



# Concurso Público Fiocruz 2023

## Pesquisador em Saúde Pública

### Prova Discursiva

#### PE 48

## Engenharia Biomédica

### Espelho de Resposta

**Pontuação de cada Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 3, de acordo com a Unidade detentora da vaga.**

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

#### Questão 01

##### a) Scaffolds e Biotintas:

**Scaffolds (arcabouços):** São estruturas tridimensionais que fornecem suporte mecânico e promovem a adesão, proliferação e diferenciação celular. Podem ser produzidos a partir de diversos materiais, como polímeros biodegradáveis, hidrogéis ou matriz extracelular natural, e sua arquitetura tridimensional é crucial para mimetizar o microambiente celular nativo. Exemplos de materiais comumente utilizados na fabricação de scaffolds incluem polímeros biodegradáveis, como poliácido láctico (PLA), poli-caprolactona (PCL) e ácido poliglicólico (PGA), hidrogéis, como gelatina e alginato, e matriz extracelular natural, como o colágeno.

- **Porosidade:** A porosidade do scaffold é crucial para permitir a difusão de nutrientes, oxigênio e metabólitos, além de facilitar a migração celular dentro do material. Ajustes na porosidade podem ser feitos durante a fabricação do scaffold para atender às necessidades específicas do tecido a ser regenerado.
- **Flexibilidade:** A flexibilidade do scaffold pode variar dependendo da aplicação desejada. Para tecidos como a cartilagem, um scaffold com certa rigidez pode ser necessário para suportar as forças mecânicas, enquanto para tecidos como a pele, uma maior flexibilidade pode ser preferível.
- **Características Reológicas:** As características reológicas do scaffold, como viscosidade e tempo de gelificação, influenciam na sua capacidade de ser manipulado e moldado durante o processo de fabricação. Essas propriedades devem ser ajustadas para garantir uma distribuição uniforme das células e dos biomateriais no scaffold.

**As biotintas** são compostas por uma combinação de biomateriais, fatores de crescimento e nutrientes que fornecem um ambiente propício para as células se desenvolverem. Os biomateriais podem incluir colágeno, gelatina, alginato, entre outros, enquanto os fatores de crescimento podem ser proteínas como o fator de crescimento epidérmico (EGF) ou o fator de crescimento transformador beta (TGF-beta). As biotintas são formuladas com uma combinação específica de biomateriais, fatores de

crescimento e nutrientes para promover a adesão, proliferação e diferenciação celular. A composição das biotintas varia de acordo com a aplicação pretendida e o tipo de células utilizadas, que podem incluir células de linhagem celular específica, células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) ou células primárias. Por exemplo, para regeneração óssea, biotintas contendo colágeno, hidroxiapatita e fatores de crescimento osteogênicos são frequentemente empregadas.

- **Propriedades gerais:** As biotintas devem possuir propriedades adequadas de viscosidade, pH e osmolaridade para garantir a viabilidade e funcionalidade celular. Além disso, a capacidade de gelificação controlada é importante para permitir a formação do scaffold durante a impressão ou a moldagem.
- **Porosidade:** A porosidade do material deve ser adequada aos dos tipos celulares que estão presentes na biotinta, também é crucial para permitir transporte de nutrientes, oxigênio e metabólitos, além de facilitar a migração celular dentro do material
- **Flexibilidade:** variável, mas tende a ser alta.
- **Características Reológicas:** As características reológicas da biotinta, como viscosidade e tempo de gelificação, influenciam na sua capacidade de ser manipulada e moldada durante o processo de fabricação. Essas propriedades devem ser ajustadas para garantir uma distribuição uniforme das células e dos biomateriais no construto.

**b) Tipos celulares em um construto:** os tipos celulares podem ser diversos dependendo de sua aplicação

**Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (iPSCs):** As células-tronco pluripotentes induzidas são células adultas reprogramadas para um estado pluripotente, o que significa que têm a capacidade de se diferenciar em praticamente qualquer tipo celular do corpo. Essas células são altamente versáteis e podem ser direcionadas para linhagens específicas, tornando-as valiosas para a regeneração de uma ampla variedade de tecidos.

**Células-Tronco Mesenquimais (MSCs):** As células-tronco mesenquimais são encontradas em vários tecidos, como a medula óssea, o tecido adiposo e o cordão umbilical. Elas possuem capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, incluindo osteoblastos, condroblastos e adipócitos, e também exibem propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, sendo úteis para a regeneração de tecidos e modulação da resposta imunológica.

**Células Progenitoras:** Essas células têm um potencial de diferenciação mais limitado em comparação com as células-tronco, mas ainda podem se diferenciar em tipos celulares específicos. Por exemplo, células progenitoras hematopoiéticas podem dar origem a diferentes tipos de células sanguíneas, enquanto as células progenitoras neurais têm capacidade de se diferenciar em células do sistema nervoso.

**Células Primárias:** Células primárias referem-se a células que são isoladas diretamente de um organismo, sem passar por processos de cultivo prolongado em laboratório. Isso inclui células epiteliais, fibroblastos, condroblastos e muitos outros tipos celulares específicos de cada tecido. Essas células mantêm muitas das características e funcionalidades do tecido original, tornando-as valiosas para estudos de regeneração e engenharia de tecidos.

**Inserção das Células no Construto:**

- **Encapsulamento durante a Produção das Biotintas:** As células podem ser encapsuladas dentro do scaffold durante a produção das biotintas. Isso geralmente envolve a mistura das células com os biomateriais antes da gelificação ou solidificação do material. Esse método permite uma distribuição uniforme das células dentro do construto.
- **Mistura com o Material do Scaffold:** Outra abordagem é a mistura das células com o material do scaffold antes da solidificação. Nesse caso, as células são incorporadas ao material do

scaffold e distribuídas homoganeamente antes da formação da estrutura tridimensional. Isso é comum em scaffolds porosos, onde as células podem migrar e se proliferar ao longo do tempo.

- Impressão Direta durante a Bioimpressão: Durante a bioimpressão, as células são depositadas diretamente no scaffold durante a deposição das camadas do material. Isso permite um controle preciso sobre a distribuição das células dentro do construto e a criação de padrões específicos. Essa técnica é particularmente útil para a fabricação de construtos complexos com múltiplos tipos celulares.

### c) A caracterização de um construto biologicamente ativo e estruturado:

pode ser realizada por meio de análises morfológicas, como uso de microscopia ótica e técnicas básicas de histologia, microscopia confocal e de fluorescência para detalhar estruturas particulares de tecidos, até o uso de microscopia eletrônica de varredura para avaliar a arquitetura tridimensional e a distribuição celular. Além disso, técnicas bioquímicas, como análise da expressão gênica e proteica, por transcriptômica e proteômica, podem ser empregadas para avaliar a funcionalidade das células e a produção de matriz extracelular. Testes funcionais também são essenciais para determinar a capacidade do construto de desempenhar sua função biológica, como ensaios de viabilidade celular, diferenciação e resposta a estímulos externos.

### d) Aplicação em Medicina Regenerativa vs. Modelo Baseado nos 3Rs:

Na medicina regenerativa, os construtos bioimpressos são utilizados para reparar tecidos danificados ou para regenerar órgãos lesionados, proporcionando uma abordagem personalizada e minimizando a rejeição do hospedeiro. Essa abordagem personalizada permite a criação de tecidos e órgãos sob medida para cada paciente, reduzindo a chance de rejeição do hospedeiro e melhorando os resultados clínicos a longo prazo. Até o momento tem sido bastante aplicada para tecidos superficiais.

Na proposição de um modelo baseado nos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), os construtos bioimpressos são utilizados como alternativa aos modelos animais em testes pré-clínicos. Isso se alinha aos princípios éticos da pesquisa científica e visa reduzir o número de animais utilizados, melhorar a qualidade dos experimentos e, sempre que possível, substituir completamente o uso de animais. Por exemplo: **Redução:** A utilização de construtos bioimpressos reduz a necessidade de experimentação animal, uma vez que permitem a realização de estudos mais precisos e relevantes in vitro. **Refinamento:** Os modelos baseados em construtos bioimpressos podem ser refinados para simular com maior fidelidade as condições fisiológicas humanas, proporcionando resultados mais confiáveis e reduzindo a variabilidade experimental. **Substituição:** Em muitos casos, os construtos bioimpressos podem substituir completamente os modelos animais, especialmente em testes de eficácia de drogas, toxicidade e biocompatibilidade.

Dessa forma, o uso de construtos bioimpressos contribui para a promoção da ética na pesquisa, redução dos custos associados aos testes em animais e aceleração do desenvolvimento de novas terapias e medicamentos.

## Questão 02

a) O *Organ-on-chip* é uma tecnologia avançada que consiste em miniaturizar órgãos humanos em um chip, para simular o funcionamento fisiológico de tecidos e órgãos específicos. Essa tecnologia permite estudar doenças humanas de forma mais precisa e personalizada, além de reduzir a necessidade de testes em animais.

O uso de *Organ-on-chip* (*kidney-on-chip*, *gut-on-chip*, etc) traz diversas vantagens para a Medicina de Precisão, como a possibilidade de testar a eficácia de medicamentos e terapias de forma rápida e precisa, além de permitir o estudo do funcionamento de órgãos específicos e o estabelecimento de estratégias terapêuticas personalizadas.

As desvantagens do uso de *Organ-on-a-chip* na medicina de precisão podem incluir:

1) Limitações na replicação completa de todas as funcionalidades e complexidades dos órgãos humanos: as versões miniaturizadas dos órgãos podem não ser capazes de reproduzir todas as funcionalidades e interações presentes em um órgão humano real.

2) Dificuldades na reprodução de um ambiente completamente realista: os chips podem não conseguir replicar completamente o ambiente tridimensional, a vascularização e a interação com outros sistemas corporais presentes no organismo humano.

3) Custos elevados: a tecnologia envolvida na criação e manutenção dos chips pode ser cara, o que pode limitar sua utilização em larga escala.

#### Referências:

1. Bovard, D., Shandas, R., & Yost, M. (2019). Organ-on-a-chip: a new approach to biomedical engineering. *Biomedical engineering online*, 18(1), 1-17.
2. Oleaga, C., Bernabini, C., Smith, A. S., Srinivasan, B., Jackson, M
3. Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., & Ingber, D. E. (2010). Reconstituting organ-level lung functions on a chip. *Science*, 328(5986), 1662-1668.
4. Skardal, A., Shupe, T., & Atala, A. (2016). Organoid-on-a-chip and body-on-a-chip systems for drug screening and disease modeling. *Drug discovery today*, 21(9), 1399-1411.
5. Zhao, Y., Zhang, F., Ross, E. W., & Wang, L. (2020). Advances in organ-on-a-chip engineering. *Nature Reviews Materials*, 5(6), 453-468.
6. Bhatia, S. N., & Ingber, D. E. (2014). Microfluidic organs-on-chips. *Nature biotechnology*, 32(8), 760-772.

**b)** As iPSCs são células adultas reprogramadas geneticamente para adquirirem características semelhantes às células-tronco embrionárias, ou seja, a capacidade de se diferenciarem em qualquer tipo de célula do corpo humano. A geração de iPSCs envolve a introdução de fatores de transcrição específicos nas células adultas, que reprogramam seu estado diferenciado para um estado pluripotente.

A geração de iPSCs envolve a introdução de fatores de transcrição específicos nas células adultas. Esses fatores de transcrição são responsáveis por reprogramar o estado diferenciado das células adultas para um estado pluripotente. Os fatores de transcrição mais comumente utilizados são:

- 1) Oct4 (Octamer-binding transcription factor 4);
- 2) Sox2 (SRX (sex determining region Y)-box 2);
- 3) Klf4 (Kruppel-like factor 4);
- 4) c-Myc (proto-oncogene Myc).

Esses fatores de transcrição, quando introduzidos nas células adultas, ativam uma cascata de eventos moleculares que levam à reprogramação do programa genético das células e à aquisição de características pluripotentes.

Existem várias opções para gerar iPSCs:

- Reprogramação baseada em vírus: os fatores de transcrição podem ser introduzidos nas células adultas usando vetores virais, como retrovírus ou lentivírus. Esses vírus carregam os genes dos fatores de transcrição e os entregam às células, permitindo sua expressão e reprogramação celular.

- Reprogramação baseada em RNA mensageiro (mRNA): em vez de usar vetores virais, os genes dos fatores de transcrição são transcritos *in vitro* e entregues às células como mRNA.

Esse método evita a integração viral no genoma das células, o que pode ser indesejável em algumas aplicações.

- Reprogramação baseada em proteínas: os fatores de transcrição podem ser produzidos e entregues às células como proteínas recombinantes. Essas proteínas entram nas células e desencadeiam a reprogramação celular.

- Reprogramação sem vetor: é possível alcançar a reprogramação celular sem o uso de vetores ou entrega de genes. Isso envolve o uso de pequenas moléculas que mimetizam a atividade dos fatores de transcrição e ativam a via de sinalização responsável pela manutenção do estado pluripotente.

As iPSCs podem ser combinadas com a tecnologia *Organ-on-a-Chip* na Engenharia Biomédica, aproveitando a capacidade dessas células de se diferenciarem em diferentes tipos de células do corpo humano. As iPSCs podem ser direcionadas a se diferenciarem em células específicas de um órgão-alvo, como células cardíacas, células hepáticas ou células renais. Essas células diferenciadas podem então ser incorporadas em chips que simulam o ambiente fisiológico desse órgão, possibilitando um estudo mais preciso e personalizado da fisiopatologia de doenças.

Referências:

1. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126(4), 663-676.
2. Sances, S., Ho Rui Jing, H., Woodruff, G., & Svendsen, C. N. (2017). iPSC-derived human microglia-like cells to study neurological diseases. *Neuron*, 94(2), 278-293.
3. Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in cell biology*, 21(12), 745-754.
4. Lee, J. H., Kim, C., & Lee, S. H. (2019). Applications of organoids and organs-on-a-chip for personalized medicine. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111464.

**c)** A metodologia para diferenciar iPSC em neurônios envolve uma série de etapas e protocolos específicos. Geralmente, o processo de diferenciação consiste em direcionar as iPSC para a linhagem neural por meio de tratamento com fatores de crescimento e moduladores de sinalização celular.

A primeira etapa é induzir a formação de corpos neurais (CNs), que são agregados tridimensionais de células que se assemelham a estruturas embrionárias precursoras do sistema nervoso. As iPSC são agregadas em suspensões e cultivadas em meios de cultura que promovem a formação de CNs. Durante esse processo, as células se organizam espontaneamente em camadas embrionárias, diferenciando-se em precursores neurais.

A segunda etapa é direcionar a diferenciação dos precursores neurais para a linhagem neuronal específica desejada, como neurônios corticais ou dopaminérgicos. Isso pode ser feito através da manipulação de fatores de crescimento e moduladores de sinalização específicos, que promovem a expressão de genes relacionados à diferenciação neuronal.

Existem vários fatores utilizados para reprogramação de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) em neurônios. Esses fatores incluem:

- Fatores de transcrição: Fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão gênica. Alguns fatores de transcrição importantes para a reprogramação de iPSCs em neurônios são o NEUROG2, NGN2, BRN2, ASCL1, MYT1L, SOX2 e PAX6. Esses fatores promovem a transição das células pluripotentes para um estado neural específico.

- Fatores de crescimento e morfogênicos: Diferentes fatores de crescimento são utilizados para direcionar a diferenciação das iPSCs em neurônios específicos. Por exemplo, o fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) é frequentemente utilizado para promover a proliferação de precursores neurais, enquanto o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) pode ser adicionado para promover a sobrevivência e o desenvolvimento dos neurônios diferenciados.

- Inibidores de sinalização: São utilizados inibidores de sinalização de desenvolvimento embrionário, como o inibidor de BMP (bone morphogenetic protein) e o inibidor de Wnt, para bloquear vias de sinalização que inibem a diferenciação neural e favorecer a formação de células neurais.

Juntos, esses fatores de transcrição, fatores de crescimento e inibidores de sinalização trabalham em sinergia para dirigir a reprogramação e a diferenciação das iPSCs em neurônios. A combinação exata desses fatores pode variar dependendo do protocolo experimental e do tipo de neurônio desejado.

Para avaliar a funcionalidade das células já diferenciadas, podem ser realizados testes e ensaios específicos. Alguns dos métodos utilizados incluem:

- Imunofluorescência: utiliza-se a marcação de diferentes marcadores neuronais (como proteínas específicas para neurônios) através de anticorpos conjugados com fluoróforos. Essa técnica permite visualizar a presença e a organização das células neuronais.

- Microscopia Eletrônica: pode ser realizada a fim de observar a ultraestrutura dos neurônios diferenciados. Por meio desse método, é possível observar detalhes intracelulares, como sinapses e organelas.
- Eletrofisiologia: esse tipo de análise permite medir a atividade elétrica das células neuronais. Isso pode ser feito utilizando técnicas como o patch clamp, que permite registrar a atividade elétrica de um único neurônio, ou ensaios de análise de potenciais de ação e correntes iônicas.
- Cultura de células e testes funcionais: as células neuronais diferenciadas podem ser cultivadas em condições adequadas para formação de sinapses e circuitos neurais. Com isso, é possível avaliar a capacidade dessas células em formar sinapses funcionais, estabelecer conexões sinápticas e responder a estímulos elétricos ou químicos.

Alguns desses marcadores incluem:

1) Marcadores de proteínas neuronais:

- $\beta$ III-Tubulina (TUJ1): Proteína estrutural de microtúbulos expressa em neurônios em estágios iniciais de desenvolvimento.
- MAP2 (Microtubule-Associated Protein 2): Proteína associada aos microtúbulos em neurônios maduros e dendritos.
- NeuN: Proteína expressa em neurônios maduros e terminais axonais.
- Synapsin I: Proteína associada a vesículas sinápticas.

2) Marcação de receptores neurotransmissores:

- GABAérgicos: GAD65/67 (Ácido Glutâmico Decarboxilase 65/67), GABA A receptor subunits (subunidades de receptores GABA A ).
- Glutamatérgicos: GluN1 (subunidade do receptor NMDA), VGLUT (transportador vesicular de glutamato).

3) Marcadores de subtipos neuronais específicos:

- Dopaminérgicos: TH (Tirosina Hidroxilase), DAT (transportador de dopamina).
- Serotonérgicos: 5-HT (serotonina), SERT (transportador de serotonina).
- Colinérgicos: ChAT (colina acetiltransferase), VAChT (transportador vesicular de acetilcolina).
- GABAérgicos: GABAergic transcription factors, como GABAergic related genes (Gad1 e Gad2).

Referências:

1. Marchetto MC, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells into functional cortical neurons in vitro. *Cell Stem Cell*. 2010;3(6):646-654.
2. Shi Y, et al. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*. 2012;15(3):477-486.
3. Zhang SC, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to functional neurons in three-dimensional culture. *Methods Mol Biol*. 2016;1307:173-183.
4. Pasca AM, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods*. 2015;12(7):671-678.
5. Hahn MS, et al. Electrophysiological properties of cortical neurons derived from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):11104.

6. Zhang SC, et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001;19(12):1129-1134.
7. Gaspard N, et al. Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc.* 2009;4(10):1454-1463.
8. Zhang Y, et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron.* 2013;78(5):785-798.
9. Ladewig J, et al. Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods.* 2012;9(6):575-578.
10. Marchetto MC, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells into functional cortical neurons in vitro. *Cell Stem Cell.* 2010;3(6):646-654.
11. Shi Y, et al. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci.* 2012;15(3):477-486.
12. Zhang SC, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to functional neurons in three-dimensional culture. *Methods Mol Biol.* 2016;1307:173-183.
13. Pasca AM, et al. Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent stem cells in 3D culture. *Nat Methods.* 2015;12(7):671-678.