₃ (2,5 µg/placa) e MMC (0,5 µg/placa), e indiretos 2-AA (1,5 µg/placa) e 2-AF (5 µg/placa). A taxa espontânea de reversão das

bactérias serviu como controle negativo, pois as amostras analisadas foram solubilizadas em tampão fosfato. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e as colônias revertentes foram contadas manualmente. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata.

O índice de mutagenicidade foi calculado pela razão do número de revertentes induzidas/placa com a amostra-teste pelo número de revertentes/placa do controle espontâneo. Um valor acima de 2 indica mutagenicidade positiva (Maron; Ames 1983; Mortelmans; Zeiger 2000).

3.6. Determinação do Índice de Intumescimento (I%) e da taxa de degradação

Os ensaios foram realizados com 500 mg de HAS nas concentrações de 1,5%, 3,3% e 5% (m/v) em tubos de ensaio contendo 2 mL de DMEM suplementado com SFB 10% (pH 7,3) e tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, pH 7). Os tubos foram incubados e armazenados em incubadora BOD a 37°C para avaliação das alterações de massa por meio da pesagem da HAS em balança analítica em diversos intervalos de tempo. Os pesos iniciais dos hidrogéis foram monitorados antes de iniciar o processo. Os valores de intumescimento (g/g) foram determinados pela razão entre a massa intumescida (M_t) e a massa obtida antes da imersão do HAS no solvente (M_0). Além disso, o grau de intumescimento (I%) foi calculado para avaliar a hidrofiliabilidade dos hidrogéis com base na equação 2, enquanto a porcentagem de degradação foi determinada seguindo a equação 3:

$$I\% = \left(\frac{M_t - M_0}{M_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Degradação (\%)} = \left(\frac{M_0 - M_t}{M_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde, M_0 e M_t representam os pesos das amostras antes e depois da imersão, respectivamente.

3.7. Incorporação celular e teste de liberação

Para o teste de incorporação e liberação celular, $1,5 \times 10^4$ células HaCaT (100 μL de suspensão celular) foram adicionadas a 500 μL de hidrogel com concentrações de 1,5%, 3,3% e 5% (m/v). A mistura foi transferida para uma placa de 24 poços contendo 400 μL de meio de cultura celular, seguida de incubação numa incubadora de CO_2 . A análise de viabilidade celular utilizando resazurina (0,01% m/v) como revelador foi realizada em intervalos pré-determinados em 24 horas por até 5 dias. O experimento foi conduzido em triplicata.

3.8. Análise estatística

Os dados dos ensaios de mutagenicidade (revertentes/placa) foram avaliados através de análise de variância (ANOVA), seguida de regressão linear utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo proposto por Bernstein et al. (1982). Todos os demais resultados foram submetidos à análise estatística no software GraphPad Prism 7.0, incluindo cálculo da estatística F e respectivos valores de p . Quando $p < 0,05$, as médias dos tratamentos foram

comparadas pelo teste de Tukey, e a diferença menos significativa foi calculada para $\alpha = 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no Capítulo 1 foram submetidos ao periódico *Biologicals* (<https://www.sciencedirect.com/journal/biologicals>).

Os testes de citotoxicidade com os materiais de partida, apresentados na Figura 1, revelaram que o alginato não apresenta potencial citotóxico e não influencia a funcionalidade dos queratinócitos quando testado *in vitro*. No entanto, o tratamento com CaCl_2 reduziu significativamente a viabilidade celular de maneira dose-dependente, a partir de 0,62 mg/mL.

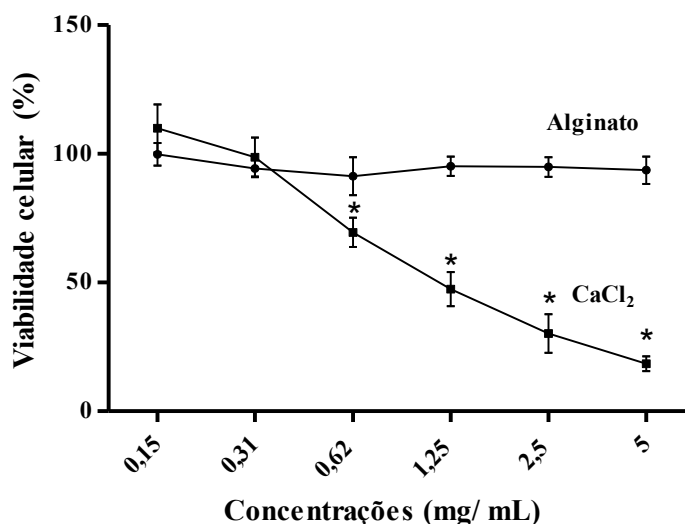


Figura 1 - Efeito do alginato e CaCl_2 na viabilidade de células HaCaT.

Controle negativo (DMEM com 10% de soro fetal bovino, 100% de viabilidade celular); Controle positivo (metilmetanossulfonato, $11,3 \pm 2,1\%$ de viabilidade celular); os resultados são

*apresentados como média ± desvio padrão de três ensaios independentes. *Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo ($p < 0,05$, ANOVA, seguido de teste de Tukey).*

Em relação à mutagenicidade (Tabela 1), experimentos realizados com e sem o sistema de ativação metabólica exógeno mostraram ausência de efeito mutagênico do alginato e do CaCl_2 e de seus subprodutos metabólicos, nas cepas de *S. Typhimurium* testadas, nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 1 - Resultados dos ensaios de mutagenicidade em linhagens de *Salmonella* Typhimurium na presença (+S9) e ausência (-S9) da mistura S9.

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM								
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CE	30 ± 3	24 ± 5	126 ± 8	119 ± 14	349 ± 29	316 ± 48	126 ± 8	115 ± 10
C +	611 ± 81 ^a	849 ± 60 ^{ad}	1335 ± 93 ^{ab}	1490 ± 195 ^{ad}	1622 ± 131 ^{ac}	1344 ± 186 ^{ae}	1235 ± 163 ^a	1559 ± 76 ^d
(mg/placa)	ALGINATO							
0,62	34 ± 1 (1,12)	25 ± 1 (1,04)	141 ± 23 (1,12)	142 ± 24 (1,19)	381 ± 37 (1,09)	351 ± 41 (1,11)	123 ± 13 (0,98)	133 ± 17 (1,16)
1,25	31 ± 2 (1,02)	27 ± 4 (1,10)	136 ± 16 (1,08)	122 ± 13 (1,03)	363 ± 20 (1,04)	341 ± 26 (1,08)	131 ± 13 (1,04)	120 ± 15 (1,04)
2,5	33 ± 1 (1,10)	26 ± 8 (1,06)	130 ± 18 (1,03)	126 ± 16 (1,05)	351 ± 22 (1,00)	329 ± 31 (1,04)	130 ± 18 (1,03)	119 ± 7 (1,03)
3,75	34 ± 4 (1,13)	24 ± 1 (1,00)	128 ± 15 (1,01)	127 ± 14 (1,07)	357 ± 35 (1,02)	324 ± 40 (1,03)	128 ± 21 (1,02)	121 ± 11 (1,05)
5	30 ± 8 (1,00)	26 ± 3 (1,08)	135 ± 21 (1,07)	111 ± 27 (0,93)	335 ± 31 (0,96)	342 ± 36 (1,08)	141 ± 11 (1,12)	125 ± 23 (1,09)
(mg/placa)	CaCl ₂							
0,62	33 ± 7 (1,10)	28 ± 4 (1,15)	142 ± 8 (1,13)	131 ± 9 (1,10)	338 ± 33 (0,97)	334 ± 30 (1,06)	130 ± 15 (1,03)	121 ± 9 (1,05)
1,25	31 ± 3 (1,03)	27 ± 6 (1,10)	130 ± 11 (1,03)	119 ± 3 (1,00)	346 ± 28 (0,99)	327 ± 18 (1,03)	139 ± 12 (1,10)	118 ± 14 (1,03)
2,5	33 ± 3 (1,10)	23 ± 4 (0,96)	130 ± 23 (1,03)	133 ± 18 (1,11)	361 ± 16 (1,03)	316 ± 28 (1,00)	122 ± 3 (0,97)	132 ± 11 (1,15)
3,75	29 ± 1 (0,97)	26 ± 3 (1,08)	129 ± 16 (1,02)	121 ± 14 (1,02)	352 ± 14 (1,01)	337 ± 34 (1,07)	142 ± 11 (1,13)	119 ± 22 (1,03)
5	27 ± 4 (0,90)	27 ± 4 (1,13)	137 ± 10 (1,09)	119 ± 10 (1,00)	322 ± 32 (0,92)	345 ± 27 (1,09)	140 ± 13 (1,11)	98 ± 15 (0,85)

* p < 0,05 (ANOVA); M ± DP = média e desvio padrão; Controle Negativo (tampão); taxa de reversão espontânea; Controle Positivo (C+); ^a4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 µg/placa - TA98 e TA97a); ^bazida sódica (1,25 µg/placa - TA100); ^cmitomicina C (0,5 µg/placa - TA102), na ausência de S9; e ^d2-antramine (1,25 µg/placa - TA98, TA100 e TA97a); ^e2-aminofluoreno (10,0 µg/placa—TA102), na presença de S9.

Considerando estes resultados preliminares, hidrogéis de alginato fisicamente reticulados com viscoelasticidade variável foram avaliados quanto ao seu perfil de liberação de queratinócitos, demonstrando-se promissores como transportadores celulares. Esses hidrogéis exibiram alta capacidade de absorção, manutenção e liberação celular.

Inicialmente, a viscosidade de cada amostra foi avaliada por meio de reologia. Esta análise indicou um aumento na viscosidade do hidrogel com o aumento da concentração de alginato, conforme representado na Figura 2, variando de $1,1 \times 10^6$, $0,5 \times 10^7$ e 2×10^7 para concentrações de 1,5%, 3,3% e 5%, respectivamente. É importante ressaltar que essas viscosidades permaneceram estáveis durante todo o tempo de análise.

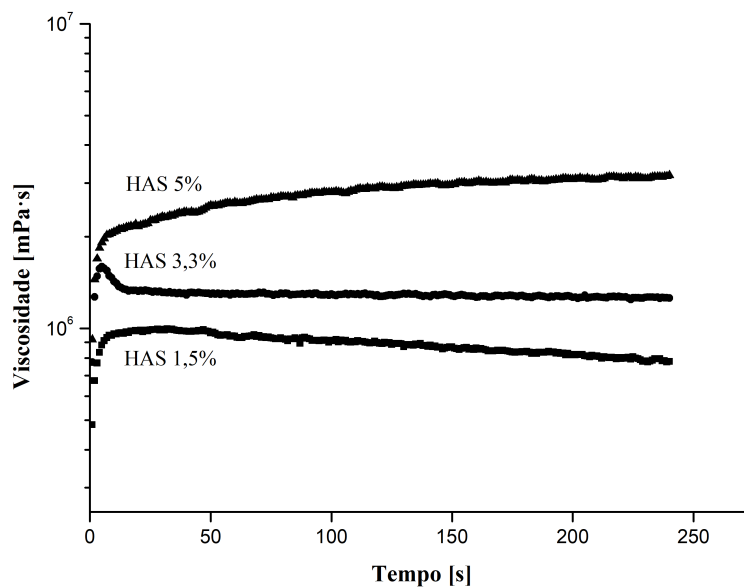


Figura 2 - Resultados dos testes de reologia em hidrogéis de alginato de sódio (HAS).

As microestruturas dos HAS estão representadas na Figura 3. As imagens MEV revelaram que, particularmente, o HAS 1,5% apresenta uma morfologia folheada e uma estrutura interna uniforme e altamente porosa. O aumento na concentração de alginato resulta em uma estrutura interna irregular, como observado no HAS 3,3%. No HAS 5%, a estrutura interna torna-se ainda mais irregular, acompanhada de redução no tamanho dos poros e distribuição heterogênea dos poros (Figura 3).

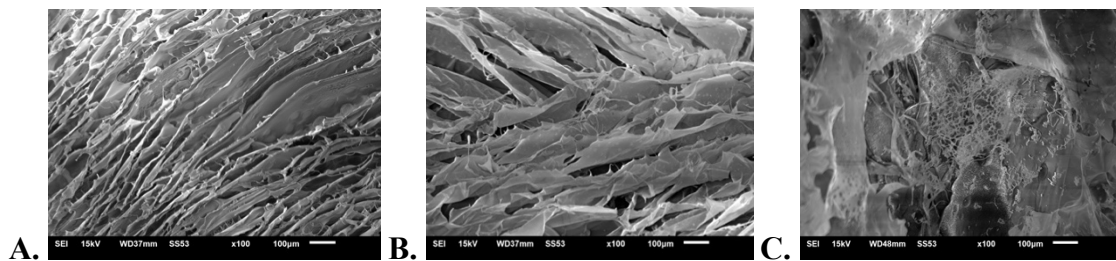


Figura 3 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de hidrogéis de alginato de sódio (HAS) com diferentes concentrações de sal alginato de sódio. (A) HAS 1,5%; (B) HAS 3,3%; (C) HAS 5%. Ampliação original: $\times 100$.

Experimentos para avaliar a taxa de intumescimento e degradação mostraram que para HAS 1,5%, independente do meio (PBS ou DMEM), a ruptura da estrutura polimérica começou em cerca de 10 minutos, impossibilitando avaliar o intumescimento no decorrer do teste. HAS 1,5% exibiu $89,0 \pm 4,0\%$ de degradação em PBS e $73,7 \pm 6,5\%$ em DMEM após 1 hora (Figura 4 A e B).

HAS 3,3% e 5% exibiram menor capacidade de intumescimento em PBS do que em DMEM devido à maior força iônica do meio tamponado (Tabela 2).

Quando imersos em PBS, HAS 3,3% e 5% atingiram o intumescimento máximo em 10 ($I\% = 20,7 \pm 6,4$) e 20 ($I\% = 98,6 \pm 5,2$) minutos, respectivamente. Porém, HAS 5% manteve sua estrutura por 1 hora, enquanto o HAS 3,3% começou a se degradar após cerca de 30 minutos (Tabela 2, Figura 4). As taxas de degradação, após 1 hora, foram de $46,7 \pm 4,9\%$ para HAS 3,3% e menos de 20% para HAS 5%. A degradação completa ocorreu após 24 horas para HAS 3,3% e 48 horas para HAS 5% (Fig. 4 A).

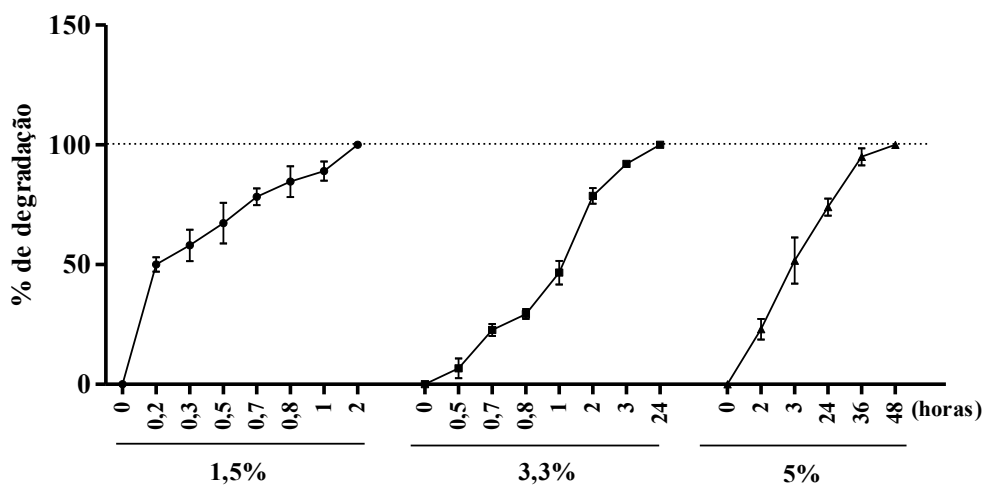
Em DMEM, HAS 5% também apresentou maior intumescimento que HAS 3,3%. Ambos apresentaram um rápido aumento inicial de massa (10 minutos de imersão), seguido de intumescimento gradual até o equilíbrio em torno de 3 horas (Tabela 2). Nesse período, o grau de intumescimento do HAS 3,3% variou de $30,8 \pm 10,7\%$ (10 min) a $42,6 \pm 5,7\%$ (3 horas), enquanto para o HAS 5%, a variação foi de $76,7 \pm 9,4\%$ (10 min) para $82,1 \pm 8,3\%$ (3 horas) (Tabela 2). Após 24 horas, HAS 5% apresentou perda de massa mais lenta e menos significativa. HAS 3,3% manteve-se estável por 48 horas e HAS 5% por 60 horas.

A degradação do HAS 3,3% começou após 60 horas (degradação de $3,0 \pm 1,7\%$) e o HAS 5% degradou-se somente após 72 horas (degradação de $7,7 \pm 3,1\%$) (Figura 4 B).

Tabela 2 - Valores do grau de intumescimento dos hidrogéis sintetizados com diferentes concentrações de alginato de sódio reticulados com CaCl₂ em PBS e meio DMEM.

Tempo (minutos)	PBS				DMEM			
	HAS 3,3%		HAS 5%		HAS 3,3%		HAS 5%	
	Q (g/g)	I%	Q (g/g)	I%	Q (g/g)	I%	Q (g/g)	I%
10	1,21 ± 0,06	20,7 ± 6,4	1,97 ± 0,06	96,6 ± 6,3	1,31 ± 0,11	30,8 ± 10,7	1,77 ± 0,09	76,7 ± 9,4
20	1,16 ± 0,01	15,6 ± 0,5	1,99 ± 0,05	98,6 ± 5,2	1,36 ± 0,08	36,4 ± 7,7	1,79 ± 0,09	78,8 ± 9,3
30			1,94 ± 0,05	93,6 ± 5,2	1,38 ± 0,07	37,6 ± 6,6	1,80 ± 0,09	79,9 ± 8,8
60					1,40 ± 0,06	40,4 ± 5,8	1,81 ± 0,09	81,4 ± 9,1
120					1,41 ± 0,06	41,5 ± 6,1	1,82 ± 0,08	81,8 ± 8,5
180					1,43 ± 0,06	42,6 ± 5,7	1,82 ± 0,08	82,1 ± 8,3
1440					1,31 ± 0,02	31,2 ± 1,6	1,70 ± 0,14	70,4 ± 13,6
2160					1,21 ± 0,01	21,3 ± 0,6	1,50 ± 0,13	49,7 ± 13,3
2880					1,10 ± 0,01	10,4 ± 1,0	1,25 ± 0,07	25,0 ± 7,2

A.



B.

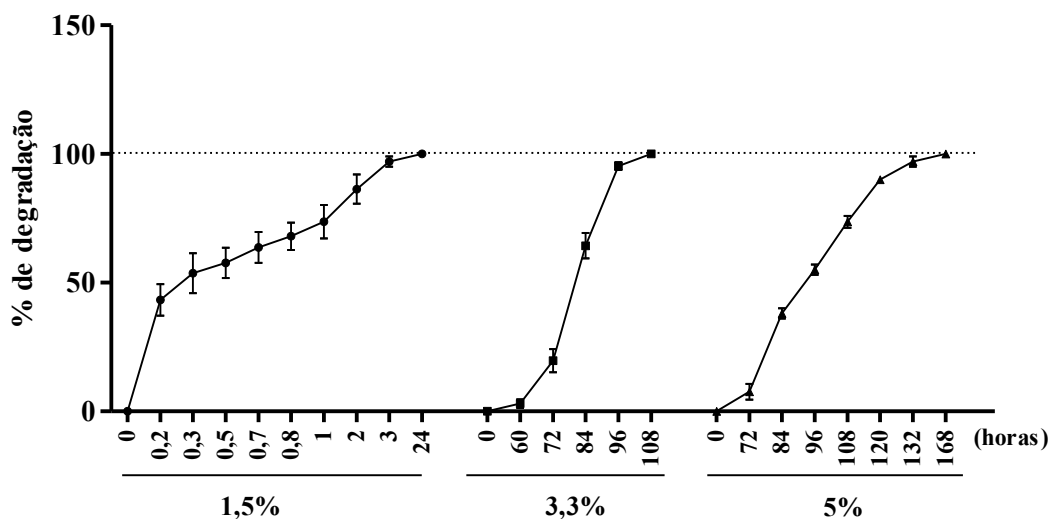


Figura 4 – Perfil de degradação dos hidrogéis de alginato 1,5%, 3,3% e 5% em PBS (A) e meio DMEM (B).

A cinética de liberação foi investigada durante a incubação, onde as células migraram, aderiram à superfície da placa e se expandiram (Figura 5). A presença de células viáveis pós-liberação do hidrogel foi confirmada com resazurina.

Nos experimentos com HAS 1,5%, apesar da degradação completa após 24 horas, foram detectadas $62,3 \pm 3,7\%$ de células viáveis. Embora a porcentagem de células vivas tenha aumentado e a viabilidade tenha persistido por até 4 dias, ocorreu uma queda estatisticamente significativa no 5º dia em comparação aos dias anteriores e ao controle negativo (células cultivadas sem aprisionamento de hidrogel) (Figura 5).

HAS 3,3% e 5% exibiram efeito semelhante nas células aprisionadas, permitindo liberação lenta e gradual governada pela difusão celular associada à degradação do hidrogel.

Experimentos com HAS 3,3% mostraram $22,9 \pm 5,4\%$ de células vivas após 24 horas, dobrando no 2º dia ($53,6 \pm 5,1\%$ de viabilidade celular). O crescimento celular exponencial foi observado após 3 dias, com $121,1 \pm 1,9\%$ de células viáveis, mantido após 4 e 5 dias ($133,9 \pm 2,0\%$ e $138,4 \pm 2,9\%$ de viabilidade celular, respectivamente). É importante destacar que apenas $19,7 \pm 4,5\%$ de degradação do HAS 3,3% foi detectada após 3 dias, atingindo degradação total em aproximadamente 5 dias (Figura 5).

Para HAS 5%, após 24 horas, apenas $15,4 \pm 1,0\%$ de liberação celular foi observada, permanecendo consistente por até 5 dias. A viabilidade celular foi de $36,1 \pm 2,2\%$, $95,5 \pm 5,1\%$, $115,3 \pm 4,8\%$ e $128,4 \pm 2,1\%$ nos dias 2, 3, 4 e 5, respectivamente. Cerca de $55,0 \pm 2,0\%$ de degradação da HAS 5% ocorreu no 4º dia, com $90,0 \pm 1,0\%$ de degradação observada após 5 dias (Figura 5).

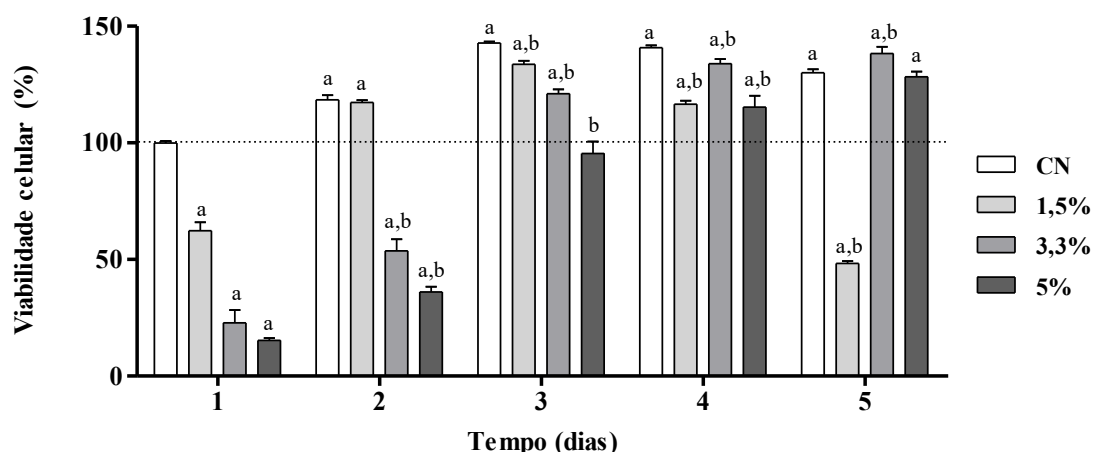


Figura 5 – Perfil de liberação de células HaCaT aprisionadas em hidrogéis de alginato com 1,5%, 3,3% e 5%.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal); Resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três ensaios independentes. ^aestatisticamente diferente do CN em 1 dia de cultivo ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey). ^bestatisticamente diferente do CN nos outros dias de cultivo ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos as características de hidrogéis à base de alginato reticulados com CaCl_2 na proliferação celular.

Os testes de citotoxicidade realizados confirmam o potencial de segurança dos materiais de partida, alginato e CaCl_2 , com o último exibindo um efeito citotóxico dose-dependente. Além disso, o teste de Ames indicou a ausência de um efeito mutagênico para alginato e CaCl_2 .

O cátion Ca^{2+} desempenha um papel importante na regulação de processos celulares como motilidade, proliferação, metabolismo, secreção, contração e alterações na permeabilidade das membranas celulares envolvendo transporte de moléculas e íons inorgânicos. Entretanto, o influxo sustentado de Ca^{2+} na célula leva

ao acúmulo de Ca^{2+} mitocondrial, com danos à membrana interna e perda da capacidade das mitocôndrias de acumular Ca^{2+} (Sulé-Suso et al., 2004). O excesso de Ca^{2+} intracelular pode induzir a morte celular via apoptose ou por necrose, o que leva à desintegração das células pela atividade enzimática de proteínas sensíveis ao Ca^{2+} (Florea et al., 2005).

Sobre estudos de instabilidade genética, Rong et al. (2017) avaliaram microesferas de alginato-cálcio carregadas com trombina, e os resultados *in vivo* confirmaram a ausência de irritabilidade e genotoxicidade, indicando a biocompatibilidade desejada. Hamouda et al. (2021) demonstraram que o alginato não induz mutações cromossômicas *in vivo*. Além disso, quando combinado com óxido de zinco (nanocompósitos de alginato de óxido de zinco), a genotoxicidade induzida pela mitomicina C foi significativamente reduzida. O estudo realizado por Ishidate et al. (1984) já havia demonstrado a mutagenicidade negativa do CaCl_2 nas cepas de *S. Typhimurium* TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535 e TA1537. Em 2019, o Painel dos Aditivos Alimentares e Aromatizantes Adicionados aos Alimentos (*Food Additives and Flavorings Added to Food - FAF*) emitiu um parecer científico reavaliando o CaCl_2 entre outros cloretos utilizados como aditivos alimentares. Os dados obtidos foram satisfatórios e não levantaram preocupações sobre a sua segurança de uso (EFSA, 2019).

O alginato compreende uma família de copolímeros binários não ramificados envolvendo ácido D-manurônico (M) e ácido L-gulurônico (G), ligados a β -1,4 em proporções variadas, formando composições com diversas estruturas sequenciais. A interação com íons metálicos divalentes, como Ca^{2+} , resulta em uma estrutura ordenada à medida que os cátions se difundem entre as cadeias de alginato, ligando-se a locais desocupados no polímero (Blandino et al., 1999). A literatura indica que a

gelificação envolve a ligação cooperativa de íons de cálcio entre blocos GG alinhados de duas cadeias de alginato (Zhang et al., 2020).

Em nosso estudo, concentrações variadas de alginato de sódio produziram hidrogéis com propriedades mecânicas distintas, influenciadas pelo aumento do número de moléculas poliméricas e sítios de ligação para Ca^{2+} . Concentrações mais altas levaram a reticulações mais densas, aumentando a resistência mecânica.

Analisando suas propriedades hidrofílicas, observou-se que o intumescimento e degradabilidade dos hidrogéis dependem não apenas da concentração de alginato, mas também do tipo de veículo utilizado (PBS ou DMEM). O intumescimento envolve o aumento de volume do polímero quando imerso em um solvente, influenciado pela temperatura, pH e interações específicas entre moléculas da solução e cadeias poliméricas (Ullah et al., 2015).

Os HAS exibiram menor capacidade de intumescimento em PBS do que em DMEM devido à maior força iônica do meio tamponado. O maior número de grupos hidrofílicos $-\text{COO}^-$ e OH na cadeia do polímero de alginato em uma concentração maior (HAS 5%) resultou em maior capacidade de absorção. Esses grupos interagem com moléculas de água durante o processo de intumescimento.

Sobre a degradabilidade, a taxa de degradação dos HAS em PBS foi mais rápida que em DMEM. No entanto, em ambos os veículos, uma maior concentração de alginato levou a uma degradação mais lenta. A concentração elevada de Na^+ no PBS em comparação ao DMEM alterou o equilíbrio da reação, afetando a reticulação do alginato. Isso fez com que moléculas de alginato reticuladas por cálcio voltassem à solubilidade, formando alginato de sódio (Ma et al., 1994; Cao et al., 2021), resultando na decomposição acelerada do hidrogel em PBS. Sob diferentes condições, a degradação ocorreu principalmente através da erosão superficial.

Ao avaliar o perfil de liberação dos queratinócitos, os hidrogéis atuaram como reservatórios, mantendo a viabilidade celular, mas não permitiram a proliferação de células aderentes enquanto retidas. Além disso, foi observado que a difusão de cátions Ca^{2+} resultantes da decomposição do hidrogel em cultivo prolongado pode ter induzido a morte celular. Diante disso, HAS 1,5% pode ser adequado para estudos de curto prazo. A rápida deterioração torna-os inadequados para implementação a longo prazo.

As diferenças nas propriedades viscoelásticas afetaram a migração celular dentro do HAS, como observado em concentrações de 3,3% e 5%, mas não limitaram a difusão de nutrientes e oxigênio. As redes de hidrogel interconectadas mais densas, devido à maior concentração de alginato, aumentam a resistência à difusão celular, resultando em tempos de retenção mais longos. Apesar disso, os hidrogéis mantêm a capacidade de suportar e liberar células viáveis, demonstrando seu potencial como ferramentas versáteis e eficazes em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, oferecendo novas oportunidades para tratamentos avançados e personalizados.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam as potenciais aplicações do HAS, com destaque para a criação de scaffolds destinados à cultura de células *in vitro* e ao desenvolvimento de modelos de tecidos tridimensionais que mimetizam o ambiente *in vivo*. Essa abordagem representa uma ferramenta promissora para acelerar a pesquisa em biologia celular e impulsionar o desenvolvimento de novas terapias regenerativas, fornecendo uma plataforma para estudos pré-clínicos. Além disso, enfatiza-se a possibilidade de fabricar andaimes com propriedades ajustáveis, capazes de atender às demandas específicas de diferentes ambientes biológicos, requisitos mecânicos e necessidades do tecido-alvo. O HAS também apresenta potencial para uso como implantes biodegradáveis, promovendo a regeneração

tecidual e favorecendo a integração dos implantes com o tecido circundante. Devido à capacidade dos hidrogéis de preservar e liberar células viáveis de forma controlada ao longo do tempo, é possível otimizar a regeneração tecidual em estágios específicos do processo de cicatrização. Estudos adicionais são necessários para aprimorar as propriedades do HAS e expandir suas aplicações para diferentes tipos de tecidos e contextos clínicos.

6. CONCLUSÃO

Os hidrogéis de alginato reticulados (HAS 1,5%, 3,3% e 5%) demonstraram matrizes capazes de confinar queratinócitos, influenciando a migração e proliferação celular. Isto contribui para a investigação de condições ideais para incorporação de queratinócitos, com o objetivo de regeneração tecidual. As células liberadas exibiram espalhamento adequado na superfície, mantendo uma morfologia normal o que é adequado para aplicações biomédicas. Nosso estudo destaca o efeito citotóxico dose-dependente do CaCl_2 , enfatizando o papel crucial dos processos de lavagem dos hidrogéis reticulados para eliminar vestígios de Ca^{2+} e aumentar a biocompatibilidade das amostras preparadas. Além disso, tanto o alginato quanto o CaCl_2 não foram mutagênicos no teste de Ames, estabelecendo sua segurança em termos de aspectos genotoxicológicos. Isto reforça o potencial dos hidrogéis de alginato reticulados como candidatos promissores para aplicações em engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS

- Aderibigbe BA, Buyana B. Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics* 2018; 2:1-18. doi: 10.3390/pharmaceutics10020042.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 1982; 4:267–281. doi: 10.1016/0165-1161(82)90026-7.
- Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater* 2014; 10:1646-62. doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.006.
- Blandino A, Macías M, Cantero D. Formation of calcium alginate gel capsules: influence of sodium alginate and CaCl₂ concentration on gelation kinetics. *J Biosci Bioeng* 1999; 88:686-69. doi: 10.1016/s1389-1723(00)87103-0.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106:761-771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Bogdanova LR, Zelenikhin PV, Makarova AO, Zueva OS, Salnikov VV, Zuev YF, Ilinskaya ON. Alginate-Based Hydrogel as Delivery System for Therapeutic Bacterial RNase. *Polymers (Basel)* 2022; 12:1-15. doi: 10.3390/polym14122461.
- Cao H, Duan L, Zhang Y, Cao J, Zhang K. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduct Target Ther* 2021;426: 1-31. doi: 10.1038/s41392-021-00830-x.
- EFSA Panel on Food Additives and Flavourings (FAF); Younes M, Aquilina G, Castle L, Engel KH, Fowler P, Fürst P, Gürtler R, Gundert-Remy U, Husøy T, Mennes

- W, Moldeus P, Oskarsson A, Shah R, Waalkens-Berendsen I, Wölfle D, Boon P, Crebelli R, Di Domenico A, Filipič M, Mortensen A, Van Loveren H, Woutersen R, Giarola A, Lodi F, Riolo F, Frutos Fernandez MJ. Re-evaluation of hydrochloric acid (E 507), potassium chloride (E 508), calcium chloride (E 509) and magnesium chloride (E 511) as food additives. *EFSA J* 2019; 17:e05751. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5751.
- Fayyazbakhsh F, Khayat MJ, Leu MC. 3D-Printed Gelatin-Alginate Hydrogel Dressings for Burn Wound Healing: A Comprehensive Study. *Bioprint* 2022; 8:1-10. doi: 10.18063/ijb.v8i4.618.
- Florea AM, Splettstoesser F, Dopp E, Rettenmeier AW, Büsselberg D. Modulation of intracellular calcium homeostasis by trimethyltin chloride in human tumour cells: neuroblastoma SY5Y and cervix adenocarcinoma HeLa S3. *Toxicology* 2005; 216:1-8. doi: 10.1016/j.tox.2005.05.029.
- Gonzalez-Pujana A, Rementeria A, Blanco FJ, Igartua M, Pedraz JL, Santos-Vizcaino E, Hernandez RM. The role of osmolarity adjusting agents in the regulation of encapsulated cell behavior to provide a safer and more predictable delivery of therapeutics. *Drug Deliv* 2017; 24:1654-1666. doi: 10.1080/10717544.2017.1391894.
- Goodarzi P, Falahzadeh K, Nematizadeh M, Farazandeh P, Payab M, Larijani B, Tayanloo Beik A, Arjmand B. Tissue Engineered Skin Substitutes. *Adv Exp Med Biol* 2018; 1107:143-188. doi: 10.1007/5584_2018_226.
- Hama R, Ulziibayar A, Reinhardt JW, Watanabe T, Kelly J, Shinoka T. Recent Developments in Biopolymer-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Biomolecules* 2023; 13:1-16. doi: 10.3390/biom13020280.

- Hamouda RA, Salman AS, Alharbi AA, Alhasani RH, Elshamy MM. Assessment of the Antigenotoxic Effects of Alginate and ZnO/Alginate-Nanocomposites Extracted from Brown Alga *Fucus vesiculosus* in Mice. *Polymers (Basel)* 2021; 13:1-15. doi: 10.3390/polym13213839.
- Ishidate M Jr, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M, Matsuoka A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem Toxicol* 1984; 22:623-36. doi: 10.1016/0278-6915(84)90271-0.
- Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 2012; 1:106-126. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- Liang J, Cui L, Li J, Guan S, Zhang K, Li J. Aloe vera: A Medicinal Plant Used in Skin Wound Healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2021; 5:455-474. doi: 10.1089/ten.TEB.2020.0236.
- Ma X, Vacek I, Sun A. Generation of alginate-poly-L-lysine-alginate (APA) biomicrocapsules: the relationship between the membrane strength and the reaction conditions. *Biotechnol* 1994; 22:43-69. doi: 10.3109/10731199409117399.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113:173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; 455:29-60. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6.
- OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

- Reig-Vano B, Tylkowski B, Montané X, Giamberini M. Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. *Int J Biol Macromol* 2021; 170:424-436. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.161.
- Rong JJ, Liang M, Xuan FQ, Sun JY, Zhao LJ, Zheng HZ, Tian XX, Liu D, Zhang QY, Peng CF, Li F, Wang XZ, Han YL, Yu WT. Thrombin-loaded alginate-calcium microspheres: A novel hemostatic embolic material for transcatheter arterial embolization. *Int J Biol Macromol* 2017; 104:1302-1312. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.020.
- Shafei S, Khanmohammadi M, Heidari R, Ghanbari H, Taghdiri Nooshabadi V, Farzamfar S, Akbariqomi M, Sanikhani NS, Absalan M, Tavoosidana G. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: An in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2020; 108:545-556. doi: 10.1002/jbm.a.36835.
- Sheng Y, Gao J, Yin ZZ, Kang J, Kong Y. Dual-drug delivery system based on the hydrogels of alginate and sodium carboxymethyl cellulose for colorectal cancer treatment. *Carbohydr Polym* 2021; 269:1-8. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118325.
- Sierra-Sánchez Á, Kim KH, Blasco-Morente G, Arias-Santiago S. Cellular human tissue-engineered skin substitutes investigated for deep and difficult to heal injuries. *NPJ Regen Med* 2021; 1:1-9. doi: 10.1038/s41536-021-00144-0.
- Sosnik A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. *ISRN Pharm* 2014;1:1-18. doi: 10.1155/2014/926157.
- Su X, Wang T, Guo S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regen Ther* 2021;16:63-72. doi: 10.1016/j.reth.2021.01.007.

- Sulé-Suso J, Forster A, Zholobenko V, Stone N, El Haj A. Effects of CaCl₂ and MgCl₂ on Fourier transform infrared spectra of lung cancer cells. *Appl Spectrosc* 2004; 58:61-7. doi: 10.1366/000370204322729487.
- Thomas D, Mathew N, Nath MS. Starch modified alginate nanoparticles for drug delivery application. *Int J Biol Macromol* 2021; 173:277-284. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.227.
- Ullah F, Othman MB, Javed F, Ahmad Z, Md Akil H. Classification, processing, and application of hydrogels: A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 57:414-33. doi: 10.1016/j.msec.2015.07.053.
- Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2017; 33: 59-75. doi: 10.22203/eCM.v033a05.
- Wilson V. Growth and Differentiation of HaCaT Keratinocytes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2013; 1195:33-41. https://doi.org/10.1007/7651_2013_42
- Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater* 2017; 57:1-25. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.036.
- Zhang M, Zhao X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. *Macromol* 2020; 162:1414-1428. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311.

Capítulo 2

**Hidrogéis de Alginato carregados com Exossomos como Moduladores da
Migração de Células de Melanoma B16-F10**

RESUMO

Os exossomos têm atraído crescente atenção como agentes terapêuticos no tratamento do câncer devido à sua capacidade de modular respostas imunes e influenciar fenótipos de células-alvo. No entanto, seu papel na biologia tumoral é determinado por diversos fatores, como a fonte das células-tronco mesenquimais (CTMs), as condições de cultivo e o microambiente tumoral. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de exossomos derivados de CTMs da medula óssea de ratos Sprague-Dawley, incorporados em hidrogéis de alginato (HA), na migração e viabilidade de células de melanoma murino (B16-F10). A análise por microscopia eletrônica de varredura confirmou que os hidrogéis preservaram sua integridade estrutural após a incorporação dos exossomos. Tanto HA quanto os hidrogéis carregados com exossomos (HAE) não apresentaram efeitos citotóxicos, uma vez que a viabilidade e a capacidade de formação de colônias das células B16-F10 permaneceram semelhantes às dos controles não tratados. Entretanto, o HAE inibiu significativamente a migração celular, uma etapa crucial para a metástase, enquanto o HA não demonstrou tal efeito. Esses achados indicam que os exossomos mantiveram sua funcionalidade dentro da matriz do hidrogel, modulando de forma eficaz a migração tumoral. O estudo destaca o potencial terapêutico de hidrogéis carregados com exossomos na regulação do comportamento de células tumorais, embora sejam necessárias investigações adicionais para compreender os mecanismos moleculares envolvidos e otimizar sua aplicação clínica.

Palavras-chave: Exossomos; Hidrogéis de alginato; Terapia do câncer; Migração celular; Viabilidade celular.

ABSTRACT

Exosomes have gained increasing attention as promising therapeutic agents in cancer treatment due to their ability to modulate immune responses and influence target cell phenotypes. However, their role in tumor biology is influenced by various factors, including the source of mesenchymal stem cells (MSCs), culture conditions, and the tumor microenvironment. This study aimed to evaluate the effects of exosomes derived from rat Sprague-Dawley bone marrow MSCs, incorporated into alginate hydrogels (AH), on the migration and viability of murine melanoma cells (B16-F10). Scanning electron microscopy confirmed that the hydrogels preserved their structural integrity after exosome incorporation. Both plain AH and exosome-loaded AH (AHE) exhibited no cytotoxic effects, as the viability and colony-forming ability of B16-F10 cells remained comparable to untreated controls. Notably, AHE significantly inhibited tumor cell migration, a critical step in cancer metastasis, whereas AH alone showed no such effect. These findings suggest that exosomes retained their functionality within the hydrogel matrix, effectively modulating tumor cell migration. This study highlights the therapeutic potential of exosome-loaded hydrogels in regulating tumor cell behavior. However, further research is needed to elucidate the underlying molecular mechanisms and optimize the clinical application of exosome-integrated hydrogels.

Keywords: Exosomes; Alginate hydrogels; Cancer therapy; Cell migration; Cell viability.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

B16-F10 - Células tumorais de melanoma murino;

CaCl₂ - Cloreto de cálcio;

CTMs - Células-tronco mesenquimais;

CoFe₂O₄ - Ferrita de cobalto;

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Eagle Modificado de Dulbecco);

DMSO – Dimetilsulfóxido;

FS – Fração de sobrevivência;

HAE – Hidrogel de alginato com exossomos;

HA - Hidrogel de alginato;

MHC I - Moléculas de classe I do complexo de histocompatibilidade;

MMS – Metilmetanossulfonato;

PBS - *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato);

SFB – Soro fetal bovino;

TGF-β - Transformador-β;

VEs - Vesículas extracelulares.

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
Figura 1 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de HA (A), HAE (B), uma análise ampliada da região em (B) indicada por setas, destacando os exossomos na estrutura do hidrogel (C), e os resultados da análise de viscosidade (D).....	55
Figura 2 - Viabilidade celular (%) de células B16-F10 após tratamento de 48 horas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.....	56
Figura 3 - Fração de sobrevivência (%) de células B16-F10 após tratamento de 24 e 48 horas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.....	57
Figura 4 – Porcentagem de migração de células B16-F10 tratadas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.....	57

1. INTRODUÇÃO

O termo "câncer" abrange um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas por processos biológicos complexos, incluindo alterações na regulação do ciclo celular, perda de função celular e a migração e invasão de células mutadas em outros tecidos (Hausman et al., 2019; Haffner et al., 2021). Os principais mecanismos subjacentes à carcinogênese envolvem mutações que ativam oncogenes e desativam genes supressores de tumor. Essas mutações podem surgir de processos endógenos, como erros durante a replicação celular, herança genética, inflamação crônica e estresse oxidativo, ou de fatores exógenos, como exposição a agentes mutagênicos ou genotóxicos (Béliveau et al., 2007; George et al., 2017).

No Brasil, estima-se que 704 mil novos casos de câncer ocorram entre 2023 e 2025, com 483 mil casos excluindo o câncer de pele não melanoma, o tipo mais prevalente no país, representando cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados (INCA 2024).

Sobre o câncer de pele, o melanoma corresponde a aproximadamente 3% das neoplasias malignas da pele e apresenta o maior risco de metástase, sendo a forma mais grave da doença (Hausman et al., 2019; Haffner et al., 2021). Originado de células da linhagem de melanócitos, o melanoma é caracterizado por um padrão de crescimento invasivo e disseminação precoce. Embora fatores de risco endógenos, como pele clara e predisposição genética para múltiplos nevos, contribuam para seu desenvolvimento, a exposição à luz ultravioleta permanece como o fator de risco exógeno mais significativo (Lodde et al., 2020).

Os tratamentos para melanoma incluem a excisão cirúrgica da área afetada, com radioterapia e quimioterapia sendo abordagens padrão para estágios avançados

(INCA 2024). No entanto, esses tratamentos estão associados a toxicidade significativa e efeitos adversos, o que impulsiona a necessidade de estratégias terapêuticas inovadoras.

Os exossomos, uma classe de vesículas extracelulares (VEs) de origem endossomal e dimensões nanométricas, são mediadores da comunicação intercelular tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Essas vesículas podem conter DNA, RNA, lipídios, metabólitos, proteínas citosólicas e de superfície celular (Kugeratski et al., 2021). Estudos revelaram que o conteúdo molecular dos exossomos derivados de células saudáveis difere significativamente daqueles das células cancerígenas (Abdouh et al., 2017).

No contexto do câncer, os exossomos podem modular o microambiente tumoral, influenciando processos como imunossupressão, progressão tumoral e respostas às terapias existentes (Kugeratski et al., 2021; Xu et al., 2020). Exossomos podem expressar moléculas envolvidas na imunossupressão, como PD-L1 e fator de transformação do crescimento- β (TGF- β) (Daassi et al., 2020; Kugeratski et al., 2021). Além disso, exossomos de células dendríticas e tumorais foram encontrados expressando moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) e marcadores tumorais, como proteínas de choque térmico (HSPs). Essas moléculas estão implicadas na apresentação de antígenos e na ativação de células T, permitindo respostas antitumorais dependentes de células T CD8⁺ em estudos *in vitro* e *in vivo* (Li et al., 2006; Xu et al., 2020).

Diante dessas descobertas, este estudo tem como objetivo investigar os efeitos da terapia com hidrogel contendo exossomos derivados de células-tronco mesenquimais (CTMs) sobre a proliferação e migração *in vitro* de células de melanoma murino (B16-F10). Esta pesquisa busca contribuir para o entendimento das

respostas biológicas associadas às terapias baseadas em exossomos, fornecendo uma base científica para estudos futuros que explorem abordagens inovadoras para o tratamento do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do hidrogel de alginato (HA) contendo exossomos (HAE) derivados de células-tronco mesenquimais (CTMs) sobre a viabilidade, clonogenicidade e migração de células de melanoma murino (B16-F10) em ensaios *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- Incorporar exossomos em HA;
- Avaliar a morfologia dos hidrogéis por microscopia eletrônica de varredura e as propriedades reológicas dos hidrogéis HA e HAE;
- Avaliar o efeito dos hidrogéis sobre a viabilidade celular das células B16-F10, utilizando o ensaio de redução de resazurina;
- Determinar a influência dos hidrogéis na capacidade clonogênica das células B16-F10 por meio de ensaios de sobrevivência clonogênica;
- Analisar o efeito dos hidrogéis na migração celular das células B16-F10 utilizando o ensaio de arranhão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Hidrogéis de alginato com exossomos

Os exossomos foram isolados do meio condicionado de células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula óssea de ratos Sprague-Dawley utilizando cromatografia por exclusão de tamanho (colunas Izon qEVsingle SEC, Boston, EUA), seguindo a metodologia detalhada em estudos anteriores (Kamińska et al., 2023; Robinson et al., 2024). As amostras de exossomos foram armazenadas a -80 °C para preservar sua integridade. Esses exossomos foram incorporados em HA preparados usando uma solução de alginato de sódio a 1,5% (p/v) dissolvida em água. A suspensão de exossomos (25 µL) foi adicionada à solução de alginato (200 µL) à temperatura ambiente, seguida de reticulação com uma solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) a 0,1% para formar o hidrogel (Shafei et al., 2020). Os hidrogéis foram designados como HAE (hidrogéis contendo exossomos) e HA (hidrogéis de alginato sem exossomos), sendo o último utilizado como controle nos ensaios biológicos.

A morfologia da superfície dos hidrogéis foi analisada com um microscópio eletrônico de varredura (FEI Inspect S 50, no Laboratório de Caracterização Estrutural, UFSCar, Brasil). Os hidrogéis foram preparados e liofilizados a -50 °C para remover qualquer umidade residual. Posteriormente, foram seccionados e revestidos com uma fina camada de ouro para melhorar a condutividade. A avaliação microestrutural foi realizada com uma voltagem de aceleração de 2,0 kV. Testes reológicos foram realizados utilizando um reômetro Anton Paar RheoCompass MCR-92 para avaliar a influência da incorporação de exossomos na viscosidade do HA. Os testes foram realizados a 25 °C com uma geometria de placa de 50 mm de diâmetro e um intervalo

de 0,2 mm. As medições de viscosidade foram realizadas em uma faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 100 s⁻¹.

3.2 Linhagem celular e condições de cultura

A linhagem celular de melanoma murino B16-F10 (ATCC® CCL-6475™) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e cultivada em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco). As condições de incubação foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Durante o período experimental, a linhagem celular foi subcultivada por tripsinização ao atingir a confluência.

3.3 Viabilidade celular - Ensaio de redução de resazurina

A viabilidade das células B16-F10 foi avaliada usando o indicador metabólico resazurina (7-hidroxi-3*H*-fenoxazin-3-ona 10-óxido, Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA). A avaliação foi conduzida após tratamentos de 48 horas com HA e HAE (200 µL). As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade inicial de 1 × 10⁵ células/poço e incubadas por 24 horas para permitir a adesão celular, a formação de uma monocamada semiconfluente e a progressão para a fase de crescimento exponencial. Células não tratadas cultivadas em meio de cultura completo foram utilizadas como controle negativo, enquanto células expostas a 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) foram usadas como controle positivo para citotoxicidade. Após o período de tratamento, 0,01% (p/v) de resazurina foi adicionado a cada poço para análise (Page et al., 1993). As medições de fluorescência foram obtidas usando um leitor de microplacas Cytation (Biotek®) com filtros de excitação e emissão de 530 nm e 590 nm, respectivamente. A fluorescência de células não tratadas (controle

negativo) foi definida como 100% e utilizada como referência para o cálculo da porcentagem de células viáveis.

3.4 Ensaio de sobrevivência clonogênica

No ensaio de sobrevivência clonogênica, as células B16-F10 foram semeadas em placas de 6 poços em uma concentração inicial de 1×10^5 células/poço em 2 mL de meio de cultura completo e incubadas sob condições de cultivo por 24 horas. Após a incubação, as células foram tratadas com HA e HAE (400 μ L) por 24 e 48 horas. Células não tratadas cultivadas em meio DMEM completo foram utilizadas como controle negativo. No final do período de tratamento, as células foram lavadas, tripsinizadas e contadas usando uma câmara de Neubauer para obter uma suspensão contendo 200 células/poço. Essas células foram semeadas novamente em placas de 6 poços e incubadas novamente para permitir a formação de colônias a partir de células individuais. Após sete dias de cultivo, as colônias foram lavadas, fixadas com uma solução de metanol:ácido acético:água destilada (1:1:8) por 30 minutos, coradas com 2 mL de corante Giemsa (Sigma-Aldrich) diluído em tampão fosfato (1:20) por 20 minutos e contadas (Franken et al., 2006). O número de colônias no controle negativo foi considerado 100%, e as frações de sobrevivência (FS) para cada tratamento foram calculadas conforme a equação (1):

$$FS\% = \frac{\text{Número de colônias em cada tratamento}}{\text{Número de colônias do controle negativo}} \times 100 \quad (1)$$

3.5 Ensaio de migração celular

Para o ensaio de migração celular (ensaio de arranhão), as células B16-F10 foram semeadas a uma densidade de 1×10^6 células/poço em placas de cultura de

24 poços. Após atingirem confluência, uma área livre de células foi criada riscando a monocamada com a ponteira de uma pipeta estéril de 200 µL. O meio de cultura foi então substituído para remover detritos celulares, e as células foram tratadas com HA e HAE (200 µL). A migração celular para a área livre foi monitorada em 24 e 48 horas. Microfotografias foram capturadas utilizando uma câmera digital (DFC7000T) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMI8, Frankfurt, Alemanha). A migração foi quantificada utilizando o software de análise ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) e normalizada em relação à área inicial livre de células no tempo 0 (Martinotti et al., 2020).

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 7.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) utilizando análise de variância One way ANOVA para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos no capítulo 2 foram aceitos para publicação no periódico *International Journal of Advances in Medical Biotechnology* (<https://journalamb.com/index.php/jamb/>).

As microestruturas de HA e HAE, juntamente com os resultados da análise reológica de viscosidade, estão apresentados na Figura 1. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelam que o hidrogel de HA possui uma estrutura

interna uniforme e altamente porosa (Figura 1A). Após a incorporação do meio condicionado contendo exossomos, foram observadas alterações na morfologia do hidrogel, incluindo uma redução no tamanho dos poros (Figura 1B). Uma análise ampliada da área destacada na Figura 1B evidencia os exossomos integrados à matriz do HA (Figura 1C). Apesar da perda da forma esférica dos exossomos devido ao processo de liofilização, as imagens demonstram que a integridade das membranas externas foi preservada.

Além das mudanças estruturais, a incorporação de exossomos resultou em um aumento significativo na viscosidade do hidrogel, conforme demonstrado na Figura 1D. Esse aumento de viscosidade no HAE, em relação ao HA, é consistente com a maior densidade estrutural do hidrogel enriquecido com exossomos, reforçando a interação entre os exossomos e a matriz porosa.

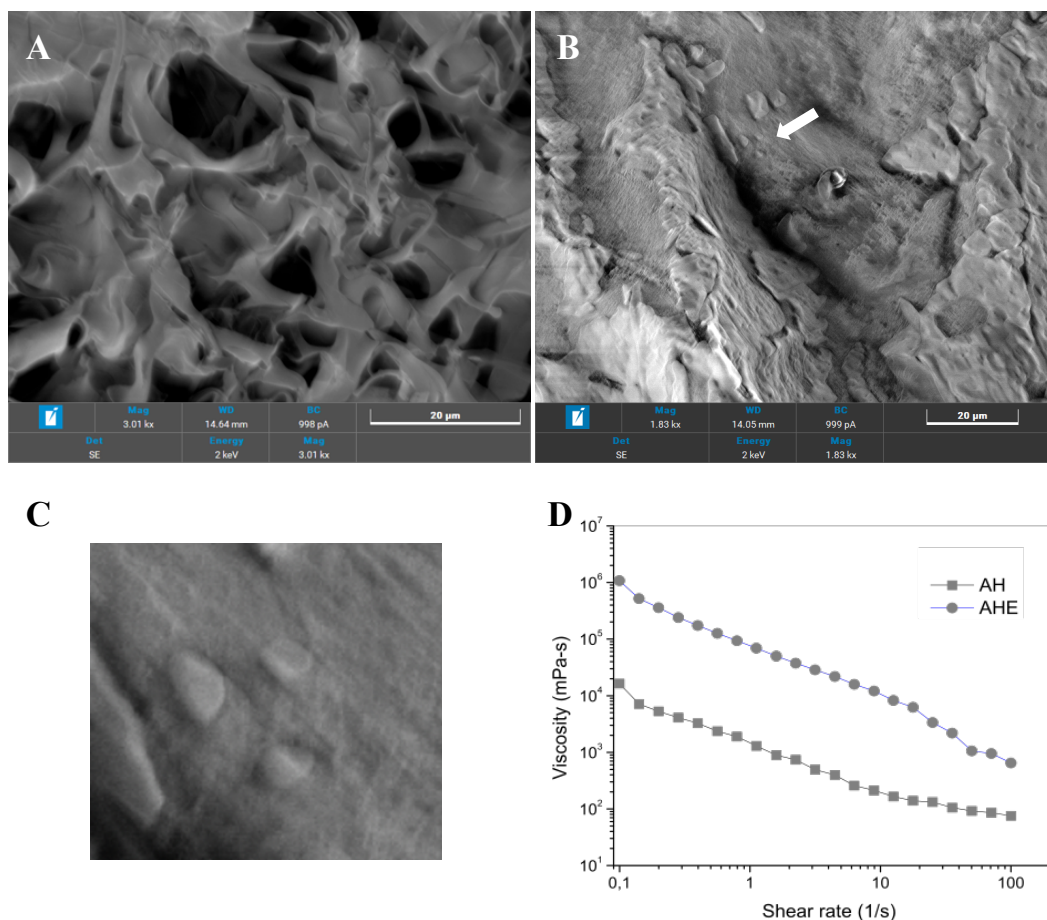


Figura 1. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de HA (A), HAE (B), uma análise ampliada da região em (B) indicada por setas, destacando os exossomos na estrutura do hidrogel (C), e os resultados da análise de viscosidade (D).

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular, avaliados por meio do ensaio de resazurina, e das frações de sobrevivência obtidas no ensaio de sobrevivência clonogênica não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo. Tanto HA quanto HAE não induziram redução na viabilidade das células B16-F10 (Figura 2), nem inibiram a formação de colônias (Figura 3), independentemente do tempo de tratamento (24 ou 48 horas), sugerindo que, nas condições testadas, nenhum dos hidrogéis exibiu efeitos citotóxicos na linhagem de células B16-F10.

Apesar disso, o ensaio de migração celular revelou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos. Enquanto o HA não interferiu na migração das células B16-F10, o HAE mostrou uma inibição significativa da migração celular em comparação ao controle negativo (meio de cultura suplementado com 10% de SFB). Esse efeito inibitório foi evidente no tempo de análise de 48 horas (Figura 4), indicando que o HAE possui um potencial modulador sobre o comportamento migratório das células tumorais.

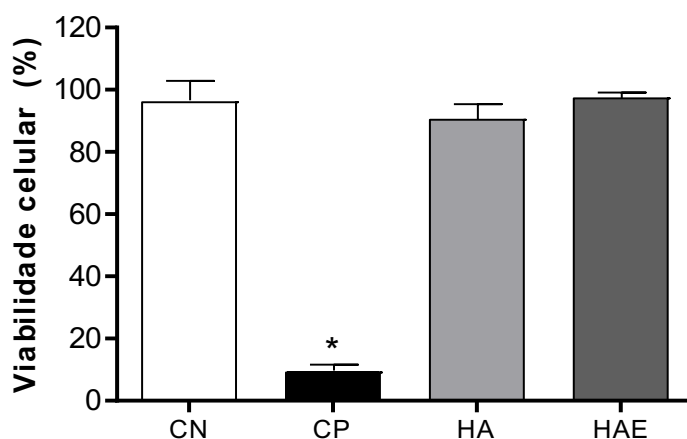


Figura 2 - Viabilidade celular (%) de células B16-F10 após o tratamento de 48 horas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal, 100% de viabilidade celular); CP: controle positivo (dimetilsulfóxido 50%); Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. *Estatisticamente diferente de CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

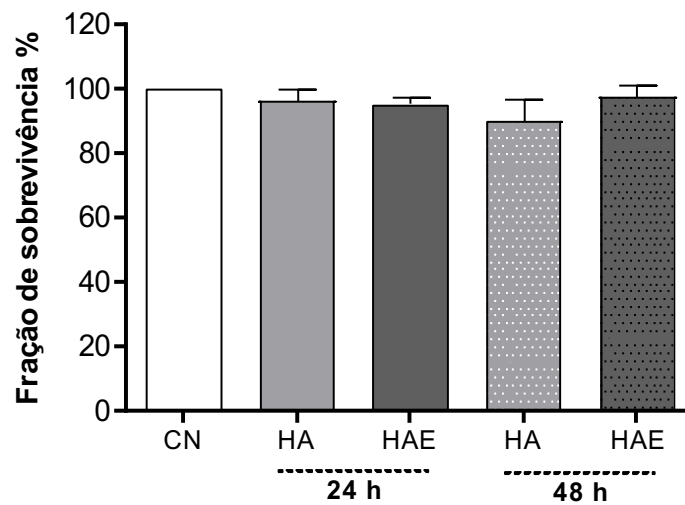


Figura 3 - Fração de sobrevivência (%) de células B16-F10 após o tratamento de 24 e 48 horas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal, 100% de viabilidade celular). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes.

*Estatisticamente diferente de CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

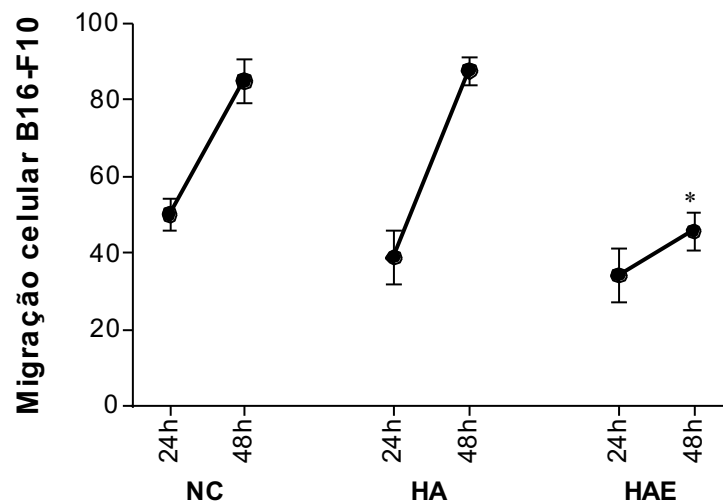


Figura 4 – Porcentagem de migração de células B16-F10 tratadas com hidrogel de alginato de sódio incorporado (HAE) ou não (HA) com exossomos.

*A zona livre de células nos pontos de estudo designados foi normalizada em relação àquela obtida em 0 h. CN, controle negativo (meio de cultura com 10% de soro fetal bovino). *Estatisticamente diferente de CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).*

5. DISCUSSÃO

Os exossomos têm se destacado como candidatos promissores na terapia contra o câncer devido à sua capacidade de modular respostas imunológicas e transferir cargas moleculares que podem influenciar o fenótipo de células-alvo. No entanto, essas vesículas apresentam uma natureza dual na biologia do câncer, atuando como mediadores parácrinos que tanto podem promover quanto suprimir a progressão tumoral (Xu et al., 2020; Yang et al., 2023).

Estudos mostram que, embora os exossomos derivados de CTMs possam facilitar a progressão tumoral ao transferirem moléculas sinalizadoras, como miRNAs, que ativam vias como ERK1/2 em tumores sólidos (Zhu et al., 2012; Du et al., 2014; Zhao et al., 2019; Zhou et al., 2021), eles também podem exercer efeitos antitumorais ao transportar miRNAs, proteínas e RNAs longos não codificantes (lncRNAs) que suprimem a proliferação de células cancerígenas e induzem apoptose (Wu et al., 2013; Bruno et al., 2013; Furuta et al., 2016; Reza et al., 2016; Takahara et al., 2016; Maffey et al., 2017; Zhang et al., 2020). Esses efeitos opostos ressaltam a complexidade do uso terapêutico de exossomos derivados de CTMs no câncer, uma vez que a eficácia na terapia é influenciada por fatores como a origem das CTMs, condições de cultivo, os métodos de extração de exossomos e as características do microambiente tumoral (Yang et al., 2023).

Dada essa complexidade, é essencial padronizar protocolos para o cultivo de CTMs e o isolamento de exossomos a fim de elucidar seus efeitos em diferentes tipos

de câncer (Yang et al., 2023). Nesse contexto, o presente estudo investigou os efeitos de exossomos derivados de CTMs da medula óssea de ratos Sprague-Dawley incorporados em hidrogéis de alginato (HA), particularmente na modulação da migração e viabilidade de células de melanoma murino (B16-F10).

Os resultados obtidos demonstraram que os HA (1,5% p/v) utilizados neste estudo atuaram como uma plataforma para a incorporação dos exossomos, oferecendo um ambiente protetor que potencialmente contribui para sua estabilidade. A análise reológica revelou que a presença de exossomos aumentou significativamente a viscosidade do hidrogel, indicando uma matriz mais densa e coesa. Isso sugere que o hidrogel foi capaz de integrar os exossomos, preservando sua funcionalidade como um sistema de suporte. Além disso, a rápida degradação dos HA os torna especialmente adequados para estudos de curto prazo (dados apresentados no Capítulo 1), permitindo a liberação eficaz dos exossomos enquanto mantém sua atividade biológica. Embora essas evidências sejam corroboradas por análises reológicas e estruturais, são necessários ensaios moleculares e funcionais adicionais para validar de forma conclusiva a estabilidade e a integridade dos exossomos dentro dessa matriz. Esses estudos complementares são fundamentais para confirmar o potencial do sistema como uma abordagem terapêutica eficaz.

Os dados mostraram que tanto HA quanto HAE não induziram citotoxicidade em células B16-F10. A viabilidade celular e a capacidade de formação de colônias das células tratadas com HA e HAE permaneceram comparáveis ao grupo controle não tratado, indicando que os exossomos não afetaram a capacidade proliferativa dessas células. No entanto, um efeito inibitório significativo na migração celular foi observado com o tratamento HAE. A migração celular é um processo essencial em várias funções fisiológicas, como desenvolvimento tecidual, resposta imune,

cicatrização de feridas e, no contexto oncológico, a metástase, um dos principais marcadores de malignidade tumoral (Morales et al., 2021). Enquanto o HA não influenciou a migração das células de melanoma, HAE suprimiu de maneira eficaz o movimento celular, destacando o potencial dos exossomos derivados de CTMs na regulação da migração de células tumorais.

Estudos têm demonstrado que exossomos derivados de CTMs podem reduzir a angiogênese, um processo essencial para o crescimento tumoral, ao modular negativamente fatores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o CD31, ambos marcadores críticos da angiogênese (Lee et al., 2013; Pakravan et al., 2017).

Em um estudo realizado por Pakravan et al. (2017), a transferência exosomal do miR-100 de CTMs para células de câncer de mama reduziu, de forma dose-dependente, a expressão de VEGF, suprimindo a angiogênese *in vitro*. Essa inibição foi atribuída à modulação da via de sinalização mTOR/HIF-1 α nas células tumorais. Além disso, o meio condicionado de células de câncer de mama tratadas com exossomos de CTMs demonstrou reduzir a migração e proliferação de células endoteliais, destacando o papel inibitório desses exossomos na angiogênese.

Outros estudos mostraram que CTMs que expressam miR-146b secretam exossomos carregados com miR-146b. Esse miRNA direciona o mRNA do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), reduzindo a expressão de EGFR e NF- κ B em células de glioma, o que inibe a migração e a invasão celular. Além disso, essa entrega exosomal de miR-146b resultou em redução do volume tumoral *in vivo* (Katakowski et al., 2013). De maneira semelhante, a entrega exosomal de miR-143 por CTMs humanas derivadas da medula óssea inibiu a migração de células de osteossarcoma, especificamente a linhagem celular 143B (Shimbo et al., 2014). Na

maioria dos casos, os exossomos induziram a parada do ciclo celular nas fases G0/G1 ou G2/M, limitando a proliferação celular tumoral (Shojaei et al., 2019).

Embora os mecanismos pelos quais os exossomos de CTMs inibem a migração de células de melanoma B16-F10 permaneçam pouco claros, estudos mostram insights sobre possíveis vias. Por exemplo, Otsu et al. (2009) demonstraram, em um modelo *in vivo* de melanoma, que a injeção de CTMs reduziu a expressão de marcadores endoteliais e a formação da vasculatura tumoral. Maestroni et al. (1999) observaram que a coinjeção de CTMs da medula óssea com células tumorais em camundongos C57BL/6 inibiu o crescimento tumoral e a formação de metástases nos modelos de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) e células de melanoma B16. Esses estudos sugerem que exossomos de CTMs podem desempenhar um papel fundamental na modulação da progressão tumoral e da metástase por meio de diversos mecanismos celulares e moleculares.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os exossomos derivados de CTMs de medula óssea incorporados em HA inibiram efetivamente a migração de células de B16-F10 sem afetar sua viabilidade, sugerindo um papel promissor no controle da metástase tumoral. Esses resultados ressaltam a necessidade de mais estudos para esclarecer as vias moleculares envolvidas e otimizar a aplicação clínica de hidrogéis integrados a exossomos no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS

- Abdouh M, Hamam D, Gao ZH, Arena V, Arena M, Arena GO. Exosomes isolated from cancer patients' sera transfer malignant traits and confer the same phenotype of primary tumors to oncosuppressor-mutated cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017; 36: 113. doi: 10.1186/s13046-017-0587-0.
- Béliveau R, Gingras D. Role of nutrition in preventing cancer. *Can Fam Physician.* 2007; 11: 1905-11.
- Bruno S, Collino F, Deregibus MC, Grange C, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth. *Stem Cells Dev.* 2013; 5: 758-71. doi: 10.1089/scd.2012.0304.
- Daassi D, Mahoney KM, Freeman GJ. The importance of exosomal PDL1 in tumour immune evasion. *Nat Rev Immunol.* 2020; 4: 209-215. doi: 10.1038/s41577-019-0264-y.
- Du T, Ju G, Wu S, Cheng Z, Cheng J, Zou X, Zhang G, Miao S, Liu G, Zhu Y. Microvesicles derived from human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote human renal cancer cell growth and aggressiveness through induction of hepatocyte growth factor. *PLoS One.* 2014; 5:e96836. doi: 10.1371/journal.pone.0096836.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc.* 2006; 5: 2315-9. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
- Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Promote Fracture Healing in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med.* 2016; 12: 1620-1630. doi: 10.5966/sctm.2015-0285.

- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem.* 2017; 45:1-14. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.11.007.
- Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, True LD, Nelson WG, Epstein JI, De Marzo AM, Nelson PS, Yegnasubramanian S. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* v. 2, n. 18, p.79-92, 2021. doi: 10.1038/s41585-020-00400-w.
- Hausman DM. What Is Cancer? *Perspect Biol Med.* 2019; 4: 778-784. doi: 10.1353/pbm.2019.0046.
- INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer. 2022. www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2022-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. [accessed 14 november 2024].
- Kamińska K, Godakumara K, Świdarska B, Malinowska A, Midekessa G, Sofińska K, Barbasz J, Fazeli A, Grzesiak M. Characteristics of size-exclusion chromatography enriched porcine follicular fluid extracellular vesicles. *Theriogenology.* 2023; 1:79-86. doi: 10.1016/j.theriogenology.2023.04.010.
- Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, Shu W, Jiang F, Chopp M. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett.* 2013; 1:201-4. doi: 10.1016/j.canlet.2013.02.019.
- Kugeratski FG, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS J.* 2021; 1:10-35. doi: 10.1111/febs.15558.
- Lee JK, Park SR, Jung BK, Jeon YK, Lee YS, Kim MK, Kim YG, Jang JY, Kim CW. Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by

- down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS One*. 2013; 12:p.e84256. doi: 10.1371/journal.pone.0084256.
- Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med*. 2006 Apr-Jun;10(2):364-75. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00405.x.
- Lodde G, Zimmer L, Livingstone E, Schadendorf D, Ugurel S. Malignes Melanom [Malignant melanoma]. *Hautarzt*. 2020; 3: 63-77. doi: 10.1007/s00105-019-04514-0.
- Maestroni GJ, Hertens E, Galli P. Factor(s) from nonmacrophage bone marrow stromal cells inhibit Lewis lung carcinoma and B16 melanoma growth in mice. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 4: 663-7. doi: 10.1007/s000180050322.
- Maffey A, Storini C, Diceglie C, Martelli C, Sironi L, Calzarossa C, Tonna N, Lovchik R, Delamarche E, Ottobrini L, Bianco F. Mesenchymal stem cells from tumor microenvironment favour breast cancer stem cell proliferation, cancerogenic and metastatic potential, via ionotropic purinergic signalling. *Sci Rep*. 2017; 1: 13162. doi: 10.1038/s41598-017-13460-7.
- Martinotti S, Ranzato E. Scratch Wound Healing Assay. *Methods Mol Biol*. 2020; 1:225-229. doi: 10.1007/7651_2019_259.
- Morales X, Cortés-Domínguez I, Ortiz-de-Solorzano C. Modeling the Mechanobiology of Cancer Cell Migration Using 3D Biomimetic Hydrogels. *Gels*. 2021;1:1-17. doi: 10.3390/gels7010017.
- Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009;18:4197-205. doi: 10.1182/blood-2008-09-176198.

- Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol*. 1993; 3: 473-6.
- Pakravan K, Babashah S, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Mossahebi-Mohammadi M, Ataei F, Dana N, Javan M. MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses *in vitro* angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017; 5:457-470. doi: 10.1007/s13402-017-0335-7.
- Reza AMMT, Choi YJ, Yasuda H, Kim JH. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Sci Rep*. 2016; 1: 38498. doi: 10.1038/srep38498.
- Robinson SD, Samuels M, Jones W, Stewart N, Eravci M, Mazarakis NK, Gilbert D, Critchley G, Giamas G. Confirming size-exclusion chromatography as a clinically relevant extracellular vesicles separation method from 1mL plasma through a comprehensive comparison of methods. *BMC Methods*. 2024; 1:1-10. <https://doi.org/10.1186/s44330-024-00007-2>.
- Shafei S, Khanmohammadi M, Heidari R, Ghanbari H, Taghdiri Nooshabadi V, Farzamfar S, Akbariqomi M, Sanikhani NS, Absalan M, Tavoosidana G. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: An *in vivo* study. *J Biomed Mater Res A*. 2020; 3: 545-556. doi: 10.1002/jbm.a.36835.
- Shimbo K, Miyaki S, Ishitobi H, Kato Y, Kubo T, Shimose S, Ochi M. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 2: 381-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.007.

- Shojaei S, Hashemi SM, Ghanbarian H, Salehi M, Mohammadi-Yeganeh S. Effect of mesenchymal stem cells-derived exosomes on tumor microenvironment: Tumor progression versus tumor suppression. *J Cell Physiol.* 2019; 4: 3394-3409,. doi: 10.1002/jcp.27326.
- Takahara K, li M, Inamoto T, Nakagawa T, Ibuki N, Yoshikawa Y, Tsujino T, Uchimoto T, Saito K, Takai T, Tanda N, Minami K, Uehara H, Komura K, Hirano H, Nomi H, Kiyama S, Asahi M, Azuma H. microRNA-145 Mediates the Inhibitory Effect of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells on Prostate Cancer. *Stem Cells Dev.* 2016; 17:1290-8,. doi: 10.1089/scd.2016.0093.
- Wu S, Ju GQ, Du T, Zhu YJ, Liu GH. Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One.* 2013;8:1-15,. doi: 10.1371/journal.pone.0061366.
- Xu K, Zhang C, Du T, Gabriel ANA, Wang X, Li X, Sun L, Wang N, Jiang X, Zhang Y. Progress of exosomes in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2021;134: 111111,. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111111.
- Xu Z, Zeng S, Gong Z, Yan Y. Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment. *Mol Cancer.* 2020;19:160. doi: 10.1186/s12943-020-01278-3.
- Yang E, Jing S, Wang Y, Wang H, Rodriguez R, Wang Z. The Role of Mesenchymal Stem Cells and Exosomes in Tumor Development and Targeted Antitumor Therapies. *Stem Cells Int.* 2023;1:7059289,. doi: 10.1155/2023/7059289.
- Zhang F, Lu Y, Wang M, Zhu J, Li J, Zhang P, Yuan Y, Zhu F. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells transfer miR-222-3p to suppress acute myeloid leukemia cell proliferation by targeting IRF2/INPP4B. *Mol Cell Probes.* 2020;1:101513. doi: 10.1016/j.mcp.2020.101513.

- Zhao W, Qin P, Zhang D, Cui X, Gao J, Yu Z, Chai Y, Wang J, Li J. Long non-coding RNA PVT1 encapsulated in bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promotes osteosarcoma growth and metastasis by stabilizing ERG and sponging miR-183-5p. *Aging (Albany NY)*. 2019;21: 9581-9596. doi: 10.18632/aging.102406.
- Zhou T, Yuan Z, Weng J, Pei D, Du X, He C, Lai P. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol*. 2021;1: 24. doi: 10.1186/s13045-021-01037-x.
- Zhu W, Huang L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M, Qian H, Xu W. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. *Cancer Lett*. 2012; 1:28-37,. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.002.

Capítulo 3

**Hidrogéis de Alginato de Sódio Carregados com Vesículas Extracelulares
Derivadas de Células-Tronco Mesenquimais: Um Biomaterial Promissor para
Promover a Cicatrização de Feridas e a Regeneração da Pele**

RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo complexo frequentemente prejudicado em ferimentos graves, como feridas crônicas e queimaduras, exigindo abordagens terapêuticas inovadoras. Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) têm se mostrado promissoras na modulação de vias celulares importantes, mas sua aplicação clínica é limitada pela baixa biodisponibilidade e estabilidade. Este estudo teve como objetivo avaliar a segurança e eficácia de hidrogéis de alginato de sódio (HAS-VEs) carregados com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais para cicatrização de feridas, com foco em triagem pré-clínica *in vitro*, migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade e potencial de irritação. CTMs-VEs derivadas da medula óssea de ratos Sprague-Dawley foram isoladas pela técnica de cromatografia de exclusão de tamanho do meio condicionado coletado em quatro tempos diferentes (24, 36, 48 e 60 horas) e caracterizadas por *Nano Tracking Analysis* (NTA), *Dynamic Light Scattering* (DLS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A maior concentração de CTMs-VEs foi obtida do meio condicionado coletado em 36 horas, com tamanhos consistentemente abaixo de 200 nm, confirmando a eficiência do método de isolamento. A caracterização confirmou a incorporação bem-sucedida de CTMs-VEs em hidrogéis com propriedades viscoelásticas desejáveis. Ensaio biológicos demonstraram que HAS-VEs estimularam a migração de células HaCaT e exibiram baixa citotoxicidade em modelos 2D e 3D, sem efeitos genotóxicos ou mutagênicos. Ensaio HET-CAM confirmaram a ausência de potencial de irritação. Essas descobertas promissoras destacam o potencial dos HAS-VEs como um biomaterial seguro e eficaz para melhorar a cicatrização de feridas e a regeneração da pele, abrindo caminho para mais pesquisas em aplicações de engenharia de tecidos.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais; Hidrogéis de alginato de sódio; Migração celular; Citotoxicidade; Genotoxicidade.

ABSTRACT

Wound healing is a complex process often impaired in severe injuries such as chronic wounds and burns, requiring innovative therapeutic approaches. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles (MSCs-EVs) have shown promise in modulating key cellular pathways, but their clinical application is limited by low bioavailability and stability. This study aimed to evaluate the safety and efficacy of sodium alginate hydrogels (SAH-EVs) loaded with mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for wound healing, focusing on *in vitro* preclinical screening, cell migration, cytotoxicity, genotoxicity, and irritation potential. MSCs-EVs derived from bone marrow of Sprague-Dawley rats were isolated from the conditioned medium collected at four different time points (24, 36, 48, and 60 hours) utilizing the size exclusion chromatography (SEC) technique and characterized by Nano Tracking Analysis (NTA), Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The highest MSCs-EVs concentration was obtained from the conditioned medium collected at 36 hours, with sizes consistently below 200 nm, confirming the efficiency of the isolation method. Characterization confirmed successful MSCs-EVs incorporation into hydrogels with desirable viscoelastic properties. Biological assays demonstrated that SAH-EVs stimulated HaCaT cell migration and exhibited low cytotoxicity in 2D and 3D models, with no genotoxic or mutagenic effects. HET-CAM assays confirmed the absence of irritation potential. These promising findings highlight the potential of SAH-EVs as a safe and effective biomaterial for enhancing wound healing and skin regeneration paving the way for further exploration in tissue engineering applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles; Sodium alginate hydrogels; Cell migration; Cytotoxicity; Genotoxicity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CaCl₂ - Cloreto de cálcio;

CAM - Membrana corioalantoica;

CTMs - Células-tronco mesenquimais;

CTMS-Ves- vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais

CoFe₂O₄ - Ferrita de cobalto;

DLS - *Dynamic Light Scattering*;

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

FS – Fração de sobrevivência;

HaCaT - Queratinócitos imortais de pele humana;

HAE – HAS carregada com CTMs-VEs;

HAS - Hidrogel de alginato de sódio;

HDFs - Fibroblastos dérmicos humanos;

HET-CAM - Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane

HGF - Fator de crescimento de hepatócitos;

HUVECs - Células endoteliais da veia umbilical humana;

HSP - Proteínas de choque térmico;

IL-6 - Interleucina-6;

IM – Índice de mutagenicidade;

IPBC - Índice de proliferação com bloqueio de citocinese;

IPSC - Células-tronco pluripotentes induzidas;

MEV - Microscopia eletrônica de varredura;

MHC I - Moléculas de classe I do complexo de histocompatibilidade;

MMS – Metilmetanossulfonato;

MN – Ensaio do micronúcleo;

NTA - *Nano Tracking Analysis*;

NHDF-1- Fibroblastos dérmicos;

PBS - Tampão fosfato salina;

SFB – Soro fetal bovino;

TGF- β - Transformador- β ;

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular;

VEs - Vesículas extracelulares

LISTA DE TABELAS	Pág.
Tabela 1 - Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) do meio condicionado de CTMs em 36 horas de cultura, analisadas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA; n = 5).....	94
Tabela 2 - Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação de bloqueio de citocinese (IPBC) em células HaCaT após 48 horas de tratamento com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas.....	99
Tabela 3 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (entre parênteses) das cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium TA98, TA100, TA102 e TA97a expostas a vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas.....	100

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1** – (A) Perfil temporal da concentração de vesículas extracelulares (VE) isoladas do meio condicionado de células-tronco mesenquimais (CTMs) em diferentes períodos de cultura (24, 36, 48 e 60 horas). (B) Distribuição de tamanho (em nanômetros) de VEs isoladas do meio condicionado de CTMs nos mesmos períodos de cultura. (C) Distribuição de tamanho de VE no meio condicionado obtido em 36 horas. As análises foram realizadas usando análise de rastreamento de nanopartículas (NTA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ 88
- Figura 2** - Caracterização reológica de hidrogéis de alginato com e sem vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMsVEs). (A) Curvas de viscosidade-taxa de cisalhamento. (B) Módulo de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') em função da deformação de cisalhamento. (C) Teste de frequência angular. Hidrogel contendo meio de cultura (HAS-CM); Hidrogéis de alginato de sódio (HAS); Hidrogel contendo CTMs-VEs (HAS-VEs)..... 90
- Figura 3** - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do (A) hidrogel de alginato de sódio e (B) hidrogel de alginato carregado com CTMs-VEs..... 91
- Figura 4** – (A) Porcentagem de migração de células HaCaT tratadas com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas. A área livre de

células em cada ponto de tempo foi normalizada para a medição inicial (0 h). CN representa o controle negativo (meio de cultura com 10% de soro bovino fetal). (B) Viabilidade celular (%) em culturas 2D e 3D e (C) Fração de sobrevivência (%) de células HaCaT após tratamento com CTMs-VEs e hidrogel de alginato de sódio (HAS-VEs e HAS).....

93

Figura 5 - Imagens estereomicroscópicas obtidas antes da aplicação da amostra (T0) e 5 minutos após a aplicação (T5) em CAMs inoculadas com controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 0,1 N), vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas.....

97

1. INTRODUÇÃO

Feridas crônicas e lesões cutâneas graves, como queimaduras, representam um desafio global significativo para a saúde, levando a gastos substanciais com saúde pública e impactando severamente a qualidade de vida dos pacientes. Essas condições são alarmantemente prevalentes, afetando aproximadamente 20 milhões de pessoas no mundo (Sharma et al., 2024).

O processo de cicatrização de feridas é uma sequência biológica complexa e altamente regulada que envolve fases interdependentes, incluindo hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual (Mascharak et al., 2022). Ao longo dessas fases, as células da pele (fibroblastos) e as células imunológicas interagem de várias maneiras, com cada interação desempenhando um papel distinto em estágios específicos para orquestrar e refinar o processo de cicatrização de feridas. No entanto, em casos de feridas graves, esse processo é frequentemente prejudicado e os tratamentos convencionais podem não ser bem-sucedidos. Conseqüentemente, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas mais eficientes, seguras e acessíveis (Kaplani et al., 2018; Kolimi et al., 2022; Falanga et al., 2022). Abordar essa questão requer estratégias terapêuticas inovadoras para melhorar o processo de cura, reduzir os custos de saúde e melhorar os resultados dos pacientes.

Uma área promissora na pesquisa de cicatrização de feridas e regeneração da pele envolve o uso de vesículas extracelulares (VEs), especialmente exossomos e microvesículas, que são um grupo de vesículas ligadas à membrana naturalmente liberadas pelas células (György et al., 2011). Os exossomos são um pequeno tipo de VE, com tamanho entre 30-150 nm e origem endossomal, e são os mediadores

essenciais da comunicação intercelular, influenciando vários processos fisiológicos e patológicos (Kugeratski et al., 2021). Ao transportar componentes intracelulares, eles regulam funções biológicas e servem como transportadores de substâncias ativas. Microvesículas, variando de 100 a 1.000 nm de tamanho, são diretamente eliminadas da superfície celular em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos e desempenham um papel crítico na comunicação intercelular ao fornecer carga bioativa, incluindo proteínas, lipídios, RNA e DNA, para células receptoras (Akers et al., 2013).

VEs derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) são particularmente notáveis por seu papel na mediação dos efeitos parácrinos das células-tronco, oferecendo uma abordagem terapêutica sem células com o potencial de melhorar a cicatrização de feridas (Ha et al., 2020). Estudos mostraram que CTMs-VEs modulam a expressão de moléculas-chave, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador β 1 (TGF- β 1), interleucina-6 (IL-6) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que são essenciais para imunomodulação e angiogênese (Tutuianu et al., 2021).

No entanto, apesar de seu potencial, as CTMs-VEs enfrentam desafios como baixa biodisponibilidade e estabilidade biológica, que limitam sua eficácia terapêutica (Zhang et al., 2022; Peng et al., 2023). Para lidar com essas limitações, os hidrogéis de alginato de sódio (HAS) surgiram como um sistema de entrega eficaz na engenharia de tecidos. Conhecido por sua biocompatibilidade e resposta imunológica favorável, o HAS é amplamente usado para entregar medicamentos, células, genes e proteínas, melhorando assim os resultados terapêuticos (Su et al., 2021; Sheng et al., 2021; Reig-Vano et al., 2021; Bogdanova et al., 2022). Suas propriedades anti-inflamatórias e capacidade de promover o crescimento celular os tornam candidatos

ideais para o tratamento de lesões de pele, servindo como um excelente curativo biológico (Aderibigbe et al., 2018; Zhang et al., 2020; Fayyazbakhsh et al., 2022).

A demanda por novas abordagens terapêuticas eficazes em engenharia de tecidos surge dos desafios associados ao tratamento de lesões cutâneas graves, como queimaduras ou feridas crônicas causadas por certas condições dermatológicas, onde o processo de cicatrização pode se tornar desregulado ou falhar completamente (Liang et al., 2021). Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência e a segurança de uma nova terapia baseada em HAS carregada com CTMs-VEs (HAS-VEs) realizando estudos de triagem pré-clínica *in vitro* de cicatrização de feridas cutâneas em células HaCaT, dado o papel fundamental dos queratinócitos na regeneração da pele. Além de avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e sua influência na migração de células HaCaT, o estudo também investigou o potencial mutagênico usando o teste de Ames e avaliou o potencial de irritação, fornecendo uma análise abrangente da segurança e eficácia terapêutica desses biomateriais inovadores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficiência e a segurança de uma nova terapia baseada em hidrogel de alginato de sódio (HAS) carregado com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) (HAS-VEs) por meio de estudos de migração celular, citotoxicidade, genotoxicidade e potencial de irritação.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar CTMs-VEs derivadas da medula óssea de ratos Sprague-Dawley pela técnica de cromatografia de exclusão de tamanho do meio condicionado coletado em quatro tempos diferentes (24, 36, 48 e 60 horas);
- Caracterizar as CTMs-VEs por análise de rastreamento de nanopartículas (*Nano Tracking Analysis*, NTA) e Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS);
- Incorporar as CTMs-VEs em HAS;
- Avaliar a morfologia dos hidrogéis por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e as propriedades reológicas dos hidrogéis HAS e HAS-VEs;
- Analisar o efeito dos hidrogéis e das CTMs-VEs na migração de queratinócitos (células HaCaT) utilizando o ensaio de arranhão, como indicador de seu potencial cicatrizante;
- Avaliar o efeito dos hidrogéis e das CTMs-VEs sobre a viabilidade das células HaCaT em monocamadas de células e em modelos celulares tridimensionais, utilizando o ensaio de redução de resazurina;
- Determinar a influência dos hidrogéis e das CTMs-VEs na capacidade clonogênica das células HaCaT por meio de ensaios de sobrevivência clonogênica;
- Investigar a genotoxicidade dos hidrogéis e das CTMs-VEs por meio do ensaio do micronúcleo em células HaCaT;
- Determinar o potencial mutagênico dos hidrogéis e das CTMs-VEs utilizando o teste de Ames;
- Avaliar o potencial de irritação dos hidrogéis e das CTMs-VEs por meio do ensaio HET-CAM.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolamento e Caracterização de MSCs-EVs

CTMs-VEs foram extraídas do meio condicionado de CTMs derivadas de medula óssea de ratos Sprague-Dawley cultivados em quatro tempos diferentes (24, 36, 48 e 60 horas). Para isolamento, o meio condicionado, armazenado a -80°C, foi filtrado em temperatura ambiente usando filtros de seringa (Sartorius Minisart High Flow PES, 28 mm Luer Lock, 0,22 µm, Sterile, Boston, EUA) para remover detritos celulares e partículas maiores. Após a filtração, o meio foi submetido à centrifugação diferencial (300 g por 10 minutos, depois 2.000 g por 20 minutos) a 4°C e concentrado usando filtros de ultrafiltração (Merck Millipore + Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). O meio concentrado foi então processado por cromatografia de exclusão de tamanho (colunas Izon qEVsingle SEC, Boston, EUA) e posteriormente concentrado usando filtros de ultrafiltração para obter a fração enriquecida de CTMs-VEs.

3.2. Caracterização das CTMS-VEs

As CTMs-VEs foram caracterizadas por NTA (Nanosight NS300) para determinar seu tamanho e distribuição. O diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das CTMs-VEs foram medidos a 25 °C e 37 °C usando espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) com um Zeta Sizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

3.3. Preparação e caracterização de hidrogéis de alginato de sódio com CTMs-VEs

Os hidrogéis de alginato de sódio (HAS) foram preparados usando uma solução de 1,5% (p/v) de alginato de sódio dissolvido em água (200 μL). Para obter o hidrogel contendo CTMs-VEs (HAS-VEs), 25 μL da fração enriquecida com CTMs-VEs foram adicionados à solução de alginato em temperatura ambiente. A mistura resultante foi reticulada pela adição de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,1%. Testes reológicos foram conduzidos usando um Anton Paar RheoCompass MCR-92 para avaliar o comportamento do fluxo dos hidrogéis. Esta análise comparou o hidrogel com CTMs-VEs a um hidrogel controle contendo apenas o meio de cultura sem CTMs-VEs. Os testes foram realizados a 25 °C com uma geometria de placa de 50 mm de diâmetro e um *gap* de 0,02 mm. As medições de viscosidade foram realizadas em uma faixa de taxa de cisalhamento de 1 a 100 s^{-1} . Testes de varredura de amplitude foram realizados em uma frequência angular constante de 1 rad/s, com a deformação de cisalhamento variando de 0 a 100 s^{-1} . A partir dessas medições, a região viscoelástica linear foi determinada, e a deformação constante de $\gamma_0 = 0,1\%$ foi então usada para realizar testes de varredura de frequência angular. Os últimos testes foram realizados em uma faixa de frequência angular constante de 1 rad/s. Além disso, a morfologia dos hidrogéis foi analisada usando um microscópio eletrônico de varredura (FEI Inspect S 50). Para isso, os hidrogéis foram liofilizados a -50 °C para eliminar a umidade, então cuidadosamente seccionados e revestidos com uma fina camada de ouro para melhorar a condutividade elétrica. A análise microestrutural foi conduzida sob uma voltagem de aceleração de 2,0 kV.

3.4. Células HaCaT

Para avaliar os efeitos dos HAS-VEs na viabilidade e comportamento das células HaCaT, a atividade citotóxica foi avaliada usando modelos de cultura de células em monocamada (2D) e esferoides (3D), complementados por um ensaio de sobrevivência clonogênica. Além disso, o ensaio de micronúcleo foi realizado para investigar os potenciais efeitos genotóxicos dos HAS-VEs, enquanto sua influência na migração celular, uma etapa crítica no processo de cicatrização de feridas, também foi avaliada.

As células HaCaT (ATCC® PCS-200-011™), uma linhagem de células de queratinócitos humanos imortalizados, foram escolhidas devido ao seu papel bem estabelecido na modelagem da homeostase e da fisiopatologia epidérmica (Colombo et al., 2017; Blanchard et al., 2023). Como os queratinócitos são o tipo de célula predominante na epiderme, as células HaCaT servem como um modelo relevante para a pesquisa de cicatrização de feridas (Li et al., 2019; Tricarico et al., 2018; Liu et al., 2022; Heebkaew et al., 2024). Essas células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio DMEM - Gibco Waltham, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco) a 37 °C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar sob umidade saturada.

3.5. Ensaio de migração celular

Para o ensaio de migração celular (ensaio de arranhão), células HaCaT foram cultivadas em uma densidade de 1×10^6 células/poço em uma placa de cultura de 24 poços e incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ em condições adequadas de cultivo celular, até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Após esse período, uma

área uniforme livre de células foi criada fazendo uma raspagem com a ponta de uma ponteira estéril de 200 µL. Os detritos celulares foram removidos trocando o meio de cultura. As células foram então tratadas com CTMs-VEs (25 µL), HAS e HAS-EVs (200 µL). A migração celular para a área livre de células foi monitorada em 24 e 48 horas. Microfotografias das células foram tiradas usando uma câmera digital (DFC7000T) acoplada a um microscópio óptico (Leica DMI8, Frankfurt, Alemanha). As imagens foram analisadas e quantificadas usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) e os resultados foram normalizados para a área da ferida em 0 horas.

3.6. Culturas de células 2D

As células HaCat foram cultivadas em monocamadas em uma densidade inicial de 1×10^5 células por poço em placas de 24 poços. As células não tratadas foram usadas como um controle negativo para representar a atividade metabólica basal, enquanto as células tratadas com 50% de dimetilsulfóxido (DMSO) serviram como um controle positivo para a morte celular. Os experimentos incluíram tratamentos com CTMs-VEs (25 µL), HAS e HAS-EVs (200 µL) durante um período de 48 horas. Os resultados foram revelados usando 0,01% (p/v) de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), que avalia a atividade metabólica celular (Page et al., 1993). A resazurina, inicialmente um corante azul não fluorescente, é reduzida ao composto rosa fluorescente resorufina por enzimas desidrogenase em células metabolicamente ativas (Rampersad, 2012). A viabilidade celular após os diferentes tratamentos foi calculada usando valores unitários de fluorescência obtidos do equipamento Cytation (Biotek®) com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm, considerando o controle negativo como 100%. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7. Culturas de esferoides

Esferoides de células HaCaT foram cultivados em placas de 96 poços previamente revestidas com meio DMEM e 1,5% de agarose. Após a solidificação do meio, o início da formação do esferoide foi realizado adicionando 200 µL de meio DMEM contendo 1×10^4 células HaCaT em cada poço. Esferoides estáveis foram formados após cinco dias de cultivo. Os esferoides foram então expostos a tratamentos com CTMs-VEs (12,5 µL), HAS e HAS-EVs (100 µL) por 48 horas. No final do período de tratamento, a viabilidade celular dos esferoides foi avaliada adicionando uma solução de resazurina (0,01%, p/v) a 100 µL de meio de cultura retirado de cada poço. Após uma incubação de 12 horas, a microplaca foi lida usando um espectrofotômetro (530Ex/590Em). A viabilidade do esferoide foi determinada usando valores de fluorescência, com o controle negativo definido como 100%.

3.8. Ensaio de sobrevivência clonogênica

Para avaliar a integridade reprodutiva das células HaCaT, foi conduzido um ensaio de sobrevivência de células clonogênicas. As células HaCaT foram inicialmente semeadas em uma concentração de 1×10^5 células por poço em placas de 6 poços. Após 24 horas de incubação para permitir a adesão celular, a formação de uma monocamada semiconfluyente e a progressão para a fase de crescimento exponencial, as células foram tratadas com CTMs-VEs (50 µL), HAS e HAS-EVs (400 µL) por 24 e 48 horas. O controle negativo consistiu em células cultivadas em meio DMEM completo sem qualquer tratamento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após o tratamento, essas células foram tripsinizadas e 200 células por poço foram então semeadas novamente em placas de 6 poços e incubadas sob

condições padronizadas de cultivo celular para permitir a formação de colônias a partir de células individuais. Após 7 dias de cultivo, as colônias foram coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich) e contadas (Franken et al., 2006). A fração de sobrevivência (FS) para cada tratamento foi calculada, considerando o número de colônias no controle negativo como 100%.

3.9. Ensaio de Micronúcleo (MN)

Neste ensaio, células HaCaT foram cultivadas em placas de 6 poços em uma concentração inicial de 1×10^5 células/poço e tratadas por 48 horas com CTMs-VEs (50 μ L), HAS e HAS-EVs (400 μ L), juntamente com controles experimentais de meio de cultura completo (controle negativo) e peróxido de hidrogênio (100 μ M, controle positivo). Citocalasina B (20 μ L, 6,25 μ M) foi adicionada 17 horas antes do final do tratamento para bloquear a citocinese. As células foram então tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em uma solução hipotônica fria (0,075 M KCl). Após mais centrifugação e ressuspensão em fixador de metanol: ácido acético (3:1), a suspensão celular foi gotejada em lâminas, corada com Giemsa e analisada em microscópio. Para cada tratamento, 1000 células binucleadas viáveis foram analisadas para a contagem de micronúcleos, seguindo os critérios de Fenech (2007). Além disso, 500 células viáveis/ tratamento/ repetição foram contadas entre mononucleares (mono), binucleares (bi) e multinucleares (três ou mais núcleos) para calcular o índice de proliferação de bloqueio de citocinese (IPBC). Este índice, que avalia a toxicidade celular ou atraso no ciclo celular, foi calculado de acordo com a equação (1) descrita pela OECD (2016). Três experimentos independentes foram conduzidos.

$$IPBC = \frac{[(n^{\circ} \text{ de céls mono}) + 2(n^{\circ} \text{ de céls bi}) + 3(n^{\circ} \text{ de céls multinucleares})]}{500} \quad (1)$$

3.10. Ensaio de mutação genética reversa com *Salmonella Typhimurium* (teste de Ames)

Para garantir uma avaliação mais abrangente da atividade mutagênica, o teste de Ames foi realizado usando o método de pré-incubação em cepas de *S. Typhimurium* TA98, TA100, TA102 e TA97a, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica (mistura S9, Molecular Toxicology, Inc) (Maron e Ames, 1983). Culturas bacterianas foram preparadas em caldo nutriente Oxoid No. 2 para uma densidade de 1×10^9 bactérias/mL (100 μ L) e incubadas por 20 minutos com a mistura S9 ou tampão fosfato (500 μ L), juntamente com as amostras de teste de CTMs-VEs (25 μ L), HAS e HAS-EVs (200 μ L). Depois, foi adicionado *top agar* contendo L-histidina e D-biotina (2 mL). As placas foram então incubadas por 48 horas, e as colônias revertentes foram contadas. Controles positivos foram usados para validar o ensaio, enquanto controle negativo estabeleceu a taxa de reversão espontânea de cada linhagem bacteriana. O índice de mutagenicidade (IM) foi calculado como a razão entre o número de revertentes por placa contendo a amostra de teste e o número de revertentes por placa do controle negativo. Um $IM \geq 2$ foi considerado indicativo de mutagenicidade (Mortelmans e Zeiger, 2000).

3.11. Ensaio de membrana corioalantóide de ovo de galinha (HET-CAM)

Para avaliar o potencial de irritação de HAS-EVs, o HET-CAM foi realizado. Nos experimentos, ovos de galinha fertilizados (Leghorn) provenientes da Globoaves Agro Avícola Ltda foram incubados horizontalmente em uma incubadora automática por 6 dias sob temperatura controlada ($37,5 \pm 0,5$ °C) e umidade relativa (55-65%). Ovos

não viáveis foram removidos no terceiro dia para garantir a fertilidade. No sexto dia, os ovos foram posicionados com a extremidade maior para cima, e a seção da casca acima da câmara de ar foi cuidadosamente removida. A membrana exposta foi umedecida com uma solução de NaCl a 0,9% e então removida suavemente. Os ovos foram divididos em grupos para tratamento: 0,1 M NaOH (padrão), solução salina 0,9% (controle), CTMs-VEs, HAS e HAS-EVs com três ovos alocados para cada tratamento. Aproximadamente 100 µL de cada solução de tratamento foram adicionados diretamente à membrana corioalantoica (CAM) usando uma pipeta. Os efeitos foram observados por 300 segundos. O escore de irritação (I), que incluiu hemorragia, lise vascular e coagulação, foi medido em segundos e calculado de acordo com a equação (2):

$$I = 301 - \left(\text{hemorragia} \times \frac{5}{300} \right) + 301 - \left(\text{lise} \times \frac{7}{300} \right) + 301 - \left(\text{coagulação} \times \frac{9}{300} \right)$$

Além disso, um escore HET-CAM semiquantitativo foi medido. A taxa de sobrevivência dos embriões foi monitorada por 10 minutos após a administração dos compostos.

3.12. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). One-way ANOVA foi usado para determinar a significância estatística, seguida pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$ considerado significativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e o critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em comparação ao controle negativo.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização de CTMs-VEs

O meio condicionado coletado em 36 horas apresentou a maior concentração de EV (EVs/mL), seguido por um declínio em 48 e 60 horas (Fig. 1A). Esses resultados indicam que o período de cultivo ideal para maximizar o rendimento de EV é de até 36 horas.

Os resultados da distribuição do tamanho de EVs por NTA em 36 horas de cultura (Fig. 1B e C e Tabela 1) demonstraram um pico principal (Modo) de aproximadamente 123 nm, e um tamanho médio de 196 nm. É possível observar na Fig. 1B curvas com múltiplos picos, ou seja, uma população de partículas com heterogeneidade, sugerindo a presença de diferentes subtipos de vesículas, principalmente exossomos e microvesículas. Corroborando esses achados, a Fig. 1C apresenta uma ampla dispersão no eixo y, sugerindo variações de partículas na amostra entre 0 e 300 nm, e apresenta pequenas populações entre 400 e 900 nm.

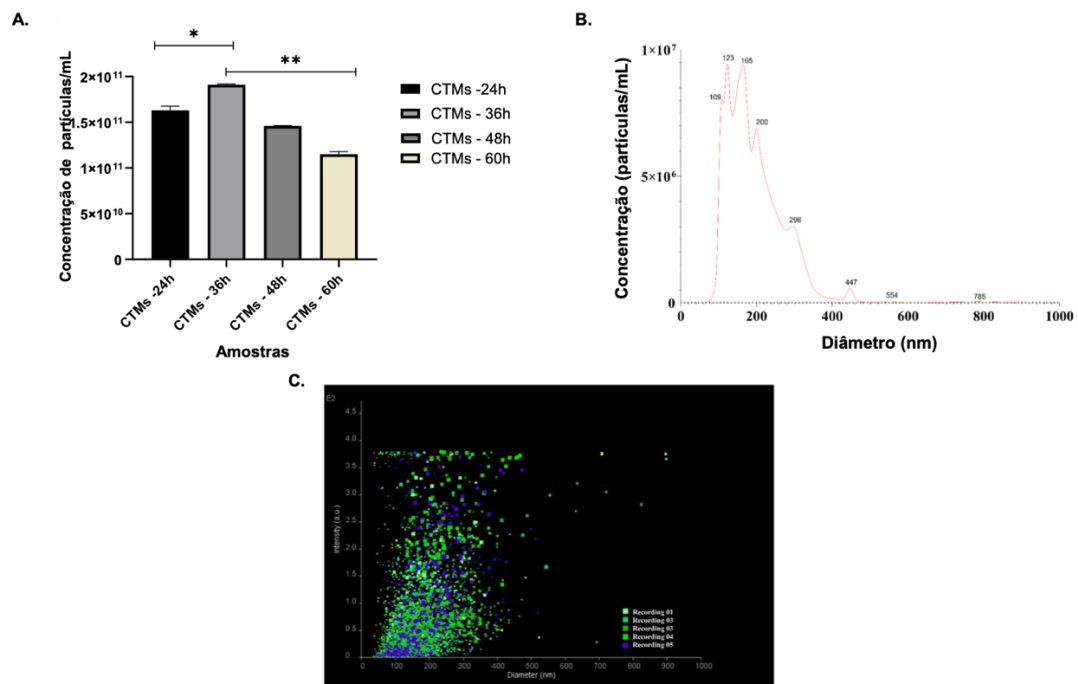


Figura 1 - (A) Perfil temporal da concentração de vesículas extracelulares (VE) isoladas do meio condicionado de células-tronco mesenquimais (CTMs) em diferentes períodos de cultura (24, 36, 48 e 60 horas). (B) Distribuição de tamanho (em nanômetros) de VEs isoladas do meio condicionado de CTMs nos mesmos períodos de cultura. (C) Distribuição de tamanho de VE no meio condicionado obtido em 36 horas. As análises foram realizadas usando análise de rastreamento de nanopartículas (*Nano Tracking Analysis*, NTA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

Tabela 1 - Caracterização de vesículas extracelulares (VEs) do meio condicionado de CTMs em 36 horas de cultura, analisadas por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA; n = 5).

Amostras	Média	Modo	DP	D10	D50	D90	Concentração
	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	(nm)	partículas/mL
CTMs-VEs	196	122.7	79.5	115.1	178.1	297.2	1.34 x 10 ⁹ +/- 8.93 x 10 ⁷

DP (Desvio Padrão); D10 (10% das partículas estão abaixo deste tamanho; D50 (50% das partículas estão abaixo deste tamanho); D90 (90% das partículas estão abaixo deste tamanho)

4.2. Caracterização de hidrogéis de alginato de sódio com CTMs-VEs

O comportamento reológico dos hidrogéis (HAS e HAS-VEs) foi avaliado para determinar seu potencial como carreadores para CTMs-EVs. Os hidrogéis contendo meio de cultura, com e sem CTMs-EVs, exibiram propriedades reológicas semelhantes e viscosidade significativamente maior em comparação ao hidrogel controle (HAS) sem meio de cultura (Figura 2A).

A análise do módulo de armazenamento (G') e do módulo de perda (G'') reforçou essas descobertas. Em todas as formulações, o módulo de armazenamento (G'), que representa o componente elástico ou sólido, foi maior do que o módulo de perda (G''), associado ao comportamento viscoso ou líquido. Isso confirma as propriedades viscoelásticas típicas dos hidrogéis (Figura 2B). Além disso, os testes de cisalhamento demonstraram a natureza elástica dos hidrogéis ($G' > G''$), permitindo a identificação do processo de transição de gelificação.

O teste de varredura de frequência angular (Figura 2C) apoiou ainda mais o comportamento predominantemente elástico dos hidrogéis sob pequenas amplitudes de deformação (0,01% a 100%). O módulo permaneceu estável durante todo o teste, indicando integridade estrutural sob essas condições. Esses resultados demonstram que os hidrogéis possuem propriedades viscoelásticas estáveis e desejáveis, reforçando seu potencial como sistemas de transporte de CTMs-EVs.

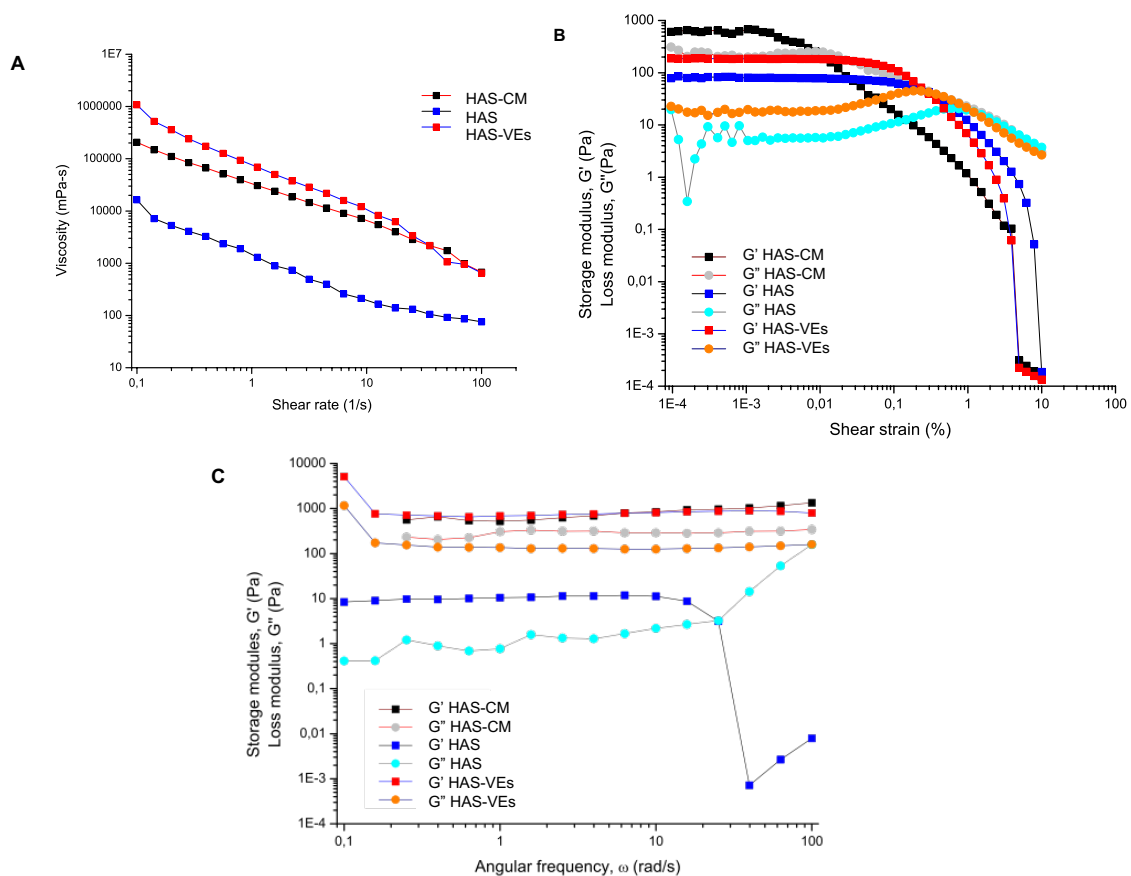


Figura 2 - Caracterização reológica de hidrogéis de alginato com e sem vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMsVEs). (A) Curvas de viscosidade-taxa de cisalhamento. (B) Módulo de armazenamento (G') e módulo de

perda (G'') em função da deformação de cisalhamento. (C) Teste de frequência angular. Hidrogel contendo meio de cultura (HAS-CM); Hidrogéis de alginato de sódio (HAS); Hidrogel contendo CTMs-VEs (HAS-VEs).

A análise por MEV revelou que a integridade estrutural e a porosidade do hidrogel de alginato foram alteradas após a incorporação do meio condicionado contendo CTMs-VEs. Conforme ilustrado na Figura 3A, o HAS exibe uma estrutura interna porosa, bem definida e interconectada. O hidrogel carregado com CTMs-VEs (HAS-VEs) apresentou uma estrutura mais densa quando comparado ao hidrogel livre deles, Figura 3B, em concordância com os resultados dos testes reológicos. Além disso, as pequenas esferas indicadas pelas setas podem sugerir a incorporação dos CTMs-VEs na matriz do hidrogel.

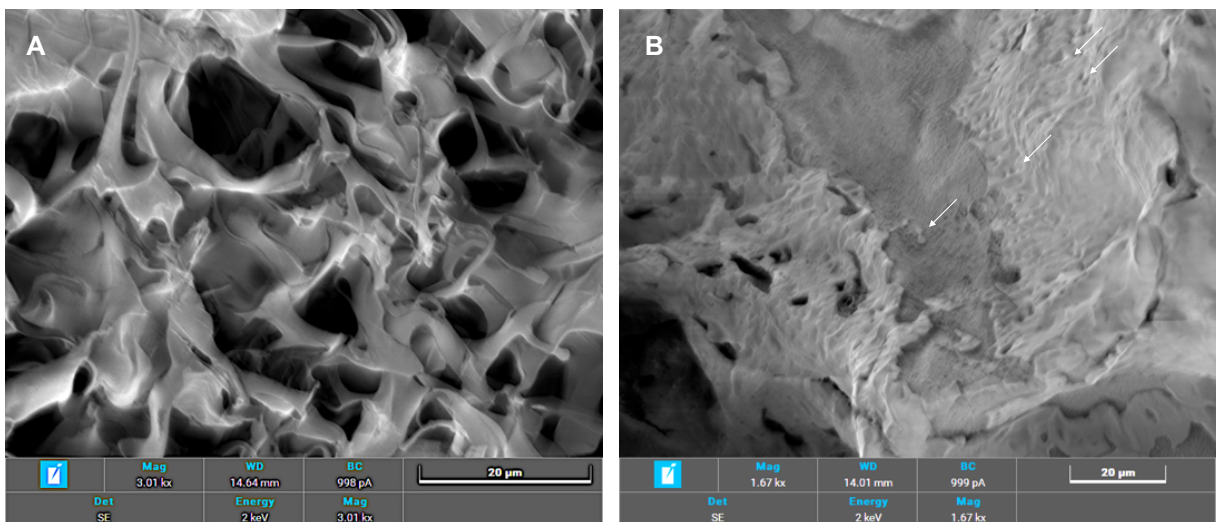


Figura 3 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do (A) hidrogel de alginato de sódio e (B) hidrogel de alginato carregado com CTMs-VEs

4.3. Ensaio biológico com células HaCaT

A atividade biológica de HAS-VEs e CTMs-VEs foi evidenciada no ensaio de arranhão, que mostrou um estímulo na migração de queratinócitos em 24 e 48 horas em comparação com o controle negativo (Figura 4A). Este efeito migratório sugere um papel potencial na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos, atribuído às propriedades bioativas de CTMs-VEs. HAS não interferiu na migração de células HaCaT.

Além disso, a avaliação da citotoxicidade em culturas de células 2D revelou que o tratamento de 48 horas com HAS reduziu estatisticamente a viabilidade de células HaCaT em comparação com o grupo controle (meio de cultura) ($p < 0,05$). No entanto, a taxa de células viáveis pós-tratamento permaneceu acima de 70%, indicando a baixa citotoxicidade induzida pelo hidrogel de alginato. Por outro lado, o tratamento com HAS-VEs e CTMs-VEs aumentou a taxa de viabilidade celular em relação ao HAS, sem nenhuma diferença estatística observada entre os efeitos desses tratamentos e o controle negativo. Esse aumento pode ser atribuído ao papel dos CTMs-VEs na regulação da homeostase e na manutenção da integridade celular.

Em modelos de cultura de células 3D, nenhum dos tratamentos exibiu efeitos citotóxicos, confirmando ainda mais seu perfil de segurança (Figura 4B). A avaliação de citotoxicidade de longo prazo por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica reforçou essas descobertas, pois os tratamentos com HAS, HAS-VEs e CTMs-VEs não inibiram a formação de colônias. Os resultados não revelaram nenhuma diferença estatística em comparação ao controle negativo, demonstrando seu baixo potencial citotóxico em células HaCaT (Figura 4C).

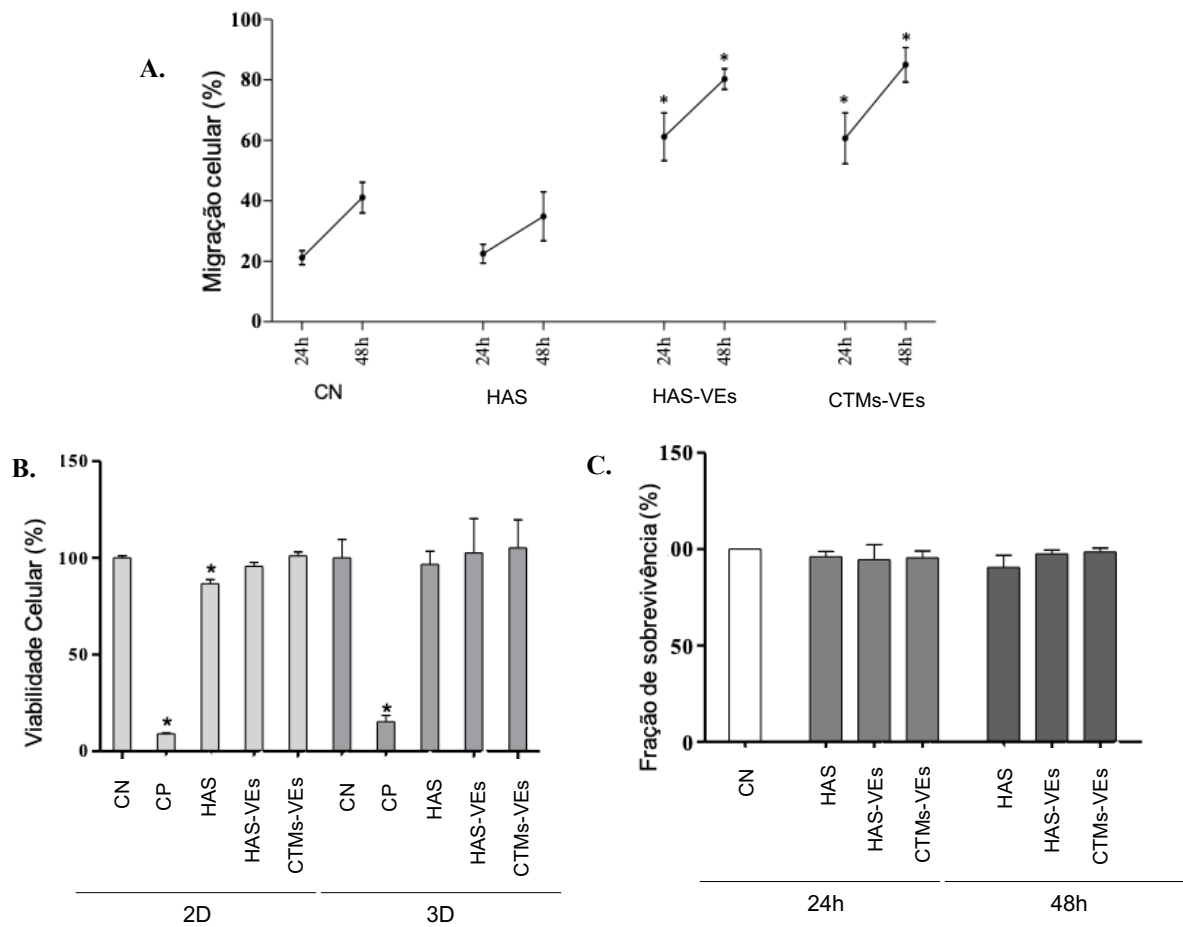


Figura 4 – (A) Porcentagem de migração de células HaCaT tratadas com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas. A área livre de células em cada ponto de tempo foi normalizada para a medição inicial (0 h). CN representa o controle negativo (meio de cultura com 10% de soro bovino fetal). (B) Viabilidade celular (%) em culturas 2D e 3D e (C) Fração de sobrevivência (%) de células HaCaT após tratamento com CTMs-VEs e hidrogel de alginato de sódio (HAS-VEs e HAS).

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal, definido como 100% de viabilidade); CP: controle positivo nos ensaios de viabilidade 2D/3D (50% dimetilsulfóxido) e ensaio de sobrevivência clonogênica (1,25 μ M cisplatina, produzindo frações de sobrevivência de $61 \pm 3,5\%$ e $55 \pm 9,0\%$ em 24 e 48 h, respectivamente). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão

de três experimentos independentes. *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

A Tabela 2 apresenta os resultados do ensaio de MN, indicando a ausência de efeitos genotóxicos, sem aumentos significativos na frequência de MN ou alterações nos valores de IPBC entre os grupos de tratamento. Os valores de IPBC para o controle negativo e CTMs-VEs foram 1,8, enquanto HAS e HAS-VEs apresentaram valores de 1,7. Os resultados obtidos mostram a ausência de danos cromossômicos e manutenção da capacidade proliferativa das células HaCaT, alinhando-se com os dados dos ensaios de citotoxicidade.

Tabela 2 - Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação de bloqueio de citocinese (IPBC) em células HaCaT após 48 horas de tratamento com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas

Tratamentos	MNs ^a	IPBC ^b
Controle Negativo	3,50 ± 0,7	1,8 ± 0,10
Controle Positivo	28,5 ± 3,5*	1,6 ± 0,09*
HAS	3,75 ± 1,0	1,7 ± 0,04
HAS-VEs	3,75 ± 1,5	1,7 ± 0,01
CTMs-VEs	3,00 ± 1,1	1,8 ± 0,05

Os dados são expressos como média ± desvio padrão para o número de micronúcleos (MNs) observados em 1000 células binucleadas e o índice de proliferação de bloqueio de citocinese (IPBC) avaliado em 500 células contadas. O controle negativo foi tratado apenas com meio de cultura completo, enquanto o controle positivo foi exposto ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 100 μM). *Estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA seguido pelo teste de Tukey). O experimento foi conduzido em triplicata.

4.4. Testes de segurança

Para fornecer uma avaliação abrangente do perfil de segurança das amostras testadas, o teste de Ames, desenvolvido para detectar a indução de mutações gênicas, foi conduzido com e sem ativação metabólica (fração S9) usando o método de pré-incubação. Os resultados demonstraram que HAS, HAS-VEs e CTMs-VEs não induziram um aumento estatisticamente significativo na média do número de colônias revertentes quando comparados ao controle negativo. Além disso, os valores de IM não excederam 2 em nenhuma das cepas testadas (TA98, TA100, TA102 e TA97a), independentemente da presença de ativação metabólica, confirmando a segurança mutagênica nas condições experimentais usadas neste estudo (Tabela 3).

Complementando esses resultados, o ensaio HET-CAM avaliou o potencial irritante das amostras. Os resultados mostraram que a aplicação de solução de NaOH (0,1 M, 100 µL) em CAM saudável resultou em hemorragia grave e imediata, seguida de lise e coagulação, que se intensificou ao longo de 5 minutos, classificando-a como um irritante grave. Por outro lado, a solução de NaCl (0,9%, 100 µL) não produziu nenhuma resposta visível ao longo do mesmo período. Os ovos tratados com HAS, HAS-VEs e CTMs-VEs exibiram o mesmo perfil de resposta que o grupo NaCl, sem resposta visual ao longo de 5 minutos (Figura 5). A pontuação semiquantitativa HET-CAM confirmou que a solução de NaOH induziu hemorragia significativa, lise vascular e coagulação, enquanto a solução de NaCl e as outras amostras não causaram tais reações em 5 minutos. Além disso, a taxa de sobrevivência após o tratamento com NaOH foi de 66% ao longo de 10 minutos, enquanto a solução de NaCl (0,9%) e os outros tratamentos não causaram mortes.

Tabela 3 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (entre parênteses) das cepas de *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA102 e TA97a expostas a vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas

Tratamentos	Número de revertentes (M ± DP)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CN	38 ± 2	30 ± 2	101 ± 21	108 ± 11	248 ± 38	299 ± 49	148 ± 16	139 ± 13
CP	682 ± 56 ^{a, **}	516 ± 61 ^{d, **}	1461 ± 109 ^{b, **}	1458 ± 89 ^{d, **}	1439 ± 64 ^{c, **}	1360 ± 153 ^{e, **}	1042 ± 98 ^{a, **}	1312 ± 74 ^{d, **}
µg/placa	HAS							
200	39 ± 2 (1,03)	30 ± 3 (1,00)	119 ± 12 (1,18)	115 ± 9 (1,06)	270 ± 22 (1,09)	314 ± 42 (1,05)	150 ± 9 (1,01)	142 ± 16 (1,02)
µg/placa	HAS-VEs							
200	40 ± 3 (1,05)	29 ± 4 (0,95)	105 ± 7 (1,04)	111 ± 14 (1,03)	319 ± 29 (1,29)	382 ± 47 (1,28)	157 ± 11 (1,06)	128 ± 11 (0,92)
µg/placa	CTMs-VEs							
25	42 ± 8 (1,11)	31 ± 1 (1,03)	126 ± 17 (1,25)	107 ± 19 (0,99)	228 ± 43 (0,92)	363 ± 35 (1,22)	138 ± 14 (0,93)	167 ± 23 (1,20)

** $p < 0,001$; M ± DP = média e desvio padrão; IMI = índice de mutagenicidade; HAS = hidrogel de alginato de sódio; HAS-VEs = hidrogel de alginato de sódio com CTMs-VEs; S9 = sistema de ativação metabólica; Controle Negativo (CN): sem tratamento, taxa de reversão espontânea da linhagem bacteriana; Controle Positivo (CP): ^a4-nitro-*o*-fenilenodiamina (10 µg/placa – TA98, TA97a); ^bazida sódica (2,5 µg/placa – TA100); ^cmitomicina (0,5 µg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^d2-antramine (1,5 µg/placa – TA98, TA100 e TA97a); ^e2-aminofluoreno (5 µg/placa – TA102), na presença de S9. O ensaio foi realizado em triplicata.

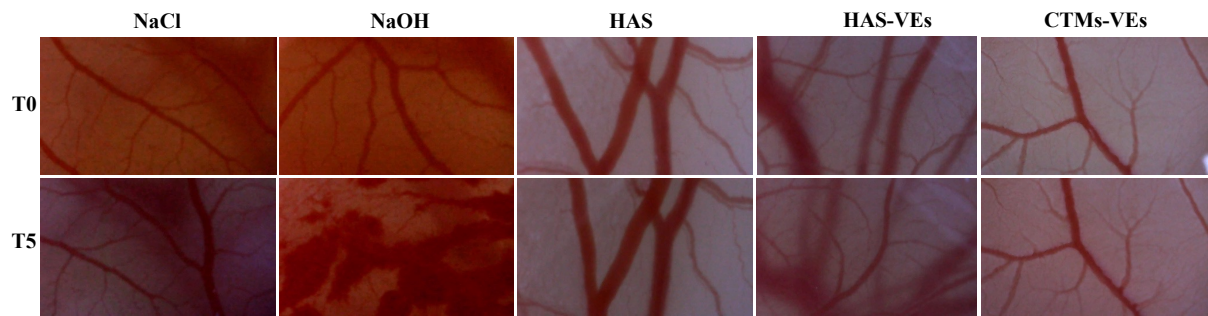


Figura 5 - Imagens estereomicroscópicas obtidas antes da aplicação da amostra (T0) e 5 minutos após a aplicação (T5) em CAMs inoculadas com controle negativo (NaCl 0,9%), controle positivo (NaOH 0,1 N), vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas

5. DISCUSSÃO

CTMs-VEs têm potencial significativo para uso em novas estratégias terapêuticas sem células na medicina regenerativa, visando doenças imunológicas, neurológicas, cardiovasculares, respiratórias e câncer (Nooshabadi et al., 2018). Embora CTMs-VEs tenham muitos benefícios e seu efeito terapêutico seja promissor, a maneira mais apropriada de usá-los na medicina regenerativa é combiná-los com biomateriais (Pan et al., 2023). Essa abordagem é crucial devido à estabilidade e retenção necessárias para aplicações clínicas, pois os VEs têm baixa biodisponibilidade e são rapidamente eliminadas pelo sistema imunológico quando injetadas *in vivo*. Para superar a rápida eliminação e preservar a bioatividade das VEs, este estudo utilizou hidrogéis de alginato para proteger as vesículas incorporadas. Os hidrogéis de alginato de sódio apresentam uma microestrutura homogênea e bem-organizada, com rigidez mecânica ajustável e excelente permeabilidade (Wisdom et al., 2018).

Um aspecto crítico da otimização de terapias baseadas em VE é determinar as condições ideais para sua produção. Aqui, CTMs-VEs foram coletados em 24, 36, 48 e 60 horas para avaliar a influência do tempo de cultivo e das condições do meio no rendimento de VE. A maior concentração de VE (VEs/mL) foi observada em 36 horas, sugerindo que as CTMs se adaptaram eficientemente às condições de cultura dentro desse período. Esse pico de produção pode ser atribuído a uma resposta celular adaptativa desencadeada pela ausência de soro bovino fetal (SBF), que provavelmente otimizou a dinâmica de secreção de VEs. No entanto, a ausência prolongada desse suplemento, um fator essencial para manter a viabilidade celular, provavelmente deixou o ambiente menos favorável, levando a um declínio no rendimento de VE em 48 e 60 horas. Essas descobertas sugerem que o período de cultivo ideal para maximizar a produção de VE é de até 36 horas.

Além de otimizar o rendimento, garantir a integridade estrutural e a pureza das VEs é fundamental para sua aplicação terapêutica. A caracterização do tamanho das VEs isoladas revelou consistentemente diâmetros abaixo de 200 nm, demonstrando a eficácia do processo de purificação. Dado que as VEs são classificadas em exossomos (30–150 nm), microvesículas (100–1000 nm), corpos apoptóticos (50–5000 nm) e oncosomas (1–10 μ m) (Kou et al., 2022), a distribuição de tamanho observada sugere fortemente que as vesículas isoladas eram predominantemente exossomos, como evidenciado por um pico predominante (modo) em aproximadamente 123 nm e um tamanho médio de 196 nm.

Além disso, uma população menor de microvesículas, estendendo-se até 900 nm, contribuiu para a heterogeneidade observada. Esses tipos de vesículas desempenham um papel crucial na comunicação intercelular em contextos fisiológicos

e patológicos, mediando a transferência de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos entre células (Kou et al., 2022).

Para avaliar a adequação dos hidrogéis de alginato como transportadores de VE, suas propriedades reológicas foram analisadas. Os hidrogéis contendo meio de cultura, com e sem CTMs-VEs, exibiram viscosidade significativamente maior do que o hidrogel controle (HAS), sem o meio de cultura. Esse aumento na viscosidade não foi diretamente influenciado pela presença de CTMs-VEs, mas sim pela composição do meio de cultura, rico em sais e íons, o que provavelmente aumentou as interações moleculares dentro da matriz de alginato. O comportamento viscoelástico dos hidrogéis foi confirmado pela predominância do módulo de armazenamento (G') sobre o módulo de perda (G''), indicativo de uma estrutura de gel estável (Guanqun et al., 2024). Os testes de cisalhamento reforçaram ainda mais a natureza elástica dos hidrogéis ($G' > G''$), identificando uma transição de gelificação bem definida (Schwab et al., 2020). Além disso, o teste de frequência angular demonstrou que o módulo permaneceu estável sob amplitudes de deformação crescentes.

A análise por MEV corroborou ainda mais esses resultados, revelando que a integridade estrutural e a porosidade do hidrogel de alginato foram alteradas após a incorporação do meio condicionado contendo CTMs-VEs. HAS exibiu uma estrutura porosa bem definida e interconectada, enquanto HAS-VEs exibiram uma morfologia mais densa, consistente com o aumento da viscosidade observada em testes reológicos.

Em nosso estudo, o tratamento com HAS-VEs e CTMs-VEs estimulou significativamente a migração em culturas de queratinócitos, um processo-chave no reparo de feridas e regeneração de tecidos, destacando o potencial terapêutico dos hidrogéis carregados com CTMs-VEs na promoção da cicatrização de feridas

cutâneas ao aumentar a migração de queratinócitos, um processo-chave no reparo de feridas e regeneração de tecidos (Morales et al., 2021).

CTMs e suas CTMs-VEs desempenham papéis cruciais na regeneração de tecidos, contribuindo para o reparo de tecidos, controle de inflamação, aumento da angiogênese e remodelação da matriz extracelular (Souza et al., 2024). Essas vesículas facilitam a cicatrização de feridas por meio de múltiplos mecanismos, incluindo efeitos de homing, imunomodulação, inibição da apoptose epitelial, polarização de macrófagos e ações pró-angiogênicas (Jung et al., 2024).

Estudos demonstraram que CTMs-VEs derivadas de tecido adiposo podem promover processos-chave envolvidos na regeneração da pele. Souza et al. (2024) relataram que essas vesículas aumentam a proliferação de queratinócitos HaCaT, estimulam a migração de fibroblastos dérmicos (NHDF-1) e HaCaT, induzem a formação de tubo endotelial em HUVECs e modulam a expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos derivados de THP-1. Da mesma forma, Ferreira et al. (2017) sugeriram que CTMs-VEs derivadas de tecido adiposo aceleram a migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos em um modelo de rato com tala de ferida excisional por meio da ativação da via Akt.

Em consonância com esses estudos, Zhang et al. (2015) demonstraram que exossomos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) aceleram a cicatrização de feridas promovendo a síntese de colágeno, neovascularização e proliferação e migração de fibroblastos e células endoteliais. Kim et al. (2018) confirmaram ainda que exossomos derivados de iPSC aumentam o crescimento, a proliferação e a migração de células da pele. Além disso, Shafei et al. (2020) incorporaram com sucesso exossomos de CTMs derivados de tecido adiposo em hidrogéis de alginato, criando um curativo que melhorou significativamente o

fechamento da ferida, a deposição de colágeno e a formação de vasos. Notavelmente, os exossomos derivados de CTMs foram relatados para induzir angiogênese por meio da ativação da via de sinalização Wnt (Gong et al., 2017; McBride et al., 2017; Olsen et al., 2017), reforçando seu potencial terapêutico em aplicações de cicatrização de feridas.

Além disso, experimentos de citotoxicidade demonstraram que tanto HAS-VEs quanto CTMs-VEs não impactaram o equilíbrio metabólico das células HaCaT em culturas 2D e 3D, nem prejudicaram sua capacidade reprodutiva, conforme avaliado pelo ensaio de sobrevivência clonogênica. A redução observada na viabilidade celular no tratamento HAS pode ser atribuída à difusão de cátions Ca^{2+} resultantes da decomposição do hidrogel na cultura celular. No entanto, a viabilidade celular permaneceu acima do limite de 70% para materiais biocompatíveis, conforme recomendado pela ISO 10993-5 (2009) nas condições experimentais utilizadas.

Pesquisas anteriores mostraram que exossomos de CTMs e aqueles derivados de iPSC podem promover a proliferação de células HaCaT e fibroblastos dérmicos humanos (HDFs) (Kim et al., 2018). Em um outro estudo, Sadeghian-Nodoushan et al. (2022) desenvolveram matrizes de alginato incorporando nanopartículas de ferrita de cobalto ($CoFe_2O_4$) para o encapsulamento de exossomos isolados de CTMs derivados de tecido adiposo humano, visando aplicação em engenharia de tecido ósseo. Essas matrizes, além de não citotóxicas, aumentaram significativamente a proliferação de células adiposas. Khalatbari et al. (2022) também contribuíram para esse campo ao desenvolver um curativo à base de nanofibras de fibroína de seda e hidrogel de alginato contendo exossomos de CTMs, que se mostraram atóxicos e eficazes na manutenção da proliferação celular adequada, achado também observado no presente estudo.

Além da citocompatibilidade, é importante ressaltar que a avaliação da genotoxicidade é uma etapa fundamental na fase não clínica do desenvolvimento terapêutico para garantir a segurança das terapias com CTMs-VEs. Neste estudo, investigamos o potencial mutagênico de HAS-VEs, tanto em nível gênico (teste de Ames) quanto em nível cromossômico (ensaio MN), para contribuir para a identificação do perfil de segurança, considerando a preocupação toxicológica desses tratamentos potencialmente atuando como mutágenos reativos ao DNA. A ausência de mutagenicidade de HAS-VEs, bem como HAS e CTMs-VEs demonstrada neste estudo é altamente significativa, pois oferece dados encorajadores para pesquisas futuras envolvendo esse tipo de tratamento.

6. CONCLUSÃO

Este estudo apresenta uma estratégia terapêutica promissora sem células ao incorporar CTMs-VEs em hidrogéis de alginato, oferecendo um microambiente estável e protetor que preserva sua integridade. HAS-VEs não foram citotóxicos ou mutagênicos e efetivamente promoveram a migração de queratinócitos. Essas descobertas destacam o potencial de HAS-VEs como uma plataforma segura e eficaz para melhorar a cicatrização de feridas e a regeneração de tecidos, abrindo caminho para um maior desenvolvimento em Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos.

REFERÊNCIAS

Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): Exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles,

and apoptotic bodies. In *Journal of Neuro-Oncology*.
<https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>

Blanchard G, Pich C, Hohl D. HaCaT cells as a model system to study primary cilia in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2022 Aug;31(8):1276-1280. doi: 10.1111/exd.14626. Epub 2022 Jun 23. PMID: 35708968; PMCID: PMC9542831.

Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, Fumagalli M, Carlino C, Corsetto PA, Scaccabarozzi D, Calvieri S, Gismondi A, Taramelli D, Dell'Agli M. HaCaT Cells as a Reliable In vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7435621. doi: 10.1155/2017/7435621. Epub 2017 Dec 17. PMID: 29391667; PMCID: PMC5748104.

Falanga V, Isseroff RR, Soulika AM, Romanelli M, Margolis D, Kapp S, Granick M, Harding K. Chronic wounds. *Nat Rev Dis Primers*. 2022 Jul 21;8(1):50. doi: 10.1038/s41572-022-00377-3. PMID: 35864102; PMCID: PMC10352385.

Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1084-104.

Ferreira A.F., da Cunha P.S., Carregal V.M., de Silva P.C., de Miranda M.C., Kunrath-Lima M., de Melo M.I.A., Faraco C.C.F., Barbosa J.L., Frezard F. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Accelerate Migration and Activate AKT Pathway in Human Keratinocytes and Fibroblasts Independently of MiR-205 Activity. *Stem Cells Int*. 2017;2017:9841035. doi: 10.1155/2017/9841035.

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro . *Nat Protoc*. 2006;1(5):2315-9.

- Gong M, Yu B, Wang J, Wang Y, Liu M, Paul C, Millard RW, Xiao DS, Ashraf M, Xu M. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget*. 2017;8:45200-45212. doi: 10.18632/oncotarget.16778.
- Guanqun P, Jia H, Jinnan G, Jiahui D, Yuanyuan Z, Tong Y, Fengjun X, Zhiyun M, Hui G, Ruolan G, Peng H, Wenzhong S, Guifang D, Yunbo S, Shuchen L. Injectable exosome-loaded quaternized chitosan/oxidized sodium alginate hydrogel with self-healing, bioadhesive, and antibacterial properties for treating combined radiation-wound injury, *Chemical Engineering Journal*. 2024; 495: 152933, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.152933>.
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011; 1: 1-10 <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
- Ha DH, Kim HK, Lee J, Kwon HH, Park GH, Yang SH, Jung JY, Choi H, Lee JH, Sung S, Yi YW, Cho BS. Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Exosomes for Immunomodulatory Therapeutics and Skin Regeneration. *Cells*. 2020 ;9:1157. doi: 10.3390/cells9051157. PMID: 32392899; PMCID: PMC7290908.
- Heebkaew N, Promjantuek W, Chaicharoenaudomrung N, Phonchai R, Kunhorm P, Soraksa N, Noisa P. Encapsulation of HaCaT Secretome for Enhanced Wound Healing Capacity on Human Dermal Fibroblasts. *Mol Biotechnol*. 2024 ;1:44-55. doi: 10.1007/s12033-023-00732-z. Epub 2023 Apr 4. PMID: 37016178.

International Organization for Standardization, "Biological evaluation of medical devices". Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods", 3st ed, ISO 10993-5, 2009.

Jung H, Jung Y, Seo J, Bae Y, Kim HS, Jeong W. Roles of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells in regeneration. *Mol Cells*. 2024;47:100151. doi: 10.1016/j.mocell.2024.100151.

Kaplani K, Koutsi S, Armenis V, Skondra FG, Karantzelis N, Champeris Tsaniras S, Taraviras S. Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;129:242-253. doi: 10.1016/j.addr.2018.02.007.

Khalatbari E, Tajabadi M, Khavandi A. Multifunctional exosome-loaded silk fibroin/alginate structure for potential wound dressing application. *Mat. Tod. Commu*. 2022; 1:1-10. 10.1016/j.mtcomm.2022.103549.

Kim S, Lee SK, Kim H, Kim TM. Exosomes Secreted from Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerate Skin Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2018;19:3119. doi: 10.3390/ijms19103119.

Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AAA, Dudhipala N. Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*. 2022 Aug 6;11(15):2439. doi: 10.3390/cells11152439. PMID: 35954282;

Kou M, Huang L, Yang J, Chiang Z, Chen S, Liu J, Guo L, Zhang X, Zhou X, Xu X, Yan X, Wang Y, Zhang J, Xu A, Tse HF, Lian Q. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration: a next generation therapeutic tool? *Cell Death Dis*. 2022;13:580. doi: 10.1038/s41419-022-05034-x

- Kugeratski FG, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS J.* 2021 Jan;288(1):10-35. doi: 10.1111/febs.15558. Epub 2020 Oct 3. PMID: 32910536; PMCID: PMC9116040.
- Li JY, Ren KK, Zhang WJ, Xiao L, Wu HY, Liu QY, Ding T, Zhang XC, Nie WJ, Ke Y, Deng KY, Liu QW, Xin HB. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10:247. doi: 10.1186/s13287-019-1366-y. PMID: 31399039; PMCID: PMC6688220.
- Liu Y, Liu Y, Zeng C, Li W, Ke C, Xu S. Concentrated Growth Factor Promotes the Wound Healing Potential of HaCaT Cells by Activating the RAS Signaling Pathway. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2022;27:319. doi: 10.31083/j.fbl2712319. PMID: 36624939.
- Liang Y, He J, Guo B. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano.* 2021;15:12687-12722. doi: 10.1021/acsnano.1c04206. Epub 2021 Aug 10. PMID: 34374515.
- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113:173-215. doi: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Mascharak S, Talbott HE, Januszyk M, Griffin M, Chen K, Davitt MF, Demeter J, Henn D, Bonham CA, Foster DS, Mooney N, Cheng R, Jackson PK, Wan DC, Gurtner GC, Longaker MT. Multi-omic analysis reveals divergent molecular events in scarring and regenerative wound healing. *Cell Stem Cell.* 2022;29:315-327.e6. doi: 10.1016/j.stem.2021.12.011.

- McBride JD, Rodriguez-Menocal L, Guzman W, Candanedo A, Garcia-Contreras M, Badiavas EV. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived CD63+ Exosomes Transport Wnt3a Exteriorly and Enhance Dermal Fibroblast Proliferation, Migration, and Angiogenesis *In vitro* . *Stem Cells Dev.* 2017; 26:1384-1398. doi: 10.1089/scd.2017.0087.
- Morales X, Cortés-Domínguez I, Ortiz-de-Solorzano C. Modeling the Mechanobiology of Cancer Cell Migration Using 3D Biomimetic Hydrogels. *Gels.* 2021;7:1-17. doi: 10.3390/gels7010017.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 2000; 455:29-60. doi: 10.1016/s0027-5107(00)00064-6.
- Nooshabadi VT, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, Allahverdi A, Izadpanah M, Daneshimehr F, Ai J, Banafshe HR, Ebrahimi-Barough S. The extracellular vesicles-derived from mesenchymal stromal cells: A new therapeutic option in regenerative medicine. *J Cell Biochem.* 2018; 119:8048-8073. doi: 10.1002/jcb.26726.
- OECD (2016), Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>.
- Olsen JJ, Pohl SÖ, Deshmukh A, Visweswaran M, Ward NC, Arfuso F, Agostino M, Dharmarajan A. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *Clin Biochem Rev.* 2017; 38:131-142. PMID: 29332977
- Pan Y, Li Y, Dong W, Jiang B, Yu Y, Chen Y. Role of nano-hydrogels coated exosomes in bone tissue repair. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023; 11:1-20. doi: 10.3389/fbioe.2023.1167012.

- Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *Int J Oncol*. 1993 Sep;3(3):473-6. PMID: 21573387.
- Peng Y, Chen X, Liu S, Wu W, Shu H, Tian S, Xiao Y, Li K, Wang B, Lin H, Qing X, Shao Z. Extracellular Vesicle-Conjugated Functional Matrix Hydrogels Prevent Senescence by Exosomal miR-3594-5p-Targeted HIPK2/p53 Pathway for Disc Regeneration. *Small*. 2023 Sep;19(37):e2206888. doi: 10.1002/smll.202206888.
- Reig-Vano B, Tylkowski B, Montané X, Giamberini M. Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. *Int J Biol Macromol*. 2021 Feb 15;170:424-436. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.161. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33383080.
- Sadeghian-Nodoushan F, Nikukar H, Soleimani M, Jalali-Jahromi A, Hosseinzadeh S, Khojasteh A. A smart magnetic hydrogel containing exosome promotes osteogenic commitment of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2022 Sep;25(9):1123-1131. doi: 10.22038/IJBMS.2022.64682.14237.
- Schwab A, Levato R, D'Este M, Piluso S, Eglin D, Malda J. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem Rev*. 2020 Oct 14;120(19):11028-11055. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00084. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32856892; PMCID: PMC7564085.
- Shafei S, Khanmohammadi M, Heidari R, Ghanbari H, Taghdiri Nooshabadi V, Farzamfar S, Akbariqomi M, Sanikhani NS, Absalan M, Tavoosidana G. Exosome loaded alginate hydrogel promotes tissue regeneration in full-thickness skin wounds: An *in vivo* study. *J Biomed Mater Res A* 2020; 108:545-556. doi: 10.1002/jbm.a.36835.

- Sharma A, Shankar R, Yadav AK, Pratap A, Ansari MA, Srivastava V. Burden of Chronic Nonhealing Wounds: An Overview of the Worldwide Humanistic and Economic Burden to the Healthcare System. *Int J Low Extrem Wounds*. 2024;15347346241246339. doi: 10.1177/15347346241246339.
- Sheng Y, Gao J, Yin ZZ, Kang J, Kong Y. Dual-drug delivery system based on the hydrogels of alginate and sodium carboxymethyl cellulose for colorectal cancer treatment. *Carbohydr Polym*. 2021 Oct 1;269:118325. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118325. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34294337.
- Souza ILM, Suzukawa AA, Josino R, Marcon BH, Robert AW, Shigunov P, Correa A, Stimamiglio MA. Cellular In vitro Responses Induced by Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Obtained from Suspension Culture. *Int J Mol Sci*. 2024;25:7605. doi: 10.3390/ijms25147605.
- Su X, Wang T, Guo S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field. *Regen Ther*. 2021 Feb 5;16:63-72. doi: 10.1016/j.reth.2021.01.007. PMID: 33598507; PMCID: PMC7868584.
- Tutuianu R, Rosca AM, Iacomi DM, Simionescu M, Titorencu I. Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Exosomes Promote In vitro Wound Healing by Modulating the Biological Properties of Skin Keratinocytes and Fibroblasts and Stimulating Angiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2021;22:6239. doi: 10.3390/ijms22126239. PMID: 34207905; PMCID: PMC8228793.
- Tricarico PM, Zupin L, Ottaviani G, Pacor S, Jean-Louis F, Boniotto M, Crovella S. Photobiomodulation therapy promotes in vitro wound healing in nicastrin KO HaCaT cells. *J Biophotonics*. 2018;11:e201800174. doi: 10.1002/jbio.201800174. Epub 2018 Jul 24. PMID: 29968387.

- Wisdom KM, Adebowale K, Chang J, Lee JY, Nam S, Desai R, Rossen NS, Rafat M, West RB, Hodgson L, Chaudhuri O. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. *Nat Commun.* 2018; 9:1-18. doi: 10.1038/s41467-018-06641-z.
- Zhang J, Guan J, Niu X, Hu G, Guo S, Li Q, Xie Z, Zhang C, Wang Y. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J Transl Med.* 2015;13:1-49. doi: 10.1186/s12967-015-0417-0.
- Zhang Y, Liu Q, Zhang X, Huang H, Tang S, Chai Y, Xu Z, Li M, Chen X, Liu J, Yang C. Recent advances in exosome-mediated nucleic acid delivery for cancer therapy. *J Nanobiotechnology.* 2022;20:279. doi: 10.1186/s12951-022-01472-z. PMID: 35701788; PMCID: PMC9194774.

Capítulo 4

Hidrogel de pululano reticulado com trimetafosfato de sódio para possível uso como plataforma de exossomos para aplicações na engenharia de tecidos cutâneos.

RESUMO

Os sistemas de entrega podem prolongar a meia-vida dos exossomos no local-alvo, impedindo sua eliminação prematura, o que é crucial para alcançar a dosagem terapêutica desejada. Nesse contexto, os hidrogéis, derivados de polímeros naturais, sintéticos ou híbridos, destacam-se como plataformas versáteis e vêm sendo amplamente explorados em diversas aplicações biomédicas. A combinação de propriedades que os tornam semelhantes às matrizes extracelulares naturais, como alto teor de água, biodegradabilidade, porosidade e biocompatibilidade, faz com que sejam particularmente atraentes para a engenharia de tecidos e a terapia celular. Entre esses materiais, os hidrogéis de pululano têm se mostrado promissores para a engenharia de tecidos e a administração de fármacos. O pululano, um polissacarídeo derivado do fungo polimórfico *Aureobasidium pullulans*, vem emergindo como um componente de grande interesse nas áreas farmacêutica e biomédica. Sua alta biocompatibilidade, ausência de toxicidade, mutagenicidade e imunogenicidade, além de sua biodegradabilidade e adaptabilidade, conferem-lhe uma ampla gama de aplicações. Ele pode ser utilizado no revestimento de comprimidos, cápsulas, grânulos e pílulas, bem como em formulações tópicas, como géis e filmes. Além disso, o pululano apresenta grande potencial em áreas como engenharia de tecidos, vacinação, direcionamento de fármacos e genes, revestimento de formas farmacêuticas, substituição de plasma, atividade insulínica e engenharia de enzimas e proteínas. Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial do hidrogel de pululano reticulado com trimetafosfato de sódio (STMP-Pululano) como uma possível plataforma de entrega de exossomos para aplicação na engenharia de tecidos cutâneos. Os resultados parciais obtidos até o momento demonstraram que a reticulação do pululano com trimetafosfato de sódio foi bem-sucedida. Além disso, os testes reológicos indicaram que os parâmetros mecânicos do hidrogel foram mantidos em diferentes temperaturas e tempos de análise. Com isso, o hidrogel STMP-Pululano foi obtido e está pronto para a realização de testes biológicos.

Palavras-chave: Pululano, hidrogel, exossomos, trimetafosfato de sódio.

ABSTRACT

Delivery systems can extend the half-life of exosomes at the target site, preventing their premature elimination, which is crucial for achieving the desired therapeutic dosage. In this context, hydrogels—derived from natural, synthetic, or hybrid polymers—stand out as versatile platforms and have been extensively explored in various biomedical applications. Their combination of properties, such as high water content, biodegradability, porosity, and biocompatibility, makes them particularly attractive for tissue engineering and cell therapy. Among these materials, pullulan-based hydrogels have shown great promise for tissue engineering and drug delivery. Pullulan, a polysaccharide derived from the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*, has emerged as an important biopolymer of interest in the pharmaceutical and biomedical fields. Its high biocompatibility, non-toxicity, non-mutagenicity, non-immunogenicity, biodegradability, and adaptability grant it a wide range of applications. It can be used for coating tablets, capsules, granules, and pills, as well as in topical formulations such as gels and films. Moreover, pullulan has demonstrated significant potential in tissue engineering, vaccination, drug and gene delivery, pharmaceutical coating, plasma replacement, insulinotropic activity, and enzyme and protein engineering. Given this background, the present study aimed to evaluate the potential of pullulan hydrogel crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP-Pullulan) as a possible exosome delivery platform for skin tissue engineering applications. The preliminary results demonstrated that the crosslinking of pullulan with sodium trimetaphosphate was successful. Furthermore, rheological analyses showed that the hydrogel maintained its mechanical properties across different temperatures and time intervals. As a result, the STMP-Pullulan hydrogel has been successfully developed and is now ready for biological testing.

Keywords: Pullulan, hydrogel, exosomes, sodium trimetaphosphate.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FTIR - Infravermelho por transformada de Fourier;

STMP - Trimetafosfato de sódio;

STMP-Pululano – Hidrogel de pululano reticulado com STMP;

VEs - Vesículas extracelulares.

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	
Figura 1. Gráficos de FTIR do pululano comercial (A), STMP-Pululano 4h de crosslinking (B) e STMP de 24h de crosslinking.....	120
Tabela 2 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes e índice de mutagenicidade (IM) (entre parênteses) das cepas de <i>Salmonella</i> Typhimurium TA98, TA100, TA102 e TA97a expostas a vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais (CTMs-VEs) e hidrogel de alginato de sódio, com (HAS-VEs) ou sem (HAS) CTMs-VEs incorporadas.....	122

1. INTRODUÇÃO

Os exossomos são vesículas extracelulares (VEs) de tamanho nanométrico (30 a 100 nm) de origem endocítica que desempenham papéis importantes na comunicação intercelular (Riau et al., 2019; Kugeratski et al., 2021). Eles estão presentes em quase todas as células, tecidos e fluidos corporais e auxiliam na manutenção da homeostase tecidual na patobiologia da doença (Muthu et al., 2021). Dependendo da célula de origem, as VEs, incluindo os exossomos, podem conter DNA, RNA, lipídios, metabólitos e proteínas citosólicas e de superfície celular (Kalluri; LeBleu, 2020; Kugeratski et al., 2021).

Sob condições específicas, as VEs provocam regeneração tecidual e homeostase e as derivadas de células estromais mesenquimais apresentam viabilidade celular, troficidade, efeitos antiinflamatórios, imunomoduladores e terapêuticos. Além disso, colaboram na neoangiogênese e na proliferação celular (Muthu et al., 2021). Diante dos vários efeitos terapêuticos que podem ser proporcionados pelos exossomos, estudos vêm sendo realizados visando sua liberação sustentada a fim de investigar a resposta biológica (Wang et al., 2019; Li et al., 2022; Cao et al., 2023).

Os sistemas de entrega podem prolongar a meia-vida dos exossomos no local alvo, impedindo que eles sejam eliminados prematuramente, o que é crucial para atingir sua dosagem terapêutica (Riau et al., 2019). Nesse sentido, os hidrogéis, derivados de polímeros naturais, sintéticos ou híbridos, são plataformas versáteis e atualmente, vem sendo explorados e utilizados em diversas aplicações biomédicas (Cao et al., 2021). A combinação de propriedades que resultam em semelhanças com matrizes extracelulares naturais, como alto teor de água, biodegradabilidade, porosidade e biocompatibilidade os tornam atraentes, principalmente, para

engenharia de tecidos e terapia celular. Além disso, sua composição, estrutura, propriedades mecânicas e bioquímicas podem ser ajustadas para controlar ou modular o crescimento, proliferação e diferenciação celular, bem como facilitar a difusão das células, solutos e nutrientes, a fim de melhorar seu uso no reparo tecidual (Yang et al., 2017; Vega et al., 2017).

Hidrogéis projetados que podem imitar a matriz extracelular nativa têm se tornado cada vez mais um grande foco de pesquisa em engenharia de tecidos. Hidrogéis são redes de polímeros reticulados tridimensionais (3D) com alto teor de água semelhante aos tecidos naturais, tornando os hidrogéis um candidato atraente para andaimes de engenharia de tecidos e análogos de matriz extracelular (Liang et al., 2021). Os hidrogéis também podem ser usados para controlar a microarquitetura em tecidos projetados por meio do uso de técnicas de fotopadronização e microfabricação. Por exemplo, blocos de construção de hidrogel têm se mostrado úteis para construir tecidos projetados com características microarquitetônicas controladas (Xie et al., 2023). Dado seu uso crescente como andaimes de engenharia de tecidos, o desenvolvimento de novos hidrogéis que podem permitir o encapsulamento celular e a formação de tecidos pode ser benéfico.

Os hidrogéis de pululano são amplamente utilizados em engenharia de tecidos e administração de fármacos (Qin et al., 2021). O pululano, derivado do fungo polimórfico *Aureobasidium pullulans*, está emergindo como uma importante fonte de polissacarídeo de interesse nas áreas farmacêutica e biomédica (Elangwe et al., 2023). Por ser altamente biocompatível não tóxico, não mutagênico, não imunogênico, biodegradável, comestível e devido sua adaptabilidade e flexibilidade, ele apresenta uma ampla gama de aplicações, podendo ser usado no revestimento de comprimidos, cápsulas, grânulos, pílulas ou formulações tópicas, como gel, filme, entre outros

(Pandey et al., 2021; Agrawal et al., 2022). O potencial do pululano na pesquisa e no campo biomédico destaca-se para engenharia de tecidos, vacinação, direcionamento de medicamentos, direcionamento genético, revestimento de dosagem farmacêutica, substituição de plasma, atividade insulínica, além de engenharia de enzimas e proteínas (Sinhg et al., 2017; 2021).

2.OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial do hidrogel de pululano reticulado com trimetafosfato de sódio (STMP-Pululano) para possível plataforma de entrega de exossomos para uso na engenharia de tecidos cutâneos.

3.MATERIAL E METÓDOS

3.1 Preparação do Hidrogel de STMP-Pululano

O Hidrogel foi preparado na concentração de 6%. Para o preparo foram dissolvidos 0,6 g de pululano (Merck Life Science) e 0,17 g de NaOH (Merck Life Science) em 6,43 mL de água deionizada em um falcon de 50 mL. Foram dissolvidos 0,3 g de trimetafosfato de sódio (STMP – Merck Life Science) em 2,5 mL de água deionizada. Quando ambas as soluções estiveram completamente dissolvidas, foi adicionado o conteúdo do tubo Falcon contendo STMP no tubo Falcon contendo pululano e NaOH. Após isso, foi adicionado HCl (4 mL para 1 mL de pululano) nos tempos de 4 horas e 24 horas e ajustado o pH até ficar neutro para interromper a reticulação. Depois de reticulado o hidrogel foi liofilizado por 4 dias.

3.2 Caracterização do Hidrogel de STMP-Pululano

3.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros foram registrados utilizando um espectrofotômetro ALPHA II Compact FT-IR. As amostras foram analisadas em estado liofilizado sobre um suporte de KRS-5, dentro da faixa de frequência de 4000–600 cm^{-1} . O processamento dos dados foi realizado utilizando o software OPUS 6.5 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Alemanha).

3.3.3 Reologia

O ponto de gel foi determinado usando um reômetro Anton Paar MCR501 controlado por estresse. A geometria placa-placa usada consistia em uma placa inferior de alumínio rugosa conectada a uma placa Peltier, bem como uma placa superior de alumínio rugosa de 50 mm de diâmetro. As placas foram rugosas para evitar deslizamento de parede. Uma varredura de tempo a uma tensão constante de 0,1% e uma frequência de 10 rad/s foi realizada a uma temperatura de 37 °C para determinar o ponto de gel. O ponto de gel é definido como o tempo que leva para o módulo de armazenamento (G') atingir e exceder o valor do módulo de perda (G'').

4. RESULTADOS

4.1 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é um método simples e sensível para entender se a reação de reticulação foi bem-sucedida e se ligações específicas foram formadas. As ligações simples entre átomos de hidrogênio e oxigênio, especificamente os estiramentos de hidrogenio ligado ao

oxigênio aparecem na região de 3300–3500 cm^{-1} , indicando a capacidade de retenção de umidade, além disso, surgiram novas bandas no intervalo de números de onda de 700–800 cm^{-1} para os hidrogéis reticulados (Figura 1). Em particular, a banda a 760 cm^{-1} , específica para $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$, que demonstra que a reticulação ocorreu.

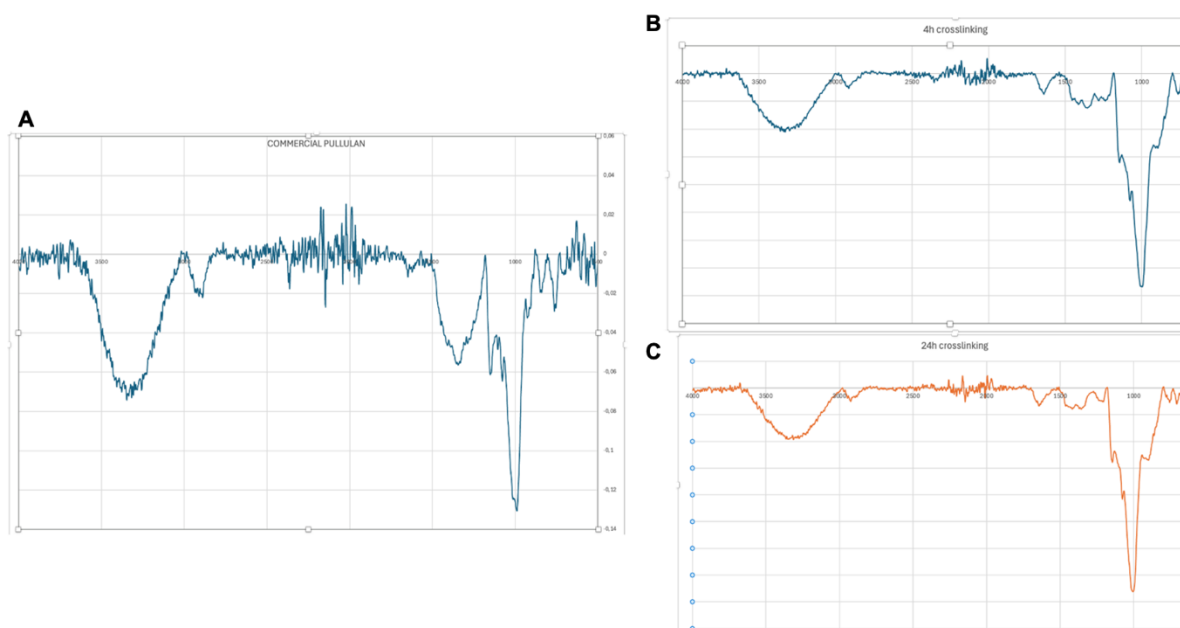


Figura 1. Gráficos de FTIR do pululano comercial (A), STMP-Pululano 4h de crosslinking (B) e STMP de 24h de crosslinking.

4.2 Reologia

Para avaliar a evolução do gel uma vez formado, suas propriedades viscoelásticas foram medidas ao longo do tempo e com diferentes temperaturas. Testes de varredura de frequência foram realizados. A Figura 2A mostra o módulo de armazenamento do gel vs. tempo. G' no tempo inicial aumenta com a frequência, tendo seu pico em 600 segundos. Portanto o teste de viscosidade demonstrou que o hidrogel de STMP-Pululano tem seu pico com 600 segundos e em 40°C (Figura 2B e 2C).

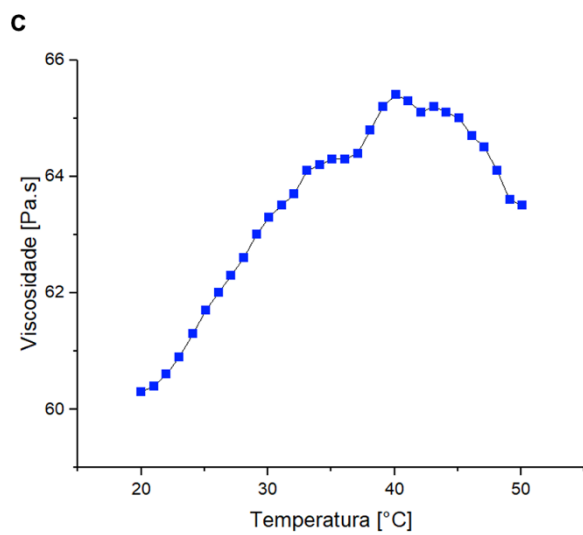
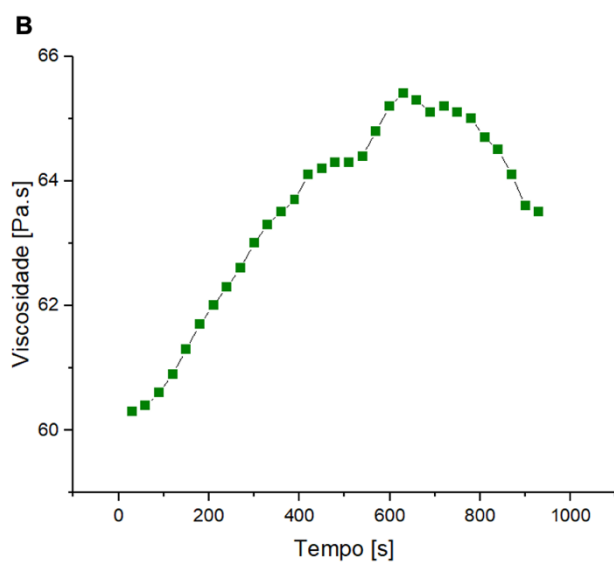
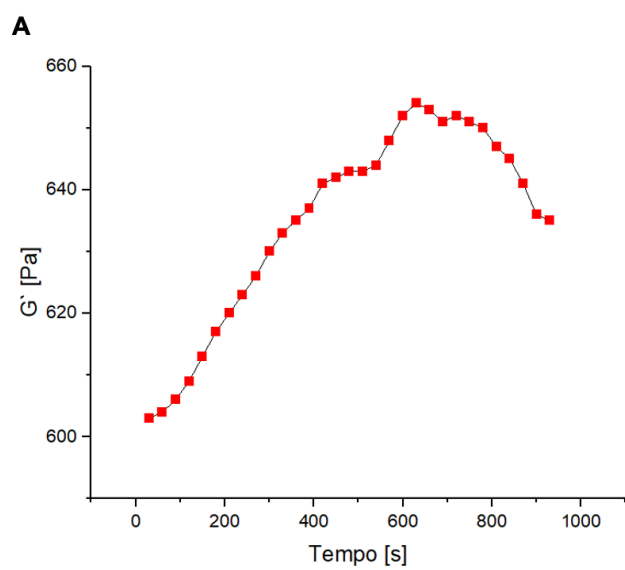


Figura 2. Gráficos de reologia do hidrogel de STMP-Pululano. (A) módulo de armazenamento do gel vs. Tempo. (B) Viscosidade vs. Tempo. (C) Viscosidade vs. Temperatura.

REFERÊNCIAS

- Agrawal S, Budhwani D, Gurjar P, Telange D, Lambole V. Pullulan based derivatives: synthesis, enhanced physicochemical properties, and applications. *Drug Deliv.* 2022;29:3328-3339. doi: 10.1080/10717544.2022.2144544.
- Cao H, Chen M, Cui X, Liu Y, Liu Y, Deng S, Yuan T, Fan Y, Wang Q, Zhang X. Cell-Free Osteoarthritis Treatment with Sustained-Release of Chondrocyte-Targeting Exosomes from Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells to Rejuvenate Aging Chondrocytes. *ACS Nano.* 2023;17:13358-13376. doi:10.1021/acsnano.3c01612.
- Cao H, Duan L, Zhang Y, Cao J, Zhang K. Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;6:426. doi: 10.1038/s41392-021-00830-x.
- Elangwe CN, Morozkina SN, Olekhovich RO, Polyakova VO, Krasichkov A, Yablonskiy PK, Uspenskaya MV. Pullulan-Based Hydrogels in Wound Healing and Skin Tissue Engineering Applications: A Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24:4962. doi: 10.3390/ijms24054962.

Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367:eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977.

Kugeratski FG, Kalluri R. Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS J*. 2021 Jan;288(1):10-35. doi: 10.1111/febs.15558. Epub 2020 Oct 3. PMID: 32910536; PMCID: PMC9116040.

Li C, Liu SY, Zhang M, Pi W, Wang B, Li QC, Lu CF, Zhang PX. Sustained release of exosomes loaded into polydopamine-modified chitin conduits promotes peripheral nerve regeneration in rats. *Neural Regen Res*. 2022;17:2050-2057. doi:10.4103/1673-5374.335167.

Li M, Wang T, Tian H, Wei G, Zhao L, Shi Y. Macrophage-derived exosomes accelerate wound healing through their anti-inflammation effects in a diabetic rat model. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47:3793-3803. doi: 10.1080/21691401.2019.1669617.

Liang Y, He J, Guo B. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano*. 2021;15:12687-12722. doi: 10.1021/acsnano.1c04206. Epub 2021 Aug 10. PMID: 34374515.

Muthu S, Bapat A, Jain R, Jeyaraman N, Jeyaraman M. Exosomal therapy-a new frontier in regenerative medicine. *Stem Cell Investig*. 2021;8:7. doi:10.21037/sci-2020-037.

Pandey S., Shreshtha I., Sachan S.G. Pullulan: Biosynthesis, Production and Applications. In: Nadda A.K., Sajna K.V., Sharma S., editors. *Microbial*

Exopolysaccharides as Novel and Significant Biomaterials. 1st ed. Springer; Cham, Switzerland: 2021. pp. 121–141. Chapter 6.

Qin X, He R, Chen H, Fu D, Peng Y, Meng S, Chen C, Yang L. Methacrylated pullulan/polyethylene (glycol) diacrylate composite hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2021;32:1057-1071. doi: 10.1080/09205063.2021.1899888.

Riau AK, Ong HS, Yam GHF, Mehta JS. Sustained Delivery System for Stem Cell-Derived Exosomes. *Front Pharmacol.* 2019;10:1368. doi:10.3389/fphar.2019.01368.

Singh RS, Kaur N, Hassan M, Kennedy JF. Pullulan in biomedical research and development - A review. *Int J Biol Macromol.* 2021;166:694-706. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.227.

Singh RS, Kaur N, Rana V, Kennedy JF. Pullulan: A novel molecule for biomedical applications. *Carbohydr Polym.* 2017 Sep 1;171:102-121. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.089.

Vega SL, Kwon MY, Burdick JA. Recent advances in hydrogels for cartilage tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2017;33:59-75. doi: 10.22203/eCM.v033a05.

Wang C, Wang M, Xu T, Zhang X, Lin C, Gao W, Xu H, Lei B, Mao C. Engineering Bioactive Self-Healing Antibacterial Exosomes Hydrogel for Promoting Chronic Diabetic Wound Healing and Complete Skin Regeneration. *Theranostics.* 2019;9:65-76. doi: 10.7150/thno.29766.

Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* 2017;57:1-25. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.036.

Xie G, Wang X, Mo M, Zhang L, Zhu J. Photothermal Hydrogels for Promoting Infected Wound Healing. *Macromol Biosci.* 2023 Feb;23(2):e2200378. doi: 10.1002/mabi.202200378.