



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**ESTUDO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EQUINAS
ORIUNDAS DO SANGUE DA MEDULA ÓSSEA
CULTIVADAS SOBRE UM FILME
MULTICAMADAS DE BIOPOLÍMEROS:
QUITOSANA, HA E CMC.**

Amanda Jeronimo Listoni

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Instituto de Biociências Campus de Botucatu, Unesp, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração de Biologia da Reprodução.

Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

**BOTUCATU – SP
2013**

Programa de Pós-Graduação Em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Junior, S/N – CEP: 18618-970 – Cx Postal 510 – Botucatu/SP/Brasil
Tel.: (14) 3880-0780 / 3880-0781 / 3880-0782 – E-mail: pos-graduacao@ibb.unesp.br



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ESTUDO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EQUINAS
ORIUNDAS DO SANGUE DA MEDULA ÓSSEA
CULTIVADAS SOBRE UM FILME
MULTICAMADAS DE BIOPOLÍMEROS:
QUITOSANA, HA E CMC.**

Amanda Jeronimo Listoni

Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Fernando C. Vasconcellos

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Instituto de Biociências Campus de Botucatu, Unesp, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração de Biologia da Reprodução.

Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

**BOTUCATU – SP
2013**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
'JÚLIO DE MESQUITA FILHO'
Campus de Botucatu



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Listoni, Amanda Jeronimo.

Estudo do potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais equinas oriundas do sangue da medula óssea cultivadas sobre um filme multicamadas de biopol-imeros : quitosana, HÁ, e CMC / Amanda Jeronimo Listoni. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Coorientador: Fernando da Cruz Vasconcellos

Capes: 31302017

1. Reprodução Animal. 2. Biocurativo. 3. Células-tronco. 4. Materias biomédicos. 5. Equino. 6. Quitosana. 7. Quitina.

Palavras-chave: Terapia celular; Células-tronco; Biocurativos; Multicamadas Layer-by-Layer.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA
CONTAGEM DE CRÉDITOS EM ATIVIDADES COMPLEMENTARES**

(De acordo com Portaria 12/09-SPG/IBB/UNESP)

Aluno(a): Amanda Jeronimo Listoni

Nível: (x) Mestrado – mínimo: 05 créditos; () Doutorado – mínimo: 10 créditos

Atividade	Equivalência em créditos	Quantidade	Total de créditos	Número do Anexo
I. ATIVIDADES DE ENSINO (Máximo 03 créditos para o Mestrado e 06 créditos para o Doutorado)				
1. Aulas em curso fundamental ou médio	30 horas = 01 crédito			
2. Aulas em curso de extensão	15 horas = 01 crédito			
3. Aulas em curso superior	15 horas = 01 crédito			
4. Aulas em pós-graduação (como convidado)	04 horas = 01 crédito			
5. Monitoria voluntária	30 horas = 01 crédito			
II. PUBLICAÇÕES (Exigência de cumprimento de no mínimo 02 créditos para o Mestrado e 04 para o Doutorado)				
1. Em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	10 créditos			
2. Em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	05 créditos			
3. Em periódico científico com índice de impacto menor à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos	1		
4. Resumos em eventos científicos internacionais	02 créditos	2		
5. Resumos em eventos científicos nacionais	01 crédito	11		
6. Resumos em eventos científicos estaduais ou regionais	0,5 crédito			
7. Resumos em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos			
8. Resumos em periódico científico com índice de impacto igual ou superior à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	02 créditos	1		
9. Resumos em periódico científico com índice de impacto menor à 50% da mediana da área de CB-I, subárea GBG (CAPES)	01 crédito			
10. Livro (autoria ou co-autoria)	10 créditos			
11. Capítulo de livro (autoria ou co-autoria)	5 créditos			
III. PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS (Exigência de cumprimento de no mínimo 02 créditos para o Mestrado e 04 para o Doutorado)				
1. Participação em evento internacional	02 créditos	1		
2. Participação em evento nacional	01 créditos	2		
3. Participação em evento estadual ou regional	0,5 crédito	1		
4. Palestra proferida em evento científico nacional	02 créditos			
5. Palestra proferida em evento científico estadual ou regional	01 créditos			
IV. ESTÁGIOS (Máximo 03 créditos para o Mestrado e 06 créditos para o Doutorado)				
1. No exterior	15 horas = 01 crédito			
2. No país	30 horas = 01 crédito			
V. CURSOS OU MINI-CURSOS ASSISTIDOS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	15 horas = 01 crédito	1		
VI. PALESTRAS ASSISTIDAS (Máximo 03 créditos - Mestrado e 06 - Doutorado)	5 palestras=01 crédito	2		
TOTAL DE CRÉDITOS			26,5 créditos	

Botucatu, 01 de Fevereiro de 2013

(Nome e Assinatura do Orientador)

(Nome e Assinatura do Aluno)

EPÍGRAFE

“Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo está vendo e pensar em algo diferente.”

(Roger Von Oech)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a grandes pessoas que fazem parte da minha vida, que lutaram, choraram, riram e torceram por mim, cada um a sua maneira. Primeiramente, aos meus pais, que tornaram possível a realização de todos os meus sonhos e sonharam comigo, dando toda a força para que eu chegasse lá. A minha querida irmã, por toda a amizade e companheirismo devotados a mim. Aos meus avós por cada oração e torcida. As minhas madrinhas e padrinhos queridos, que estão sempre ao meu lado. Dedico também a minha amada prima, minha irmã, que sempre torceu por mim e se alegrava com minhas conquistas e infelizmente não pôde estar aqui, mas sei que onde estiver se alegra por mim. E ao meu querido namorado e amigo, que esteve ao meu lado pacientemente, torcendo e incentivando mesmo que em dias tão difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que estiveram envolvidos comigo e com minha tese durante estes dois anos, principalmente a toda equipe do laboratório, sem vocês o trabalho não seria o mesmo, os dias seriam mais pesados. Vocês me ensinaram o trabalho em equipe, a amizade e a tolerância no trabalho. Ao Rafael Abdalla, por me auxiliar na dissertação e sempre torcer como irmão. Agradeço a minha querida e amiga orientadora Fernanda, que permitiu este trabalho, que confiou em mim e deu liberdade para que pudesse estudar, pesquisar e realizar esta pesquisa, ao meu coorientador Fernando, que possibilitou o desenvolvimento de novas técnicas e transmitiu seus conhecimentos para que pudesse concluir esta fase. Também agradeço aos funcionários da pós-graduação do IB, e a todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ.

Sumário

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUÇÃO.....	15
2.0 OBJETIVOS GERAIS.....	16
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Células-Tronco.....	17
3.1.1 Origem.....	17
3.1.2 Conceito.....	18
3.1.3 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais de Medula óssea em Equinos.....	21
3.1.4 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais.....	22
3.1.5 Terapia Celular em Equinos.....	24

CAPÍTULO II

1.0 MEMBRANAS BIODEGRADÁVEIS.....	27
1.1 Quitosana.....	27
1.2 Ácido Hialurônico.....	29
1.3 Carboximetilcelulose.....	31
2.0 TÉCNICA DE LAYER-BY-LAYER PARA A PRODUÇÃO DE PEMs (Polieletrólitos Multicamadas).....	31
2.1 Modelo para disposição das Multicamadas de Polieletrólitos.....	32

CAPÍTULO III

1.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.1 Obtenção das Células-Tronco Mesenquimais.....	34
1.1.1 Medula óssea.....	34
1.2 Passagens.....	37
1.3 Preparação das PEM's- Quitosana e Ácido Hialurônico.....	38
1.4 Preparação das Soluções.....	40
1.5 Diferenciação Osteogênica nas Membranas e nas Placas.....	41
1.6 Diferenciação Condrogênica nas Membranas e nas Placas.....	41
2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
2.1 Interações Células-Membrana e Células-Placa.....	42
2.2 Diferenciação Osteogênica nas Membranas e nas Placas.....	46
2.3 Diferenciação Condrogênica nas Membranas e nas Placas.....	51
2.4 Interação Membrana/placas e Membrana/Lâmina.....	52
3.0 CONCLUSÃO.....	52
4.0 REFERÊNCIAS.....	54

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da Mesoderme

Figura 2: Estrutura da Quitosana.

Figura 3: Estrutura do Ácido Hialurônico.

Figura 4: Estrutura da Carboximetilcelulose.

Figura 5: Modelo de disposição de zonas de multicamadas.

Figura 6: Idealização do processo de formação do filme multicamadas e sua deposição.

Figura 7: Deposição das Bicamadas.

Figura 8: Interação Iônica entre a Quitosana e o Ácido Hialurônico.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação entre tempo de adesão e crescimento celular das células quando dispostas em membranas e somente em placas.

Lista de Fotos

Foto 1: Animal três após 6 dias de cultivo.

Foto 2: Animal cinco, após 10 dias de cultivo.

Foto 3: Animal dois no momento da coleta

Foto 4: Animal 3, momento da coleta (fonte: Arquivo Pessoal)

Foto 5: Animal dois sendo coletado.

Foto 6: Sangue coletado de Medula óssea.

Foto 7: Sangue na fase de processamento com Histopaque 1077.

Foto 8: Material utilizado para a produção dos meios, passagens e processamento do material.

Foto 9: Antibióticos e Antimicóticos utilizados nos protocolos.

Foto 10: Células colocadas para cultivar nas membranas.

Foto 11: Células após 12hs de cultivo na membrana.

Foto 12: Amostra dois, cultivada em membrana após 48hs.

Foto 13: Controle da diferenciação na membrana.

Foto 14: Diferenciação Osteogênica.

Foto 15: Diferenciação Osteogênica.

Foto 16: Diferenciação Osteogênica sem Membrana.

Foto 17: Controle da Diferenciação Osteogênica Sem Membrana.

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Comparativo entre tempo de adesão na membrana e na placa.

Gráfico 2: Comparativo entre o tempo de crescimento entre membrana e placa.

Resumo

A terapia com Células-Tronco vive hoje o seu momento de máxima visibilidade. Toda esta atenção dá-se ao fato deste procedimento ser alvo potencial em tratamento de doenças graves. A grande aplicabilidade da terapia com as células-tronco dá-se através de seu potencial ilimitado de diferenciação em varias linhagens celular, além de sua capacidade de auto-renovação. Para que esta técnica possa ser utilizada na correção de fraturas ou na cicatrização de vários tecidos pode-se realizar a associação com biomaterias, que tenham um potencial de incorporação celular e ajudem na regeneração tecidual, e depois de adesão em seu local de ação, esta técnica é chamada de biocurativos e diversos substratos podem ser utilizados, desta forma foi escolhido um biomaterial Quitosana, o qual advém de uma matéria-prima conhecida como quitina, um polímero muito abundante na natureza, o qual tem sido recentemente testado como biocurativo. Em nossos testes, pudemos notar que estas biomembranas aceleram o processo de adesão celular e apresentam um desenvolvimento celular constante, sendo assim uma excelente opção na terapêutica cirúrgica.

Palavras-chave: Terapia celular, Células-tronco, Biocurativos e Multicamadas Layer-by- Layer.

Abstract

Stem Cell therapy is currently experiencing its moment of maximum visibility. All this attention is given the fact that this procedure is a potential target in the treatment of serious diseases. The wide applicability of therapy with stem cells is possible due to your unlimited potential to differentiate into several cell lineages, as well as their capacity for self-renewal. For this technique can be used in the repair of fractures or healing of various tissues can be performed in combination with biomaterial, which have a potential merger of cellular and assist in tissue regeneration, and after accession in their place of action, this technique is called Biocure and diverse substrates can be used in this way was chosen a biomaterial Chitosan, which comes from a raw material known as chitin, an abundant polymer in nature, which has recently been tested as Biocure. In our tests, we noticed that these biomembranes accelerate the process of cell adhesion and cell growth have a constant, so a great option in the surgical therapy.

Keyword: Cellular Therapy, Stem-cells, Biocure and Layer-by-Layer Multilayers

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUÇÃO

A terapia com Células-Tronco apresenta grande visibilidade. Sendo foco da imprensa em quase todo o mundo quando se fala em saúde e biotecnologia. Toda esta atenção deve-se ao fato desta terapia ter um alto potencial para o tratamento de doenças com baixas perspectivas de melhoras, como as neurológicas, diabetes, cardiopatias e distrofias musculares.

A capacidade terapêutica das células-tronco decorre de sua potencialidade quase ilimitada de diferenciação em varias linhagens celular, assim como de sua aptidão para a autorrenovação.

As células-tronco podem ser classificadas, de acordo com sua origem: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto que é pluripotente, ou seja, possui a potencialidade de originar todos os tipos celulares derivados dos três folhetos germinativos, exceto anexos embrionários. Embora o potencial terapêutico destas células seja enorme, o seu uso ainda representa risco de formação de tumores após o transplante. Além disso questões éticas envolvendo o uso de embriões no cultivo celular, limitam ainda mais sua utilização.

Por outro lado, as células-tronco adultas são mantidas em reserva nos tecidos sendo denominadas multipotentes quando possuem a capacidade de originar vários tipos celulares originados de um único folheto embrionário, ou unipotentes, quando originam somente um tipo celular. Dentre estas um tipo de células multipotentes amplamente estudado, visando a terapia celular, é o das células tronco mesenquimais (CTM)

As fontes de CTM mais conhecidas são o sangue da medula óssea e tecido adiposo. No entanto, este tipo celular também é encontrado em quase todos os tecidos do organismo, incluindo os anexos embrionários tais como líquido e membrana amniótica e no sangue e parede do cordão umbilical. A medula óssea é uma excelente fonte de CTM, no entanto, o número e a capacidade de diferenciação das CTM deste tecido diminuem com a idade e seu potencial terapêutico também declina com o tempo. Sendo assim, utilizam-se outras fontes de célula-tronco.

O transplante de CTM autólogas em um número muito maior do que o presente normalmente no tecido, tem se mostrado capaz de promover a regeneração e reparação de tecidos de origem mesenquimal lesionados, como ossos, cartilagem e tendões. Contudo, é

importante ressaltar que ainda é necessária a realização de estudos para o melhor entendimento da maneira como essas células atuam no local de lesão. Atualmente há duas teorias que explicariam este potencial: as células implantadas se diferenciam em células do tecido em questão; ou as células secretariam fatores que induziriam as células adjacentes (implantadas ou residentes) a promover a reparação (RICHARDSON, et al, 2007).

De acordo com o conceito de engenharia de tecidos é possível regenerar vários tecidos ou órgãos utilizando-se células maduras ou células tronco semeadas em arcabouços tridimensionais apropriados (BOO et al., 2002). Desta forma, diversos arcabouços estão atualmente disponíveis e podem ser classificados tanto como polímeros biológicos isolados de matriz extracelular, plantas e algas, ou como materiais sintéticos, além da associação destes (KASSEM, 2004). Dentre os diversos tipos de biomateriais, um que tem recebido grande destaque na mídia é a Quitosana, um polímero biodegradável, derivado da quitina presentes no exoesqueleto de crustáceos. Este componente pode ser utilizada como biocurativos por sua ótima aderência, tanto celular, quanto em seu local de atuação.

A equideocultura mundial movimentada cerca de R\$ 7,5 bilhões de reais gerando milhões de empregos. Além disso, os esportes equestres movimentam milhões em nosso país gerando muitos empregos vinculados a ele. Através deste ponto de vista, a pesquisa para Equinos intensifica-se a cada ano, focando na medicina veterinária esportiva, em neonatologia, em diagnósticos por imagem, entre outras técnicas. Em medicina equina os estudos com CTMs tem se restringido, particularmente, ao tratamento de lesões musculoesqueléticas e osteoarticulares, com resultados promissores para sua utilização na reparação de diversos tecidos (MAIA et al, 2010).

Dessa forma segue-se o interesse por um estudo mais amplo do uso das células-tronco na medicina- veterinária. Sendo assim, o objetivo dessa revisão é fazer considerações acerca das CTMs, relatando suas características gerais, fontes de obtenção, processamento, caracterização in vitro e suas aplicações terapêuticas na medicina equina.

2.0 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste projeto foi observar a interação das CTMs, obtidas de diferentes tecidos, frente à presença de um filme multicamadas de biopolímeros (Quitosana,

Carboximetilcelulose e Ácido Hialurônico), visando o desenvolvimento de um biocurativo a ser utilizado futuramente no tratamento de lesões ósseas e cartilaginosas em equinos.

Como objetivos específicos tiveram o seguinte:

1) Avaliar, na presença ou não do filme multicamadas de biopolímeros, o potencial de expansão, adesão, viabilidade e fenótipo de CTMs oriundas do sangue da medula óssea.

2) Comparar o potencial de diferenciação das CTMs de diferentes origens para tecido ósseo e cartilaginoso, na presença ou não do filme multicamadas de biopolímeros.

3) Estabelecer qual o melhor procedimento para o desenvolvimento de um curativo biológico com boa aplicação prática.

3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Células-Tronco

3.1.1 Origem

Sabemos que a Mesoderme é um folheto embrionário que tem sua formação durante a neurulação do embrião dos animais triploblásticos. A mesoderme se encontra entre outros dois folhetos embrionários conhecidos como Ectoderme e Endoderme. Este folheto, ao se desenvolver e multiplicar suas células dá origem a tecidos como o do esqueleto, muscular, sistema circulatório, excretor e reprodutor. (WIKIPÉDIA, acessado em 18/12/2012)

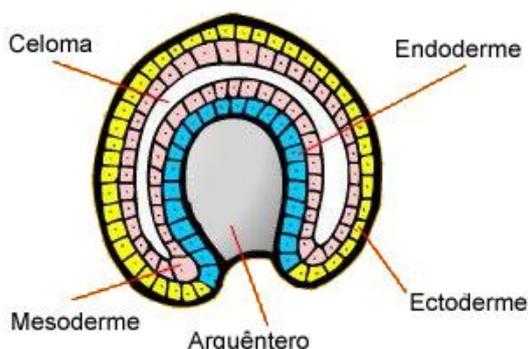


Figura 1: fonte < <http://www.infoescola.com/embriologia/mesoderme/>>

3.1.2 Conceito

O conceito de células-tronco como regeneradora tecidual teve início no século XVIII, quando Réaumur estudou a regeneração das patas do caranguejo, Spallanzani mostrou que o caracol regenera sua cabeça, e Trembley descobriu que os pólipos de água doce podem ser enxertados como as plantas. (FAGOT-LARGEAULT, 2004)

Zago e Covas, (2006), trazem as células-tronco como as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos além de renovar, reparar e modelar os tecidos lesionados dos órgãos. Estas células se diferem das outras por apresentarem três características: são indiferenciadas, não especializadas e com grande capacidade de se multiplicar por grandes períodos. Originando assim populações de células semelhantes e por fim sendo capazes de se diferenciar em células de tecidos específicos.

As fontes de células para fins terapêuticos são várias, que incluem medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico, sangue de cordão umbilical e células de tecidos fetais. (ZAGO E COVAS, 2006)

As Células-tronco Mesenquimal também são conhecidas como células do estroma medular ou unidades formadoras de colônia fibroblásticas. São células-tronco não hematopoética, cuja característica mais relevante é a adesão as placas de cultivo baseadas em polipropileno. (BITTENCOURT et al, 2005).

Segundo *Bittencourt e cols, 2005, Friedenstein et al.*, foi quem descreveu primeiramente as células-tronco mesenquimais, em sua descrição ele citava a aderência ao plástico, formando colônias fibroblatóides. Ainda traz que recentemente muitos estudos têm se voltado a ela, devido ao interesse para o estudo e tratamento de diversas doenças.

As Células-Tronco adultas provenientes de medula-óssea têm recebido grande atenção por apresentarem alto potencial de desenvolvimento, além de seu fácil isolamento e grande adesão. (LE BLANC et al., 2003; MAYHALL et al., 2004). As células-tronco hematopoiéticas (CTH), que originam todos os tipos de células sanguíneas, são as células originadas da medula óssea conhecidas há mais tempo, sendo o transplante de medula óssea praticado a mais de 40 anos em humanos (NARDI, 2007). Entretanto, em 2005 foi descrita a presença, na medula óssea, de outro tipo de células-tronco denominadas Células-Tronco Mesenquimais (CTM) que possuem alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo (CONRAD e HUSS, 2005). Em determinadas condições, as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) poderiam dar origem a células de diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, gordura e músculo. (BITTENCOURT et al, 2006).

Uma característica importante das CTMs é que estas estão presentes em diversos tecidos do organismo, sendo a medula óssea um dos mais ricos. Entretanto, estas células já foram encontradas em menor quantidade e isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como, sangue periférico, sangue de cordão umbilical e tecido placentário, tecido muscular e esquelético, derme e tecido adiposo (PRATA, 2006).

Entretanto, estudos hoje testam a diferenciação este tipo de célula não apenas em tecidos de seu folheto como também da endoderme e da ectoderme. (SCHAUWER, et al, 2010)

Esse tipo de comportamento sugere que, apesar de se originarem da medula óssea, as CTM são circulantes, passando por órgãos e tecidos quando estes necessitam de reparos. Isso ocorre através de um processo fisiológico estreitamente regulado por uma complexa interação, após a mobilização das células da medula óssea. Além disso, a grande variedade de quimiocinas secretadas pelos tecidos adjacentes pode induzi-las a diferenciarem-se em linhagens celulares distintas e específicas do nicho onde se encontram (TAKAHASHI, et al 2007). Alguns experimentos têm mostrado que CTMs circulantes tem alta capacidade de diferenciação em células do tecido hematopoiético, células do trato intestinal e ainda melhoram a função do sistema cardíaco. (SATOH *et al.*, 2004;MANGI *et al.*, 2003).

Sendo assim, a regeneração do tecido mesenquimal é, em grande parte, dependente da quantidade de CTMs existentes durante a vida adulta, (MULLER, *et al*, 2010). As células-tronco tem um potencial significativo nesta regeneração, devido às características que possuem: habilidade de regular inflamação, promover a regeneração tecidual e ainda prevenir a formação de lesões patológicas. (BORJESSON, DORI L. E PERONI, JOHN F., 2011).

Lai et al (2011), nos mostra que esta característica de adesão é altamente atrativa para as terapias baseadas em transplante autólogo para uma vasta gama de doenças. Dessa forma se sabem que estas células são encontradas em diversos tecidos adultos, fetais, tecidos embrionários, bem como a medula óssea, tecidos adiposos e pele. Entretanto, há diferentes métodos para isolar, caracterizar e comparar os tipos celulares.

Estudos recentes mostram que as CTMs medeiam à reparação tecidual através da produção ou secreção de fatores parácrinos que promovem o crescimento e desenvolvimento celular, além de reduzir a inflamação dos tecidos lesionados, sujeitos aos transplantes autólogos. (LAI, et al, 2011)

Caplan (2009), ainda afirma que as CTMs são responsáveis pela renovação e pela manutenção de todos os outros tecidos do organismo devido a sua característica conhecida

como plasticidade. Porém, esta característica não foi totalmente estudada e existe ainda dúvida em seus mecanismos de ação. (MEIRELLES, et al, 2006).

Evidências recentes sugerem que as CTM migram seletivamente para áreas de lesão, inflamação e tumores, onde elas estão envolvidas na reparação tecidual. Esses efeitos tornam essas células candidatas atrativas para uso como veículo para terapia em sítios específicos (CHEN et al., 2008).

De acordo com *Chen et al. (2008)* as CTMS secretam diferentes citocinas e quimiocinas, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-a), fator de crescimento ligado a insulina, (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator derivado de estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória alfa e beta-1 de macrófagos e eritropoietina em quantidades maiores do que os fibroblastos da derme. Adicionalmente, foi evidenciado que a secreção desses fatores pelas CTMs recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, aumentando assim a cicatrização da ferida.

No entanto, *Minguell et al., (2001)* cita as limitações da idade e a diminuição da quantidade de células produzidas pela medula-óssea ao longo do tempo, sendo assim outras fontes de CTM foram identificadas, sendo possível isolá-las em trabéculas ósseas, tecido adiposo, líquido sinovial, sangue periférico e tecido musculoesquelético.

É conhecido que os anexos embrionários contêm múltiplos tipos celulares derivados do feto em desenvolvimento (TSAI et al., 2004, MIKI et al., 2005). CTMs foram descritas no fluido amniótico humano, na membrana amniótica, no sangue do cordão umbilical, da parede do cordão umbilical e da gelatina de Wharton (ROMANOV et al., 2003; FUKUSHI et al., 2004)

No modelo animal *Uranio et al. (2011)* demonstrou que, em cães, é possível o isolamento e cultivo in vitro de CTMs de anexos fetais, tais como, matriz extravascular de cordão umbilical, líquido amniótico e membrana amniótica, *Zucconi e colaboradores (2010)* isolaram com sucesso CTMs da veia do cordão umbilical humano, no entanto a mais estudada é o sangue do cordão, onde pode ser encontrado CTH e CTM, as hematopoiéticas, que também são encontradas na medula óssea são bastante estudadas, e utilizadas rotineiramente na medicina humana, onde já existem bancos de sangue de cordão umbilical, para se necessário, promover um transplante autólogo dessas células.

De acordo com *Lovati et al (2010)*, o uso dos anexos fetais como fonte de células-tronco tem inúmeras vantagens em potencial. Além da grande quantidade de células, grande

potencial de expansão e diferenciação, permite uma forma de coleta não invasiva e de tecidos que, normalmente, são descartados após o parto. Este fato permite que o uso dessas células na medicina humana seja mais eticamente aceitável, fazendo dessas fontes um grande atrativo para medicina regenerativa (CREMONESI et al., 2011).

As células-tronco derivadas dos anexos fetais preservam características dos tecidos embrionários de onde se originaram e muitos estudos estão indicando que exibem algumas características de células-tronco embrionárias como a expressão de alguns marcadores de superfície como o Oct-4 e grande capacidade proliferativa, sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade. Entretanto, o potencial de diferenciação destas células seria intermediário, ou seja, entre as pluripotentes embrionárias e as multipotentes adultas. Estas características abriram uma nova perspectiva no estudo do desenvolvimento biológico e na medicina regenerativa, não só para humanos como para animais (CREMONESI et al., 2011).

3.1.3 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais de Medula óssea em Equinos

Medula óssea (MO) é um tecido esponjoso, o qual preenche o interior de ossos longos, e é o local de grande produção de todos os componentes sanguíneos e imunológico do corpo. (FREITAS, 2005), as CTMs são as mais conhecidas e mais estudadas hoje, por apresentarem grande potencial de adesão, além de seu fácil isolamento e alto potencial de desenvolvimento. (LE BLANC et al, 2003)

Araújo e Conrad & Huss (2005) relatam que na década de 60 pesquisadores descobriram que a MO era composta por dois tipos de células: Hematopoiéticas e Células-Tronco Mesenquimáticas. As células Hematopoiéticas- são responsáveis pela produção de hemácias, plaquetas, leucócitos, eosinófilos, macrófagos, basófilos e neutrófilos. Células-Tronco Mesenquimáticas- também conhecidas como Células-Tronco Mesenquimais (CTM) é uma população de célula multipotente progenitora de diversas linhagens celulares.

De acordo com *Lubis e Lubis (2012)*, independente de sua origem as CTMs se destacam por apresentarem facilidade de indução para diferenciação em outras linhagens, como óssea, cartilaginosa, ligamento, tendão e outros tecidos de conexão. Além disso já foi descrita a capacidade das CTMs em diferenciar para tecido cardíaco e células neurais (HERZOG et al, 2003).

As CTM apresentam ainda características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam sua utilização terapêutica, secretando uma variedade de citocinas anti-inflamatórias e fatores de crescimento por meio de moléculas bioativas, que proporcionam a modulação de uma resposta inflamatória e a reparação adequada do tecido. (MONTEIRO *et al*, 2010)

Segundo *Chen, et al (2008)*, *Blanc et al (2003)*, e *Maihall et al (2004)*, as células-tronco foram inicialmente caracterizadas *in vitro* pela sua aderência e morfologia fibroblastóide, sendo assim, o isolamento e a caracterização destas células ainda dependem de sua habilidade de adesão ao plástico e seu potencial de expansão. Além disso, as células-tronco mesenquimais possuem marcadores de superfície celular são utilizados para refletir características biológicas e funcionais.

Para a caracterização das células-tronco utilizam-se alguns critérios mínimos de cultivo, sendo eles a aderência ao plástico quando mantidas em cultivo celular, possuir a habilidade de se diferenciar nas três linhagens mais comuns de diferenciação (osteogênica, adipogênica e condrogênica), expressar alguns marcadores de superfície como CD73, CD90, e CD 105 e não expressar os seguintes marcadores que indicam a linhagem hematopoiética: CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (DOMINICI, *et al*, 2006).

Entretanto, vale salientar que estes marcadores podem não ser específicos, ocorrendo também em outros tipos celulares de origem estromal (DE BARI *et al*, 2001). Além disso, a maioria dos marcadores utilizados de CTM não foi desenvolvida especificamente para espécie equina, havendo evidências de que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não apresentam reação cruzada com equinos (TAYLOR *et al*, 2004, MAMBELLI *et al*, 2009).

3.1.4 Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais

O isolamento e cultivo das CTM já são bem conhecidos e seguem o protocolo descrito a seguir. A punção da medula óssea pode ser realizada do esterno, costelas, pélvis, crânio, úmero, fêmur e tíbia, pois nesses locais há constante função hematopoiética. Em equinos, o esterno é o sitio de escolha para a técnica, pois a atividade hematopoiética persiste na esternébra por toda a vida do animal. Essa região é coberta por massa muscular delgada, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso. São recomendadas agulhas especiais para a coleta da medula óssea e dentre elas estão incluídas as

agulhas modelo Rosenthal, Illinois sternal, Jamshidi e Komiyashiki. A aspiração é realizada com seringa descartável contendo heparina sódica. Como o material da seringa contém anticoagulantes, sua observação sobre uma placa de Petri revela a presença de partículas de medula, também chamadas de espículas. Sua presença confirma a origem medular da amostra obtida (KATHELEEN, 2000).

Em cultivo, as CTMs demoram cerca de 15 dias para atingir uma subconfluência próxima aos 80%, momento em que será realizada a primeira passagem para a manutenção do cultivo. As condições padrão para expansão e cultivo das células-tronco mesenquimais incluem a utilização de meio de cultivo celular (DMEM/F12) acrescido de soro, sendo o mais utilizado o Soro Fetal Bovino (SFB). Outro parâmetro importante durante o cultivo é a densidade celular (FIBBE, 2002). O cultivo dessas células é realizado em garrafas de cultivo celular e se baseia na habilidade das CTM de aderirem ao plástico do frasco e formar colônias. A capacidade de aderência da CTM é usada para separar essas células das hematopoiéticas, as quais não aderem ao frasco. A separação ocorre quando há troca de meio de cultura (TAYLOR et al., 2007), mas não se pode afirmar que todas as células aderidas são CTM, sendo necessária realização de testes de caracterização imunofenotípica e diferenciação para linhagens de tecido conjuntivo para confirmar a origem mesenquimal das células em cultivo.

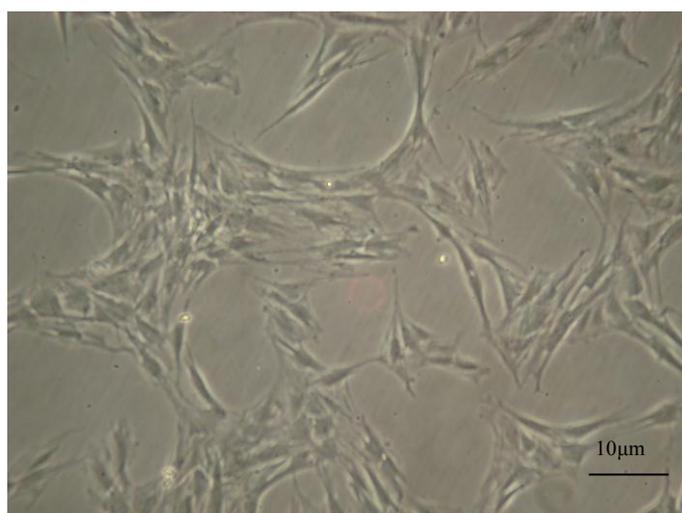


Foto 1: Animal 3, após 6 dias de cultivo (fonte: arquivo pessoal)

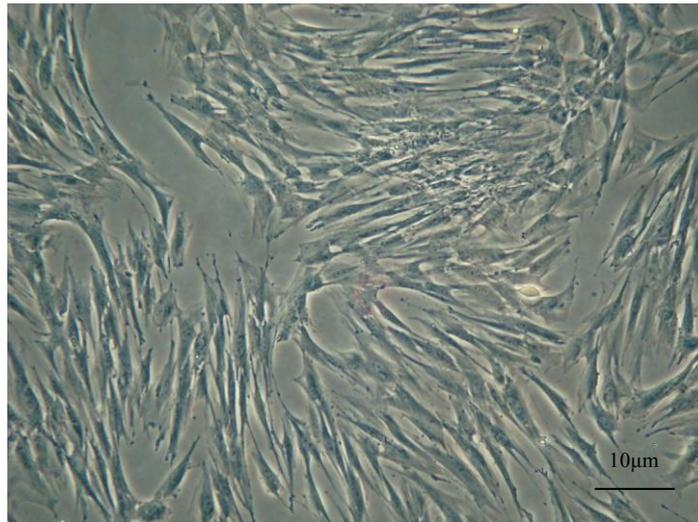


Foto 2: Animal 5, após dez dias de cultivo (fonte: arquivo pessoal)

3.1.5 Terapia Celular em Equinos

Com o intuito de melhorar a produção equina e a expectativa de vida destes animais a pesquisa com células-tronco cresceu exponencialmente nos últimos anos, isso devido ao seu grande potencial de regeneração de tecidos e órgãos lesados, incluindo também novas técnicas cirúrgicas, utilizando a medicina regenerativa e biocurativos. (VIOLLINI et al, 2009).

Nos últimos anos, uma nova área da medicina, chamada medicina regenerativa, vem sendo desenvolvida, e com isso emergindo perspectivas inovadoras principalmente para o tratamento de doenças crônico-degenerativas. Essa terapia consiste na utilização de células, biomateriais e fatores de proliferação e diferenciação celulares que permitem ao próprio organismo reparar tecidos lesionados (NIH, 2009). Segundo Zago e Covas (2006), a grande maioria das pesquisas com CT está focalizada em aspectos básicos da fisiologia celular e sua capacidade de diferenciação em tecidos diversos, sendo que uma parcela menor focaliza a aplicação clínica destas células em modelos animais.

Maia et al (2010) explica que os estudos com células-tronco mesenquimais estão restritos aos tratamento de lesões osteoarticulares e musculoesqueléticos com resultados promissores para a utilização do reparo destes tecidos, inclusive extra-mesenquimais.

O interesse pelo tratamento destes tipos de lesões é porque os equinos são excelentes atletas, com performances extraordinárias, entretanto, devido aos treinos exaustivos para competições estes animais desenvolvem doenças de cunho neurodegenerativo, patologias

vinculadas às articulações, além de um desgaste ósseo excessivo, levando frequentemente seus donos a grandes perdas econômicas. (RESENDE, 2005)

Das patologias que são culminadas pelo treinamento rigoroso podemos citar as lesões tendíneas, lesões ligamentares, osteoatrofes e miosites. Os tratamentos existentes, portanto, não são os ideais, expondo estes animais a longos períodos de reabilitação, com baixas taxas de melhora e grande possibilidade de recidivas. Para tanto, utiliza-se as células- tronco como uma alternativa de sucesso para a aceleração no processo de cura do animal. (RESENDE, 2005, ROSS & DISSON, 2003, PAGANELA et al 2008)

Smith et al. (2003), relatam que as CTMs apresentam potencial de diferenciação em tenócitos, com regeneração da matriz tendínea após lesão. Em estudo com 26 eqüinos apresentando tendinite do tendão do músculo flexor digital superficial (TFDS), 11 foram tratados com CTMs provenientes da medula óssea e os demais com terapia convencional (grupo controle). Entre os animais tratados, nove apresentaram melhora significativa através do exame ultrassonográfico e retornaram a atividade atlética sem recidiva. Por outro lado, todos os equinos tratados com terapia convencional apresentaram recidiva após 4 a 12 meses do tratamento (PACINI et al., 2007). Em outro estudo, porém com tendinite induzida com colagenase, *Crovace et al. (2007)* observaram a presença de colágeno do tipo I e III maduro através de histopatologia e imunohistoquímica, além de organização da arquitetura tecidual nos tendões tratados com CTM e células mononucleares provenientes da medula óssea. Em estudo realizado no Brasil com seis eqüinos com tendinite induzida, *Barreira (2005)* constatou que a terapia com células precursoras mesenquimais obtidas da medula óssea também acelera o processo de cicatrização do TFDS de equinos.

Wilke et al. (2007) utilizaram enxertos contendo CTMs provenientes da medula óssea no tratamento de lesões osteocondrais induzidas na articulação femuropatelar de seis eqüinos adultos e observaram benefícios da terapia apenas na fase inicial do processo de reparação tecidual. Esses bons resultados em tecidos mesenquimais, estimulam não só a realização de estudos pré-clínicos nesses tecidos, mas também em tecidos não mesenquimais, como o tecido nervoso.



Foto 3: Equinos, utilizados no experimento.

CAPÍTULO II

1.0 MEMBRANAS BIODEGRADÁVEIS

Também conhecidas como curativos biológicos, tendo como função interagir de forma direta e ativa no processo cicatricial, seja acelerando o processo de cicatrização ou criando um arcabouço estável para que haja a proliferação e estabilização do tecido no local da lesão. (PASIAN e FERREIRA, 2012).

Sabe-se muito que as membranas biodegradáveis estão sendo utilizadas de forma constante na indústria farmacêutica, na liberação de medicamentos de forma lenta e controlada, e além desta técnica já se utiliza estas para transplantes oculares, durante cirurgias de córnea, como traz *Fialho et al (2003)*.

Segundo *Martins e col. (2010)*, as biomembranas ainda possuem potencial de barreira nos tratamentos ósseos, impede a invasão de fibroblastos durante o período cicatricial pós-cirúrgico, permitindo e acelerando o povoamento de células osteoprogenitoras.

Outro estudo recente utilizando biomembranas, dessa vez com a ligação Quitosana-Alginato (soluções aniônicas e catiônicas) foi na cicatrização de úlceras de pele em ratos. Pois estas membranas mantêm um ambiente favorável (temperatura e umidificação ideais para a cicatrização, além do controle bacteriano no local da lesão) para o tratamento da lesão. (CAETANO, 2012), Além disso, sabe-se que biomembranas formadas por biomateriais tem a função de estabelecer um suporte biológico, tridimensional saudável e mimetiza um ambiente ideal para o crescimento e desenvolvimento celular durante todo o processo cicatricial.

1.1 QUITOSANA

Com o notável crescimento do estudo para criação de novas formas para liberação lenta de fármacos, a indústria tem se destacado na criação e utilização de membranas produzidas a partir de polímeros biodegradáveis, por possuírem baixo custo e fácil acessibilidade. (MACÊDO, 2009)

A Quitosana destaca-se por sua abundância, baixa toxicidade e biodegradabilidade. (FREIRE, *et al*, 2006), além disto de acordo com *Borschiver et al (2008)*, a Quitosana é um dos polímeros com maior citação num estudo de monitoramento tecnológico de biomateriais

De acordo com *Macedo (2009)*, as membranas de quitosana têm permeabilidade molecular seletiva, podendo ser utilizadas na liberação de diferentes drogas e no

empacotamento de alimentos. Segundo *Hamilton, et al, (2006)*, a Quitosana também é utilizada na produção de pele artificial, e na cicatrização de diferentes feridas, por atuar como agente homeostático e cicatrizante, tendo ação antifúngica e bactericida (*ASSIS, et al, 2007*). Vale ressaltar que tal permeabilidade é afetada pelo grau de molhabilidade, massa molar e espessura do filme de Quitosana.

O filme de Quitosana é um polissacarídeo amino derivado de um processo de acetilação alcalina da quitina, ou seja, este processo envolve a remoção de diferentes proteínas e a dissolução de sais orgânicos. (*SANFORD, et al, 1988*)

Kumar et al (2004), cita que a quitina pode ser encontrada abundantemente no exoesqueleto de crustáceos, como: lagosta, camarão e caranguejo e também em insetos. Sendo considerado como o segundo polímero em abundância no planeta, ficando atrás somente da celulose.

De acordo com relatos de *Illun et al (1994)*, a Quitosana promove a absorção transmucosa de moléculas polares, como drogas peptídica. Posteriormente *Thanou et al, (2001)*, demonstraram que a membrana exerce um importante papel de carreador de fármacos, podendo resultar numa maior absorção e permanência do medicamento no local da adesão, melhorando sua liberação e a biodisponibilidade do fármaco em questão.

As membranas de Quitosana foram caracterizadas pela primeira vez por *Muzzarelli et al (1978)*, sendo utilizadas como barreiras de curativos, imitando a pele. Além disso, *Arthursson et al (1994)*, comprovou que o filme de Quitosana é um bioadesivo promissor em pHs fisiológicos, promovendo a mucoadesão.

Zhu, et al, (2005), utilizaram plasma de argônio para melhorar a hidrofiliabilidade da quitosana auxiliando na proliferação de células fibroblásticas derivadas da pele. Desta forma, frente a suas propriedades mecânicas *Silva et al (2006)*, evidenciam o potencial desta membrana para uso como curativo cirúrgico. Atualmente tem-se proposto uma modificação das membranas de Quitosana para atuarem em plasma, sendo assim utilizadas na permeabilidade de fármacos, gases e proliferação e adesão celular. (*WANG, et al, 2001*; *ASSIS, et al, 2007*; *PÉREZ, et al, 2007*)

Pérez et al (2007), induziu a polimerização da membrana de Quitosana em plasma com o objetivo de aumentar a adesão de células osteoblástica. Este processo foi feito em duas etapas, onde a membrana foi inicialmente tratada com oxigênio para ativar a superfície. E depois foram introduzidos dois monômeros na membrana, para melhorar a absorção e adesão celular, sendo eles: ácido vinil sulfúrico (AVS), e ácido acrílico (AA).

Apesar dos diversos estudos realizados com a utilização de Quitosana como curativo biológico, pouco se sabe a interação de membranas de Quitosana com células-tronco adultas visando à otimização do processo cicatricial nos diversos tipos de tecido.

Sobre a utilização de biomaterias ainda podemos citar outros produtos que quando adicionados a Quitosana proporcionam uma melhora na viabilidade da membrana.

Alguns produtos visam à formação de uma matriz extracelular. Podendo ser citada como uma zona de ação dinâmica, pois suas proteínas formadoras interagem diretamente com os receptores da superfície celular, modulando diferentes processos. (SOUZA e PINHAL, 2011)

Segundo *Pasian (2012)*, a quitosana age como biopolímero resistente com propriedades cicatrizantes e bactericidas em tecidos.

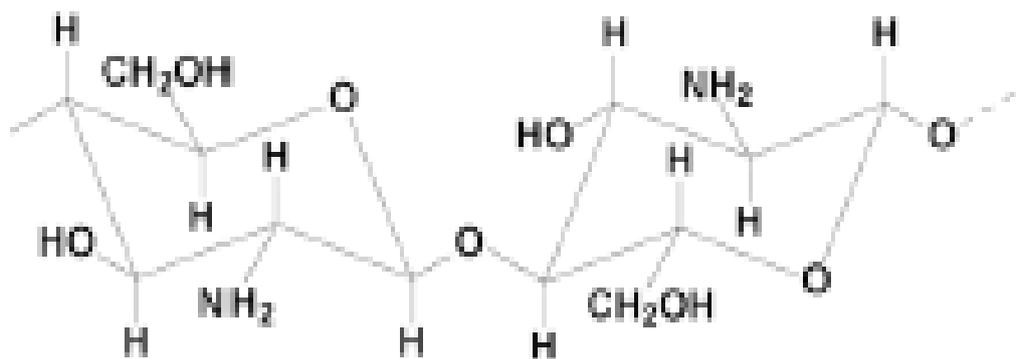


Figura 2- Quitosana (Vasconcellos, 2011)

1.2ÁCIDO HIALURÔNICO

De acordo com *Souza e Pinhal (2011)*, a matriz extracelular é constituída por quatro grandes classes de macromoléculas: colágenos, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas, sendo estas responsáveis pela sustentação, hidratação e volume do tecido, transporte, organização dinâmica e resistência. A principal substância na qual a

produção é de extrema importância para esta pesquisa é o Ácido Hialurônico que é um glicosaminoglicanos.

Ainda em sua descrição *Souza e Pinhal (2011)*, o ácido hialurônico quando dentro da célula forma um complexo macro celular importante para tecidos que sofrem pressão como ossos e cartilagens.

Segundo *Kim, et al (2010)*, o ácido hialurônico faz a conexão entre tecidos, sendo este encontrado na membrana basal celular, amplamente utilizado na cultura de tecidos endoteliais.

O ácido Hialurônico pode ser encontrado nos tecidos conjuntivos dos mamíferos e no olho (esclera e córnea), atualmente esta sendo utilizado além dos biocurativos como também em aplicações oftalmológicas. (FIGUEIREDO, et al, 2010)

Sabe-se que, segundo *Figueiredo et al (2010)*, em condições fisiológicas o Ácido Hialurônico apresenta-se carregado negativamente, e apresenta dessa forma propriedade viscoelásticas. Isto leva a formação de uma rede e conseqüentemente com o aumento da concentração na solução onde se encontra a formação de gel.

No caso deste presente estudo utiliza-se o ácido hialurônico para preencher estruturas ósseas e cartilaginosas, sendo já utilizado a alguns estudos. Como também em soluções oftálmicas e auxiliando nos transplantes de córnea, como visco anestésico.

Além disto, segundo *Ávila e col. (2009)*, as soluções de ácido hialurônico têm sido utilizadas para tratar a fibrose no fígado, nos casos de hepatite C crônica. Sua utilização ajuda a reverter o processo de fibrosamento hepático.

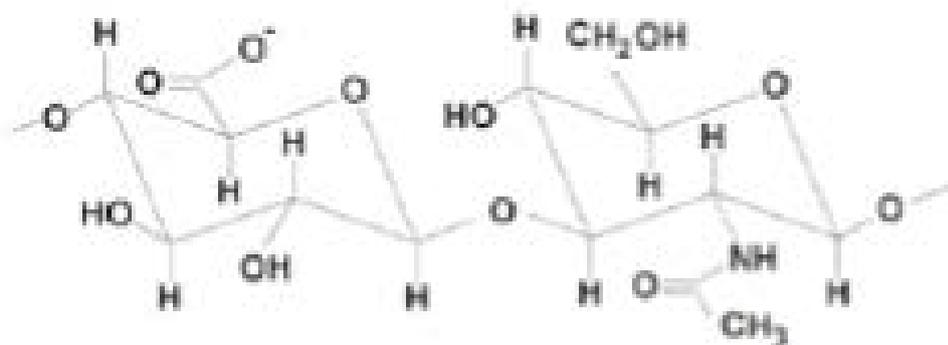


Figura 3- Ácido Hialurônico (VASCONCELLOS, 2011)

1.3 CARBOXIMETILCELULOSE

Segundo *Caraschi e Campana Filho (1999)*, a Carboximetilcelulose é um derivado hidrossolúvel obtido através de uma reação de suspensão da celulose. Sendo um preparado utilizado na forma sódica, que se destaca na função de agente espessante devido a sua grande variedade de aplicações. Encontrado nas formas de pó e de géis.

De acordo com a Empresa Quimesp Química a carboximetilcelulose tem diferentes aplicações como na alimentação na forma de gomas, em cosméticos, na agricultura, no papel, e na indústria farmacêutica como componentes de bioadesivos. Também amplamente utilizada em medicamentos como colírios, pois é um lubrificante ocular potente.

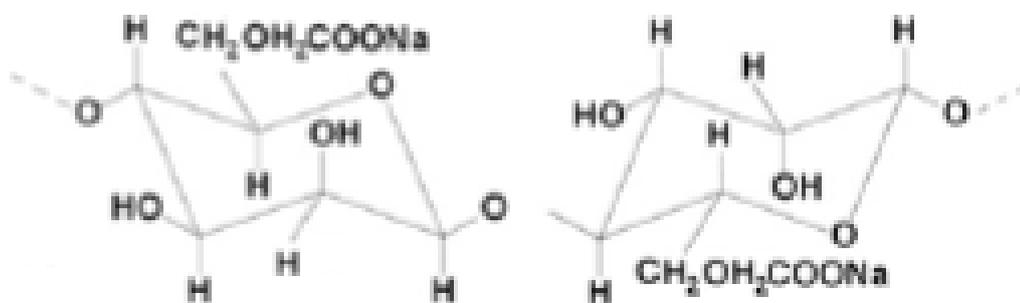


Figura 4- Carboximetilcelulose (VASCONCELLOS, 2011)

2.0 Técnica de Layer-by-Layer para a produção de PEMs (Poli-eletrólitos Multicamadas)

Segundo *Vasconcellos (2011)*, **Layer-by-layer** (descrita inicialmente por *Iller (1966)* e desenvolvida por *Decher et al (1992)*; *Decher & Schmitt (1992)*; *Decher (1997)*), é uma técnica que consiste em depositar camadas alternadas de íons com cargas opostas, para a produção de estruturas com diferentes camadas e de multicomponentes, assim como filmes para nanotecnologia.

A técnica **Layer-by-Layer** é considerada simples, versátil, de custo efetivo para modificar e funcionalizar uma variedade de superfícies. Os biopolímeros de polieletrólitos fracos são os maiores candidatos a produção das PEM devido a sua hidrofiliidade e atoxicidade, a sua ação bioativa, suas propriedades biodegradáveis. (VASCONCELLOS et al, 2010)

Por ser uma técnica feita a partir de diferentes soluções, esta pode ser aplicada em uma variedade de materiais e permite um controle absoluto de seus componentes e de suas

variações. Em estudo realizado por *Hu et al (2009)*, utilizaram a técnica LbL na engenharia de tecidos utilizando placas de titânio recoberta por quitosana e gelatina em conjunto osteoblastos (células-tronco mesenquimais já diferenciadas).

A técnica LbL permite uma composição estrutural conhecida como 3D, o que possibilita uma atividade funcional destas membrana em diferentes órgãos. As ligações são possibilitadas através das forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas das nano partículas. (STEPHAN e IRVINE, 2011), ainda este mesmo autor cita que estas ligações permitem a adesão das células na membrana e da membrana no local de atuação (lesão).

2.1 Modelo para disposição das Multicamadas de Polieletrólitos

Um filme multicamadas pode ser disposto em três diferentes camadas, sendo eles catiônicos e aniônicos, para *Vasconcellos (2011)*, estes filmes são divididos em três diferentes zonas, segundo seus estudos sobre *Decher e Schelenoff (2002)*, a zona I é composta por polieletrólitos e é a mais próxima a substratos, a zona II é o meio contínuo do filme, é, portanto distante da possível influência das interfaces, a zona III é constituída por algumas camadas de polieletrólitos, é a mais externa, sendo recoberta por uma solução de hidratação.

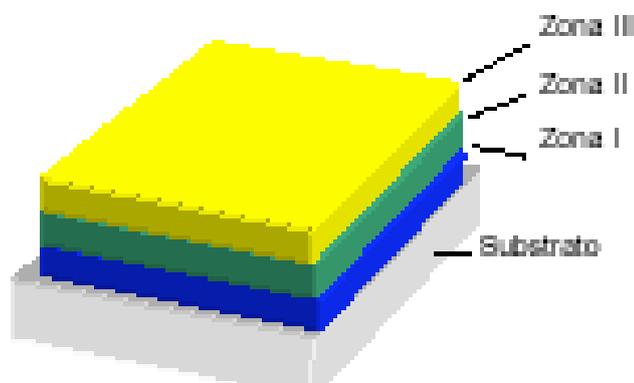


Figura 5: Modelo de disposição de zonas de multicamadas (VASCONCELLOS, 2011)

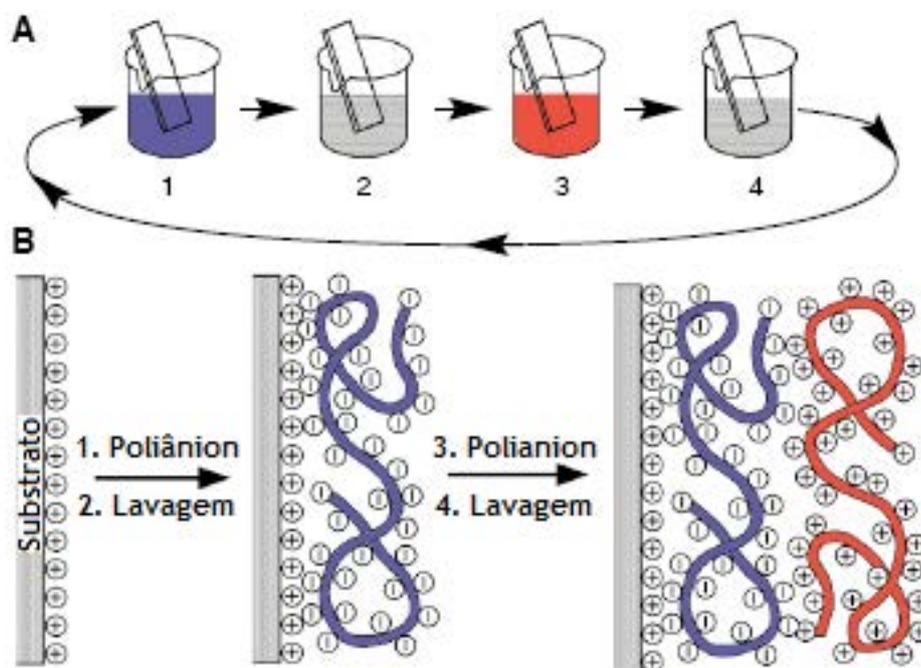


Figura 6: Idealização do processo de formação do filme Multicamadas e sua deposição, funcionalização por Decher 1997, e traduzido por Vasconcellos, 2011.

CAPITULO III

1.0 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os protocolos citados durante a dissertação foram elaborados pelo Laboratório de Terapia Celular e Fertilização inVitro (UNESP- FMVZ/ Botucatu, SP) e pelo Laboratório de Química Analítica (UNICAMP/ Campinas, SP)

1.1 Obtenção das Células-Tronco Mesenquimais

1.1.1 Medula óssea

Os animais são mantidos em estação, contidos em tronco e sedados com Xilazina 10% na dose de 0,5 mg/kg pela via intravenosa. Em seguida, foi realizada a tricotomia de 5 x 20 cm na área do osso esterno de cada equino, permitindo a execução do exame ultrassonográfico. Após a identificação da 5^a esternébra por meio da ultrassonografia, o bloqueio anestésico é realizado com a aplicação de 15mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor no tecido subcutâneo, seguida da antisepsia do local com clorexidine tópico 0,5%. A punção da Medula Óssea é realizada por meio da introdução de uma agulha modelo Komiyashiki de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento, no sentido ventro-dorsal perpendicular à pele. Uma vez bem fixada à agulha dentro do esterno, retira-se o mandril e realiza-se a aspiração das células da medula óssea com auxílio de uma seringa de 20 mL contendo 2 mL de heparina (5000UI/mL) e 2 mL de PBS. A primeira alíquota é expelida em placas de Petri para verificação da presença de espículas e glóbulos de gordura, sugerindo a origem medular da amostra. Então, serão coletados mais 20 mL de sangue da medula óssea para separação das CTMs. As amostras são identificadas e encaminhadas ao laboratório para a separação da fração mononuclear.

No laboratório as amostras são manipuladas em fluxo laminar, a fim de evitar sua contaminação. São filtradas em equipo de transfusão, para remoção dos agregados celulares e em seguida diluídas em solução salina tamponada com fosfato (DPBS). O sangue da medula óssea terá seus constituintes separados por gradiente de concentração sob centrifugação. Para que essa ação seja cumprida, as amostras serão gentilmente depositadas em Ficoll ou

Histopaque 1770 e centrifugadas a 1500rpm por 40 minutos. Após a centrifugação, forma-se um halo esbranquiçado rico na fração mononuclear da medula óssea. Após a separação da fração mononuclear, o pellet resultante é lavado 2 vezes com DPBS a fim de retirar totalmente o Ficoll ou Histopaque 1770. Após a lavagem o pellet é ressuspenso em 1mL do meios de cultivo composto por 40% de DMEM baixa glicose (Invitrogen), 40% de F12 (Invitrogen) com 20% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen), suplementado com antibióticos (1% de Penicilina e Estreptomicina) e antimicótico (1,2% de Anfotericina) (Gibco) (Invitrogen®) sendo realizada a contagem das células.

Na sequencia, as amostras de cada cavalo foram colocados em frascos de 25 cm² e cultivados em estufa a 5% de CO₂ a 37,5°C. O meio de cultivo é trocado a cada 48hs inicialmente, seguido de troca duas vezes por semana.



Foto 4: Animal 3, momento da coleta (fonte: Arquivo Pessoal)

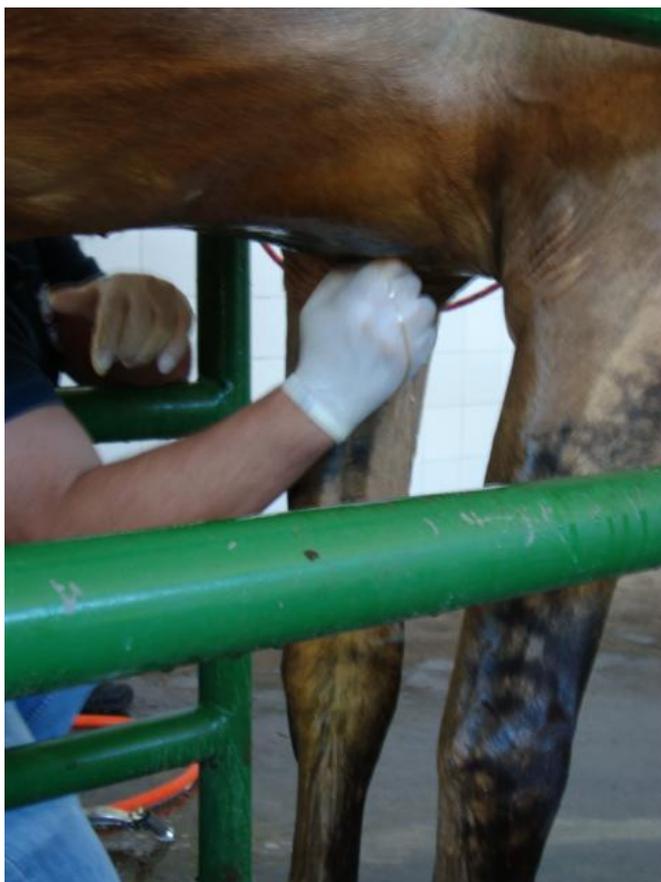


Foto 5: Animal 2, momento da coleta. (fonte: Arquivo Pessoal)

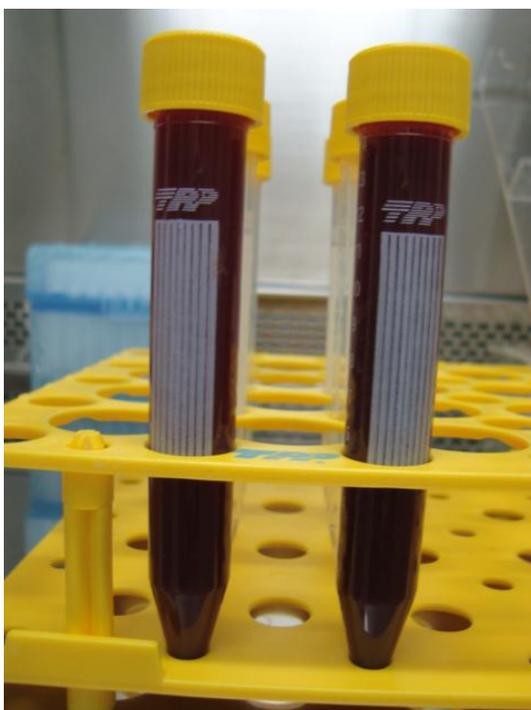


Foto 6: Sangue coletado de Medula Óssea. (fonte: Arquivo Pessoal)



Foto 7: Sangue na fase de processamento com o Histopaque® 1077. (fonte: Arquivo Pessoal)

1.2 Passagens

Quando os cultivos das CTMs atingirem 80% de confluência serão realizados as passagens das células para novos frascos de cultivo. Para tanto, o meio de cultivo dos frascos será descartado, serão adicionados 3 mL de DPBS para a lavagem das mesmas, em seguida será adicionado 2ml de Tripsina/EDTA 0,05% a 37°C e os frascos serão mantidos em estufa de CO₂ a 37°C por 5min. Após este período, os frascos serão retirados da estufa com as células em suspensão e será adicionado 1ml do meio de cultivo completo, com o objetivo de bloquear a ação da tripsina. As células em suspensão serão centrifugadas por 10min a 1500rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuscitado.

Após a ressuspensão, uma alíquota das células será corada com Azul de Tripán (que cora em azul as células mortas), e realizada a contagem do número de células vivas por ml na garrafa com o auxílio de uma câmara de “Neubauer”. Após o estabelecimento do número de células será realizada a primeira passagem, utilizando-se de uma concentração final de $2,0 \times 10^5$ células/ml, completando-se o meio de cultivo da garrafa para 5 ml de meio de cultivo completo.

Quando as células atingirem confluência novamente será realizado a segunda passagem. Neste momento as CTMs serão plaqueadas em placas com 6 poços contendo ou

não o filme multicamadas biopolimérico. Após 5 dias de cultivo as células de parte dos poços serão ressuspensas, coradas com azul de tripan e a população celular será novamente



contada para estimativa do índice de crescimento de acordo com *Zago e Covas (2006)*

Foto 8: Material utilizado para a produção dos meios, passagem e processamento do material. (fonte: Arquivo Pessoal)



Foto 9: Antibióticos e Antimicóticos utilizados nos protocolos. (fonte: Arquivo Pessoal)

1.3 Preparações das PEM's- Quitosana e Ácido Hialurônico

Para a preparação das PEMs é necessário que as placas passem por um tratamento com substâncias que facilitem a adesão celular. Desta forma é feita uma lavagem das placas

com a Poli- D- Lisina, numa concentração de 50mg/L, e congeladas por 24 horas, antes da adição das soluções.

Os sais utilizados para a preparação da PEMs foram obtidos do SIGMA[®] ALDRICH (USA). Para que as camadas fossem formadas utilizamos o método de sobreposição de soluções, através da imersão das placas de cultivo nas soluções previamente preparadas. Esta imersão durava por volta de 10 minutos em cada solução. Entre as soluções, as placas, eram lavadas com água estéril e pH próximo a 4,0. Estas lavagens eram feitas duas vezes consecutivas e depois se sobrepunha uma nova solução.

As placas passaram por este processo três vezes seguido, levando a seguinte sequência.

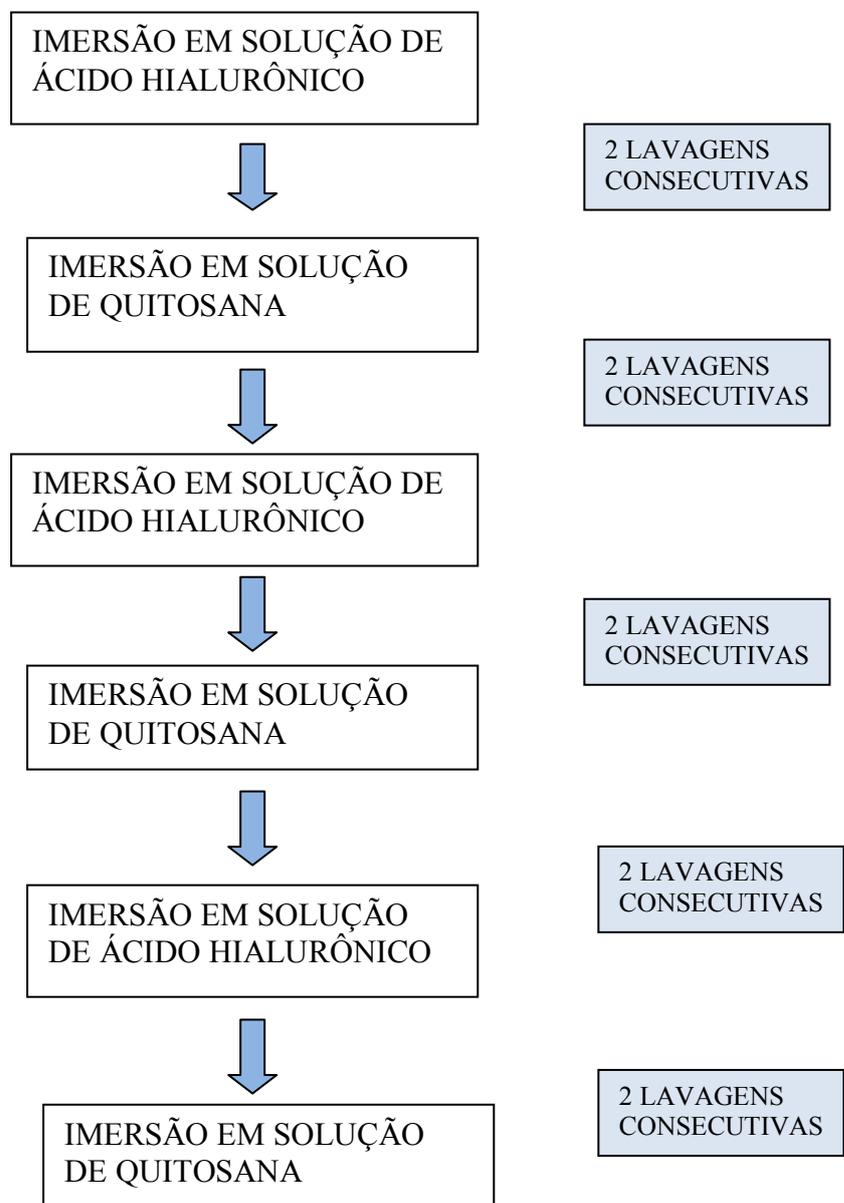


Figura 7: Fonte Pessoal Amanda Jerônimo Listoni

Esta deposição de soluções somente é possível devido as suas ligações iônicas, ou seja, soluções aniônicas e catiônicas serão depositadas uma sobre a outra. (VASCONCELLOS, 2011)

Desta forma as interações ocorrem da seguinte maneira:

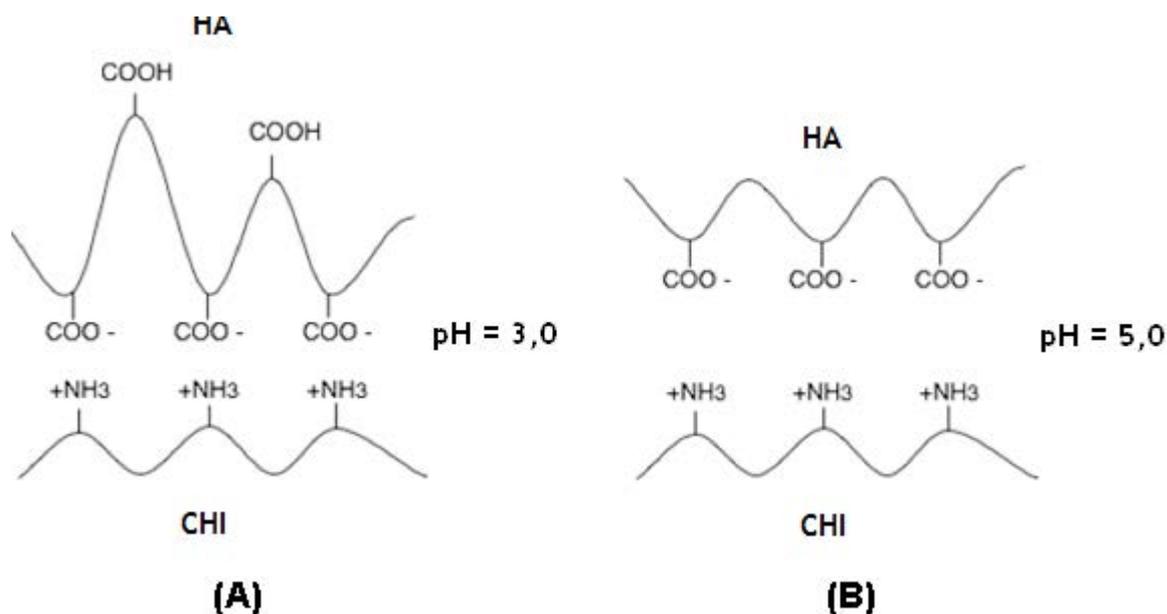


Figura 8: Interação Iônica entre a Quitosana e o Ácido Hialurônico (VASCONCELLOS, 2011)

1.4 Preparação das Soluções

Os polieletrólitos utilizados não passaram por purificação prévia, e seus pHs foram ajustados com soluções de HCl e NaOH 1M, respectivamente. As soluções foram preparadas na concentração de 1% e agitação constante e leve por 24 horas. Para as soluções de Quitosana, utilizamos ácido acético numa concentração 0,1M. Para a solução de Ácido Hialurônico utilizamos água MiliQ para a diluição.

As concentrações das soluções deverão ser relativamente altas, para que dessa forma possamos garantir a deposição de polieletrólitos nas placas de polipropileno.

O pH das soluções foram ajustados entre 3,0 e 4,0, isso permite que haja uma melhor rugosidade nas membranas. Permitindo uma melhor adesão e cultivo celular.

Para que as placas pudessem receber as membranas e as células, foram feitas soluções de Poli-D-Lisina e água Mili-Q, na concentração de 50mg/mL, estas soluções foram colocadas nas placas e deixadas em repouso em cabine de fluxo laminar por 40 minutos, para que a Poli-D-Lisina pudesse aderir à superfície. Em seguida estas placas foram mantidas em freezer -20⁰ C, por até 30 dias

1.5 Diferenciação Osteogênica nas Membranas e nas Placas

Esta etapa do experimento foi feita com um N=15, tanto para as células colocadas em membrana, quanto as apenas plaqueadas. Esta etapa foi feita concomitantemente com a diferenciação condrogênica. Portanto, os grupos foram os mesmos.

Para a diferenciação osteogênica, utilizamos meios previamente preparados e industrializados comprados pela Lifetech/Invitrogen- Gibco do Brasil- StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit. No kit vinha StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium e o StemPro Osteogenesis Supplement. A proporção de preparo deste meio era de 9:1 respectivamente. Suplementando com SFB-5%, Anfotericina-1,2% e Penicilina/estreptomicina- 1,5%.

1.6 Diferenciação Condrogênica nas Membranas e nas Placas

Como dito anteriormente as mesmas amostras que passaram pela diferenciação osteogênica também passaram pela Condrogênica. Os kits também foram adquiridos pela Lifetech/Invitrogen- Gibco do Brasil- StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit. No kit vinha StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium e o StemPro Chondrogenesis Supplement.

No preparo deste meio foi utilizada a proporção 9:1, respectivamente, e enriquecido com Anfotericina B- 1,2% e Penicilina/Estreptomicina-1,5%.

2.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 Interações Células-Membrana e Células-Placa

Segundo *Chen, et al (2008)*, *Blanc et al (2003)*, e *Maihall et al (2004)*, as células-tronco foram inicialmente caracterizadas *in vitro* pela sua aderência e morfologia fibroblastóide, sendo assim, o isolamento e a identificação destas células ainda dependem de sua habilidade de adesão ao plástico e seu potencial de expansão.

No presente experimento, para caracterizar esta interação utilizamos dois grupos com N=5 para cada teste. Os resultados estão representados na tabela abaixo com o tempo de adesão e o tempo de crescimento celular. Vale ressaltar que as placas sem e com membranas passaram por um tratamento prévio utilizando a Poli-D- Lisina numa concentração de 50mg/mL. A quantidade de meio utilizada por poço foi padronizada com 1mL, mantidas em estufa com temperatura de 37⁰C, e atmosfera modificada com 5% de CO₂ e umidificada.

Também foi feita a padronização da quantidade ideal de células por poço que foi de 230.000 células por poço. Esta quantidade foi a ideal possibilitando a adesão e o crescimento celular constante.

Notou-se durante esta etapa do experimento que as células quando colocadas na membrana apresentavam uma maior velocidade de adesão. Entretanto, o crescimento celular posterior foi mais lento, Dessa forma podemos dizer que as membranas formadas por Ácido Hialurônico e Quitosana facilitam o processo de adesão. Este resultado foi comprovado por *Arhtursson (1994)*, que mostrou a eficácia da quitosana no auxílio da adesão celular e adesão da biomembrana no local cicatricial, pois esta membrana possui carga positiva e trabalha com o pH fisiológico do organismo promovendo a mucoadesão.

Em virtude de sua carga positiva, a Quitosana facilita a adesão celular. Entretanto, no presente experimento a presença deste componente retardou o crescimento das CTMs. É conhecido que a Quitosana possui uma evidente atividade antimicrobiana quando utilizada na concentração de 0,5 a 1,5% (*No et al., 2002; Zheng & Zhu, 2003*). Os mecanismos exatos pelos quais a Quitosana e seus derivados exercem essa atividade ainda permanecem desconhecidos. Entretanto, diferentes ações têm sido propostas por pesquisadores. A Quitosana age como agente quelante que se liga seletivamente a traços de metais e inibe, dessa forma, a produção de toxinas e o crescimento microbiano (*Tarsi et al., 1997*). O biopolímero possui ainda capacidade de ativar diversos mecanismos de defesa nos tecidos hospedeiros, atuando como um agente sequestrante de água e inibindo várias enzimas (*Tarsi*

et al., 1997). Além disso a quitosana interage com a membrana alterando a permeabilidade celular (LIU et al., 2001).

Segundo *Yeongseon et al (2011)*, as membranas produzidas pela técnica de LBL possui uma estrutura rugosa, que facilita a adesão celular, e a dispersão de medicamentos que por ventura possam ser utilizados em sua superfície, dessa forma, nota-se que a velocidade de adesão é maior, devido a rugosidade e as possíveis modificações da superfície pelo pH das soluções, outro fator que auxilia imensamente na rápida adesão celular nestas membranas são a polaridade entre célula e a biomembrana, característicos das proteínas de superfície celular. Enquanto que em placas que não possuem o tratamento da biomembrana possuem poros e uma superfície mais lisa, aumentando assim o tempo de adesão. Entretanto, sabe-se que algumas moléculas ou substâncias extras quando incorporadas ao material ou a biomembrana, ainda aceleram o processo de crescimento celular.

A Poli-D-Lisina foi utilizada para melhorar a superfície de contato entre células e a placa, e entre placas e membranas. E esta etapa de melhoramento segue a mesma linha entre a polaridade celular e superfície, cargas opostas melhoram a adesão.

	Adesão Célula/Membrana		Adesão Célula/Placa	
	Tempo de Adesão	Tempo de crescimento	Tempo de Adesão	Tempo de crescimento
Amostra 1	15h	72h	24h	48h
Amostra 2	18h	72h	24h	48h
Amostra 3	18h	72h	24h	72h
Amostra 4	24h	96h	48h	72h
Amostra 5	24h	96h	48h	72h
Média T	20h	81,5h	33,5h	62,5h

Tabela 1: tabela referente ao tempo de adesão e crescimento celular

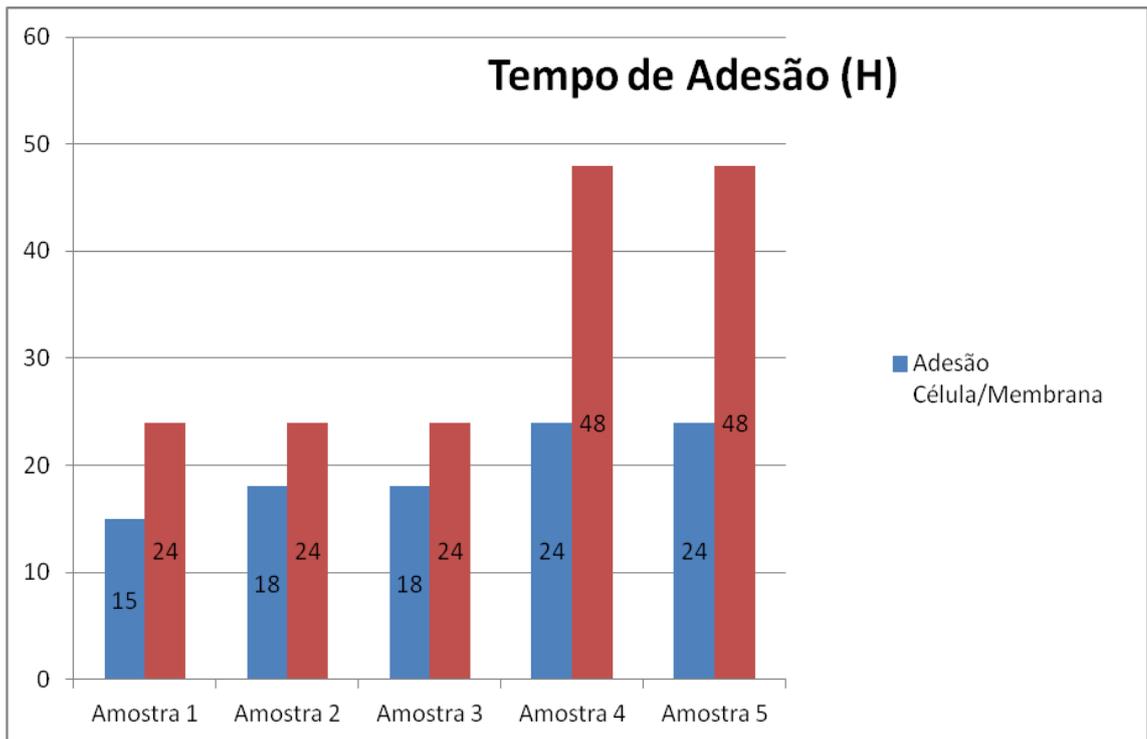


Gráfico 1: Comparativo entre o tempo de adesão membrana e placa.

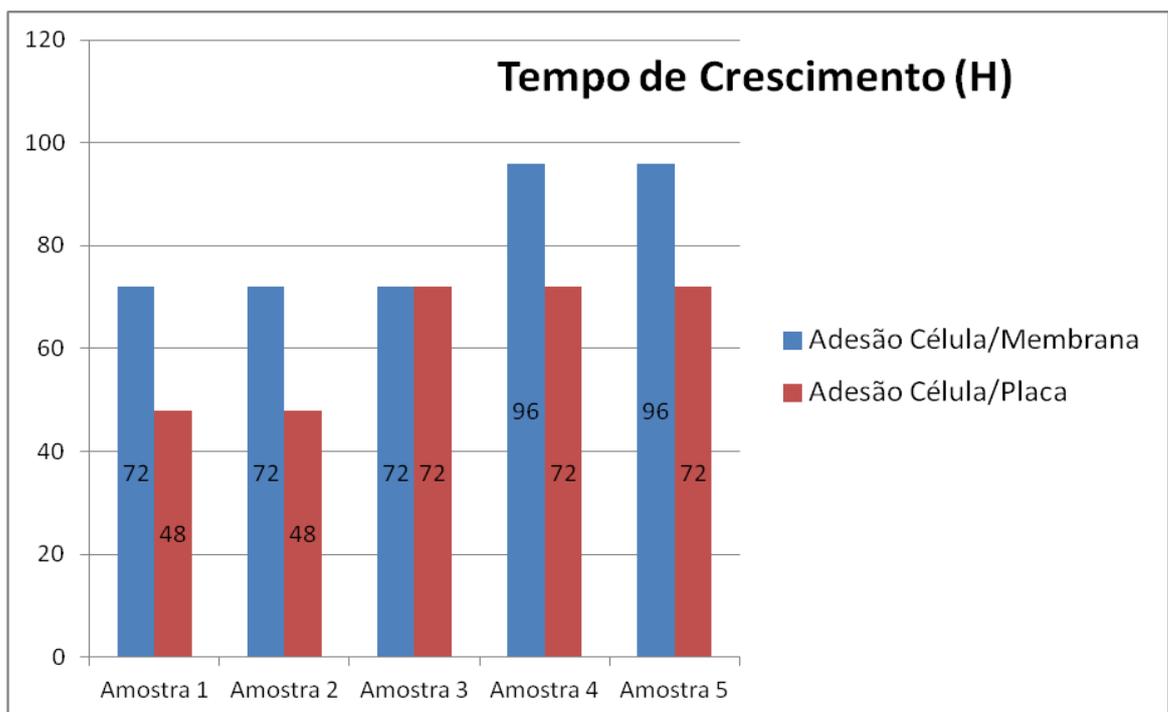


Gráfico 2: comparativo entre o crescimento celular entre membrana e placa.

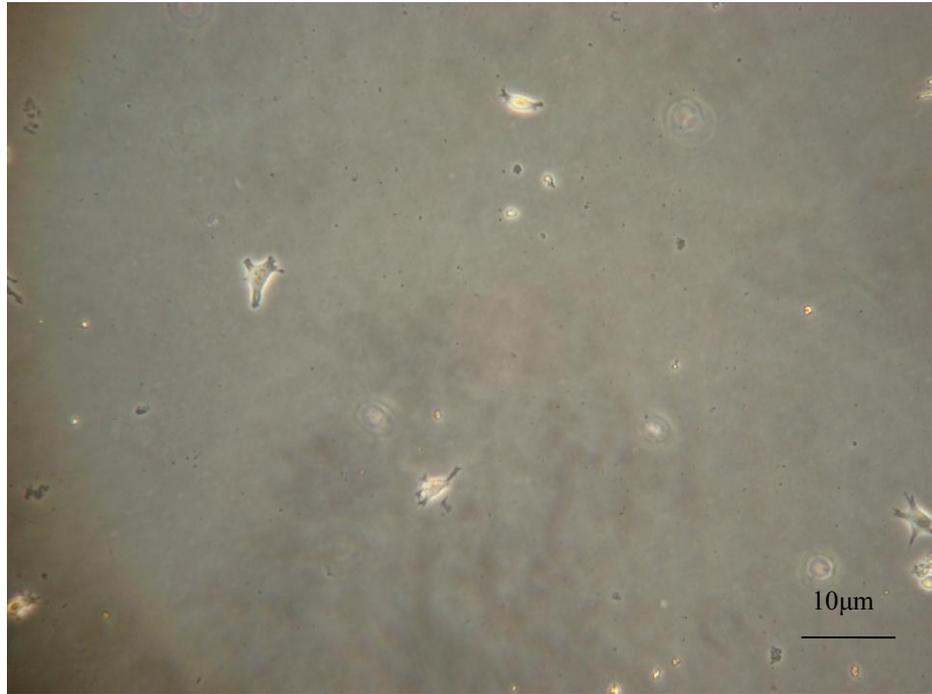


Foto 10: células colocadas para cultivar na membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

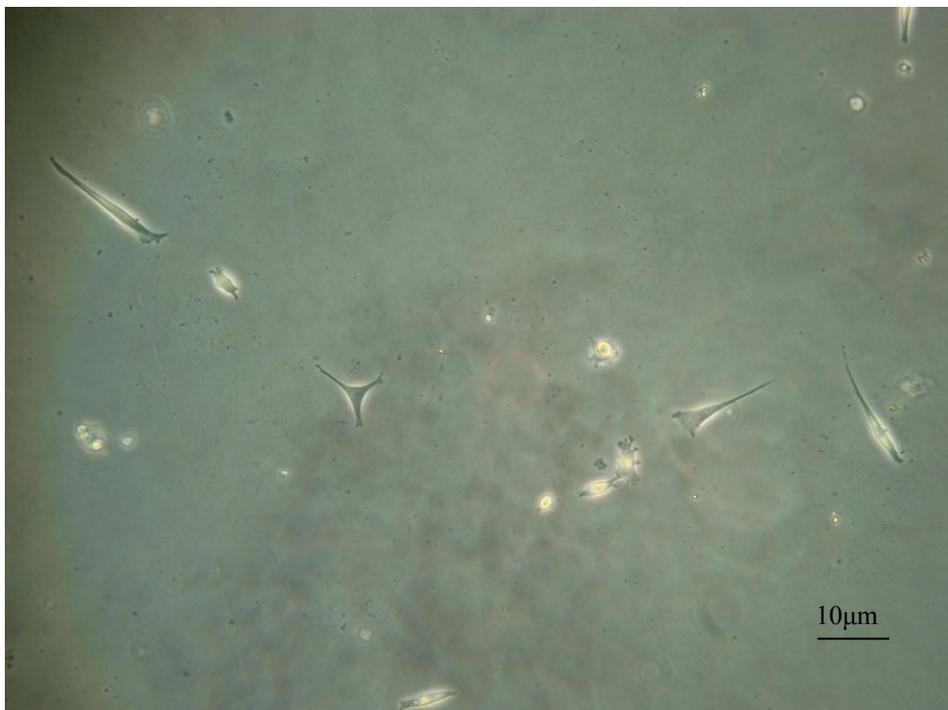


Foto 11: células após 12 horas no cultivo em membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

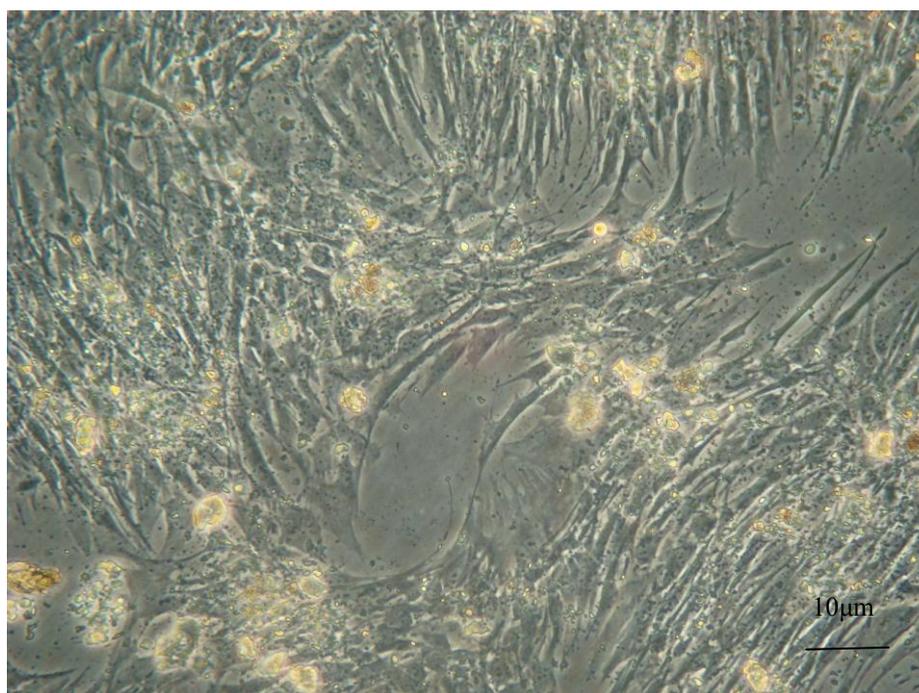


Foto 12: Amostra 2, cultivada em membrana após 48 hs. (fonte: Arquivo Pessoal)

2.2 Diferenciação Osteogênica nas Membranas e nas Placas

O osso tem uma incrível capacidade regenerativa, mas esta pode ser mascarada por uma perda considerável de tecido ósseo que ocorre devido a presença de um ambiente de regeneração inadequado em decorrência das agregações ósseas, como trauma, deformidades relacionadas ao desenvolvimento, ressecções de tumores e demais cirurgias. Neste caso, a bioengenharia dos tecidos é uma alternativa promissora, com grande potencial terapêutico (*Costa-Pinto et al., 2011*). A seleção do material mais adequado para produção de arcabouços a serem utilizados em bioengenharia aplicada é um passo fundamental no sucesso da terapia. Polímeros biodegradáveis, sintéticos ou naturais, tem se apresentado como os substratos mais adequados por permitirem a adesão e crescimento celular, permitindo ainda a manutenção do fenótipo desejado. Na última década, polímeros de origem natural, entre eles o ácido hialurônico e a quitosana tem sido amplamente utilizados na confecção de arcabouços destinados a reparação óssea (*COSTA-PINTO et al, 2011*).

Os meios foram colocados entre 72h e 96h e trocados a cada 48h. Foram mantidos por 10 dias, em estufas padronizadas com temperaturas, CO₂ e umidificação constante. Após este período as células foram fixadas com Citofix (Sigma- Aldrich dos USA), por 30 min. Em

seguida foi lavado com água Mili-Q três vezes consecutivas. Foi preparada uma solução de Alizarin Red com concentração de 2% e filtrado em filtros com membrana de 40µm. Esta solução foi depositada nas células previamente fixadas por 2 a 3 minutos. Em seguida lavadas três vezes com água Mili-Q. Sendo analisadas e fotografadas em microscópio. Para que pudessemos confirmar a diferenciação era preciso procurar grânulos vermelhos pelo citoplasma e pela placa. Isto era indicativo de produção de cálcio.

Nas 15 amostras colocadas em membrana e passadas pelo processo de diferenciação 13 delas se diferenciaram, produzindo grânulos de cálcio em seu espaço de cultivo. Apenas duas não houve êxito em sua diferenciação.

Nas 15 amostras colocadas diretamente em placas e diferenciadas 13 delas também se diferenciaram e 2 delas não produziram grânulos.

A característica fundamental da CMTs em cultura segundo **Zago e Covas (2007)**, é sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura. A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores que incluem o betaglicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias as células mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e depositar matriz extracelular rica em cálcio.

No presente experimento, a maioria das amostras (13/15) respondeu ao protocolo de diferenciação osteogênica com a produção de depósitos de cálcio. Esta resposta não diferiu entre os grupos. Este resultado difere do observado por **Klokkebold (1996)** que observou uma maior velocidade de diferenciação osteogênica de CTMs de camundongos em presença de um substrato de quitosana. Da mesma forma, **Cai et al.**, observaram que a diferenciação de CTMs aderidas a placas de titânio foi mais rápida quando estes foram tratados com quitosana. No entanto, nestes experimentos foi avaliado o potencial de diferenciação *in vivo* das células, ao contrario dos resultados aqui apresentados, onde foi induzida uma diferenciação *in vitro* através da adição de drogas.

De acordo com **Hu et al (2009)** e **Sun et al (2011)**, a Quitosana auxilia no processo de diferenciação osteogênica, mas algumas substâncias podem ser adicionadas para que o processo de polarização membrana/meio sejam melhorados, como por exemplo o BMP₂, este faz com que altere as ligações da membrana celular, para que os componentes dos meios possam entrar com maior facilidade nas células, produzindo assim os fatores de osteogenicidade, que são grânulos de cálcio, osteocalcina, osteopontina e passem a expressar a fosfatase alcalina.

Assim, pudemos concluir que as células que não se diferenciaram em ambos os protocolos pertenciam à mesma amostra. Dessa forma, nota-se que as células, podem não ser de linhagem mesenquimal, ou expressaram proteínas incompatíveis com o meio de diferenciação, impossibilitando assim a entrada dos nutrientes no citoplasma e não diferenciando as duas amostras.

Sabe-se que este teste também não é definitivo, já que ainda há técnicas de imunocitoquímica, que utiliza diferentes marcadores para dizer se as amostras que não produziram granulações se diferenciaram ou não.

Além disso, há alguns estudos sendo um deles citados por *Souza et al, 2011*, que trazem a utilização de alguns indutores como enzimas, proteínas e até mesmo biomateriais podem induzir esta diferenciação.

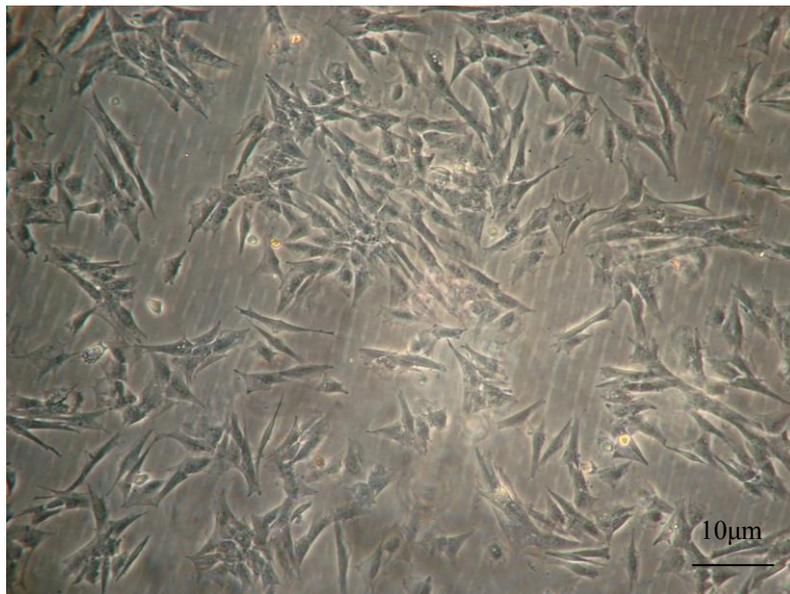


Foto 13: Controle da diferenciação na membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

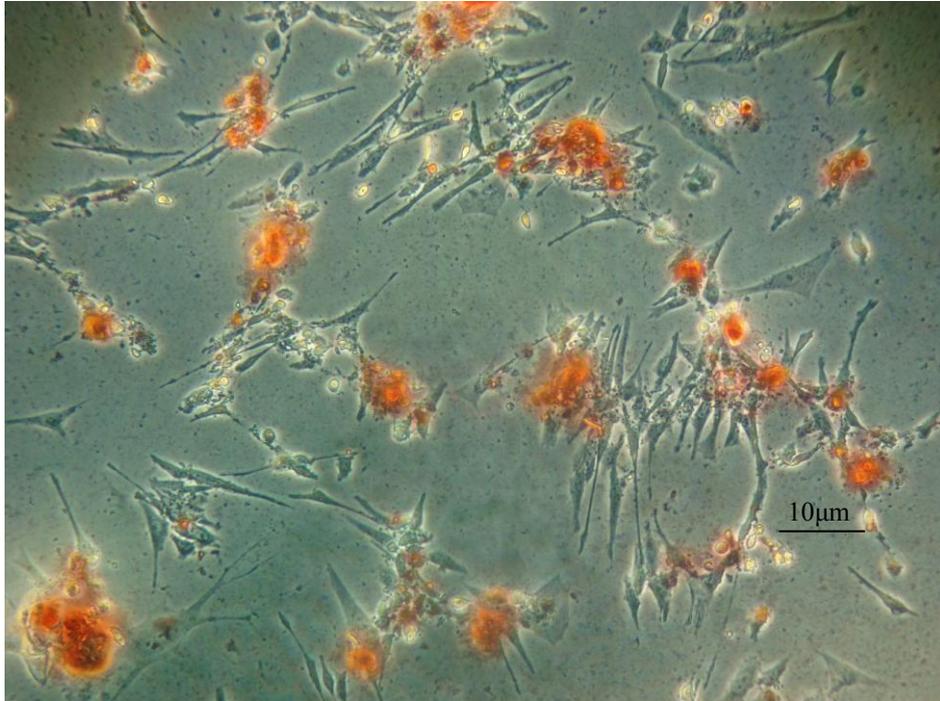


Foto 14: Diferenciação osteogênica. (fonte: Arquivo Pessoal)

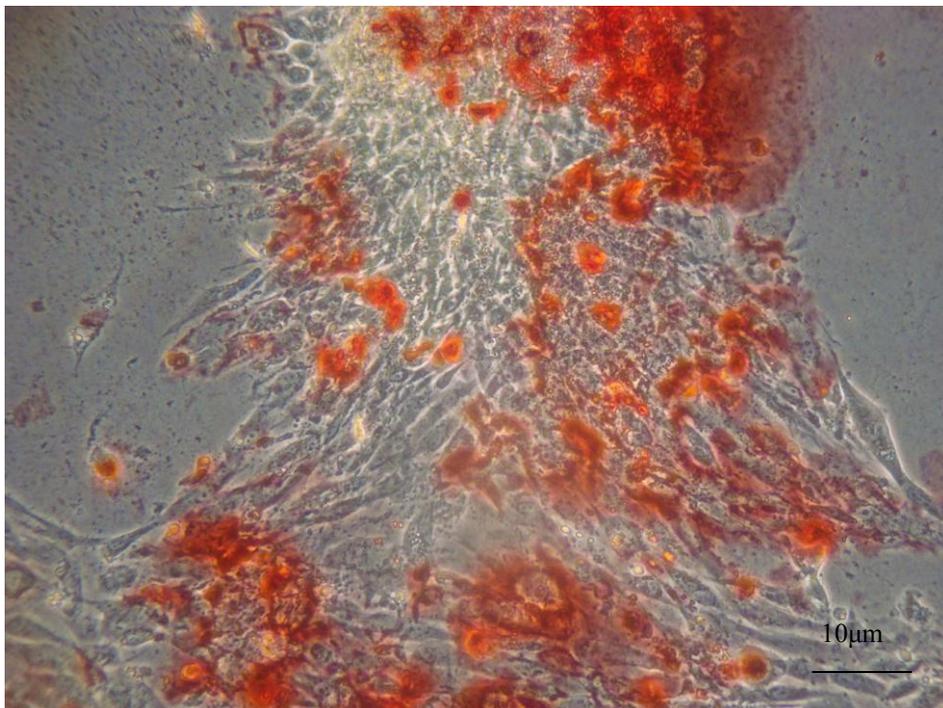


Foto 15: diferenciação osteogênica na membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

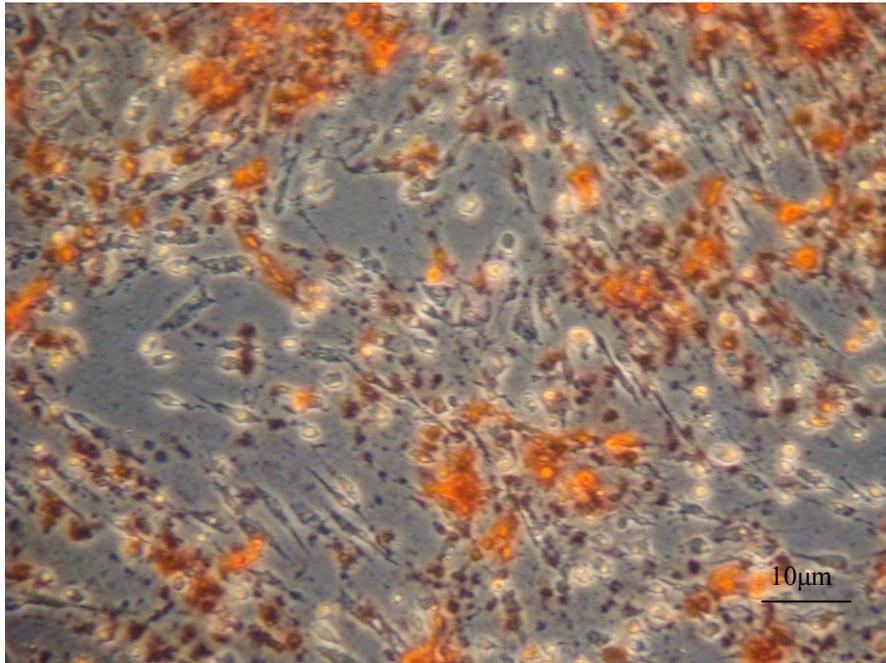


Foto 16: Diferenciação Osteogênica sem membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

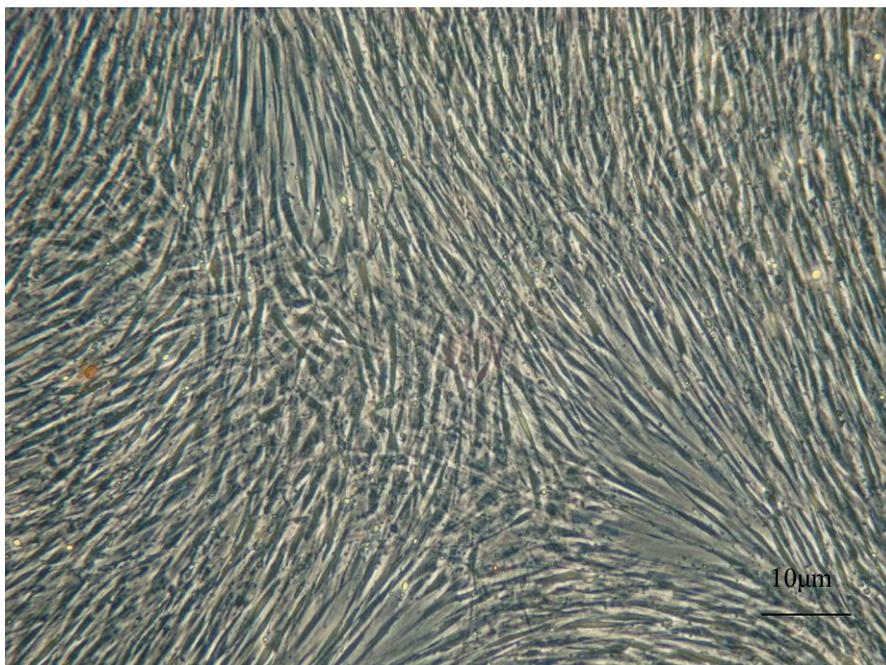


Foto 17: Controle da diferenciação osteogênica sem membrana. (fonte: Arquivo Pessoal)

2.3 Diferenciação Condrogênica nas Membranas e nas Placas

Estudos mostram que componentes específicos presentes na matriz extracelular da cartilagem, como o colágeno tipo II e os glicosaminoglicanos são essenciais para que ocorra a condrogenese, tanto *in vivo* como *in vitro* (*Suh & Matthew, 2000*). Sendo a cadeia de quitosana estruturalmente similar aquelas dos glicosaminoglicanos, considera-se este polímero um candidato atraente para mimetizar a matriz extracelular da cartilagem (*Thein-Han et al., 2008*). Desta forma, no presente experimento testamos a diferenciação condrogênica de CTMs na presença ou não de um filme de quitosana.

Os meios foram colocados também após 72h a 96h de crescimento, padronizando 1mL por poço e mantidos por 48 hs quando foi feita a primeira troca. E mantidas dessa forma até que se completasse 21 dias. Nesta técnica para manter a diferenciação foi necessária a vedação total das placas, pois a cartilagem hialina se forma sem a presença de oxigênio e gás carbônico.

Após 21 dias, foi feita a fixação com o Citofix- Sigma-Aldrich dos USA e coradas com Alcian Blue, comprado também da Sigma-Aldrich dos USA. O tempo de deposição do Alcian foi de 30 minutos, em seguida lavados com água Mili-Q e analisados no microscópio.

Notou-se que todas as amostras plaqueadas com e sem as membranas não sofreram diferenciação e nem produziram matriz hialina.

A diferenciação condrogênica ocorreria quando as células são cultivadas com baixa concentração de soro fetal bovino e na presença de TGF- α . Nestas condições, as CTMs mudariam rapidamente sua morfologia e passariam a secretar glicosaminoglicanos, agreganos, fibromodulina, proteína oligomérica da matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II e condroaderina. (*ZAGO e COVAS, 2007*).

Tan et al (2009), trouxe em seu estudo com células de líquido amniótico que estas são perfeitas para a utilização na diferenciação condrogênica, pois crescem em monocamadas. Diferentemente das outras origens celulares que necessitam de uma estrutura 3D para que possam diferenciar-se e produzir matrizes cartilaginosas.

Em experimentos prévios realizados em nosso laboratório, a diferenciação condrogênica foi obtida, utilizando-se CTMs de MO de equinos (*Radcliffe et al, 2010*). No entanto, nestes experimentos, a diferenciação foi realizada em tubos, quando as células se organizam em um pellet tridimensional. Sendo assim, a explicação plausível para esta não

diferenciação seria que células mesenquimais de origem medular teriam dificuldade de se desenvolver e produzir matriz hialina, quando cultivadas em monocamadas.

2.4 Interação Membrana/placas e Membrana/Lâmina

A produção das membranas foi vinculada com e sem “coating”, percebemos que as placas que possuíam uma cobertura prévia de Poli-D-Lisina tinham uma aderência melhor e um desenvolvimento celular mais acelerado.

Placas que não possuíam o “coating” permitiam um descolamento da membrana e como resultado o descolamento e morte das células ali cultivadas.

Portanto, fez-se essencial a utilização de uma pré-cobertura, que facilita a adesão e o cultivo das células na membrana pré-moldada.

Para a cobertura em lâminas de vidro, independente de haver o “coating” ou não a célula não aderiu na membrana, este eventual resultado pode ser concluído devido à espessura da membrana. Sendo 3 bicamadas insuficientes para evitar o contato vidro e célula. *Zago e Covas (2006)* já demonstravam que o cultivo celular em vidro era inviável, impossibilitando a adesão celular no mesmo.

3.0 CONCLUSÃO

Através desta pesquisa pudemos perceber que PEM's produzidas entre a união do Ácido Hialurônico e da Quitosana são adequadas para a elaboração de um biocurativo biodegradável, por melhorarem a adesão celular. Este filme parece ser excelente para o tratamento de lesões ósseas, já que as tais membranas estimulam as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem, se reproduzirem e a formarem um novo tecido no local.

O potencial de uso do filme em lesões cartilaginosa não foi comprovado uma vez que não houve diferenciação condrogênica no sistema bidimensional testado. Desta forma o uso de um scaffold tridimensional, formado ou recoberto pelos mesmos materiais se faz necessário para confirmar o potencial de diferenciação destas células.

Para que haja a produção destes bioadesivos ainda há muito que se estudar e modificar, principalmente a quantidade de biocamadas, pois o uso de somente três biocamadas, embora suficientes para recobrir a superfície da placa, impossibilitou a retirada destas das placas de cultivo. Assim, quantidades maiores de bicamadas, com nova espessura e

alterações de pH devem ser testadas para adaptação ao local cicatricial, propiciando melhor adesão e crescimento celular.

4.0 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA FQ, Silva V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(supl esp):119-29.
- ARAÚJO, J.D., Araújo Filho, J.D., Ciorlin, E., Ruiz, M.A., Ruiz, L.P., Greco, O.T., Lago, M.R., Ardito, R.V., A Terapia Celular no Tratamento da Isquemia Crítica dos Membros Inferiores, vol-4, 357-365, 2005.
- ÁVILA, R.E., Carmo, R.A., Farah, K.P., Teixeira, A.L., Coimbra, L.V., Antunes, C.M.F., Lambertucci, J.R.; Hyaluronic acid in the evaluation of liver fibrosis inpatients with hepatitis C and haemodialysis; *Brazil Infections diseases*; p.335-341; 2010.
- BARREIRA, A.P.B. Implante autólogo de células mesenquimais no tratamento de tendinites induzida em equinos: avaliação clínica, ultra-sonográfica e imunohistoquímica. Botucatu, SP: UNESP, 2005. 86p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- BITTENCOURT, R. A. C., Pereira, H. R., Felisbino, S. L., Murador, P., Oliveira, A. P. E., Deffune, E., Isolamento de Células-tronco Mesenquimais de Medula Óssea, *Acta Ortop Bras*, 2006.
- BORJESSON, D. L., Peroni, J. F., The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease, *Elseve*, February, 2011.
- CAETANO, G.F.; Biomembrana de Quitosana-Alginato na Cicatrização de Úlceras Cutâneas em Ratos, USP/Butantan/IPT, dissertação de mestrado, 2012.
- CAI L, HU Y., JANDT K., WANG V. Surface modification of titanium thin film with chitosan via electrostatic self-assembly technique and its influence on osteoblast growth behaviour. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19:499. 2008
- CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, v.217, p.318-324, 2009.
- CHEN, Y.; Shao, J.Z.; Xiang, L.X; Dong, X.J.; Zhang, G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.40, p.815-820, 2008.
- CONRAD C., Huss R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research*, v.124, 201-208, 2005.

COSTA-PINTO, A. R., Reis R. L., Neves N. M. Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan. *TISSUE ENGINEERING*. 17,(5),2011. DOI: 10.1089/ten.teb.2010.0704

CROVACE, A.; Lacitgnola, L.; De Siena, R.; Rossi, G.; Francioso, E., Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study.

DE BARI C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F.P., Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis Rheum*, v. 44(8), p. 1928-42, August 2001.

DOMINICI, M., Le Blanc, Mueller L., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. J., Horwitz E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, vol.8(4), p. 315-7, 2006.

FAGOT-LARGEAULT, A., Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e antropológicas, *Ética e Ciências da vida*, vol 18, May-Augs, 2004.

FIBBE W. E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis*; 61(Suppl II):ii29–ii31, 2002.

FIALHO, S.L., Rego, M.G.B, Cardillo, J.A, Siqueira, R.C., Jorge, R., Cunha Júnior, A.S.; Implantes Biodegradáveis Destinados à Administração Intraocular. *Arq. Brasileiro de Oftalmologia*, p.891-896, 2003.

FIGUEIREDO, E.S., Macedo, A.C, Figueiredo, P.F.R., Figueiredo, R.S.; Aplicações oftalmológicas do ácido hialurônico; *Arq. Brasileiro de oftalmologia*; p.92-95; 2010.

FUKUSHI Y., Nakajima H., Sugiyama D., Hirose I., Kitamura T., Tsuji K. Human Placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem cells* 22(5): 649-658, 2004

HERZOG, E.L., Chai, L., Krause, S.D., Plasticity of Marrow- Derived Stem Cells, *Blood Journal*, July 2003. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística , Produção Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1761&id_pagina=1> Acesso em: 23 de julho de 2012.

HU, Y., CAI, K., LUO, Z., ZHANG, R., YANG, L., DENG, L., JANDT, K.D.; Surface mediated in situ differentiation of mesenchymal stem cells on gene-functionalized titanium films fabricated by layer-by-layer technique. *Biomaterials*, vol.37, p.3626-3635, 2009.

JANG, Y., PARK, S., CHAR, K; Functionalization of polymer multilayer thin films for novel biomedical applications. Invited Review Paper, V.28, p. 1149-1160, 2011.

KATHELEEN, P.F., Feldman, B. F.; Zinkl, J.G., Jain, N.C. *Shalm's Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lippencott Williams and Wirilkins, cap. 5, p. 29-32, 2000.

KLOKKEVOLD P.R. Osteogenesis enhanced by chitosan in vitro. *J.Periodontol.* 67: 1170. 1996.

LAI, C.R.; Choo, A.; Lim, S.K. Derivation and Characterization of Human ESC- Derived Mesenchymal Stem Cells. Springer Science, vol.698, cap 11,p.141-150, 2011

LE BLANC K., Frassoni F., Ball L., Locatelli F., Roeloffs H., Lewis I., et al. Mesenchymal Stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study, *Lancet*, v. 371, p.1579-86, 2006

LE BLANC, K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, v. 6, p. 485-489, 2003.

LE BLANCK, K., Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA Expression And Immunologic Properties Of Differentiated And Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells. *Exp Hematol.* 2003.

LIU X.F., GUAN Y.L., YANG D.Z., LI Z., YAO K.D. Antibacterial action of chitosan and carboximethylated chitosan. *J. Appl. Polym, Sci.* 79: 1324-1335. 2001.

LIMA, R.A.S.; Shiota, R.; Barros, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada, ESALQ/USP, 2006. 250p.

LOVATI, A. B., Corradetti, B., Consiglio, A. L., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D., CREMONESI, F.; Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid-derived progenitor cells. Springer, 2010.

LUBIS, A.M.T. & LUBIS, V.K., Adult Bone Marrow Stem Cells in Cartilage Therapy, *Acta Medica Indonesia- The Indonesian Journal of Internal Medicine*, v. 44, n., January 2012.

MAMBELLI, L.I. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering*, v.15, n.1, p.87-94, 1999.

MANGI AA, Noiseux N, Kong D, H.E.H, Rezvani M, Ingwall J.S, Dzau, V,J; Mesenchymal Stem Cells Modified With Akt Prevent Remodeling And Restore Performance Of Infarcted Hearts. *Nature Med*,2003.

MARTINS, R., Kinoshita, A.M.O., Carvalho, N.T.A, Guimarães, S.A.C.; Estudo comparativo da resposta do tecido ósseo em técnica de regeneração tecidual guiada û avaliação macroscópica: parte 1; *LILACS*, p.224-230, jun 2010.

MAYHALL EA, Paffett-Lugassy N, Zoni, LI. The Clinical Potential Of Stem Cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2004.

MEIRELLES, L.S. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v.119, p.2204-2213, 2006. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/reprint/119/11/2204.pdf>>. Acesso em: 07 julho. 2012.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem cells*. v.23.p.1549-1559.

MINGUELL J, Erices A, Congent P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*.2001;(226):507-20.122

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na Escola**, p.25-29, 2007. Online. Capturado em 18 de Dezembro, 2008. Disponível em: <http://www.sbg.org.br/GeneticaEscola2/web/ano2vol2/05.pdf>.

NIH- National Institutes of Health. Stem cells: a primer. Disponível em: <<http://www.travisroyfoundation.org/pages/PDF/NIH-stemcells.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

NIXON, A.J.; Dahlgreen, L.A, Haupt, J.L.; Yeager, A.E.; Ward, D.L. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase- induced tendinitis. *American Journal Veterinary Research*, v.69, n.7, p.928-937, 2008.

NO H.K., PARK N.Y., LEE S.H., MAYERS S.P. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with diferente molecular wheights. *Int. J. Food Microbiol.* 74: 65-72. 2002.

PASIAN, A.C.P., Ferreira, R.R.; Estudo comparativo de três diferentes scaffolds para crescimento de célula tronco mesenquimal, fibroblastos e queratinócitos, projetos FAPESP, 2012

PRATA, K.L. Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas. Dissertação de Mestrado. Ribeirão Preto, 2006.

PACINI, S.; Spinabella, S.; Trombi, L.; Galimbert, S. Dini, F.; Carulicci, F.; Petrini, M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiae mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Engineering*, n.12, p.2949-2955, 2007.

RADCLIFFE, C.H., FLAMINIO, M.J.B.F., FORTIER, L.A.; Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations. *Stem Cell and Development*, v.19, fevereiro 2010.

RESENDE, A.M., Miosites no Cavalo Atleta. Anais do II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta. IV Semana do Cavalo. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. P. 56-75, 2005

RIBITSCH, I., Burk, J., Dellling, U., Geibler, C., Gittel, C., Julke, H., Brehm, W.; Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine, SpringerLink, 2010.

RICHARDSON, L., Dudhia, J., Clegg, P. D., Smith, R.K.W., Stem cells in veterinary medicine- attempts at regenerating equine tendon after injury. Trends Biothechnol. Vol. 25 (9), p. 409- 416, 2007.

ROMANOV Y.A., Svintsitsaya, V.A., Smirnov, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 21 (1): 105-110. 2003;

SATOH H, Kish K, Tanaka T, Kubota Y, Nakajima T; Akasaka Y, Ishii T. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Are Effective For Skin Regeneration In Acute Cutaneous Wounds. Cell Transplantation, 2004.

SMITH RKW, M Korda, GW Blunn, AE Goodship. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J* 35, 99-102.

SCHAUWER, C.; Meyer, E.; Van De Walle, G.R.; Soom, A.V. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells a plea for uniformity. Elsevier, p. 01-11, Nov. 2010.

SUH J.K.F. & MATTHEW H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering. A review. *Biomaterials* 26: 1-21. 2000.

SUN, B., MA, W., SU, F. WANG, Y.; The osteogenic differentiation of dog bone marrow mesenchymal stem cells in a thermo-sensitive injectable chitosan/collagen/beta-glycerophosphate hydrogel: in vitro and in vivo. Springer, Junho, 2011.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v.131, p.1-12, 2007.

TARSI R., MUZZARELLI R.A.A., GUZMAN C.A. PRUZZO C. Inhibition of *Streptococcus mutans* absorption to hydroxyapatite by low molecular weight chitosan. *J Dent. Res.* 76: 665-672. 1997.

TAN, S.L., Sulaiman, S., Pinguann-Mrphy, B., Selvaratnam, L., Tai, C.C, Kamarul, T.; Human Amnion as a novel cell delivery vehicle for chondrogenic mesenchymal stem cells, Springer science, vol.12, p. 59-70, 2009.

TAYLOR, H.S. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*, v. 292, n. 1, p. 81-5, Jul. 2004.

THEIN-HAN W.W., KITIYANANTY Y., MISRA R.D.K. Chitosan as scaffold matrix for tissue engineering. *Material Science and technology* 24: 1062-1075. 2008.

TSAI M.S.; Lee, J.L.; Chang, Y.J; Hwang, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. *human reproduction*. v. 19. n. 6. p. 1450- 1456. 2004.

VENDRUSCOLO, C.P, Watanabe, M.J., Maia, L., Carvalho, A.M., Garcia-Alves, A.L., Plasma Rico em Plaquetas: Uma Nova Perspectiva Terapêutica Para a Medicina Equina. P.33-43, vol 19, 2010.

VIOLINI S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells embryo stem cell markers and show the ability for fenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*. 2009;10:172-80.

WILKE, M.M.; Nydam, D.V.; Nixon, A.J. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, v.25, p.913-925, 2007.

WIKIPEDIA, disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Mesoderme>>. Acesso em 18 de dezembro de 2012.

ZAGO, M. A., Covas, D. T.; *Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina*, Editora Atheneu, São Paulo, 2006.

ZHENG L.Y., ZHU J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with diferente molecular wheigts. *Carbohydr Polym*. 54: 527-530. 2003.