

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
UNESP

**Utilização de técnicas de engenharia de tecidos para validação do  
uso do *scaffold* de quitosana em ampliação vesical de coelhos**

Regina Avelina de Moraes da Silva

Botucatu  
2012

**Regina Avelina de Moraes da Silva**

**Utilização de técnicas de engenharia de tecidos para validação do uso do *scaffold* de quitosana em ampliação vesical de coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica.

**Orientadora: Prof. Dra. Elenice Deffune**  
**Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho**

Botucatu - SP  
2012

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

Silva, Regina Avelina de Moraes da.

Utilização de técnicas de engenharia de tecidos para validação do uso do *scaffold* de quitosana em ampliação vesical de coelhos./ Regina Avelina de Moraes da Silva. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Co-orientador: José Carlos Souza Trindade Filho

Capes: 90400003

1. Biotecnologia. 2. Quitosana. 3. Bexiga. 4. Regeneração (Biologia)

Palavras-chave: Medicina regenerativa; Bexiga, Membrana de Quitosana, Engenharia de tecidos, Biomaterial.

*Dedico essa dissertação a Deus, à toda minha família e aos animais utilizados*

*Em primeiro lugar agradeço a Deus, por estar presente em todos os momentos de minha vida, seja me protegendo, guiando, confortando ou escutando.*

*À Dra. Elenice Deffune, minha orientadora. Visionária, é sinônimo de competência, intelectualidade e sabedoria ímpares. Com certeza é alguém que me proporcionou um valioso crescimento profissional e pessoal, me instigando a correr atrás de novos desafios e perspectivas de vida. Como pessoa é um exemplo da mais pura perseverança e garra, não se abatendo por mais inesperados que sejam os obstáculos. É uma vencedora nata. Agradeço por todos os ensinamentos, pelas oportunidades, pela confiança depositada e pela contribuição na lapidação de mais uma importante etapa em minha vida. Além de orientadora é alguém por quem tenho profundo carinho, admiração e respeito. Mais uma vez, o meu muito obrigado. Foi um prazer fazer parte de sua equipe. Nossa equipe.*

*Ao Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, meu co-orientador, pelo apoio, contribuição, disponibilidade e incentivo sempre demonstrados em relação à pesquisa proposta neste trabalho e ao meu desenvolvimento profissional. Obrigada.*

*À Dra. Rosana Rossi-Ferreira, pelo acolhimento em todos os momentos solicitados, pelo conforto de suas sábias palavras, pelos ensinamentos diários, sejam eles pessoais ou profissionais, pelo otimismo transparecido, pelo exímio exemplo de profissionalismo e pela confiança depositada em mim. O carinho, respeito e admiração também são inquestionáveis. Muito obrigada.*

*À Priscila Murador, "meu braço direito". Exemplo de honestidade, dedicação e disciplina. Alguém que me mostrou a importância de sempre se priorizar nossas virtudes. Não só profissionalmente, mas em matéria pessoal, foi*

*incessantemente zelosa comigo.É, sem dúvida, uma pessoa muito querida, da qual a amizade vou levar ao longo da vida.*

*À Michele Janegitz Acorci Valério por ser um modelo de generosidade e competência.Obrigada pela disponibilidade, pela transmissão de seu conhecimento, pelos muitos ensinamentos pessoais e conselhos profissionais.Com carinho, agradeço a oportunidade de poder ter convivido com uma pessoa de tamanha serenidade, amabilidade e capacidade de subjugar os problemas.*

*À Josy Campanhã Vicentini de Oliveira. Obrigada pela paciência, pelo pronto auxílio sempre que solicitado, pela sua amizade e competência demonstrados. Seu profissionalismo e disciplina são evidentes. Além disso é uma pessoa de grande generosidade por quem tenho muito carinho.*

*À Thaiane Cristine Evaristo. Primeiramente agradeço pela sua amizade, conselhos, companhia, momentos de descontração, de desabaços e de ensinamentos. É alguém cuja sensibilidade e solidariedade imperam. Além de possuir um coração imenso é sinônimo de disciplina, organização, competência, perseverança e caprichosidade o que a faz brilhar e servir de “molde” aos outros. Tenho um carinho gigante. Muito Obrigada por tudo.*

*À Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves por me auxiliar na estruturação do trabalho, por transmitir sua competência e doar sua experiência sempre que solicitado.Muito obrigada.*

*À Helga Caputo Nunes. Alguém que em tão pouco tempo me identifiquei,afinal somos muito parecidas, tornando-se uma pessoa muito querida. Muito obrigada pela sua amizade, pela companhia e pelo interesse sempre presente em quais*

*fossem os assuntos ou circunstâncias. Sua ambição em aprender e sua curiosidade peculiar te levarão ao sucesso certamente.*

*Ao Andrei Moroz, pelo auxílio na execução do trabalho, pelos ensinamentos prestados e pelas sugestões pertinentes. O meu muito obrigado.*

*À toda equipe do Laboratório de Engenharia celular. Tanto os que já passaram quanto os que vem chegando são pessoas que me ajudaram a desenvolver o espírito do verdadeiro trabalho em equipe, me ensinando tudo o que foi indagado, jamais deixando de oferecer assistência, sendo sempre solícitos. Com certeza a união do trabalho em equipe é o que determina nosso sucesso, pois ninguém trabalha sozinho. Muito obrigada: Alexandro Fagner Ferreira, Aline Aparecida Del Vescovo, Aline Garcia Aun, Ana Carolina Paisan, Ângelo Biasi Govone, Aparecida Vitória Gonçalves de Souza, Armando de Mattos Carvalho, Daniel Bassetto Jesuíno, Fátima Regina Guimarães, Flávia Ribeiro Nogueira, Gabriel Alves dos Santos, Gabrielle Reinoldes Bizarria Guilherme, Henrique de Souza Vieira, Juliana Ravelli Baldassare Martins, Juliane Campos Inácio, Leandro Garcia Alvarado, Luciana Jesuina Barbosa, Matheus Bertanha, Mariele Gobo de Oliveira, Ondina Silvia Cotrim, Paula Scatena, Regiane Marques Castro Olimpio, Renan Padron Almeida, Renato Colenci, Simone da Silva Ferreira, Wilson Rodrigo Alves Carvalho, Woner Mion.*

*Ao Carlos Roberto Gonçalves Lima, Ednelson Henrique Bianchi e José Lucas de Carvalho, pela dedicação, disponibilidade e paciência em todas as coletas de bexiga e procedimentos histológicos realizados.*

*À todos os colegas de pós-graduação pela companhia encontrada às sextas-feiras. Obrigada pelos momentos de descontração proporcionados, os quais tornaram nossas sextas em 2011 muito agradáveis.*

*À Prof. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues do Departamento de Patologia pela atenção prestada na avaliação dos resultados e pelo pronto auxílio.*

*À equipe do Departamento de Patologia, em especial: Claudiney Jurandir Figueira, Marcos Roberto Franchi e José Carlos Pedroso de Lima.*

*À equipe do Departamento de Química e Bioquímica do IBB. Em especial, Prof<sup>a</sup> Dra. Margarida Juri Saeki e Murillo Longo pela ajuda na primeira parte da produção da membrana de quitosana.*

*À equipe da pós-graduação e aos funcionários da biblioteca, pela paciência em minhas inúmeras visitas durante a composição deste trabalho.*

*Aos funcionários do Hemocentro: Cléo, Esmite, Rita e Parré. Sempre muito prestativos e solícitos. Em especial à Janice pela competência e eficiência.*

*Às funcionárias responsáveis pela limpeza do hemocentro: Ednéia Aparecida Santos Inácio e Rosana Alves Alcantara.*

*Aos professores da pós-graduação por compartilharem seu amplo conhecimento. Especialmente à Dra. Maria Inês Pardini pela oportunidade de participação no programa de pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento; à Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto; ao Dr. Carlos R. Padovani; à Dra. Izolete Ap. Thomazini Santos; à Dra. Márjore de Assis Golim; à Dra. Valéria Alves da Silva.*

*Aos meus pais, Felisberto Pedro da Silva e Teresinha de Moraes da Silva, os pilares de sustentação da minha vida. Exímios exemplos de honestidade,*



*perseverança, determinação, caráter e generosidade. Dois seres humanos maravilhosos que sempre apoiam minhas decisões, por mais confusas e inconstantes que possam ser, por terem a certeza que obterei sucesso, sejam elas quais forem. Obrigada por sempre enfatizarem a importância do estudo, do amor e da união, proporcionando as bases do meu desenvolvimento como pessoa e profissional. Obrigada pelo incessante, profundo e zeloso amor de vocês. Amo-os incondicionalmente.*

*Aos meus irmãos, Raphael Eduardo e Júlia Renata. Sempre juntos, estou certa de que o elo que nos une é transcendental. E é isso que faz com que sejamos unidos, companheiros, amigos e irmãos. Amo vocês.*

*Ao meu avô José e minhas avós Elvira e Maria, por serem um motivo a mais para eu acordar todos os dias e me sentir abençoada. Vocês são o espelho do que eu almejo ser em minha vida e do amor que eu vou demonstrar perante a família que construirei um dia, assim como vocês o fizeram comigo. O amor que sinto por vocês é profundo e infinito.*

*À minha família por inteiro. A qual foi, é e sempre será responsável pelo meu caráter e virtudes. Agradeço aos meus tios Adão Fernando, Maurício, meu padrinho Ângelo José, às minhas tias Guida, Márcia, Vilma, Rosana, minha madrinha Hilda aos meus primos e primas; Ricardo André, Karla Júlia, Marcelo Eduardo, Rodrigo, Bruna Fernanda, Ana Carolina, Feliphi, Fernanda, Bárbara Elvira e Arthur Guilherme.*

*Aos queridos Miguel, Rosângela e Victória, por serem considerados por mim parte integral da minha família, sempre presentes em minhas conquistas e, portanto, também tendo uma parcela de responsabilidade pelo que sou hoje. Obrigada, amo vocês.*

*À Letícia, Renata, Daniel, César e Márcia, pelos momentos de descontração desfrutados juntos, e pela sempre agradável e indispensável companhia de vocês. Vocês também fazem parte da família.*

*À minha segunda família, minha república, que deixará saudades por representar uma fase responsável por uma das experiências mais marcantes, intensas, inovadoras e desafiadoras da minha vida. Todos os momentos estarão guardados no meu coração. Amo cada um do seu jeito; em especial: Vanessa Nóbrega (Mixinga); Ana Carolina Saad (Prof); Mariana Acciaris (Pistolão); Tamara Haramita (Raitec); Natasha Castro (Flácida); Camila Lima (Mosquete); Natália Hanna (Montana); Maria Júlia Ferreira (Joelminha); Gabriela Bertti (Premonição); Patrícia Bellete (Made-in), Pedro Bisson (Xú), Fernando Careli de Carvalho (Bongô), Eduardo Tachlitsky (Reservado), Stefanni Rico (Waka), Bruna Azevedo Belão (Susto), Beatriz Della Terra Garrido (Tchubi), Gabriela Daolio (Milka).*

*Ao Pedro Ernesto Baseio. Obrigada por apoiar minhas decisões e acompanhá-las. Pela sua presença, pela sua amizade, conselhos, pela sua paciência comigo, compreensão e pelo seu amor. Seu coração é imenso. Muito obrigada por tudo meu amor.*

*A todos os integrantes da minha querida bateria, pelos momentos imprescindíveis de descontração, união, alegria e música. À toda turma da Biomedicina XLIII Em especial: Denise Reis (Diarista); Mariana Nars (Massa); Marianna Bartelega (Kafa) e Martina Correa (Isva).*

*Aos animais sacrificados para a realização deste trabalho.*

*À todas as demais pessoas que me ajudaram de alguma maneira, direta ou indiretamente. Meu muito obrigado.*

*“A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás; mas só pode ser vivida olhando-se para frente.”*

*Soren Kierkegaard*

<b>Figura1:</b> Aspecto histológico da bexiga corado com H&E. Em 1, células superficiais relaxadas. Em 2, epitélio de transição. Em 3, células basais. Em 4, capilares. Em 5, tecido de conexão.....	28
<b>Figura2:</b> Os diferentes epitélios que, juntos, constituem o urotélio.....	29
<b>Figura3:</b> Tecido muscular liso de bexiga.....	29
<b>Figura4:</b> Estrutura química da quitina e quitosana.....	32
<b>Figura5:</b> Fonte: Roman, P. <i>et al</i> , 2007 em Gobo-Oliveira, 2011. Em “A”, conteúdo intra-plaquetário. Em “B”, plaquetas inativas. Em “C”, ativação plaquetária ocorrida na adesão com formação de pseudópodes e liberação dos fatores de crescimento.....	34
<b>Figura6:</b> Mecanismos de morte celular. Adaptado de Guilherme, G. R. B.; 2009.....	36
<b>Figura7:</b> Vias de morte celular. Adaptado de Bertanha, 2011.....	38
<b>Figura8:</b> Fonte <a href="http://www.celldeath.de">www.celldeath.de</a> , acessado em 15/01/12. Esquema geral de morte celular por apoptose (linha acima: a célula perde suas organelas e torna-se progressivamente picnótica) e necrose (linha abaixo: formação de poros na membrana que permitem a entrada de líquido de forma não controlada, aumento do volume celular, destruição das organelas intracelulares, desintegração da membrana celular).....	39
<b>Figura9:</b> Ilustração da exposição das PS. No lado esquerdo, na célula viável, a PS encontra-se na membrana citoplasmática interna. No lado direito, PS externalizadas para o lado externo da membrana, na célula em apoptose.....	39
<b>Figura10:</b> Laboratório convencional ou <i>standard</i> (LAC).....	46
<b>Figura11:</b> Área Limpa – <i>screening</i> .....	46
<b>Figura12:</b> Área Limpa- Ambiente de Microscopia Figura Dissociação Mecânica da bexiga com <i>cell scrapper</i> .....	46
<b>Figura13:</b> Área Limpa-Área de manipulação Estéril.....	46
<b>Figura14:</b> Dissociação Mecânica da bexiga com <i>cell scrapper</i> .....	49
<b>Figura15:</b> <i>Pellet</i> de células da bexiga retiradas por dissociação mecânica.....	49
<b>Figura16:</b> Enzima Colagenase.....	50
<b>Figura17:</b> Etapas da dissociação enzimática: obtenção dos fragmentos de tecido e deposição em meio Hepes contendo enzima colagenase.....	51
<b>Figuras18 e 19:</b> Quadrantes da câmara e câmara de Neubauer.....	52
<b>Figuras20 e 21:</b> Na primeira, células de músculo liso em início de adesão. Aumento de 100x. Na segunda, células de músculo liso em confluência de 80%. Aumento de 100x. Ambas em contraste de fase ph1.....	52
<b>Figura22:</b> Ampolas na caixa (gaveta) de criopreservação. Compõem o Banco de Células presente no LEC.....	54
<b>Figura23:</b> Quitosana comercial - Chitosan from shrimp shells, practical grade .....	55
<b>Figura24:</b> Etapas do preparo da membrana de quitosana – Departamento de Química e Bioquímica IBB Unesp.....	56
<b>Figura25:</b> Quitosana líquida acrescida de hormônio plaquetário.....	57
<b>Figura26:</b> Em cima, membranas em fase de secagem e adição de Na OH. Embaixo, membrana pronta para uso.....	59
<b>Figura27:</b> Membranas esterilizadas pelo sistema Sterrad®.....	60
<b>Figura28:</b> Na esquerda, meio Agar Sabouraud em placa de Petri. Na direita, “plaqueamento” de <i>C. albicans</i> sobre o meio de cultura.....	62
<b>Figura29:</b> Implante dos segmentos de membrana <i>in vivo</i> . Em “A”, incisões no dorso dos animais. Em “B”, marcação das membranas com fio azul. Em “C”e “D”, implante das membranas nos segmentos. Em “E”, sutura. Em “F”, cirurgia finalizada.....	70
<b>Figura30:</b> Procedimento cirúrgico piloto do implante de membrana <i>in vivo</i> .....	71

<b>Figura31:</b> Na esquerda, células em início de adesão. Aumento de 100x. Na direita, células em confluência de 80% após alguns dias de cultura. Aumento de 100x.....	75
<b>Figura32:</b> Células de músculo liso em terceira passagem. Aumento de 100x.....	75
<b>Figura33:</b> Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animais 1 e 2.....	77
<b>Figura34:</b> Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animais 3 e 4.....	78
<b>Figura35:</b> Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animal 5.....	79
<b>Figura36:</b> Células não marcadas representam o controle negativo. Aumento de 50 e 100x, respectivamente.....	80
<b>Figura37:</b> Células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Na esquerda, células marcadas com o anticorpo HHF35. Na direita, células marcadas com o anticorpo HDIC 1 a 4. Aumento de 50 e 100x, respectivamente.....	80
<b>Figura38:</b> Células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Células marcadas com o <i>Alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Antibody</i> Aumento de 200x.....	81
<b>Figura39:</b> Halos de inibição de crescimento de <i>C. albicans</i> após 48h de incubação.....	83
<b>Figura40:</b> Adesão celular ao <i>scaffold</i> , <b>sem</b> fator promotor da adesão. Filtros usados: Em verde, FITC 200X. Em azul, DAPI 200X. Em vermelho, TxRed 200X.....	85
<b>Figura41:</b> Adesão celular ao <i>scaffold</i> , <b>com</b> fator promotor da adesão. Filtros usados: Em verde, FITC 200X. Em azul, DAPI 200X. Em vermelho, TxRed 200X.....	85
<b>Figura42:</b> Resultado da citometria de fluxo utilizando Anti-Caspase-3.....	86
<b>Figura43:</b> Resultado da citometria de fluxo para o teste de Anexina/PI: controles negativos.....	88
<b>Figura44:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana 3%”.....	89
<b>Figura45:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana 4%”.....	90
<b>Figura46:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana Dopada 3%”.....	91
<b>Figura47:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana Dopada 4%”.....	92
<b>Figura48:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana 4% em maior concentração (20g de quitossana/1L de ácido)”.....	93
<b>Figura49:</b> Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana Dopada 4% em maior concentração” (20g de quitossana/1L de ácido)”.....	94
<b>Figura50:</b> Processo inflamatório pós – operatório.....	95
<b>Figura51:</b> Implante dorsal da membrana, <i>in vivo</i> . Na esquerda, implante após sete dias no coelho1. Na direita, implante após sete dias no coelho2.....	95
<b>Figura52:</b> Implante dorsal da membrana, <i>in vivo</i> após 14 dias. Na esquerda, coelho 1. Na direita, coelho2.....	96
<b>Figura53:</b> Implante dorsal da membrana, <i>in vivo</i> após 21 dias. Na esquerda, coelho 1. Na direita, coelho 2 com formação de abscesso do lado esquerdo do implante.....	96
<b>Figura54:</b> Resultados histologia coelho 1. Coloração H&E. Aumento 100X.....	98
<b>Figura55:</b> Resultados histologia coelho 2. Coloração H&E. Aumento 100X.....	99
<b>Figura56:</b> Piloto do implante <i>in vivo</i> do segmento de membrana em bexiga. Aspecto macroscópico.....	102
<b>Figura57:</b> Resultado histologia piloto implante <i>in vivo</i> : Bexiga. Em “A”, membrana de quitossana ao meio. Aumento de 100x. Em “B”, aumento de 50x. Coloração H&E.....	103
<b>Figura58:</b> Etapas de construção do modelo envolvendo os princípios da Terapia celular propriamente dita.....	113

<b>Tabela1:</b> Fatores de crescimento liberados pelas plaquetas.Gobo-Oliveira, 2011. Modificado.....	34
<b>Tabela2:</b> “Publicações sobre “Ampliação Vesical”, “Engenharia Tecidual em Bexiga” e Engenharia Tecidual, Bexiga e Quitosana” na base de dados Pubmed, outubro 2011.....	40
<b>Tabela3:</b> Publicações sobre “Ampliação Vesical”, “Engenharia Tecidual em Bexiga” e “Engenharia Tecidual, Bexiga e Quitosana” na base de dados <i>Scopus</i> , outubro, 2011.....	41
<b>Tabela4:</b> Grupos estudados e suas características.....	58
<b>Tabela5:</b> Nomenclatura implante dorso.....	69
<b>Tabela6:</b> Resultado do ensaio antimicrobiano em laboratório.....	82
<b>Tabela7:</b> Resultado do ensaio antimicrobiano ambiental.....	83
<b>Tabela8:</b> Respostas da detecção da exposição das FS por citometria de fluxo usando Anexina-V e PI. Adaptado de Guilherme, G. 2006.....	87
<b>Tabela9:</b> Avaliação histomorfológica das amostras <i>in vivo</i> .....	100

<b>Gráfico1:</b> Resultados referentes à apoptose induzida pela via das caspases nos testes em “Quitosana pura” e “Quitosana contendo solução de glutaraldeído 0,25%”.Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	104
<b>Gráfico2:</b> Resultados referentes à necrose celular, expressa pelo PI, quando em contato com as membranas dos subgrupos elencados no estudo. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	105
<b>Gráfico3:</b> Resultados referentes à viabilidade celular quando em contato com a membrana de quitosana, a partir do teste de AnexinaV/PI. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	106
<b>Gráfico4:</b> Resultados referentes à apoptose celular induzida quando em contato com as membranas pertencentes aos seis subgrupos elencados. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	107
<b>Gráfico5:</b> Resultados provenientes do cruzamento entre as três variáveis: necrose, células viáveis e apoptose. Os resultados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão.....	108

ITU- Infecções do Trato Urinário  
H&E- Hematoxilina e Eosina  
ET- Engenharia de Tecidos  
GA- Grau Médio de Acetilação  
EGF- Fator de crescimento epidérmico  
PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas  
FGF- Fator de crescimento de fibroblasto  
TGF- $\beta$ 1- Fator de crescimento transformador beta  
IGF-1- Insulin-Like Growth Factor-1  
LEC- Laboratório de Engenharia Celular  
ELISA- Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay  
FISH- Fluorescence in situ Hybridization  
DNA- Desoxinucleic Acid  
PS- Fosfatidilserinas  
PI- Iodeto de Propídio  
CF- Citometria de Fluxo  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
UNESP- Universidade Estadual Paulista  
IBB- Instituto de Biociências de Botucatu  
FMB- Faculdade de Medicina de Botucatu  
FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo  
CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
BNDES- Banco Nacional do Desenvolvimento  
FINEP- Financiadora de estudos e projetos  
FNS- Fundo Nacional de Saúde  
LAC- Laboratório de Atividades Complementares  
HEPA- High-Efficiency Particulate Air  
EPIs- Equipamentos de Proteção individual  
COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
PVPI- Polivinilpirrolidona-iodo  
HEPES- Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid  
EC- Engenharia Celular  
PBS- Phosphate-Buffered Saline  
POP- Procedimento Operacional Padrão  
MC- Meio de Cultura  
DMEM F12- Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium  
SFB- Soro Fetal Bovino  
CO<sub>2</sub>- Dióxido de Carbono  
EDTA- Ethylenediamine tetraacetic acid  
DMSO- Dimetilsulfóxido  
Anti-CD90- Anti-rat cross reacting with rabbit  
ICQ- Imunocitoquímica  
GD- Grau de desacetilação  
kDa- Kilo Daltons  
PM- Peso Molecular  
Na OH- Hidróxido de Sódio  
pg/dl- picogramas/ decilitro  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrogênio  
CTM- Célula-Tronco Mesenquimal  
NK- Natural Killer



## **Utilização de técnicas de Engenharia de Tecidos para validação do uso do *scaffold* de quitosana em ampliação vesical de coelhos**

**Introdução:** Levando-se em consideração avanços tecnológicos na área médica, a engenharia de tecidos (ET) surgiu como um capítulo do livro da Medicina Regenerativa a qual se caracteriza pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos, ou órgãos, desenvolvidos em laboratório, para apoiar ou substituir a função de partes do corpo defeituosas ou danificadas. Dentre os principais desafios está a abordagem dos chamados biomateriais ou *scaffolds*, que atuam como substratos adesivos para as células implantadas, propiciando suporte físico tridimensional e auxílio no crescimento de um tecido organizado, como é o caso do polímero constituído de quitosana. A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, o qual apresenta propriedades inerentes dos biomateriais, sendo aqui apresentado sob a forma de membrana. Assim, foram aliadas técnicas derivadas da biotecnologia para a viabilização do uso desse biomaterial, *in vivo*, à demanda existente por alternativas visando restabelecer as funções vesicais para então, posteriormente, se constituir a materialização da Ampliação vesical. **Objetivos:** 1) Propor o interfaceamento das áreas de urologia e de Engenharia de Tecidos visando à aplicabilidade do *scaffold* de quitosana em bexiga. 2) Padronizar critérios necessários para o devido emprego da membrana *in vivo*. **Material e Métodos:** Foram produzidos dois grupos de membranas divididos em três subgrupos cada, elencados em função da concentração de ácido usado para diluição do polímero, quantidade de quitosana em gramas e acréscimo ou não de fatores de crescimento de plaquetas, sendo os subgrupos diferenciados pela denominação “Membranas não Dopadas” e “Dopadas”. Amostras de células de tecido muscular liso de bexiga foram retiradas de coelhos e submetidas a testes de caracterização por imunocitoquímica (ICQ) e citometria de fluxo (CF) para posterior implante nos *scaffolds*. Em relação às membranas, foi proposta a padronização dessas, com diferentes composições, esterilização pelo método *Sterrad*<sup>®</sup>, realização de ensaios de adesão, de citotoxicidade celular com kit de Caspase-3 e Anexina-V/Iodeto de Propídio (PI) por CF, de atividade antimicrobiana, atividade antifúngica, de avaliação da toxicidade residual ao organismo, piloto do implante na bexiga, *in vivo*, e análise estatística dos dados pelo programa Graphpad Instat<sup>®</sup>. **Resultados e Discussão:** Foi possível padronizar a produção dos seis subgrupos distintos de membrana. O fenótipo de músculo liso foi confirmado pelas caracterizações por ICQ e CF. Os ensaios de adesão mostraram a união celular junto ao *scaffold* com e sem fator promotor de adesão, validando a característica de adesividade da membrana. De forma geral, foi confirmada a ausência de citotoxicidade, necrose e apoptose celular induzida pela exposição às membranas pelos testes de Anexina-V/PI e Caspase-3, sendo apenas a amostra contendo solução de glutaraldeído 0,25% em sua composição considerada altamente tóxica. O estudo das atividades antimicrobianas e antifúngicas apresentou o obstáculo da ausência de uma metodologia pré-estabelecida específica para testes no polímero usado. No entanto, apresentou-se satisfatório. Já os ensaios realizados *in vivo*, a avaliação da toxicidade residual e piloto do implante em bexiga de coelho, mostraram um possível caráter imunogênico do polímero, tendo em vista uma importante resposta inflamatória observada. **Conclusões:** Os seis subgrupos de membranas estudados se apresentaram como uma alternativa eficaz para uso como biomaterial, *in vitro*, porém, observa-se a necessidade de um estudo aprofundado do potencial imunogênico dos polímeros para a posterior aplicação clínica desses, corroborando com os achados da literatura.

Palavras-chave: Medicina regenerativa, Engenharia de tecidos, biomaterial, membrana de quitosana, ampliação vesical.

## **Utilization of Tissue Engineering Techniques to validate the use of Chitosan scaffold in rabbit bladder augmentation**

**Introduction:** Due to medicine technological advances, tissue engineering (TE) has emerged as a Regenerative Medicine chapter, characterized by the development and manipulation of molecules, cells, tissues, and organs, cultivated in laboratory to support or replace body's defective or damaged functions or parts. One of the main challenges is the approach of the biomaterials or scaffolds, responsible to guide and explore living tissue interactions between synthetic materials to optimize processes such as fixation, recognition, and colonization. As adhesive substrates for cells implanted; they provide tridimensional physical support assisting an organized tissue growth. Chitosan polymer is a polysaccharide derived from chitin that demonstrates inherent properties of biomaterials, presented here in a membrane form. Therefore, biotechnological techniques to validate the use of this biomaterial *in vivo* were allied to the demand for alternatives in order to restore bladder function, instigating bladder augmentation materialization. **Objectives:** 1) Propose to interface Urology and TE in order to apply the Chitosan scaffold in bladder. 2) Standardize necessary criteria for the proper membrane use *in vivo*. **Material and Methods:** Each one of the two groups of membranes produced was divided into three subgroups, listed according to the addition or not of Platelet Growth Factors. They were called "doped membranes" and "no doped membranes", respectively. Rabbit's bladder smooth muscle cells samples were removed and characterized by immunocytochemistry (ICC) and flow cytometry (FC) techniques for subsequent implant in the scaffolds. In relation to the membranes, it was proposed a standardized production of the different subgroups; sterilization by the *Sterrad*<sup>®</sup> method; adhesion test; evaluation of cellular cytotoxicity using Caspase-3- and Annexin V /Propidium iodide (PI) Kit for FC; antimicrobial and antifungal activity; *in vivo* evaluation of residual toxicity; *in vivo* bladder implant first trial; and statistical analysis by GraphpadInstat<sup>®</sup> software. **Discussion and Results:** It was possible to standardize six distinct membrane subgroups production. Smooth muscle phenotype was confirmed by ICC and FC characterizations. The adhesion assays showed cellular attachment to the scaffolds with and without adhesion promoting factor, validating the adhesive membrane characteristic. There were no cytotoxicity, necrosis and apoptosis after membrane exposure, however the sample containing glutaraldehyde 0.25% solution was considered highly toxic. The determination of the membrane's antimicrobial/antifungal properties was difficult to evaluate, since there was no pre-established method to test this specific polymer, however, they performed satisfactorily. Both, "*in vivo* evaluation of residual toxicity" and "*in vivo* bladder implant first trial" showed a possible polymer's immunogenic feature characterized by an important inflammatory response. **Conclusions:** The six membrane subgroups studied were presented as an effective *in vitro* biomaterial. However, it is imperative to define the real immunogenic risks before this scaffold can be fully employed as a new tool in Regenerative Medicine.

**Key words:** Regenerative Medicine, Tissue Engineering, Biomaterial, Chitosan membrane, Bladder Augmentation.

## Sumário

I- Introdução.....	26
I.1-Aspectos Gerais.....	26
I.2-Bexiga: Embriologia, Anatomia e Histologia.....	28
I.3-Engenharia Tecidual.....	29
I.4-Biomaterial.....	30
I.5-Quitosana.....	31
I.6-Fatores de Crescimento das Plaquetas.....	33
I.7-Vias de Morte Celular.....	36
I.8-Relevância do Tema.....	40
II- Objetivos.....	43
II.1- Objetivo Geral.....	43
II.2- Objetivos Específicos.....	43
III- Material e Métodos.....	45
III.1- Instalações.....	45
III.2- Animais.....	47
III.3- Técnicas de Engenharia de Tecidos.....	47
III.4- Membrana de Quitosana.....	55
III.5- Modelo de membrana celularizada.....	63
III.6- Modelo <i>in vivo</i> .....	68
III.7-Análise estatística.....	72
IV- Resultados e Discussão.....	74
IV.1- Técnicas de Engenharia de Tecidos.....	74
IV.2- Membrana de Quitosana.....	82
IV.3- Modelo de membrana celularizada.....	84
IV.4- Modelo <i>in vivo</i> .....	95
IV.5- Análise estatística.....	104
V- Conclusões.....	110
VI- Perspectivas.....	112
VII- Referências.....	115
Anexos	



## **I. Introdução**

### **I.1- Aspectos Gerais**

A bexiga é o órgão responsável pelo armazenamento de urina sob baixas pressões, sendo que a função vesical encontra-se adequada quando os períodos de armazenamento e esvaziamento do trato urinário inferior estão preservados. Para que o reservatório vesical esteja em condições ideais, este deve manter-se com adequada complacência e ser facilmente esvaziado<sup>1</sup>.

Várias patologias adquiridas ou congênitas, malignas ou benignas, promovem alterações funcionais e ou anatômicas, que se tornam empecilhos ou impossibilitam a função de reservatório da bexiga. Tais alterações podem levar à redução da capacidade vesical, elevação de sua pressão e, como conseqüência, do trato urinário superior, resultando em perda de função<sup>2</sup>.

Os pacientes com baixa capacidade e complacência vesical ou com elevadas pressões de micção podem ser, inicialmente, submetidos ao tratamento clínico. Nesse caso, o cateterismo intermitente limpo associado à terapêutica farmacológica seria uma alternativa para o controle adequado da pressão, da preservação da função renal e a melhora da continência<sup>3</sup>.

No entanto, nos casos em que terapias conservadoras não são efetivas são recomendadas alternativas terapêuticas como a ampliação vesical ou derivação urinária. A ampliação vesical objetiva o desenvolvimento de um reservatório com capacidade adequada, baixa pressão de enchimento, que não promova alterações hidroeletrólíticas, apresente mínima morbidade operatória e capacidade de esvaziamento completo sem resíduos<sup>4</sup>.

A ampliação vesical tem como funções: preservar o rim, adquirir continência urinária, impedir infecções do trato urinário (ITU) e promover um esvaziamento vesical voluntário e completo. Quando esse órgão possui pouca capacidade de armazenamento em seu interior, a urina desce dos rins e fica presa, aumentando a pressão nos ureteres: canais que transportam a urina produzida nos rins para a bexiga. Portanto, quando a urina cai na bexiga e tem pouco espaço para preencher, ela fica acumulada nos ureteres e até mesmo nos rins, aumentando a pressão e causando dor. Essa pressão de urina pode causar lesões sérias e irreversíveis ao rim, originando a insuficiência renal e até mesmo sendo necessário a hemodiálise ou o transplante renal<sup>5</sup>. Logo, a cirurgia para aumento da capacidade da bexiga torna-se muito importante para os doentes que perderam a função de armazenamento adequado de urina. A cirurgia também tem a função de aumentar a auto-estima dos pacientes que possuem incontinência urinária, além da função de evitar danos maiores ao nosso corpo. Isto porque após a cirurgia, esse

paciente será capaz de conseguir segurar por maior tempo a urina e, muitas vezes, não precisará do uso de fraldas e poderá frequentar lugares que antes ele evitava como shopping ou parques. Portanto, essa cirurgia torna-se muito importante para a inclusão social. Podemos então perceber que os benefícios desse tipo de vertente cirúrgica são diversos, quando indicada para o caso específico de cada paciente pelo seu urologista <sup>5</sup>.

A enterocistoplastia, no momento, é o único método largamente utilizado na prática médica, para ampliação vesical. A primeira enterocistoplastia de aumento, ou ampliação vesical, foi realizada no homem, em 1889 por Von Mikulicz. Até a década de 80 do século XX esta cirurgia era realizada muito raramente e essencialmente no tratamento de bexigas acometidas pela tuberculose. A partir de então, esta técnica vulgarizou-se no tratamento de muitas doenças da bexiga, e para tal, contribuiu em maior conhecimento da patofisiologia (funcionamento) do aparelho urinário, para o desenvolvimento de diversas outras técnicas úteis na urologia. Nesse método, segmentos gastrointestinais como íleo, colon e estômago, podem ser utilizados, por isso, o nome enterocistoplastia de aumento pode ser utilizado também, pois “entero” provém de intestino e “cisto” de bexiga. O termo “plastia” quer dizer reconstrução. Originalmente, as ampliações vesicais eram realizadas em doentes com bexigas de pequena capacidade. Outras indicações incluem cistite intersticial, cistite pós-quimioterapia, extrofia vesical e após múltiplas cirurgias vesicais, como em crianças com malformações ao nascimento. Mais recentemente, a ampliação vesical foi introduzida no tratamento da instabilidade do músculo da bexiga (bexiga neurogênica), com o objetivo de diminuir as contrações e aumentar a capacidade de armazenamento de urina da mesma <sup>5</sup>.

Muitas são as técnicas utilizadas pelos urologistas para essa cirurgia, gerando resultados e tendo funções diferentes. Entretanto, apesar do sucesso da técnica, esta pode levar a alterações diversas. Pode-se observar, agressão ao trato gastrointestinal, devido à ressecção de segmento, podendo levar a alterações hidroeletrólíticas (acidose hiperclorêmica) bem como alterações nutricionais no paciente, abscessos, aderências peritonais, produção abundante de muco, fístula entérica, colonização bacteriana e até mesmo câncer <sup>5</sup>.

Cartwright e Snow (1989) propõem outras técnicas e procedimentos para a auto-ampliação vesical. Realizando a excisão parcial do músculo detrusor da cúpula vesical, permanecendo a mucosa vesical intacta. Esta técnica formaria uma proposta de grande divertículo, propiciando um reservatório com boa capacidade e baixa pressão <sup>2</sup>.

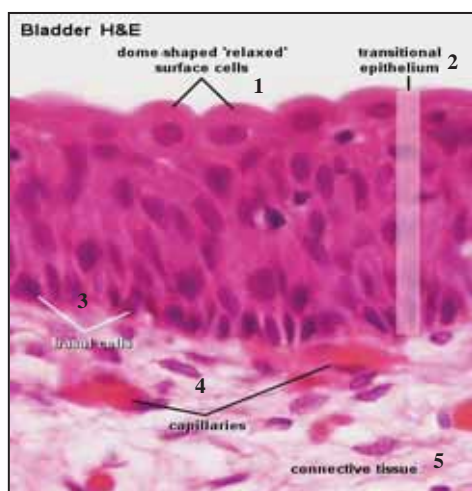
A enterocistoplastia é uma cirurgia invasiva, de grande porte. A literatura médica aponta uma mortalidade de 0 a 2%, com complicações médicas pós-operatórias em torno de

5% dos casos. Porém, o sucesso dessa cirurgia variou entre 58 a 95%, segundo questionários aplicados aos próprios pacientes submetidos a ela. Logo, podemos notar que os benefícios da ampliação vesical são muitos, sendo pequena a quantidade de complicações associadas a esse procedimento<sup>5</sup>.

## I.2 Bexiga: Embriologia, Anatomia e Histologia

A bexiga deriva do seio urogenital e do Mesênquima Esplâncnico adjacente.<sup>6</sup> Macroscopicamente, é um órgão oco o qual tem a função de servir como reservatório para a urina. No indivíduo adulto possui a capacidade de 350 a 450 ml. Quando vazia, fica localizada atrás da sínfise pubiana e é um órgão pélvico em grande parte. Quando cheia, eleva-se acima da sínfise e pode ser facilmente palpada.<sup>7</sup>

Histologicamente é composta por quatro túnicas: serosa, submucosa, mucosa e muscular. Apresenta ainda, um tecido epitelial especial, internamente: o urotélio ou epitélio de transição especializado, o qual atapeta a superfície interna da bexiga e vias urinárias, parte da uretra e reveste a pelve renal. A mucosa dos ureteres e da bexiga é constituída por uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo e epitélio de transição.<sup>8</sup> (Figuras 1,2).



Fonte: Adaptado de:  
[HTTP://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/epithelia/images/blad042he.jpg](http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/epithelia/images/blad042he.jpg)  
Acessado em 26/01/10.

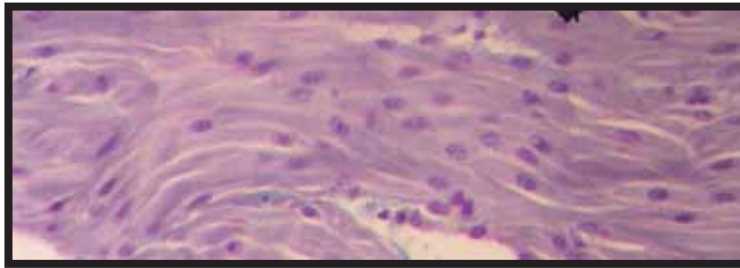
**Figura 1:** Aspecto histológico da bexiga corado com H&E. Em 1, células superficiais relaxadas. Em 2, epitélio de transição. Em 3, células basais. Em 4, capilares. Em 5, tecido de conexão.

Sob o epitélio, há uma camada submucosa bem desenvolvida formada de tecido conjuntivo e elástico. O músculo detrusor, apresenta-se externamente à submucosa, e é constituído de uma mistura de fibras musculares lisas (Figura 3) dispostas ao acaso em sentido longitudinal, espiral e circular, sem nenhuma orientação específica ou formação de camada, exceto próximo ao meato interno, onde o músculo detrusor forma camadas distintas: longitudinal interna, circular média e longitudinal externa.<sup>7</sup>



Fonte: <http://magicnumbers-parussolo.blogspot.com/2011/06/sistema-urinario.html> acesso em: 10 novembro de 2011.

Figura 2: Os diferentes epitélios que, juntos, constituem o urotélio.



Fonte: <http://bloganatomiahumana.blogspot.com> acesso em: 17 novembro de 2011.

Figura 3: Tecido muscular liso de bexiga.

### I.3 Engenharia Tecidual

A Engenharia de Tecidos (ET) é apenas um capítulo do vasto livro da Medicina Regenerativa a qual se caracteriza pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, de células, de tecidos, ou órgãos desenvolvidos em laboratório para apoiar ou substituir a função de partes do corpo defeituosas ou danificadas. Embora o cultivo de células *ex-vivo* vem sendo realizado há muitos anos, a real possibilidade de crescimento de tecidos tridimensionais complexos, reproduzindo literalmente o *design* e função desses, é um desenvolvimento considerado recente. Pesquisadores têm trabalhado por décadas no cultivo de células e tecidos fora do organismo humano para a geração de tecidos do próprio paciente em quantidade e qualidade necessárias para a terapêutica<sup>7</sup>. Desde meados da década de 80, a engenharia celular é considerada um campo de pesquisa independente com uma cooperação interdisciplinar entre os especialistas<sup>9</sup>. A ET visa o cultivo de todo tipo de tecido *ex vivo*. No caso de tecidos humanos, esta inclui o fígado, músculos, ossos, cartilagem, músculos do coração, nervos, vasos sanguíneos, ilhotas de pâncreas, e mais. Os princípios da ET englobam a retirada de um número mínimo de células do paciente, por técnica de biópsia; expansão celular em laboratório; implantação das células no biomaterial desejado, ou ainda, na presença de fatores de crescimento e diferenciação. As células que estiverem providas com as condições e sinais adequados para sua viabilidade irão secretar determinados componentes de matriz extracelular para criar, de fato, um tecido vivo que pode ser então usado como tecido substituto a ser reimplantado no sítio defeituoso do paciente<sup>10</sup>.



## I. 4 Biomaterial

O homem busca cada vez mais por melhorias na qualidade de vida com foco em possível aumento da longevidade. Esta busca instiga o desenvolvimento de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos, sejam eles vitimados por lesões, traumas ou patologias. Nesta ótica, a possibilidade de introdução de materiais sintéticos no corpo, os biomateriais, aparece como uma opção pertinente. O desafio dos biomateriais se resume fundamentalmente na necessidade de explorar e guiar interações entre tecidos vivos e materiais sintéticos visando otimizar processos tais como biofixação, bioreconhecimento e biocolonização. Os *scaffolds* biodegradáveis são utilizados na engenharia de tecidos como substratos adesivos para as células implantadas, proporcionando suporte físico e auxiliando o crescimento dessas células, constituindo um tecido organizado. Além do mais, o *scaffold* ideal deve-se apresentar biologicamente compatível às células semeadas e ter uma força biomecânica suficiente<sup>11</sup>.

O sucesso de trabalhos desenvolvidos com biomateriais não só viabiliza a fixação do dispositivo no local de implantação, mas também permite a manipulação de mecanismos intracelulares responsáveis pela reprodução celular, produção e distribuição de fatores de crescimento e de mediadores de respostas imunológicas e inflamatórias os quais são indispensáveis ao favorecimento e à regeneração do tecido anfitrião<sup>12</sup>, englobando não apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor sendo, portanto, biocompatíveis e funcionais<sup>13</sup>.

Apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos, caracteriza a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para estes fins podem ser produtos metálicos, poliméricos sintéticos ou naturais, compósitos, cerâmicas, destacando-se o colágeno purificado, as fibras protéicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados<sup>14</sup>.

Tais polímeros podem ainda ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários. Os bioestáveis são materiais utilizados na substituição, por tempo indeterminado, de um tecido lesado, devendo possuir, portanto, características mecânicas e físico-químicas compatíveis com tal função. Os materiais bioabsorvíveis são aqueles degradados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sendo, portanto, utilizados como dispositivos temporários<sup>15</sup> como é o caso da quitosana.

Na ampliação vesical, os suportes biológicos, fabricados a partir de materiais sintéticos como o plástico, foram utilizados sem sucesso. Mais recentemente, tem sido testada matriz vesical acelular em animais experimentais revelando resultados promissores, evidenciando que células autólogas combinadas com biomateriais apropriados podem fornecer, no futuro, soluções funcionais e bem-sucedidas para sérios distúrbios clínicos<sup>16</sup>.

## I. 5 Quitosana

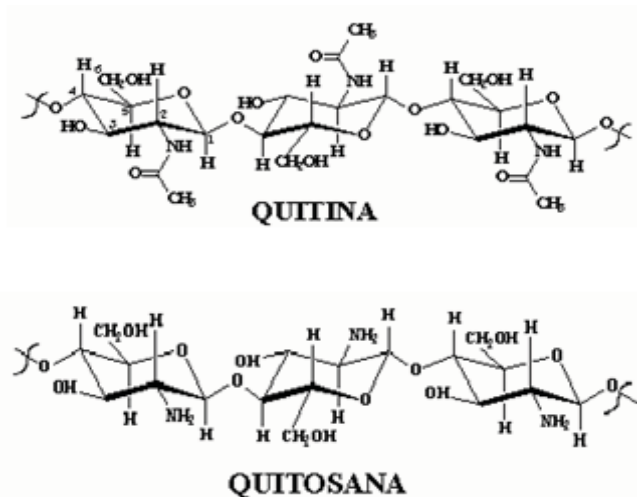
A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina, biopolímero presente nas carapaças dos crustáceos, nos exoesqueletos dos insetos e nas paredes celulares de fungos<sup>17</sup>.

Apresentam em maior proporção, na cadeia polimérica, unidades de  $\beta$  - (1-4) - 2 - desóxi - D - glicose e, um menor número de unidades de  $\beta$  - (1-4) - 2 - acetamido - 2 - desóxi - D - glicose da quitina, caracterizando-a como um copolímero composto por unidades repetidas de quitosana e quitina alternadamente<sup>18</sup>.

Depois da celulose, a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo o composto principal presente no exoesqueleto de crustáceos e insetos; sua presença ocorre também em nematóides e parede celular de fungos e leveduras<sup>19</sup>.

A quitosana pode ser obtida a partir da quitina por meio da desacetilação com ácido acético, estando naturalmente presente também em alguns fungos, como os pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*<sup>20</sup>.

De acordo com o grau médio de acetilação (GA), parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades *N*-acetil-*D*-glicosamina de quitina e quitosana, pode-se obter diversas quitosanas variando-se, assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pka e viscosidade<sup>21</sup>. A quitosana com elevado grau de desacetilação é de difícil obtenção, pois, à medida que este aumenta a possibilidade de degradação do polímero também aumenta<sup>22</sup>. A Figura 4 representa as estruturas químicas da quitina e quitosana.



Fonte:  
<http://cvmnaturplac.dnsalias.com/materias-naturais/polimeros-biodegradaveis-de-origem-natural/principais-aplicacoes-de-polimeros>- Acesso em 18/11/2011.

**Figura 4:** Estrutura química da quitina e quitosana.

O emprego de quitina e quitosana e a pesquisa por novas aplicações tem aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura e indústrias de alimentos, mas especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas<sup>23</sup>. A quitosana possui grande aplicabilidade no campo da engenharia biomédica e de biomateriais, devido à sua habilidade em acelerar a cicatrização de lesões cutâneas. Apresenta propriedades favoráveis de biocompatibilidade e bioatividade. Alguns estudos indicam propriedades antimicrobianas (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática). Seus metabólitos residuais também são atóxicos tornando-a, um material de grande potencial de aplicação na área médica-farmacêutica<sup>24</sup>.

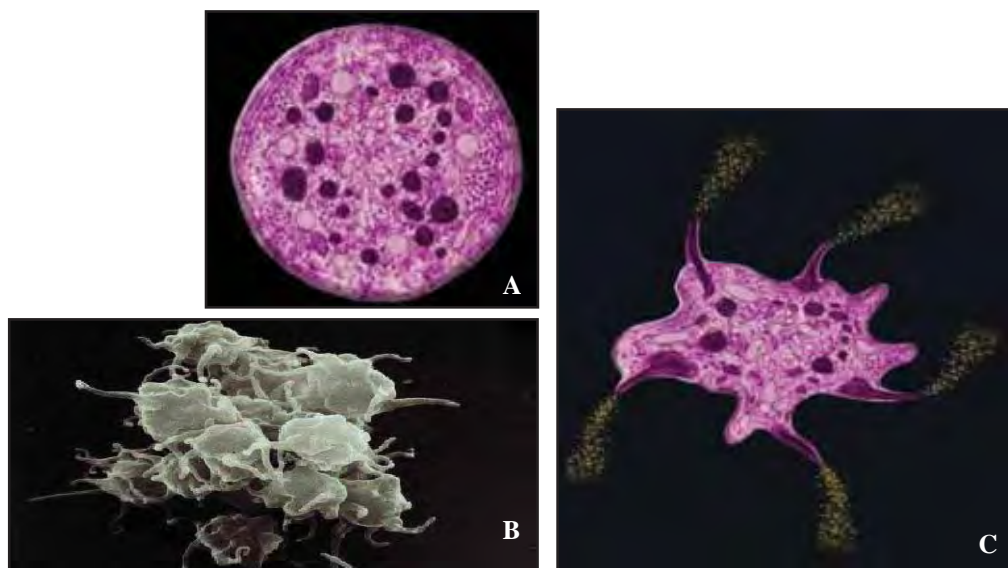
Experimentos utilizando aplicações tópicas de quitosana através de pomadas e bandagens mostraram que este biopolímero promove uma rápida cicatrização de ferimentos e abscessos infectados por *Staphylococcus*. Tais aplicações diminuíram o tempo de coagulação, que é de fundamental importância na cicatrização de ferimentos ou em procedimentos cirúrgicos<sup>25</sup>.

Contudo, mesmo com a intensa pesquisa na área de biomateriais, nota-se a existência de poucos trabalhos na literatura científica, enfocando a produção de membranas, contendo simultaneamente quitina e quitosana (assim como outros agentes ativos em sua composição). São poucas as informações detalhadas sobre as condições para a obtenção e utilização destas membranas, os fatores que influenciam nas características físicas, químicas, mecânicas e biológicas destes materiais, resultados comparativos entre as características de membranas densas e porosas bem como da padronização nos métodos de caracterização destes biomateriais. Diante da escassez destas informações, este trabalho objetiva o

interfaziamento das áreas de urologia e de engenharia de tecidos visando a aplicabilidade do biomaterial ou *scaffold* de quitosana em bexiga.

### **1.6 Fatores de Crescimento das plaquetas**

As plaquetas são fragmentos anucleados formados a partir da fragmentação de longas e finas protruções do citoplasma de megacariócitos. Possuem a forma discóide e, quando ativadas, modificam para pseudópode. No ser humano saudável, há entre 150.000 a 400.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue, agindo na hemostasia através da adesão, secreção, agregação e atividade prócoagulante e também estão envolvidas na resposta imune, na cicatrização tecidual e nas metástases por via hematogênica.<sup>26</sup> Seu diâmetro é de 1,5 a 3,0µm e o seu tempo médio de vida é de cinco dias, sendo depois desse período destruída no baço. Em seu citoplasma há inúmeras proteínas de grande relevância clínica, sendo a plaqueta dividida estruturalmente em: 1-Zona periférica, 2- Zona sol gel, 3- Zona das organelas. Possui 3 tipos de grânulos: lisossomas, grânulos densos e os grânulos α, onde se encontram os fatores ou moduladores do crescimento<sup>27,28</sup> (Figura 5).



**Figura 5:** Fonte: Roman, P.*et al.*, 2007 em Gobo-Oliveira, 2011. Em “A”, conteúdo intra-plaquetário. Em “B”, plaquetas inativas. Em “C”, ativação plaquetária ocorrida na adesão com formação de pseudópodes e liberação dos fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que estimulam a proliferação celular. Atuam como reguladores e desreguladores da atividade celular, enzimas, fatores angiogênicos e anti-angiogênicos indutores de expressão gênica, entre outras atividades, como o aumento rápido do número de células-tronco e a promoção de sua atividade durante a agressão aos tecidos. Diversos fatores de crescimento têm sido relatados como participantes do processo de reparação tecidual, incluindo o EGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta_1$  e IGF-1.<sup>29,30</sup>

A tabela a seguir evidencia alguns dos mais expressivos fatores de crescimento liberados pelas plaquetas.

**Tabela 1:** Fatores de crescimento liberados pelas plaquetas.

FATORES DE CRESCIMENTO	
<i>PDGF</i>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<i>EGF</i>	Fator de crescimento epidérmico
<i>VEGF</i>	Fator de crescimento celular endotelial vascular
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	Fator de crescimento transformador beta

Fonte: Gobo-Oliveira, M. 2011. Modificado.

Os *PDGF* atuam aumentando as quantidades de colágeno, a vascularização tecidual, promovem a proliferação de fibroblastos e estimulam produção de tecido de granulação. O

*EGF* induz o crescimento de tecido epitelial e promove também a angiogênese. O *VEGF* estimula a angiogênese, a permeabilidade vascular e a mitogênese. O *TGF-β* é uma proteína envolvida no controle e diferenciação celular apresentando três isoformas bem conhecidas: *TGF-β1*, *TGF-β2* e *TGF-β3*. Atua em processos imunes, nas fases iniciais da oncogênese, no controle da apoptose entre outras ações. É um fator estimulante da produção de fibrinogênio estimulando a quimiotaxia fibroblástica, intensificando a produção de colágeno, proteoglicanos e fibronectina. Desta forma, estabiliza os vasos recém formados pela intensificação da produção de proteínas da Matriz Extra Celular (MEC). Portanto, esses fatores de crescimento tornam a cicatrização mais rápida e eficiente, favorecendo a integração de enxertos, a reparação tecidual e auxiliando na regeneração do tecido lesionado.<sup>30, 31, 32, 33.</sup>

Roback *et al*, 2008<sup>34</sup> publicam a indicação do uso tópico de plaquetas em áreas de reconstrução cirúrgica, pois o produto estimula a angiogênese e promove reparação tecidual mais rápida. Estudos já desenvolvidos pelo Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro de Botucatu têm mantido uma linha de pesquisa com base na purificação dos hormônios derivados de plaquetas para a composição de uma matriz de gel laminar de uso tópico, a qual se evidencia o estímulo à cicatrização. Além disso, os hormônios extraídos dos grânulos plaquetários são usados na constituição de um *scaffold* tridimensional para a incorporação de células.<sup>35,36</sup>

Navarro, 2008<sup>37</sup> demonstra a relação entre a concentração de plaquetas humanas e fatores de crescimento como o *PDGF* e *VEGF*. Para concentrado de plaquetas com volume médio de 45-60 ml, concentração média de  $5,5 \times 10^{10}$  plaquetas, pH entre 6,4 e 7,4 a concentração média de *PDGF* pelo método ELISA é 100 vezes maior que o *VEGF* (*PDGF* = 35.000pg/dl e o de *VEGF* de 350pg/dl).

Levando-se em consideração as observações citadas e tendo em vista a inexistência de kits para a determinação de fatores de crescimento (*PDGF* e *VEGF*) específicos para coelhos; o já estabelecido mapeamento da homologia coelho-homem pela metodologia FISH, em trabalho publicado por Korstanje *et al.*<sup>38</sup> e o fato da aplicação do produto para o coelho ocorrer em uma única vez, não havendo exposições repetitivas, optou-se pelo uso de plaquetas humanas neste protocolo de pesquisa.

Assim, unindo-se as propriedades observadas à membrana de quitosana e aquelas inerentes aos fatores de crescimento plaquetários ou “hormônios plaquetários”, a união dos dois elementos em uma membrana potencializaria as propriedades favoráveis ao reparo tecidual vesical, justificando o uso no presente estudo.

### I.7 Vias de morte celular

O fenômeno da morte celular pode ser desencadeado por uma série de fatores ou injúrias tais como: danos de DNA, hipóxia tissular, agressão imunológica, infecciosa e tóxica, entre outros. A morte celular pode ser dividida em duas categorias: a programada, denominada fisiopatológica e a patológica (ou necrótica). A primeira é o tipo de morte onde a célula possui todo o aparato genético para a produção e/ou ativação e/ou inativação de proteínas específicas que geram uma sequência de eventos ininterruptos os quais levam a sua própria destruição. Essa pode ocorrer tanto em processos patológicos quanto em processos fisiológicos normais, sendo que pode ser dividida em três grandes grupos ou vias: morte autofágica, apoptose (dependente ou não de caspases) e outros mecanismos. A morte celular fisiopatológica do tipo autofágica (também definida como lisossomal ou “tipo II”) é sempre independente da via das caspases e caracterizada pela presença de lisossomos primários (os quais realizam a digestão de organelas e partículas intracelulares), autofagossomos e vacúolos autofágicos, nem sempre levando a morte celular.<sup>39, 40, 41, 42,46</sup> (Figura 6).

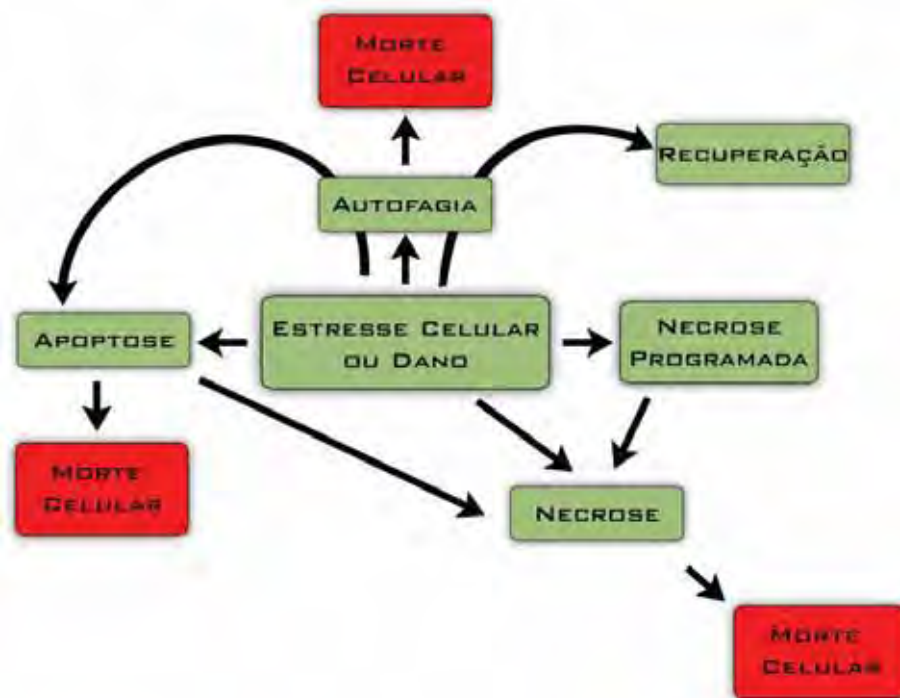


Figura 6: Mecanismos de morte celular. Adaptado de Guilherme, G. R. B.; 2009.

A apoptose é a morte celular programada que possui mudanças morfológicas típicas, tais como: fragmentação nuclear, condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina pela membrana, perda de controle iônico, encolhimento do citoplasma, perda das organelas tornando a célula picnótica e formação de corpos apoptóticos. A ativação da via das caspases (proteínas efetoras) é observada na forma clássica, podendo a apoptose ser independente ou dependente dessas vias. Ainda sim, a apoptose dependente da via das caspases pode estar relacionada a meios extrínsecos (receptor se superfície celular) ou intrínsecos, relacionados aos mecanismos respiratórios mitocondriais (despolarização da mitocôndria) ou a mecanismos ligados ao retículo endoplasmático, não gerando resposta inflamatória.<sup>39, 40, 41, 42, 43, 46</sup>

As caspases são proteases de cisteína que clivam substratos em um ponto específico, onde sempre há resíduos de ácido aspártico.<sup>47,48</sup>

Especificamente, a Caspase-3 é uma proteína de 32kDa que depois de clivada gera duas subunidades de 17kDa e 12kDa. É classificada como efetora da apoptose, ou seja, responsável pela clivagem proteolítica dos substratos-chaves para a manutenção da sobrevivência celular. Além disso, está relacionada a modulação do sistema imune durante o desenvolvimento deste<sup>47</sup>.

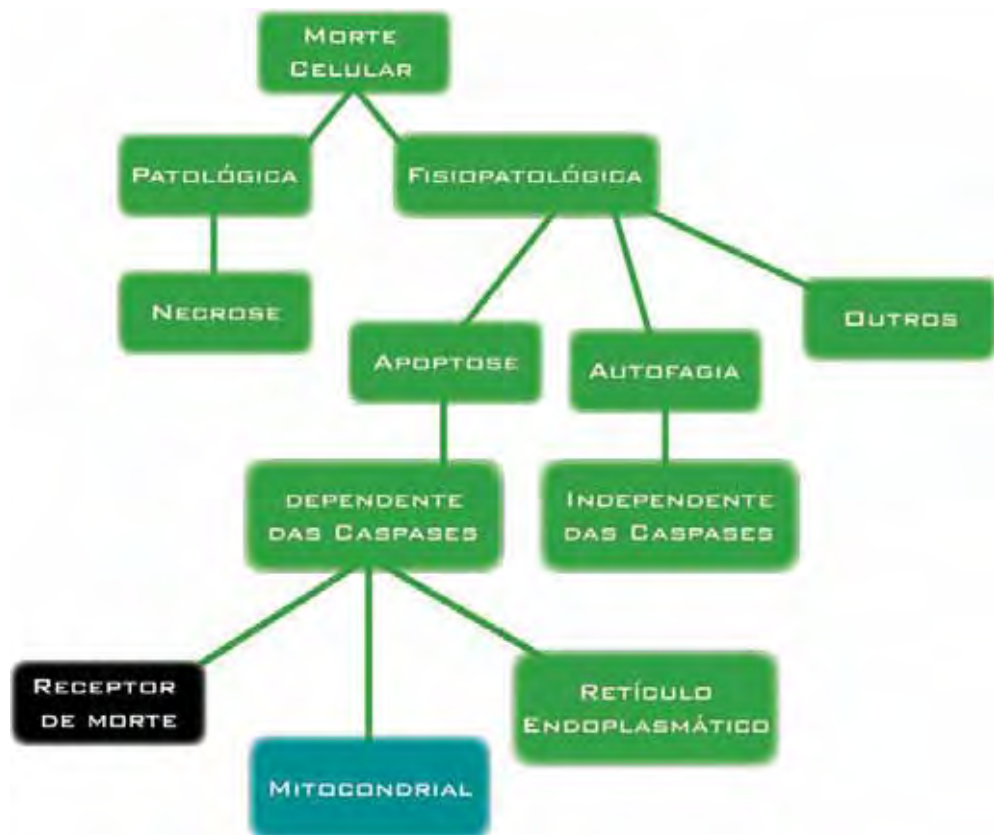
A morte celular fisiológica, ou seja, ocorrida por autofagia das células, determinada por alterações citoplasmáticas, posterior condensação da cromatina e diminuição do volume celular seguido da formação dos autofagossomos,<sup>44, 45,46</sup> pode ser medida tecnicamente de duas formas:

A primeira seria a realização de testes de viabilidade e determinação da exposição das fosfatidilserinas (proteínas intrínsecas da parede interna da membrana as quais são externalizadas quando as células apresentam-se em apoptose independente da via das Caspases)<sup>44,45,46</sup>.

A segunda seria aquela em que são realizados testes mais complexos, os quais devem evidenciar o comprometimento dos receptores de morte, do retículo endoplasmático e da via respiratória mitocondrial, no caso da apoptose dependente da via das Caspases. Tal via de



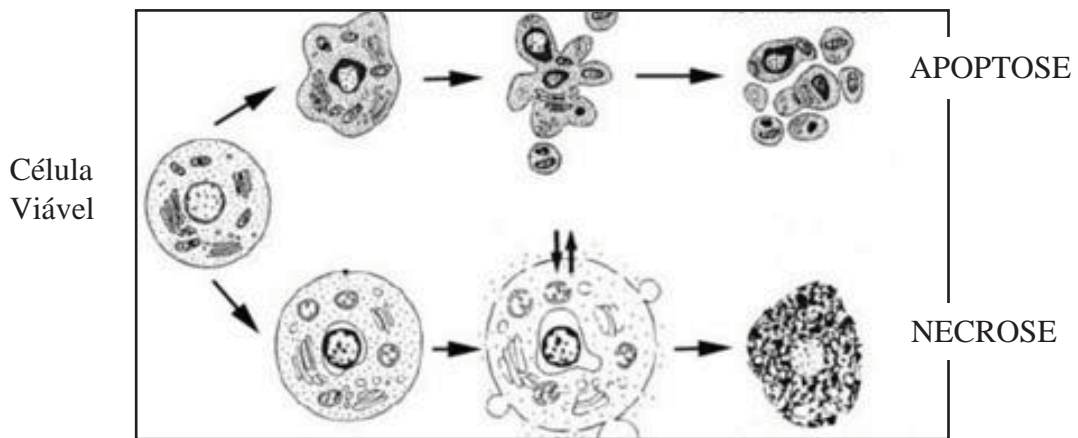
apoptose pode ser identificada por testes de citometria de fluxo medindo a Caspase-3, que é uma protease chave ativada durante o estágio inicial da apoptose.<sup>44,45,46</sup> (Figura 7).



**Figura 7:** Vias de morte celular. Adaptado de Bertanha, 2011.

O estudo da apoptose apresenta-se importante pois, tal fenômeno pode ser desencadeado por estímulos diversos, que podem estar presentes ou ausentes na cultura celular, como: toxinas, hormônios ou fatores tróficos, competição negativa entre células, etc. Assim, a análise de sua progressão pode contribuir para a devida correção da cultura, seja no que estiver em escassez ou excesso para as células.

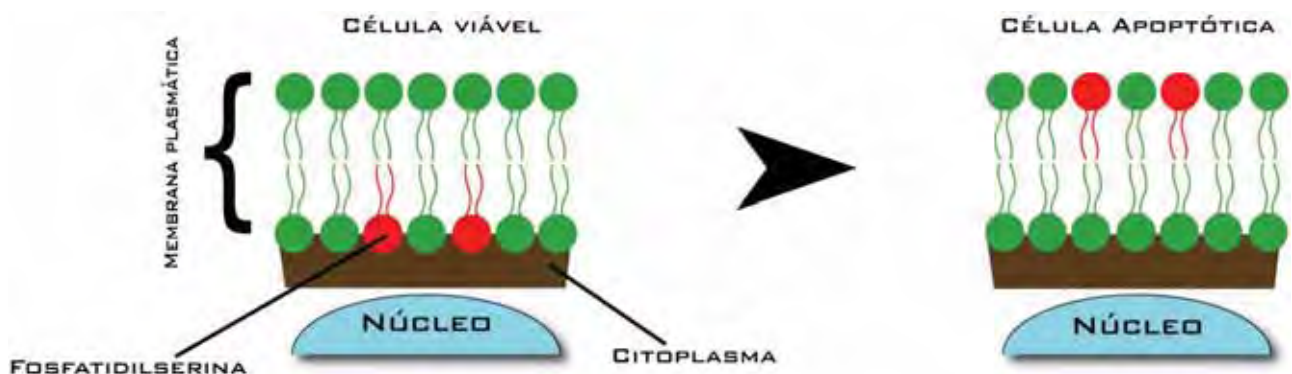
A segunda forma de morte celular, a patológica, é aquela que determina a necrose. Esta pode ser secundária à injúria celular, determinada pelos fatores citados anteriormente. (Figura 8). Tais modificações apresentam-se como parte de um programa de morte com regulação intracelular, que pode ser inibido ou ativado dependendo de estímulos, sejam esses fisiológicos ou patológicos.<sup>43,46</sup>



**Figura 8:** Fonte [www.celldeath.de](http://www.celldeath.de), acessado em 15/01/12. Esquema geral de morte celular por apoptose (linha acima: a célula perde suas organelas e torna-se progressivamente picnótica) e necrose (linha abaixo: formação de poros na membrana que permitem a entrada de líquido de forma não controlada, aumento do volume celular, destruição das organelas intracelulares, desintegração da membrana celular).

As anexinas são uma família de proteínas as quais se ligam a fosfolipídios aniônicos de superfície na presença de cálcio. Daí o significado do nome, que vem do grego, “trazer junto”. Elas possuem, ainda, uma região amino-terminal que varia de tamanho e sequência, o que se relaciona a propriedade de ligação aos diferentes substratos <sup>49,50</sup>.

As Anexinas possuem afinidade pelas fosfatidilserinas (PS), fosfolipídios que atuam como cofatores de variadas enzimas, e apresentam-se internalizadas na membrana citoplasmática. No entanto, existem casos específicos, de extrema importância, nos quais a exposição das FS ocorre, ou seja, são externalizadas. Seriam eles a ativação de pró- coagulantes e a presença de apoptose celular <sup>51</sup> (Figura 9).



**Figura 9:** Ilustração da exposição das PS. No lado esquerdo, na célula viável, a PS encontra-se na membrana citoplasmática interna. No lado direito, PS externalizadas para o lado externo da membrana, na célula em apoptose.

Assim, a exposição das PS pela membrana plasmática das células durante a apoptose, seria outra maneira de avaliar a presença ou não da indução a apoptose celular, por vias independentes da via das caspases. Partindo-se do princípio que a Anexina-V tem alta especificidade pelas PS, um dos métodos mais confiáveis para a detecção da apoptose é a utilização da ANEXINA-V com o Iodeto de Propídio (PI) (ambos apresentam-se no mesmo kit), por CF. O uso conjugado da Anexina-V e do PI distingue a apoptose de necrose <sup>45,49,50,52</sup>.

## I.8 Relevância do Tema

As preocupações a cerca da reconstrução e ampliação vesical tem crescido no decorrer dos anos. Essa afirmação é justificada pela simples análise das publicações referentes à Ampliação Vesical (*Bladder Augmentation*) e Engenharia Tecidual em Bexiga (*Bladder's Tissue Engineering*), apresentada no Pubmed. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Já os estudos relacionados à engenharia de tecidos, bexiga e Quitosana (*Tissue Engineering, Bladder and Chitosan*), apresentam escassas citações, constatando a necessidade do surgimento de um maior número de estudos sobre esse assunto especificadamente. A tabela 2 evidencia tais informações.

**Tabela 2:** Publicações sobre “Ampliação Vesical”, “Engenharia Tecidual em Bexiga” e “Engenharia Tecidual, Bexiga e Quitosana”.

Itens Buscados	Citações encontradas
<i>Bladder Augmentation</i>	1487
<i>Bladder's Tissue Engineering</i>	486
<i>Tissue Engineering, Bladder and Chitosan</i>	4

Fonte: base de dados Pubmed, outubro 2011

A procura dos mesmos itens citados anteriormente em outra base de dados, o *Scopus* (<http://www.scopus.com>) mostrou o mesmo perfil demonstrado acima: Um número significativo de estudos relacionados à “Ampliação Vesical” (*Bladder Augmentation*), uma porcentagem menor quando procurado o termo “Engenharia Tecidual em Bexiga” (*Bladder's*

*Tissue Engineering*), e a mesma escassez de citações em relação ao termo “Engenharia de Tecidos, Bexiga e Quitosana” (*Tissue Engineering, Bladder and Chitosan*). A tabela 3 evidencia as informações.

**Tabela 3:** Publicações sobre “Ampliação Vesical”, “Engenharia Tecidual em Bexiga” e “Engenharia Tecidual, Bexiga e Quitosana”.

Itens Buscados	Citações encontradas
<i>Bladder Augmentation</i>	1834
<i>Tissue Engineering Bladder</i>	771
<i>Tissue Engineering, Bladder and Chitosan</i>	6

Fonte: base de dados *Scopus*, outubro, 2011.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 17% da população economicamente ativa e até 30% da população mais idosa apresenta algum tipo de alteração vesical, sejam essas funcionais ou anatômicas<sup>53</sup>. Sendo assim, perante os dados expostos, a ET inclui-se no leque de ferramentas inovadoras disponíveis para o auxílio da resolução de problemas médicos difíceis de serem transponíveis com o uso das técnicas tradicionais. Entretanto, a existência de fatores limitantes como: a busca por estruturas tridimensionais artificiais ou homólogas as quais apresentem biocompatibilidade, ou seja, que favoreçam a adesão celular de células expandidas *in vitro*; ou que apresentem fatores de crescimento; propriedades antimicrobianas; baixos níveis de toxicidade; e que ainda assim compreendam um tempo satisfatório de produção em laboratório, evidenciam preocupações pertinentes.

## II. Objetivos

### II.1 Objetivo Geral

- ✓ Propor o interfaceamento das áreas de urologia e de Engenharia de Tecidos visando à aplicabilidade do *scaffold* de quitosana em bexiga.

### II.2 Objetivos Específicos

Quanto às técnicas de engenharia de tecidos:

- ✓ obter músculo liso da bexiga de coelhos;
- ✓ cultivar células de músculo liso de bexiga de coelho, caracterizando-as por técnicas de Citometria de Fluxo e Imunocitoquímica;

Quanto à membrana de quitosana:

- ✓ desenvolver um modelo visando aplicabilidade em bexiga;
- ✓ analisar Atividade Antimicrobiana e Antifúngica.

Quanto ao modelo de membrana celularizada:

- ✓ propor o modelo de membrana com células de músculo liso
- ✓ avaliar adesividade
- ✓ determinar a citotoxicidade quando em presença de células de músculo liso

Quanto ao modelo *in vivo*:

- ✓ piloto do implante da membrana em duas regiões anatômicas;
- ✓ realizar avaliação histomorfológica dos implantes;

### III. Material e Métodos

#### III.1 Instalações

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios da UNESP de Botucatu-Faculdade de Medicina de Botucatu: Laboratório Experimental de Cirurgia e Laboratório Experimental da Urologia, onde foram coletadas as amostras de tecido adiposo e bexiga dos animais; Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro, onde as células em estudo foram caracterizadas e analisadas, Instituto de Biociências de Botucatu: Laboratório de Química e Bioquímica, onde a primeira etapa da produção da Membrana de Quitosana foi realizada e Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), onde as demais etapas como processamento de tecidos, cultura celular e segunda etapa do preparo da membrana foram realizados. O LEC é apresentado detalhadamente a seguir:

O LEC integra a seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu tendo iniciado suas atividades em dezembro de 1992. Ao longo deste período, graças às fontes de financiamento de pesquisas vigentes no país, em especial FAPESP, CNPq, BNDES, FINEP E FNS que foram entidades de suporte à pesquisa, as atividades tiveram um vertiginoso crescimento dando hoje vazão a três diferentes linhas de atuação. Tais linhas são: a) diferenciação de células-tronco de diferentes espécies, b) obtenção de anticorpos monoclonais murinos, c) produção de curativos bioativos com foco na terapêutica humana.

Essas três linhas de pesquisa ocupam uma área correspondente a 1200m<sup>2</sup> classificados nas categorias:

✓ Laboratório convencional ou *standard* – Laboratório de Atividades Complementares (LAC) onde são desenvolvidas tais atividades: viabilidade celular, contagem celular, técnica de ELISA, preparo de tampões, eletroforese de proteínas em gel de agarose ou poliacrilamida, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, *western blotting*, imunodifusão (*ouchterlony*), imunofenotipagem, técnicas de hemaglutinação, entre outras (Figura 10).

✓ Área Limpa classificada 10.000. Essa área possui ar filtrado sob pressão positiva com filtros HEPA, apresenta vestiário específico com ducha na entrada e colocação de equipamentos de proteção individual (EPIs) de circulação interna para diferenciar de aventais de circulação convencional em corredores ou em outros laboratórios. Após a passagem pelo vestiário próprio encontra-se a área comum equipada e em funcionamento denominada de *screening* (Figura 11) que serve de ante-sala aos três laboratórios de cultura celular com ar filtrado individualizado (L1, L2 e L3). Em todos os laboratórios de cultura existem dois ambientes diferenciados: microscopia (Figura 12) seguida da área de manipulação estéril propriamente dita onde fundamentalmente encontram-se a capela de fluxo laminar Classe IIA e banho-maria além de insumos plásticos estéreis para cultura (Figura 13).

No L1 são desenvolvidas atividades relacionadas à diferenciação de células-tronco; no L2 obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais murinos e no L3 produção dos curativos bioativos.



**Figura 10:** Laboratório convencional ou *standard* (LAC).



**Figura11:** Área Limpa – *screening*



**Figura 12:** Área Limpa- Ambiente de Microscopia.



**Figura 13:** Área Limpa-Área de manipulação Estéril.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2010.

### **III.2 Animais**

Para a aplicação da ET em bexiga, foi proposta a utilização de coelhos considerando a experiência da equipe de cirurgia, *know-how* do bioterista e dimensões de tamanho médio da bexiga que permitiria menor gasto financeiro com insumos usados em cultura, acrescidos ao fato de que outras linhas de pesquisa com células-tronco são desenvolvidas pela equipe em coelhos.

Assim, o estudo foi conduzido com modelo em coelhos da raça *New Zealand*, provenientes do Biotério Central da UNESP – Campus Botucatu. Sendo que os animais utilizados apresentavam peso superior a 2,5 e inferior a 4,0 Kg. A utilização desses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, previamente estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), como consta no protocolo 868-2011.

Os animais foram mantidos no Biotério da Cirurgia Experimental em gaiolas (um por gaiola) com dimensões de 55 X 55 X 55 cm. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 20°C. Eles receberam ração normal para coelhos (Nutricoeelhos, Purina Nutrimentos Ltda.) água *ad libitum* durante todo o tempo do estudo, e foram mantidos sob os cuidados de técnicos especializados.

Os animais utilizados para a etapa de retirada das bexigas foram coelhos de experimentos dos alunos da pós - graduação, com eutanásia previamente agendada e sem complicações ou empecilhos que pudessem interferir nessa pesquisa. Desta forma, nessa etapa, nenhum animal precisou ser sacrificado exclusivamente para a pesquisa. A obtenção das bexigas foi realizada no mesmo tempo anestésico com intuito de minimizar o estresse cirúrgico dos animais. Anestesia utilizada foi Cloridrato de Ketamina 35-50mg/Kg + Cloridrato de Xilazina 5-10mg/Kg de peso vivo administrada via intramuscular.

### **III.3 Técnicas de Engenharia de Tecidos**

Esta etapa da pesquisa envolveu: obtenção da bexiga de coelho e cultivo de células de músculo liso de bexiga, caracterizando-as por técnicas de citometria de fluxo e imunocitoquímica;



### **III.3.1 Obtenção das bexigas**

A primeira etapa do trabalho consistiu na retirada da bexiga dos animais para posterior expansão das células de músculo liso desse órgão com a finalidade de se realizar testes de citotoxicidade, indução de apoptose e necrose quando em contato com a membrana de Quitosana. Para tanto, os animais foram colocados em decúbito dorsal com os membros imobilizados sendo realizada tricotomia da região abdominal e anti-sepsia com Povidine Iodine (PVPI, 10% iodo ativo, Made Care – produtos hospitalares Ltda.), utilizando-se campo oftálmico estéril para delimitar a região cirúrgica.

A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal, por meio de laparotomia mediana, com 2,5cm de extensão, que se iniciou a 2,0cm do púbis. A incisão da pele foi realizada com bisturi e o músculo reto abdominal foi divulsionado, na linha média, abrindo-se, a seguir, o peritônio. O afastamento das bordas cirúrgicas permitiu a localização intracavitária da bexiga, que, após a liberação romba de tecido adiposo, aderido em sua porção lateral e medial, foi exteriorizada pela incisão. A seguir, foi realizada a cistectomia total da bexiga. O órgão foi então lavado com solução fisiológica para retirada do excesso de urina presente, e então colocado em recipiente estéril contendo meio de cultura HEPES, específico para transporte de tecidos. O material foi levado para o LEC para devido processamento.

### **III.3.2 Isolamento das células musculares da bexiga**

A etapa levou em consideração a Engenharia Celular (EC) aplicada ao tecido vesical de coelhos. Após a remoção cirúrgica das bexigas, essas foram preservadas em 0,1M *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), pH 7,2 suplementado com 1% de Gentamicina (Merck®), ou meio HEPES (Invitrogen™) com a mesma concentração de gentamicina para preservação da integridade do tecido durante o transporte deste. A amostra foi transferida para o LEC, onde foram feitos os procedimentos para o processamento do tecido em questão e a obtenção das células do tecido muscular liso. O processamento do órgão foi feito de acordo com as normas padronizadas nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) do LEC.

Em relação ao processamento das bexigas, essas foram lavadas três vezes com solução fisiológica estéril e meio HEPES contendo 100µL de antibiótico e antimicótico (Invitrogen™) para cada 10 mL de MC.

Após essa etapa, a bexiga foi separada em dois fragmentos de mesmo tamanho para serem processadas as etapas seguintes: dissociação mecânica e enzimática.

- **Dissociação Mecânica das células do Músculo Liso**

A dissociação mecânica foi realizada com o auxílio de uma ferramenta de trabalho denominada *cell scraper* (Figura 14). Atuando como uma forma de apoio em uma das mãos e realizando uma espécie de varredura das células na outra, o *cell scraper* é responsável pela remoção das células do tecido de forma mecânica. Em seguida, o conteúdo celular despreendido foi aspirado com o auxílio de uma seringa e colocado em tubo Falcon BD® para centrifugação. Centrifugou-se o conteúdo a 1200rpm por 10 minutos, obtendo-se um *pellet* de células (conjunto de células sedimentadas no fundo do tubo). (Figura 15). O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* homogeneizado em 1mL do meio de cultura DMEM F12 (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium*) Invitrogen™. Retirou-se alíquota de 30µL do *pellet* para realizar viabilidade e contagem celular em câmara de Neubauer. O restante do conteúdo celular presente no tubo foi semeado em cultura e as células foram mantidas em estufa de 37°C em uma atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar.



**Figura 14:** Dissociação Mecânica da bexiga com *cell scraper*.



**Figura 15:** *Pellet* de células da bexiga retiradas por dissociação mecânica.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2010

- **Dissociação Enzimática**

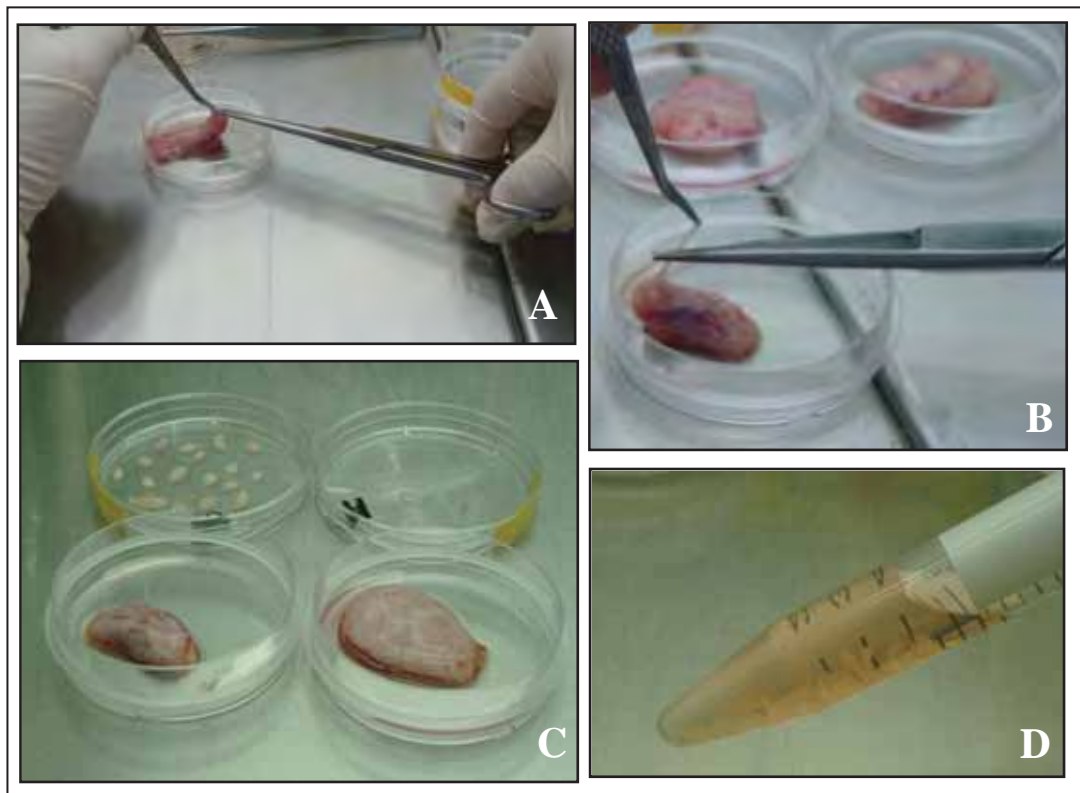
A dissociação enzimática é a técnica mais utilizada internacionalmente. Tem a finalidade de extrair células de um determinado tecido, com auxílio de uma solução de enzimas específica. No caso, foi utilizada a Colagenase<sup>®</sup> tipo II - Gibco<sup>®</sup> (Figura 16), que realizou um debridamento químico decompondo as fibras de colágeno que sustentam o tecido, deixando as células em exposição<sup>55</sup>.

Com o auxílio de pinça e tesoura estéreis foi realizada a retirada de pequenos fragmentos da camada superficial da bexiga. O material foi pesado e colocado em solução de meio HEPES e Colagenase<sup>®</sup> em tubo Falcon BD<sup>®</sup> (Figura 17). A proporção usada entre peso do tecido; HEPES e enzima foi de 1: 2: 4, respectivamente em gramas, mL e mg. Após a adição do tecido à solução contendo a enzima, todo o conteúdo foi mantido em estufa de 37°C em uma atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar, por 15 horas para a devida ação do produto.



Fonte:  
<http://www.biodee.net/ProductDetail>  
acesso em 13 novembro 2011.

**Figura 16:** Enzima Colagenase<sup>®</sup>.



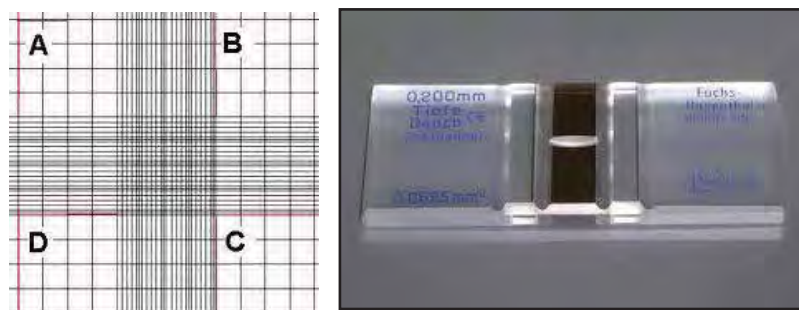
**Figura17:** Etapas da dissociação enzimática: Em “A e B”, obtenção de tecido muscular liso. Em “C”, bexiga íntegra e fragmentos a serem trabalhados. Em “D”, fragmentos em meio de cultura.  
Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

Decorridas 15 horas de atuação enzimática, essa foi desativada com a deposição de meio de cultura contendo Soro Fetal Bovino (SFB). O material contendo SFB foi centrifugado novamente a 1200rpm por 10 minutos para a remoção da enzima por completo. O conteúdo celular ao fundo do tubo foi homogeneizado em um 1 mL de meio de cultura e alíquota de 30  $\mu$ L retirada para contagem e viabilidade celular em câmara de Neubauer.

### III.3.3 Contagem celular

A contagem de determinado conteúdo celular em câmara de Neubauer, (Figuras 18 e 19) objetiva verificar a viabilidade celular e o número estimado de células/mL de meio de cultura (MC), para então se semear em cultura as mesmas em frascos de 25 ou 75  $\text{cm}^2$  de superfície (Nunc®), dando seguimento à expansão da cultura de células em estudo. O MC utilizado no

presente estudo foi DMEM F12, suplementado com aminoácidos essenciais (Invitrogen™), aminoácidos não essenciais (Invitrogen™), antibiótico / antimicótico (Invitrogen™) e SFB (Invitrogen™)<sup>35</sup>.

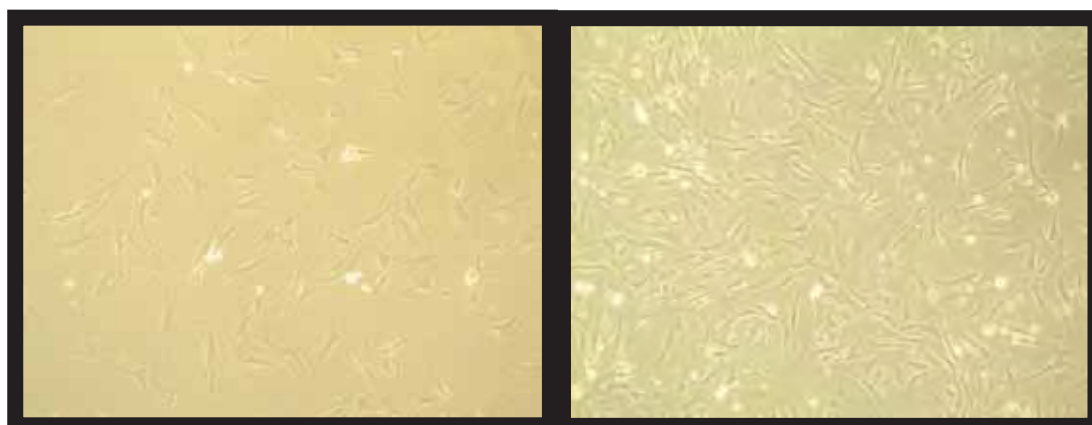


Fonte:  
<http://www.molecularlab.it>  
acesso em 19 dezembro  
2011

**Figuras 18 e 19:** Quadrantes da câmara e câmara de Neubauer.

### III.3.4 Cultura Celular

As células permaneceram na Área Limpa em estufa a 37°C, atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar (Thermo Class 100<sup>®</sup>) (Figuras 20 e 21). No monitoramento por microscopia invertida (microscópio Axiovert 200<sup>®</sup>, Zeiss™), ao apresentar confluência de 80 a 100%, as células foram destacadas dos frascos de cultura com 0,25% da enzima tripsina/1mm de EDTA (Invitrogen™). Após tripsinização foi realizada contagem em câmara de Neubauer e viabilidade celular. As células foram colocadas novamente em cultura em frascos de 75cm<sup>2</sup>(Nunc®). Quando necessário, após a terceira passagem em tripsina as células foram crio preservadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) (LGC Biotecnology™) 10% SFB, e colocadas em nitrogênio líquido a -196°C<sup>35</sup>.



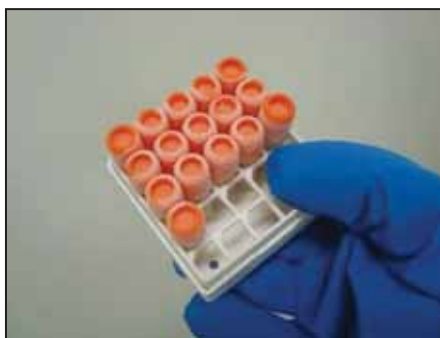
**Figuras 20 e 21:** Na primeira, células de músculo liso em início de adesão. Aumento de 100x. Na segunda, células de músculo liso em confluência de 80%. Aumento de 100x. Ambas em contraste de fase ph1.

Fotos: Arquivo pessoal 2011

### III.3.5 Criopreservação do Tecido

A Criopreservação é um processo de congelamento de células ou tecidos biológicos a temperaturas muito baixas para manter a integridade destes. Células em cultura, mantidas por longos períodos, podem apresentar alterações morfológicas e funcionais. Devidamente congeladas, as células podem ser preservadas por períodos maiores sem alteração em suas características e em sua viabilidade. O banco de células é uma espécie de estoque que contém células idênticas criopreservadas de uma mesma cultura original, que garante que o Laboratório tenha uma reserva reprodutível de células. Além disso, um estoque de células garante a minimização dos riscos de se perder uma cultura por acidentes como contaminações microbianas, ou possíveis falhas em equipamentos essenciais em cultura celular como as incubadoras de CO<sub>2</sub>. As células a serem congeladas devem estar livres de contaminação e com viabilidade acima de 90%. As condições ótimas de criopreservação diferem para cada tipo de linhagem celular e estas, devem ser tratadas com um agente crioprotetor para suportarem o processo de congelamento e descongelamento. O agente crioprotetor utilizado foi o DMSO (LGC Biotecnology™), o qual age na permeabilidade da membrana plasmática, permitindo que a água saia do interior das células à medida que ocorre o resfriamento. Assim, este impede que os cristais de gelo formados em baixas temperaturas rompam a membrana celular e levem as células à morte<sup>55</sup>.

No caso das células de músculo liso, após a dissociação mecânica e/ou enzimática da parede externa da bexiga, as células foram lavadas com meio HEPES e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos. Houve então a formação do *pellet* no fundo do tubo. Em seguida, as células foram ressuspensas em SFB adicionado de 10% DMSO (v/v). A amostra foi homogeneizada, transferida para criotubo, devidamente identificado, e rapidamente armazenada à -80°C. Após sete dias no freezer à -80°C as ampolas contendo as células foram transferidas para *containers* de nitrogênio líquido. Assim, as ampolas congeladas foram registradas no Banco de Células do LEC para posterior utilização nas demais etapas do trabalho.(Figura 22)



**Figura 22:** Ampolas na caixa (gaveta) de criopreservação. Compõem o Banco de Células presente no LEC.

Foto: Arquivo Pessoal 2010

### **III.3.6 Caracterização por citometria de fluxo**

A CF consiste numa técnica que avalia as características físico-químicas das células, individualmente, as quais são submetidas à passagem por um sistema fluido, sendo detectadas por sensores eletrônicos e ópticos. A caracterização das células foi realizada após a terceira passagem em cultura, sendo usado o anticorpo Anti-CD90(anti-rat cross reacting with rabbit) Biolegend®. A ausência no mercado de anticorpos específicos para o reconhecimento dos antígenos existentes nas células de coelhos, demandou a utilização de tal anticorpo. No entanto, o fabricante alega a reação cruzada com células de coelho.

### **III.3.7 Caracterização por Imunocitoquímica**

Etapa realizada no Departamento de Patologia da FMB. A imunocitoquímica (ICQ) foi feita em células após terceira passagem em cultura, utilizando os anticorpos “HHF 35” , “1 A 4” e. O protocolo utilizado para a realização da técnica de ICQ envolveu a recuperação antigênica com solução *Trilogy (Cell Marque 920P)* pelo método de calor em banho-maria por 20 minutos. Após este procedimento uma incubação com anticorpos primários (*Anti-Human Muscle Actin, clone HHF35 – Dako – M0635 e Alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Antibody Sigma™*) para a confirmação do fenótipo célula de músculo liso por 18 horas em geladeira à 4°C, foi realizada. Posteriormente, nova incubação com anticorpo secundário (*Anti-Mouse*) e terciário (Amplificador). Utilizou-se kit de detecção por polímeros Hedef (*Cell Marque 954D*) por 10 minutos cada um, e posterior revelação com cromógeno 3,3-diaminobenzidina (*Spring BGDAB-999*). A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina. Células tronco mesenquimais, isoladas de tecido adiposo de coelhos foram utilizadas como controle negativo.

### III.4 Membrana de Quitosana

#### III.4.1 Preparo da Quitosana: parte I

A primeira dentre as duas partes da etapa de produção da Membrana de Quitosana foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica do IBB. Foi utilizada Quitosana comercial da marca Sigma - Aldrich<sup>®</sup> - *Chitosan from shrimp shells, practical grade* com 50 KDa de peso molecular. (Figura 23)



**Figura 23:** Quitosana comercial - *Chitosan from shrimp shells, practical grade*.

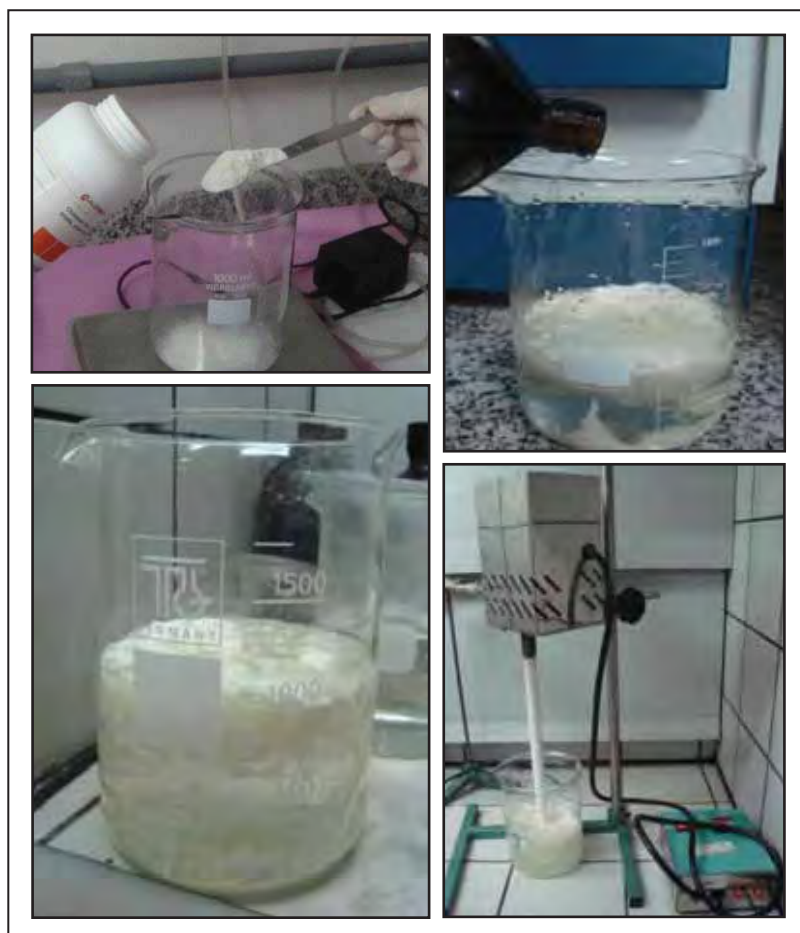
**Foto:** Arquivo Pessoal 2011

A produção da Quitosana consistiu na desacetilação da mesma pela adição de ácido acético em diferentes concentrações de acordo com o grau de desacetilação (GD) desejado, variando assim suas propriedades físico-químicas: viscosidade, dureza<sup>56</sup>. A viscosidade, solubilidade, elasticidade e resistência ao rasgo, são dependentes do peso molecular (PM) do polímero em questão<sup>57</sup>, podendo este variar de 50 a 2000 kDa<sup>58</sup>. Segundo Khan, 2001 é mostrado que a cristalinidade da membrana aumentou com a diminuição no PM de Quitosana, sendo também demonstrado que, quanto menor o PM, maior a pureza do polímero e menor o potencial alergênico do composto<sup>59</sup>.

Após a adição do ácido, com o auxílio de um aparelho misturador a 180rpm a Quitosana foi diluída, ao longo de 24h ininterruptamente. Decorrida a primeira fase do preparo a Quitosana apresentou aspecto viscoso e foi mantida em geladeira à temperatura de



15°C. As preparações dopadas foram mantidas em geladeira a 4°C. A figura 24 exemplifica a etapa I da produção.

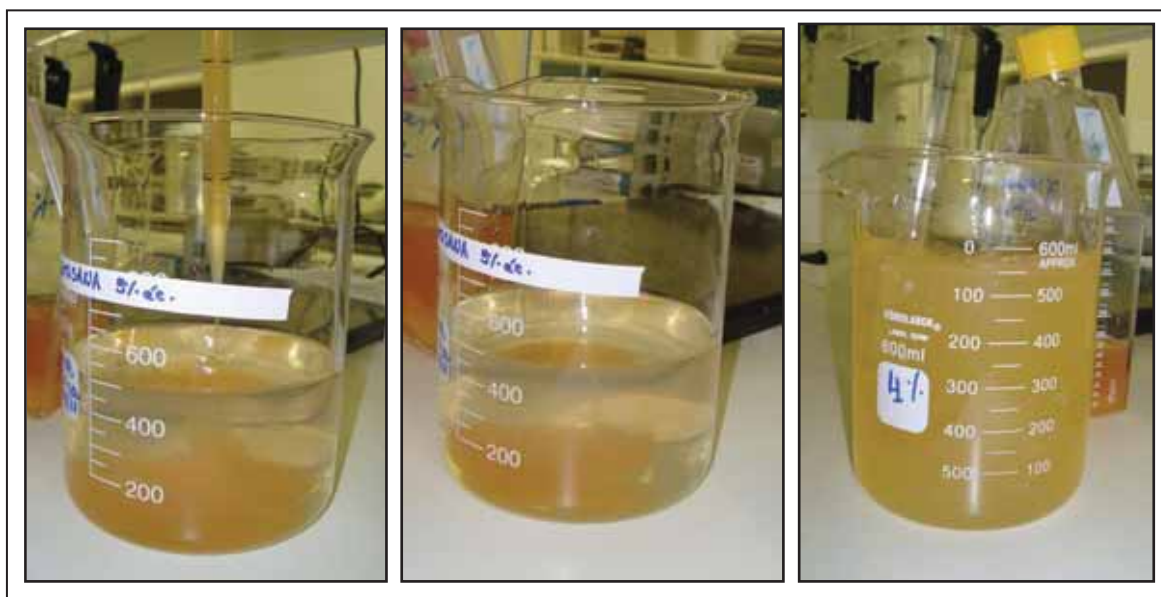


**Figura 24:** Etapas do preparo da membrana de Quitosana – Departamento de Química e Bioquímica IBB UNESP.

Fotos: Arquivo Pessoal 2011

No presente trabalho foram produzidos dois grupos subdivididos em seis subgrupos distintos designados de “A” a “F” de acordo com os interesses em termos de concentração e posterior aplicação cirúrgica da membrana. Os subgrupos A, B e C apresentaram as membranas “puras”, ou seja, sem adição de fatores de crescimento ou hormônios plaquetários, sendo que em A e B, 15g de Quitosana em pó foi diluída em 1L de ácido acético a 3% e 4% respectivamente; e no grupo C, de maior concentração de Quitosana, 20g de pó foram diluídos em ácido acético a 4%.

Nos grupos D, E e F além da Quitosana diluída da mesma maneira que nos grupos A, B e C, foi acrescentado a esses hormônio plaquetário na quantidade de 10% do volume total de Quitosana de cada grupo (Figura 25), o que corresponde a 58.333,33pg/dl de PDGF e 583,33pg/dl de VEGF. As membranas tratadas com hormônios plaquetários foram denominadas de membranas “dopadas”.



**Figura 25:** Quitosana líquida acrescida de hormônio plaquetário.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2011

A concentração de Quitosana utilizada foi estabelecida com a finalidade de se estudar sua possível ação antimicrobiana, sua toxicidade (indução de apoptose e necrose celular) e sua morfologia. Assim, foram utilizadas duas concentrações, sendo uma menor e uma maior para verificar se o aumento da concentração de Quitosana influenciaria o resultado dos testes mencionados. Os diferentes grupos estão listados na tabela 4.

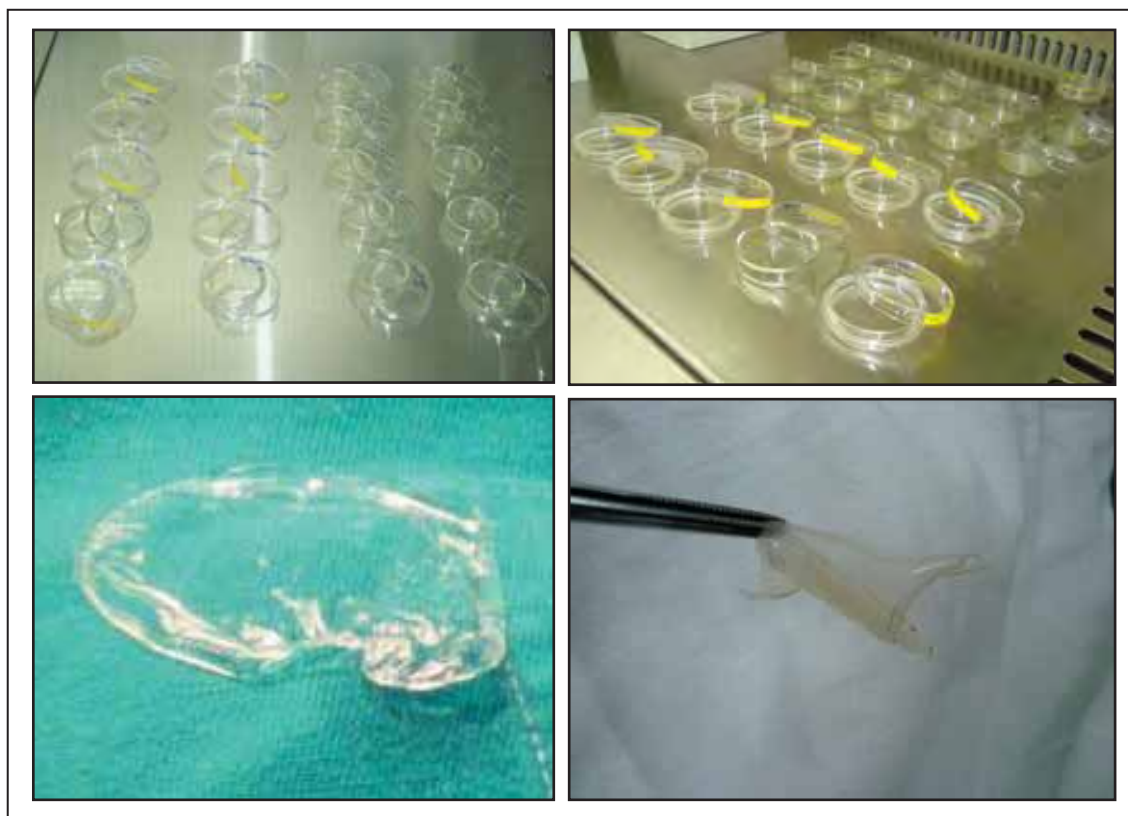
Grupo	Nomenclatura utilizada	Concentração de Ácido Acético usada	Quantidade de Quitosana em gramas	Quantidade de Ácido em Litros	Concentração Final
A	Quitosana 3%	3%	15	1L	3% em massa
B	Quitosana 4%	4%	15	1L	4% em massa
C	Quitosana 4% com maior concentração	4%	20	1L	4% em massa
D	Dopada 3% Quitosana	3%	15	1L	3% em massa
E	Dopada 4% Quitosana	4%	15	1L	4% em massa
F	Dopada 4% Quitosana com maior concentração	4%	20	1L	4% em massa

**Tabela 4:** Grupos estudados e suas características.

#### III.4.1.2 Preparo da Quitosana: parte II

A segunda parte do preparo da membrana de Quitosana foi realizada no LEC. Em capela de fluxo laminar, a Quitosana ainda líquida foi colocada em placas de Petri de vidro para secagem. Em temperatura ambiente há uma mudança conformacional do polímero, o qual devido à perda da umidade se solidifica. A evaporação de uma solução de Quitosana espalhada sobre uma placa de vidro é a técnica mais simples para a preparação de filmes de Quitosana e, geralmente, produz um filme flexível e resistente, sem acarretar nenhum custo adicional à sua produção<sup>60</sup>. No entanto, o procedimento só se complementa, ao adicionar sobre as membranas, já secas, uma solução de Hidróxido de Sódio (Na OH) 0,5N. O Na OH

nessa concentração é utilizado para neutralizar o excesso de ácido acético da membrana, deixando seu pH próximo de 7,0, garantindo assim uma certa plasticidade à mesma, tornando-a maleável. Além do mais, a adição do Na OH é realizada com a finalidade de se controlar a porosidade do polímero, sendo as membranas consideradas “densas” quando em contato por 24h com a solução e “porosas” quando a exposição limita-se a 48h<sup>61</sup>. (Figura 26).



**Figura 26:** Em cima, membranas em fase de secagem e adição de Na OH. Embaixo, membrana pronta para uso.

Fotos: Arquivo Pessoal 2011

### III.4.2 Analisar atividade antimicrobiana e antifúngica

A análise da atividade antimicrobiana e antifúngica foi realizada após procedimentos de esterilização da membrana seca.

- **Esterilização das Membranas de Quitosana**

O processo de esterilização deve ter capacidade de inativar uma ampla variedade de microorganismos, incluindo os esporos bacterianos resistentes. A esterilização se diferencia da desinfecção por ser capaz de destruir todas as formas de microorganismos. Tratando-se de seres vivos, todos os instrumentos e objetos que penetram nos tecidos ou vasos sanguíneos, ou que entram em contato com as mucosas, membranas ou feridas, devem ser esterilizados<sup>62</sup>.

O método escolhido para tal foi o Sistema *Sterrad*<sup>®</sup> de Esterilização (Figura 27), o qual age a baixas temperaturas, (excluindo a hipótese de derretimento da membrana como no caso de autoclaves convencionais) utilizando vapor de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sem deixar resíduos tóxicos. O  $H_2O_2$  é bactericida, viruscida, tuberculiscida, esporocida e fungicida. Age por meio da produção de radicais livres que lesam membranas lipídicas, DNA e outros componentes celulares essenciais<sup>63</sup>.



**Figura 27:** Membranas esterilizadas pelo sistema *Sterrad*<sup>®</sup>.  
Foto: Arquivo Pessoal, 2011

- **Atividade antimicrobiana da membrana**

Com o intuito de avaliar as propriedades inerentes à membrana, propôs-se a realização de ensaios antimicrobianos e antifúngicos. A hipótese do comportamento da membrana retrata que o grupo aminocatiônico da Quitosana age sobre os grupos aniônicos dos fungos e bactérias, causando a inibição do crescimento.<sup>64</sup> O ensaio antimicrobiano foi realizado no Hospital Estadual de Bauru – Dr. Arnaldo Prado Curvêllo. Foram realizados dois tipos de testes sendo o primeiro feito em condições estéreis e o segundo em exposição ambiental.

- ❖ **Teste realizado em capela de fluxo laminar classe IIA**

Foram utilizadas membranas provenientes de cada um dos seis subgrupos elencados. As cepas utilizadas em ambos os testes foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, (cepas consideradas mais comuns em infecções hospitalares, de corrente sanguínea, pele, e dispositivos). Os controles negativos demonstraram crescimento de 100.000 unidades formadoras de colônias para *S. aureus*. Na amostra contendo a cepa *P. aeruginosa* não houve crescimento.

As membranas foram transferidas para placas de Petri estéreis, sendo utilizada uma placa para cada membrana. Para a verificação de contaminação bacteriana foi utilizado um inóculo de cada bactéria de 0,01mL colocado sobre cada membrana, com a quantidade estimada de  $10^6$  bactérias nesse volume.

O tempo de exposição à bactéria foi de 60 minutos em estufa a 37°C. Após esse tempo, foi colocada salina estéril em cada placa com auxílio de uma seringa e agulha para lavar as membranas, na sequência essa salina foi recuperada e semeada em meio Agar sangue. As placas foram deixadas em estufa a 37°C por 24 horas e após esse tempo foi feita a verificação de crescimento e posterior contagem de colônias.

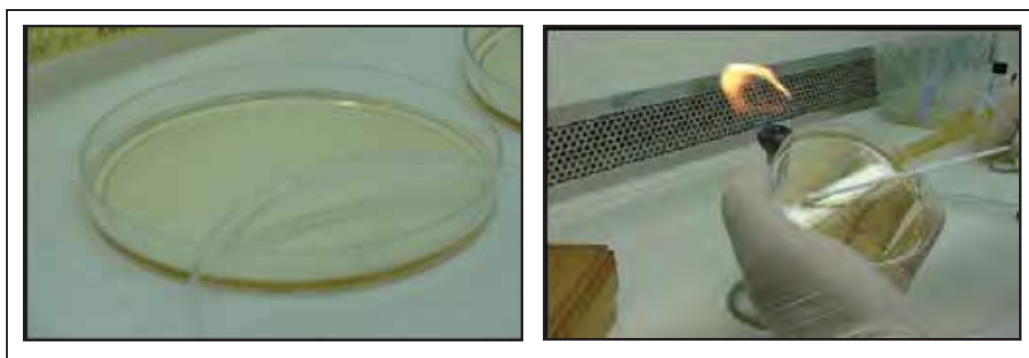
- ❖ **Teste de exposição ambiental**

Para o teste de exposição ambiental, procedimento semelhante foi realizado, sendo que as placas com as membranas foram deixadas à temperatura ambiente sobre a bancada por 60 minutos. Após esse tempo os procedimentos foram iguais ao descrito no teste realizado em capela de fluxo laminar classe IIA.

- **Atividade Antifúngica da membrana**

A avaliação antifúngica da membrana foi realizada no Departamento de Microbiologia do IBB. <sup>65</sup> O microrganismo utilizado foi Levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e o método usado foi o Método Agar Difusão para *C. albicans*.

O meio de cultura foi o Agar Saboraud (Difco<sup>TM</sup>), preparado com 6,5g do meio para 100–mL de água destilada, autoclavados a 120°C por 15 minutos. O meio líquido foi distribuído em placas de Petri (20 mL por placa de 90x15mm) esterilizadas, incubadas em estufa a 37°C por 24h. Os microrganismos (*C.albicans*) foram repicados em meio Ágar BHI (Brain Heart Infusion, Difco<sup>tm</sup>) caldo 20% glicerol, armazenados em estufa a 37° C por 24h formando uma suspensão. *Swabs* estéreis foram mergulhados na suspensão de *C. albicans* e semeados em cultura sobre o meio. Em seguida foram colocadas três amostras de Quitosana. As placas foram colocadas em estufa bacteriológica à temperatura de 37°C por 48 horas, a fim de observar o crescimento dos microrganismos (Figura 28).



**Figura 28:** Na esquerda, meio Agar Saboraud em placa de Petri. Na direita, “semear em cultura” de *C. albicans* sobre o meio de cultura.

Fotos: Arquivo pessoal, Alvarado 2011

### III.5 Modelo de membrana celularizada

Após a confirmação de que as membranas se encontravam devidamente esterilizadas, as mesmas foram colocadas uma a uma, em condições estéreis com manipulação em capela de fluxo laminar em placas plásticas de seis poços, com posterior adição de MC DMEM F12. Os protocolos referentes ao ensaio de adesão sobre a membrana e análises de citotoxicidade pelo método de CF são descritos a seguir.

#### II.5.1 Ensaio de Adesão e Marcação Celular ao *Scaffold* – Imunofluorescência

Com a finalidade de demonstrar a adesão celular ao *scaffold*, um teste de marcação e adesão das células de músculo liso à membrana foi realizado.

A proposta de adesão foi feita utilizando duas técnicas, sendo uma contendo um artifício promotor da adesão e a outra sem nenhum artifício externo promotor da adesão das células, a título de comparação. O artifício promotor da adesão usado foi o Puramatrix Peptide Hydrogel BD<sup>®</sup>, uma matriz sintética comercializada a qual, gelificada, tem a finalidade de criar microambientes tridimensionais definidos para uma variedade de experimentos com culturas celulares de diferentes linhagens<sup>66</sup>. O protocolo utilizado, descrito por Bertanha (2011)<sup>67</sup>, foi modificado e adaptado ao presente estudo.

Utilizou-se uma amostra de células sendo procedida a contagem das células viáveis com uso de *Trypan blue*<sup>™</sup> em câmara de Neubauer, seguido de centrifugação à 1200rpm por 10 minutos para remoção do MC DMEM F12 e obtenção do botão celular (*pellet*). As células foram marcadas com o marcador fluorescente *Qtracker*<sup>™</sup> *Cell Labeling Kits* - Invitrogen<sup>™</sup> conforme instruções do fabricante. Foi homogeneizando 1µL do componente A + 1µL do componente B seguido de incubação por 5 minutos. Após este procedimento foi adicionado 200µL de MC e homogeneizado no agitador tipo Vortex por 30 segundos. Sobre o volume de 200µL da solução A+B foram colocadas  $1 \times 10^5$  células de músculo liso e incubado à 37°C por 45 a 60 minutos. Foi acrescentado 1 mL de MC e centrifugado por duas vezes a 1200rpm durante 10 minutos.

- Ensaio com artifício promotor da adesão

Após o protocolo mencionado acima, o MC celular foi removido e o *pellet* de células homogeneizado com 10µL de solução de sacarose 10% (preparada no protocolo Puramatrix<sup>®</sup> conforme especificações do fabricante – BD Puramatrix Peptide Hydrogel). Foi acrescentada



sempre a mesma quantidade em volume da solução de Puramatrix® acrescida de sacarose, para então adicionar MC que é o promotor da gelificação do Puramatrix® já contendo as células. Após aspiração de 20µL da solução preparada,  $1 \times 10^5$  células de músculo liso foram depositadas sobre os *scaffolds*, de forma circular. O conjunto foi mantido em repouso durante duas horas em estufa para facilitação da adesão, com posterior adição de MC.

- Ensaio sem artifício promotor da adesão.

Após a realização do procedimento padrão, o MC celular foi removido e o *pellet* de células homogeneizado em 1 mL de MC. As células foram então depositadas gentilmente sobre o *scaffold* e deixadas em estufa por duas horas. Decorrido o tempo previsto, julgado necessário para a facilitação do processo de adesão celular ao biomaterial em questão, foi adicionado MC. Ambos os experimentos foram mantidos em cultura por 72h para a efetivação do processo de adesão celular.

Após o tempo previsto, as membranas contendo células de músculo liso marcadas, complementadas ou não com Puramatrix® foram transportadas *in natura* para o Departamento de Patologia da FMB para a realização da técnica de congelamento seguida de cortes histológicos e análise da imunofluorescência.

### **III.5.2 Testes de toxicidade residual dos *scaffolds*: Caspase-3 e Anexina-V/Iodeto de Propídio**

Para a realização do teste de toxicidade residual da membrana de Quitosana, foi proposto protocolo segundo Bertanha, (2011)<sup>67</sup>, no qual as células, previamente expandidas em laboratório, se apresentassem em contato físico direto com o *scaffold* utilizado.

- Caspase-3

Adaptando-se o protocolo citado foi avaliada a possível indução a apoptose celular que os *scaffolds* de Quitosana poderiam provocar nas células de músculo liso, quando expostas a eles. Tal método foi realizado com o kit Caspase-3 (*PE- Conjugated Monoclonal Active Caspase - 3 Antibody Apoptosis Kit-BD Pharmingen™*) para Citometria de Fluxo (CF).

Para o teste utilizou-se uma cultura de células de músculo liso de bexiga, previamente expandida em cultura, que foi submetida ao tratamento com tripsina-EDTA LGC® para destacar do fundo do frasco de cultura e proceder à contagem e viabilidade celular.

Alíquotas de  $1 \times 10^6$  células foram separadas para aplicação em seis poços de placa não aderente (Nunc<sup>®</sup>) contendo as membranas produzidas por dois diferentes métodos: Membrana de Quitosana pura 4% (de maior concentração) e Membrana de Quitosana pura 4% acrescida de solução de glutaraldeído a 0,25%. Segundo a literatura, o glutaraldeído seria responsável pela promoção de uma maior densidade e resistência do polímero, sendo por isso utilizado<sup>68</sup>.

O grupo controle foi colocado em três poços, constituindo-se apenas das células de músculo liso, sem nenhum tipo de membrana.

De acordo com os POPs, os conjuntos foram mantidos em cultura por 48h, a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> a fim de garantir o contato e adesão celular ao *scaffold*. Após esse tempo, as células foram retiradas da membrana por dissociação mecânica com auxílio da ferramenta *Cell Scrapper* Nunc<sup>®</sup>. Nesta etapa foram realizados os procedimentos de:

- ✓ Viabilidade celular com corante *Tripán Blue* Invitrogen<sup>™</sup>;
- ✓ Determinação do Índice de Apoptose mediada pela Caspase-3, por CF, utilizando equipamento *FacsCalibur* BD<sup>™</sup>.

Para a determinação da viabilidade celular, foi colocado na presença de 30µL de *Tripán Blue* a 0,4%, 30µL de uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL. O conjunto foi aspirado e depositado gentilmente sobre câmara de Neubauer procedendo-se a contagem das células vivas e mortas.

Para a determinação da marcação intracelular com anti-Caspase-3 por CF, incubou-se  $1 \times 10^6$  células com a solução permeabilização, disponível no kit apresentado pelo fabricante, por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram lavadas em solução de Isoton<sup>®</sup> BD e uma nova incubação foi realizada com 20µL de anticorpo monoclonal anti-caspase-3 na presença de 100µL de solução de permeabilização, por 45 minutos no escuro. As células foram suspensas em solução de Isoton<sup>®</sup> BD e encaminhadas para leitura em Citômetro de Fluxo. Os protocolos foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes do Kit. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento FACsCalibur da BD<sup>®</sup> e a reação analisada com auxílio do software Cell Quest<sup>™</sup> da BD.

- Anexina V

Tendo em vista que o mecanismo de morte celular fisiopatológico pode ser desencadeado dependentemente ou não da Via das Caspases, sugeriu-se estudar uma possível indução a apoptose das células em contato com as membranas por uma técnica distinta.

Assim, num segundo momento, a possível indução a apoptose celular foi avaliada pela utilização do kit Anexina-V(BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit) para CF.

Utilizou-se cultura de células de músculo liso de bexiga, previamente expandida, que foi submetida ao tratamento com tripsina-EDTA LGC® para destacar do fundo do frasco de cultura e proceder à contagem e viabilidade celular.

Nesse caso, com o decorrer do trabalho houve a possibilidade de se padronizar a produção dos outros grupos de membrana de Quitosana (os quais ainda não tinham sido padronizados no período em que o teste com a Caspase-3 foi realizado). Assim, alíquotas de  $1 \times 10^6$  células foram separadas para aplicação em 21 poços de placa não aderente Nunc® contendo os seis subgrupos de membranas produzidos, e o grupo controle. São eles:

Membrana de Quitosana pura 3%, membrana de Quitosana dopada 3%, Membrana de Quitosana 4%, Membrana de Quitosana dopada 4%, Membrana de Quitosana pura 4% (de maior concentração), Membrana de Quitosana dopada 4% (de maior concentração). O grupo controle foi constituído apenas pelas células de músculo liso, sem nenhum tipo de membrana.

A contagem e viabilidade celular foram procedidas da mesma forma que no teste com a Caspase-3.

Para a determinação da marcação Anexina-V/PI por CF, utilizou-se 5µL de Anexina-V FITC e 5µL de Iodeto de Propídio por teste (tubo). Em seguida, as células foram colocadas em solução tampão 1X (*buffer*), disponibilizada pelo fabricante, e foram adicionados os volumes descritos de Anexina e PI. Para cada tubo, incubou-se aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por 15 minutos a 25°C no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, foi adicionado 400µL da solução tampão 1X em cada tubo. As células foram encaminhadas para leitura em Citômetro de Fluxo. Os protocolos foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes do Kit. Posteriormente, as leituras foram feitas no equipamento FACs Calibur da BD® e a reação analisada com auxílio do software Cell Quest™ da BD.

Ambos os experimentos, Caspase e Anexina/PI foram realizados em triplicata a fim de se obter a posterior análise estatística dos dados.

### **III.6 Modelo *in vivo***

#### **III.6.1 Implante *in vivo* dos segmentos de membrana: dorso**

Com o objetivo de avaliarmos a resposta inflamatória provocada pelo implante dos segmentos de membrana produzidos quando em contato direto com a mucosa dos animais, foi utilizado protocolo realizado *in vivo*, descrito por Evaristo (2011), adaptado<sup>69</sup>.

O implante foi realizado com dois subgrupos de membrana dentre os seis subgrupos elencados no estudo. A escolha dos subgrupos foi determinada pela concentração de Quitosana existente nas amostras, visto que se observou nas membranas compostas com maior concentração do produto, uma maior estabilidade do polímero no ato do procedimento cirúrgico, tratando-se da transposição do fio cirúrgico pela membrana.

Os subgrupos escolhidos para o ensaio foram:

- ✓ Quitosana 4% em maior concentração (20g de Quitosana/1L de ácido)
- ✓ Quitosana 4% Dopada em maior concentração (20g de Quitosana/1L de ácido)

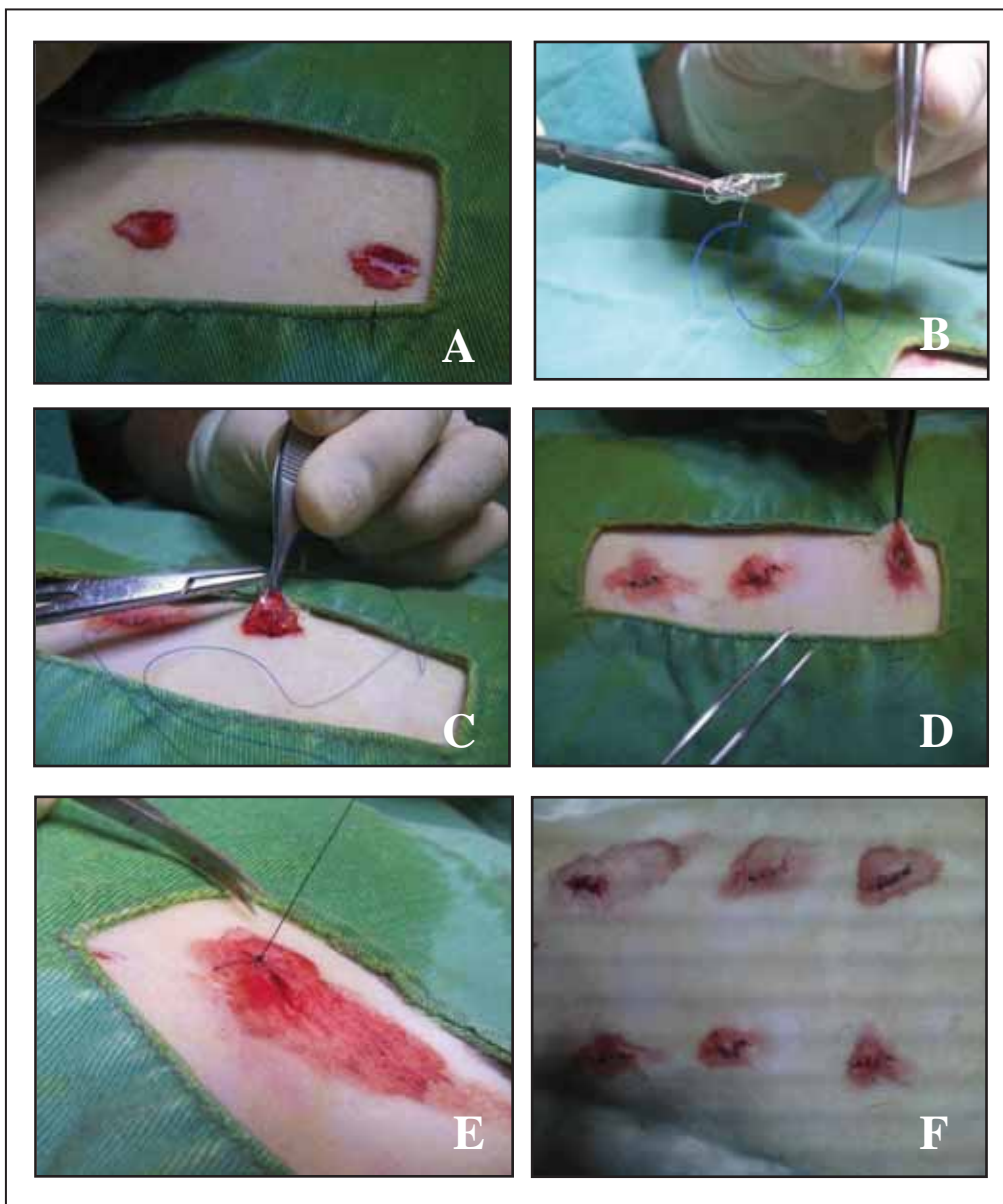
Os coelhos foram anestesiados com injeção de Cloridrato de Ketamina e Xilasina, administrado via intramuscular<sup>70, 71,72</sup>. Foram feitas seis incisões pequenas no dorso dos animais, com posterior divulsão dos tecidos e implante dos segmentos de membrana subcutâneamente. As membranas foram marcadas com fio cirúrgico azul de prolipropileno Trulene<sup>®</sup> antes de serem implantadas para posterior localização. Os animais receberam antibiótico Clamoxyl<sup>®</sup> pós-operatório.

Num mesmo animal foram colocados segmentos dos dois subgrupos, sendo o lado posterior direito contendo três segmentos de membrana pura e o lado posterior esquerdo contendo as membranas dopadas. Ambos os tipos de membrana foram inseridos no mesmo animal com o intuito de viabilizar a resposta inflamatória para ambas as amostras, ou seja, não haver interferência nos resultados por utilizar animais diferentes para cada subgrupo. O ensaio foi realizado em dois animais totalizando 12 amostras. Avaliou-se existência de fibroblastos; edema; polimorfonucleares (PMN); vasos neoformados; hemorragia; ulceração da epiderme:

presente ou ausente; necrose: presente ou ausente; macrófagos e bactérias. A nomenclatura utilizada para cada amostra (Tabela5) e o procedimento cirúrgico dos implantes (Figura 29) são demonstrados a seguir.

**Tabela5:** Nomenclatura implante dorso.

LADO	COELHO 1	COELHO 2
Posterior	Coe 1 quit dir 1	Coe 2 quit dir 1
DIREITO	Coe 1 quit dir 2	Coe 2 quit dir 2
(Quitosana não dopada)	Coe 1 quit dir 3	Coe 2 quit dir 3
Posterior	Coe 1 dop esq 1	Coe 2 dop esq 1
ESQUERDO	Coe 1 dop esq 2	Coe 2 dop esq 2
(Quitosana dopada)	Coe 1 dop esq 3	Coe 2 dop esq 3



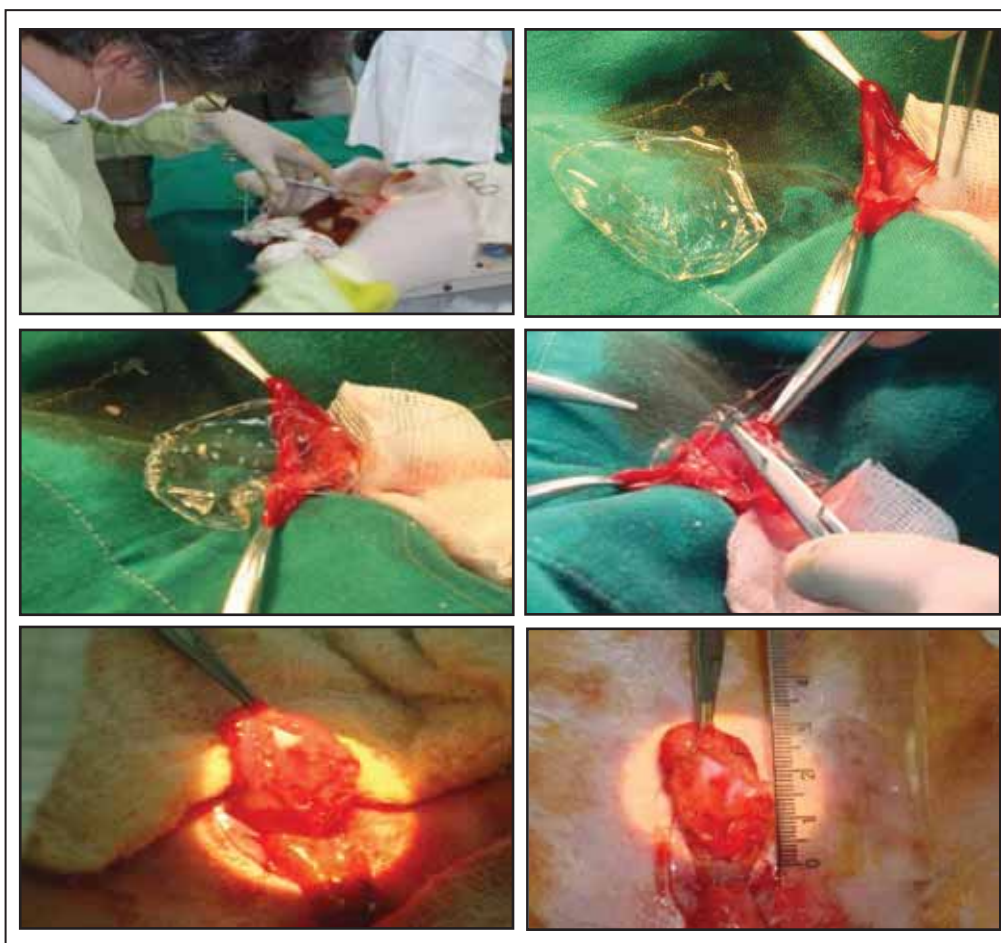
**Figura 29:** Implante dos segmentos de membrana *in vivo*. Em “A”, incisões no dorso dos animais. Em “B”, marcação das membranas com fio azul. Em “C” e “D”, implante das membranas nos segmentos. Em “E”, sutura. Em “F”, cirurgia finalizada.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

Após 21 dias, os coelhos foram sacrificados com injeção intravenosa letal de Pentobarbital. As porções do dorso foram retiradas e preparadas para a análise histológica.

### III.6.2 Piloto do implante *in vivo* dos segmentos de membrana: bexiga

Foi realizado do Departamento de Cirurgia Experimental da Urologia. O animal foi anestesiado com Cloridrato de Ketamina 35-50mg/Kg + Cloridrato de Xilazina 5-10mg/Kg de peso vivo administrados via intramuscular. O coelho foi colocado em decúbito dorsal com os membros imobilizados sendo realizada tricotomia da região abdominal e anti-sepsia com povidine iodine (PVPI, 10% iodo ativo, *Made Care* – produtos hospitalares Ltda.), utilizando-se campo oftálmico estéril para delimitar a região cirúrgica. A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal e a incisão da pele com bisturi. O músculo reto abdominal foi divulsionado, e após a liberação romba de tecido adiposo, aderido em sua porção lateral e medial, a bexiga foi exteriorizada. Foi então exposta à submucosa vesical e implantada a membrana de Quitosana, com sutura contínua. Os fios utilizados foram o Catgut<sup>®</sup> cromado 4-0 respectivamente para a bexiga e parede abdominal (Figura 30).



**Figura 30:** Procedimento cirúrgico piloto do implante de membrana *in vivo*.  
Fotos: Arquivo Pessoal, 2011

### **III.7 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada pelo software Graphpad Instat<sup>®</sup> 73. O teste de Análise de Variância para amostras dependentes determinou as diferenças significativas entre as variáveis estudadas. As médias foram comparadas pelo teste de Correlações Múltiplas de Tukey-Kramer, assumindo como verdadeiras as hipóteses cuja probabilidade de erro fosse menor que 5% ( $p < 0,05$ ).



## **IV. Resultados e Discussão**

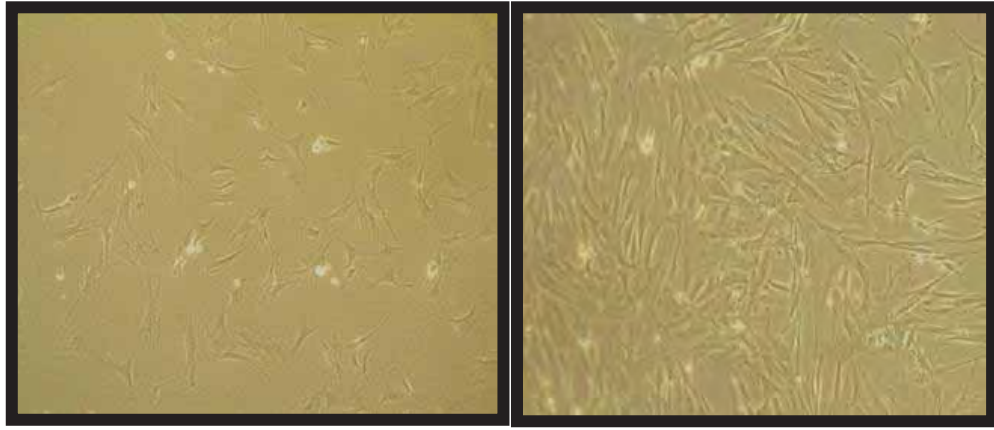
### **IV.1 Técnicas de Engenharia de Tecidos**

#### **IV.1.1 Isolamento das células da Bexiga**

As células da parede externa da bexiga foram isoladas de duas maneiras distintas: dissociação mecânica e dissociação enzimática. Segundo Evaristo, 2011<sup>65</sup> a evolução das culturas celulares por dissociação mecânica não demonstrou diferença significativa ao se comparar com a evolução das células obtidas por digestão enzimática. Entretanto, a Colagenase, enzima utilizada para a realização da digestão enzimática, apresenta custo elevado. Cleto, 2011<sup>74</sup> identifica pelo *Komet test*, que CTMs humanas de tecido adiposo expandidas em cultura submetidas à dissociação mecânica sofreram menor dano de DNA quando comparadas com aquelas da dissociação enzimática (3,4 vezes mais danos de DNA). Estes resultados apontam para a prioridade na escolha do método de dissociação mecânica para procedimentos com vistas à terapia celular e implantes, uma vez que o ensaio de quebra de DNA relaciona-se com a mutagenicidade e a genotoxicidade<sup>74,75</sup>.

Entretanto, no caso das células provenientes de músculo liso de coelho percebeu-se na evolução da cultura maior desenvolvimento e crescimento na dissociação enzimática. Tal fato pode estar correlacionado ao tipo de órgão, tendo em vista a constituição fina da parede da bexiga, tornando o material mais friável, associado ao fato de que na dissociação mecânica obtêm-se inicialmente menos células quando comparado com o método enzimático, sendo o tamanho da bexiga de coelho limitante.

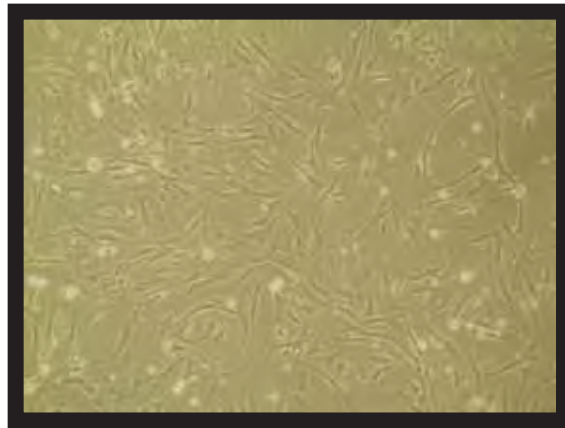
Após dois dias da deposição das células extraídas da bexiga, nos frascos de cultura, observou-se adesão das células em baixa densidade ao fundo do frasco (Figura 31). Conforme a evolução da cultura o crescimento celular alcançou 80-100% de confluência, ocupando assim toda a superfície inferior do frasco (Figura 31).



**Figura 31:** Na esquerda, células em início de adesão. Aumento de 100x. Na direita, células em confluência de 80% após alguns dias de cultura. Aumento de 100x. Fotos:

Fotos: Arquivo pessoal 2012.

Morfologicamente, no início da cultura, as células mantiveram-se alongadas e providas de prolongamentos, com aspecto denominado fibroblastóide. Conforme as passagens das células foram sendo efetuadas houve melhor expansão bem como aumento em volume (globosidade) celular. As características celulares foram observadas no microscópio invertido Axiovert 200<sup>®</sup>, Zeiss <sup>™</sup> (Figura 32).



**Figura 32:** Células de músculo liso em terceira passagem. Aumento de 100x.

Foto: Arquivo pessoal 2012

As células foram mantidas em cultura até a terceira passagem quando foram submetidas à caracterização por técnica de CF e posterior validação por técnica de ICQ.

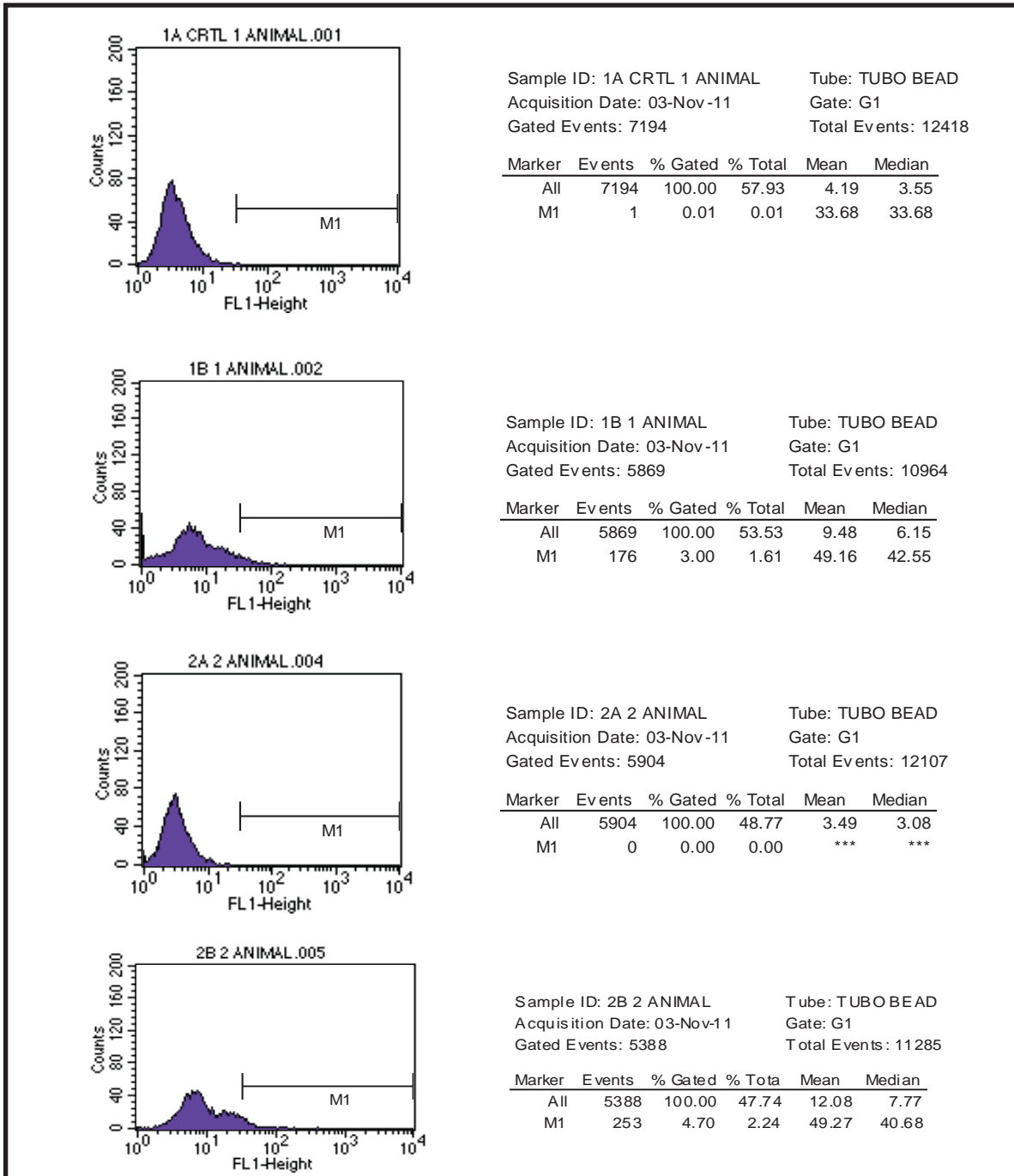
#### **IV.1.2 Caracterização por Citometria de Fluxo**

A utilização da técnica de CF nessa etapa do trabalho teve caráter eliminatório. Devido à heterogeneidade da constituição do epitélio vesical foi necessário eliminar a possibilidade de se estar trabalhando com células que não pertencessem ao grupo muscular, como, por exemplo, as próprias CTMs com perfil fenotípico definido em literatura especializada<sup>76</sup>. Dentre os marcadores utilizados para a fenotipagem de CTM, encontra-se o CD90 utilizado neste trabalho. A expressão de CD90 está relacionada às seguintes células, tecidos e ou

tumores: timócitos (células precursoras de células T no timo), neurônios, células mesenquimais, células hematopoiéticas, NK, células T murinas, endotélio, células glomerulares renais, melanoma, células dendríticas foliculares, fibroblastos e miofibroblasto<sup>76</sup>. Tendo em vista a dificuldade de mercado para se obter anticorpos dirigidos contra antígeno de coelho utilizou-se o anticorpo anti - CD90 (*anti-rat cross reacting with rabbit*) Biolegend<sup>®</sup>. O reagente utilizado apresenta especificidade pelas CTMs humanas e reação cruzada com células de coelho conforme informações do fabricante.

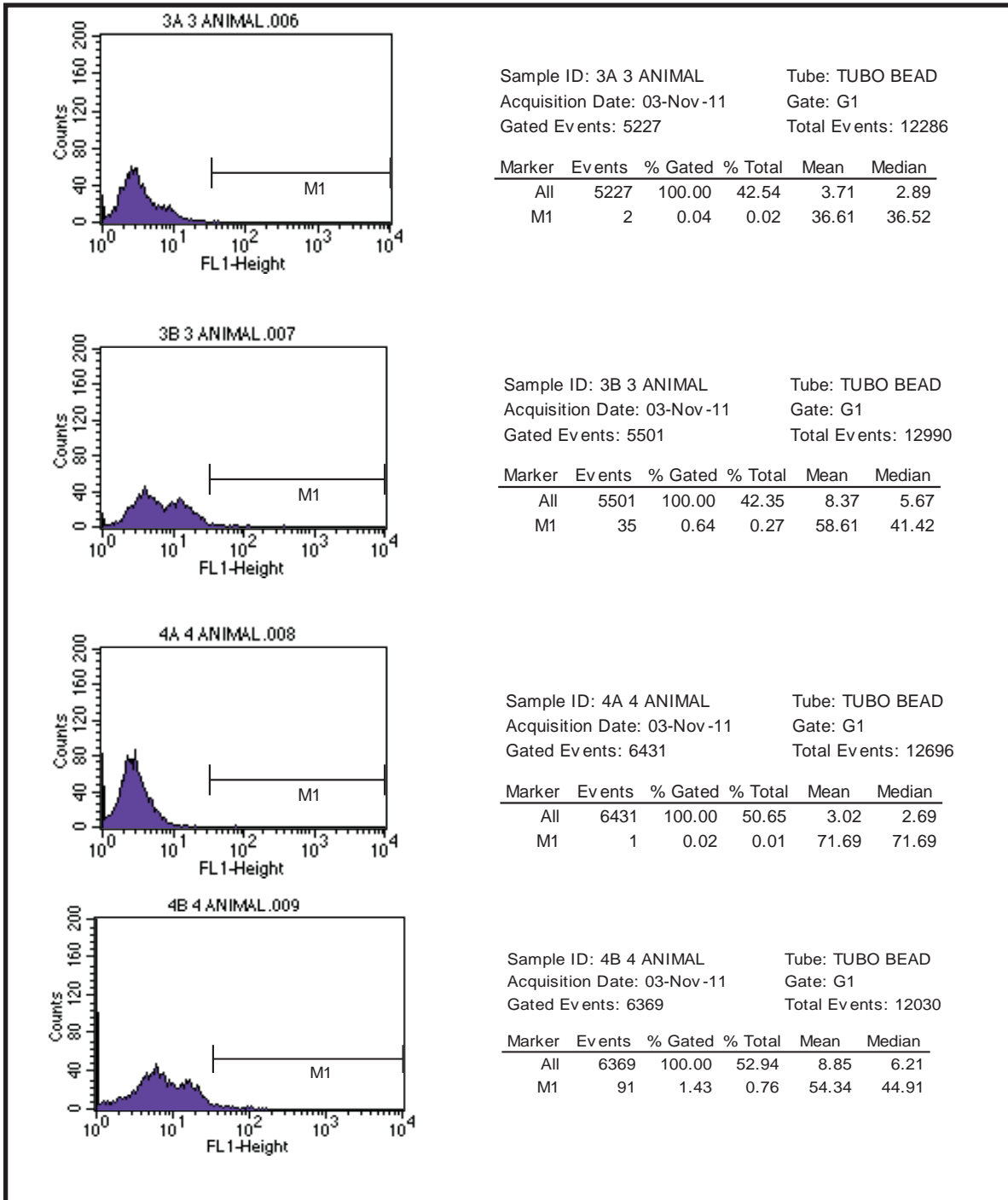
Na figura 33 pode-se observar que na análise do controle (*sample 1: 1<sup>a</sup> animal 1*) onde foram analisados 7194 eventos, correspondendo a 100% do *gate*, 0,01% apresenta autofluorescência (controle negativo). No histograma seguinte identificado como *sample 1b: 1 animal*, dentre 5869 eventos o teste foi positivo em 3% do total analisado. Shapiro, 1995<sup>76</sup> descreve que na imunofenotipagem pela metodologia de citometria de fluxo, resultados inferiores a 5% são considerados negativos<sup>77,78</sup>.

Ao analisarmos os resultados da CF de forma global, nota-se que nas cinco amostras provenientes de animais distintos a média de eventos analisados foi de 7000. Dentre estes, a análise pelo citômetro registrou o valor médio de 2% de positividade. Entretanto, o fato de excluirmos o fenótipo de CTMs nas amostras, não permitiu concluir a caracterização do tecido cultivado como músculo liso. Por isso foi proposta a realização de teste com maior especificidade: a ICQ. Os resultados da CF podem ser observados abaixo (Figuras 33,34 e 35).



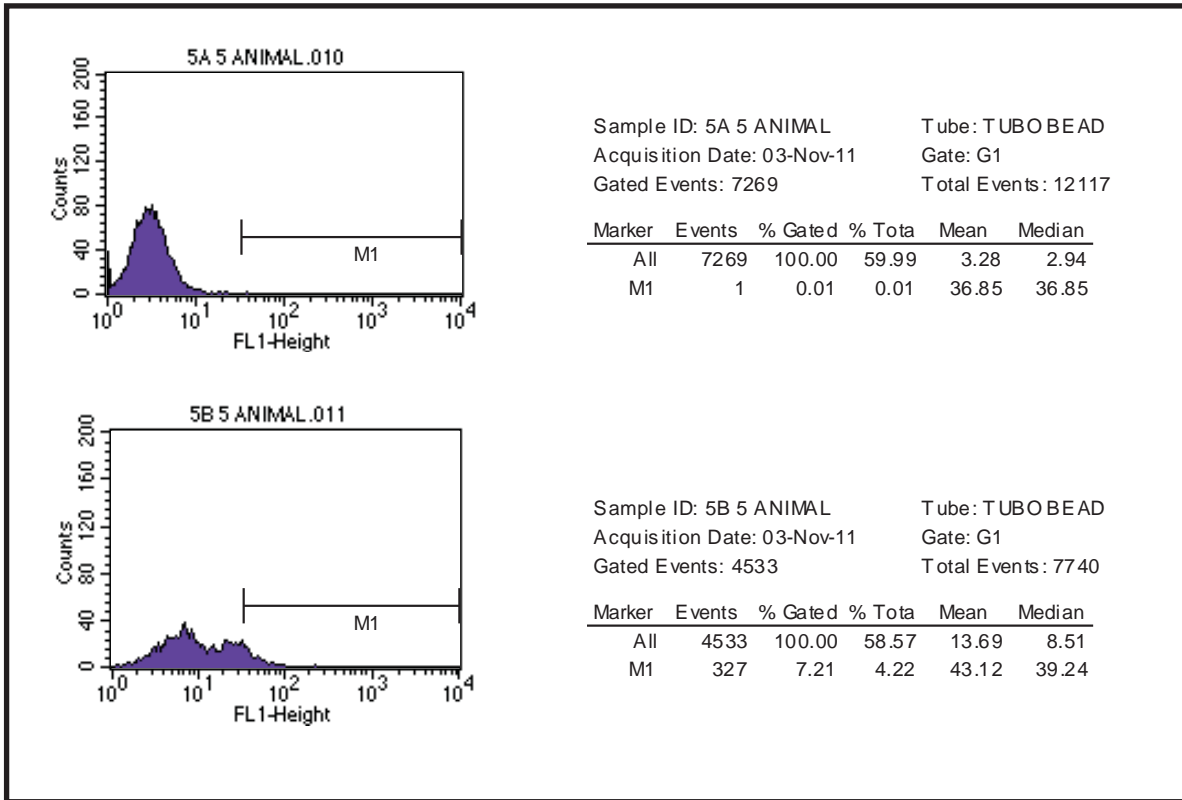
**Figura 33:** Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animais 1 e 2.

Sample ID: 1A CTRL 1 animal = controle negativo das células do animal 1; Sample ID 1B: 1 animal = análise da expressão de CD90 no animal 1; Sample ID: 2A animal= controle negativo das células do animal 2. Sample ID 2B 2 animal= análise da expressão de CD90 no animal 2.



**Figura 34:** Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animais 3 e 4.

Sample ID: 3A 3 animal = controle negativo das células do animal 3; Sample ID 3B: 3 animal = análise da expressão de CD90 no animal 3; Sample ID: 4A 4 animal = controle negativo das células do animal 4. Sample ID 4B 4 animal = análise da expressão de CD90 no animal 4.

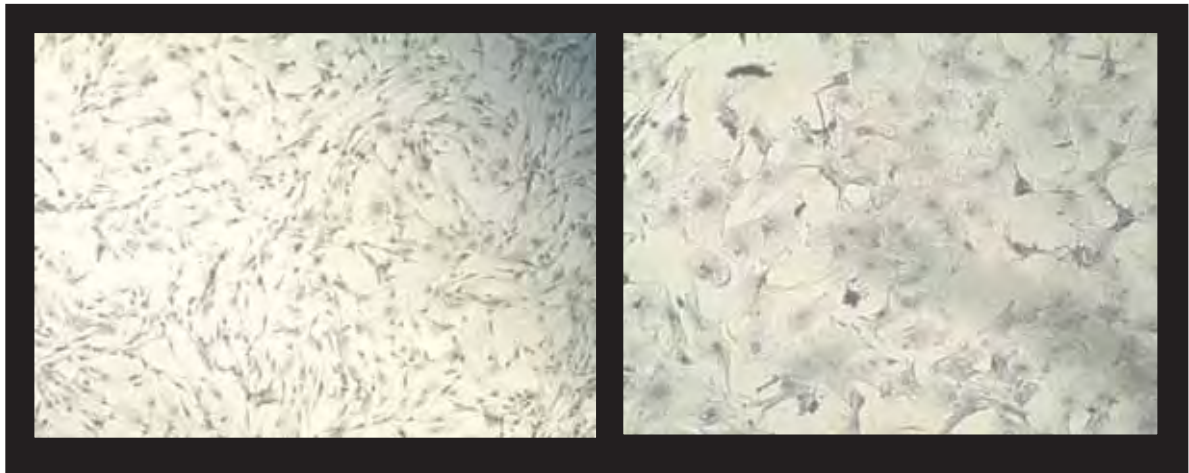


**Figura 35:** Resultado da CF para células expressando CD90 em sua superfície. Animal 5.

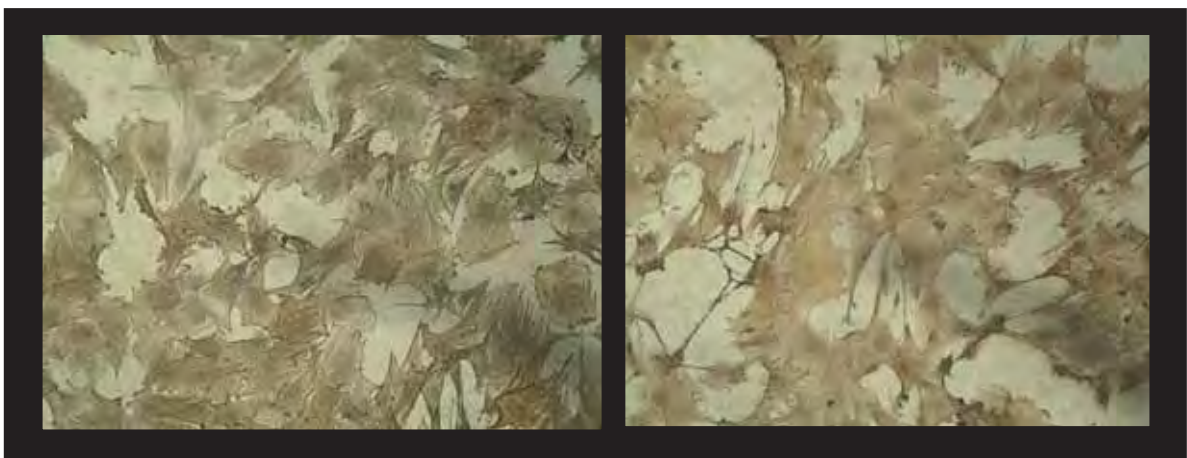
*Sample ID:* 5A 5animal = controle negativo das células do animal 5; *Sample ID* 5B: 5 animal = análise da expressão de CD90 no animal 5.

### IV.1.3 Caracterização por Imunocitoquímica

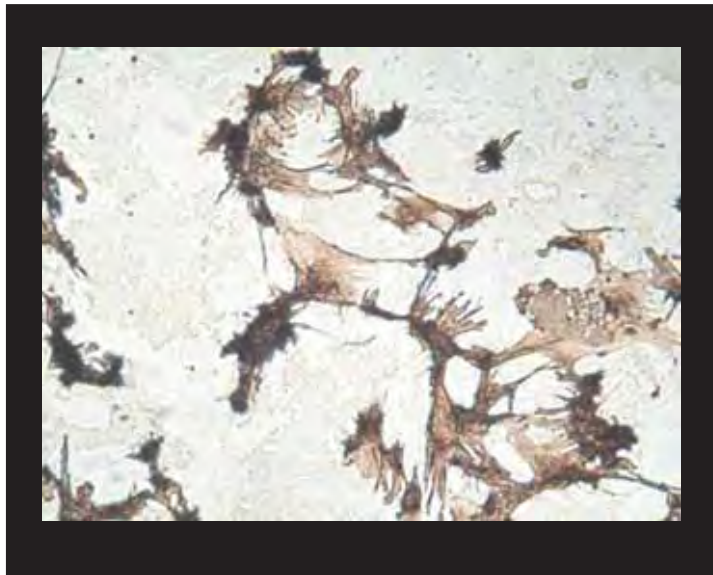
A caracterização por ICQ foi realizada como complemento necessário para a efetiva validação do tipo celular estudado, ou seja, a utilização dos devidos anticorpos, com reação cruzada para células de coelho, confirmou o fenótipo esperado de células de músculo liso. Estes resultados confirmam os resultados eliminatórios obtidos na CF que excluiu as hipóteses das células apresentarem os fenótipos fibroblasto, células-tronco e os demais citados anteriormente<sup>76</sup>. As figuras 36 e 37 evidenciam o controle negativo (não marcado) de CTMs provenientes de Tecido adiposo de coelho e as células marcadas com os anticorpos HHF35, 1A4 e *Alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Antibody Sigma*<sup>TM</sup>.



**Figura36:** Células não marcadas representam o controle negativo. Aumento de 50 e 100x, respectivamente.



**Figura 37:** Células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Na esquerda, células marcadas com o anticorpo HHF35. Na direita, células marcadas com o anticorpo HDIC 1 a 4. Aumento de 50 e 100x, respectivamente.



**Figura 38:** Células marcadas em marrom confirmam o fenótipo de músculo liso. Células marcadas com o *Alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Antibody* Aumento de 200x.

Fotos: Arquivo Pessoal. 2012



## IV.2 Membrana de Quitosana

### IV.2.1 Atividade antimicrobiana da membrana

Tendo em vista a escassez de estudos relacionados à utilização de uma membrana constituída de quitosana, a avaliação da comprovação das características descritas na literatura<sup>24</sup>, como no caso de uma possível atividade antimicrobiana da membrana, apresentou-se como um obstáculo. Sendo assim, a ausência de uma metodologia pré-estabelecida para a validação do teste, promoveu a submissão às alternativas já existentes por métodos convencionais.

O mesmo protocolo foi aplicado aos testes realizados em capela de fluxo laminar e teste de exposição ambiental. No teste em capela de fluxo laminar, em comparação com os controles (*S. aureus* 100.000 UFC e *P. aeruginosa* sem crescimento), a *S. aureus* apresentou diminuição da taxa de crescimento quando em contato com a membrana dopada 4%, e inibição de crescimento quanto em contato com a membrana 4%, corroborando a literatura. Os resultados estão na tabela a seguir:

**Tabela 6:** Resultado do ensaio antimicrobiano em laboratório.

Tipo de membrana	Teste em laboratório	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Membrana 3%/15g	10 <sup>6</sup> colônias	Sem crescimento
Membrana DOP 3%/15g	10 <sup>6</sup> colônias	Sem crescimento
Membrana 4%/15g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana DOP 4%/15g	4x 10 <sup>4</sup> colônias	Sem crescimento
Membrana 4%/20g	10 <sup>6</sup> colônias	Sem crescimento
Membrana DOP4%/20g	10 <sup>5</sup> colônias	Sem crescimento

O teste de exposição ambiental se demonstrou satisfatório, visto que não houve crescimento bacteriano em nenhum dos subgrupos estudados, corroborando os achados da literatura. Os resultados encontram-se na tabela a seguir:

**Tabela7:** Resultado do ensaio antimicrobiano ambiental.

Tipo de membrana	Teste ambiental	
	<i>S. aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Membrana 3%/15g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana DOP 3%/15g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana 4%/15g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana DOP 4%/15g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana 4%/20g	Sem crescimento	Sem crescimento
Membrana DOP4%/20g	Sem crescimento	Sem crescimento

#### IV.2.2 Atividade Antifúngica da membrana

Assim como observado em relação à atividade antimicrobiana da membrana, a ausência de testes específicos destinados à aplicação nesse polímero, no que condiz com a atividade antifúngica, também se apresentou como um obstáculo. Entretanto, o teste conduzido no Departamento de microbiologia do IBB, segundo Alvarado, 2012<sup>64</sup> evidenciou a formação de halos de inibição de crescimento após o tempo de 48h de cultivo de *C. albicans*, em meio de cultura Agar Sabourad, onde as membranas encontravam-se dispostas. A figura a seguir mostra os halos formados.



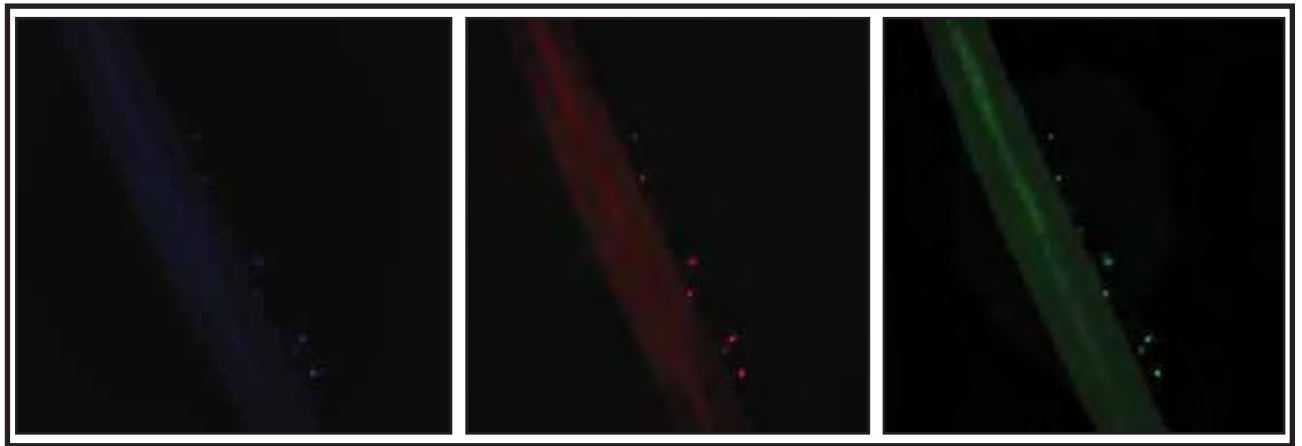
**Figura 39:** Halos de inibição de crescimento de *C. albicans* após 48h de incubação.  
Foto: Arquivo Pessoal, 2011

### **IV. 3 Modelo de Membrana Celularizada**

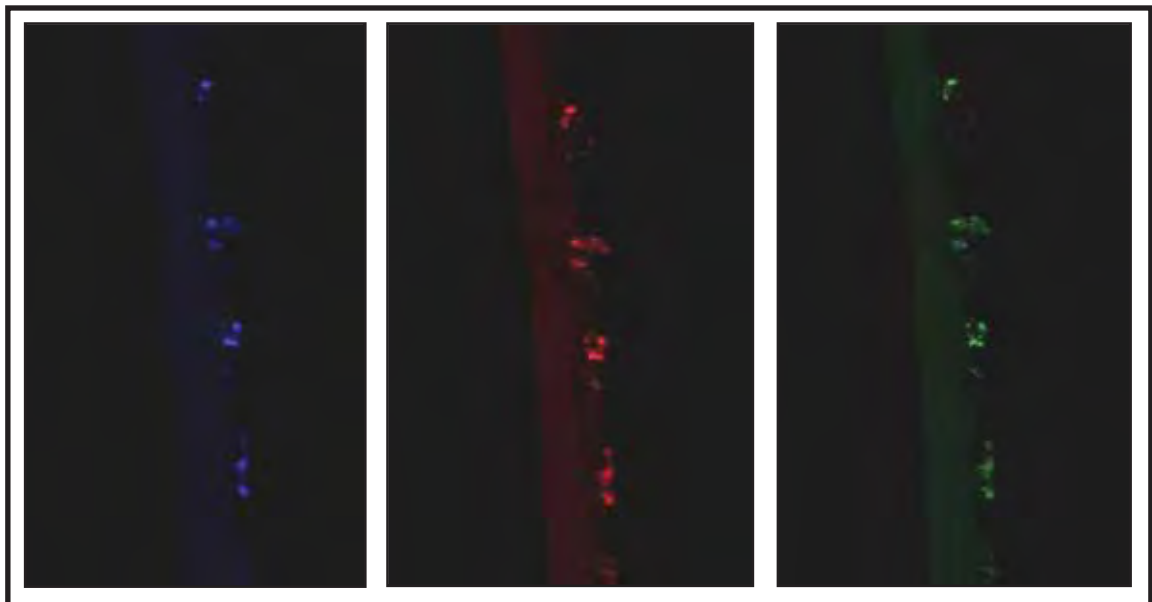
#### **IV. 3.1 Ensaios de Adesão e marcação celular ao *scaffold* – Imunofluorescência**

Segundo a literatura, os biomateriais se fundamentam nas interações entre tecidos vivos e materiais sintéticos visando a biofixação, bioreconhecimento e biocolonização<sup>11</sup>. A utilização de um artifício promotor da adesão demonstrou quantitativa e visualmente, o contato celular com o biomaterial, por mecanismos artificiais. No entanto, justamente devido à constatação da “adesão provocada” ao *scaffold* foi possível estabelecer uma comparação visual perante os dois casos, evidenciando a adesão celular ao *scaffold* sem nenhum artifício promotor de adesão, mesmo que em menor quantidade, mas ainda sim corroborando os achados da literatura, viabilizando o uso da membrana com essa finalidade.

Observou-se marcação do citoplasma das células em análise microscópica de aumento 200X. Foi usado microscópio de fluorescência Olympus BX41 acoplado a câmera digital Olympus Camedia C-7070. Os ensaios se apresentam a seguir (Figuras 40 e 41).



**Figura40:** Adesão celular ao *scaffold*, **sem** fator promotor da adesão. Filtros usados: Em verde, FITC 200X. Em azul, DAPI 200X. Em vermelho, Txred 200X.



Fotos: Arquivo Pessoal, 2011

**Figura 41:** Adesão celular ao *scaffold*, **com** fator promotor da adesão. Filtros usados: Em verde, FITC 200X. Em azul, DAPI 200X. Em vermelho, TxRed 200X.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2011

### IV.3.2 Testes de toxicidade residual dos *scaffolds*: Caspase-3 e Anexina-V/Iodeto de Propídio

- **Caspase-3**

O ensaio de toxicidade realizado com o kit de Caspase evidenciou que a exposição às membranas puras não induziu à apoptose celular pela via da Caspase-3. Entretanto, nas membranas acrescidas de solução de glutaraldeído a 0,25% confirmou-se a inviabilidade do uso desse devido à extrema toxicidade induzida pelo produto, quando em contato com as células, ainda na cultura, sendo que a viabilidade celular foi nula em algumas amostras. Tais informações foram confirmadas pela análise conjunta da contagem, viabilidade celular e citometria de fluxo. Esses resultados podem ser evidenciados nos histogramas abaixo (Figura 42).

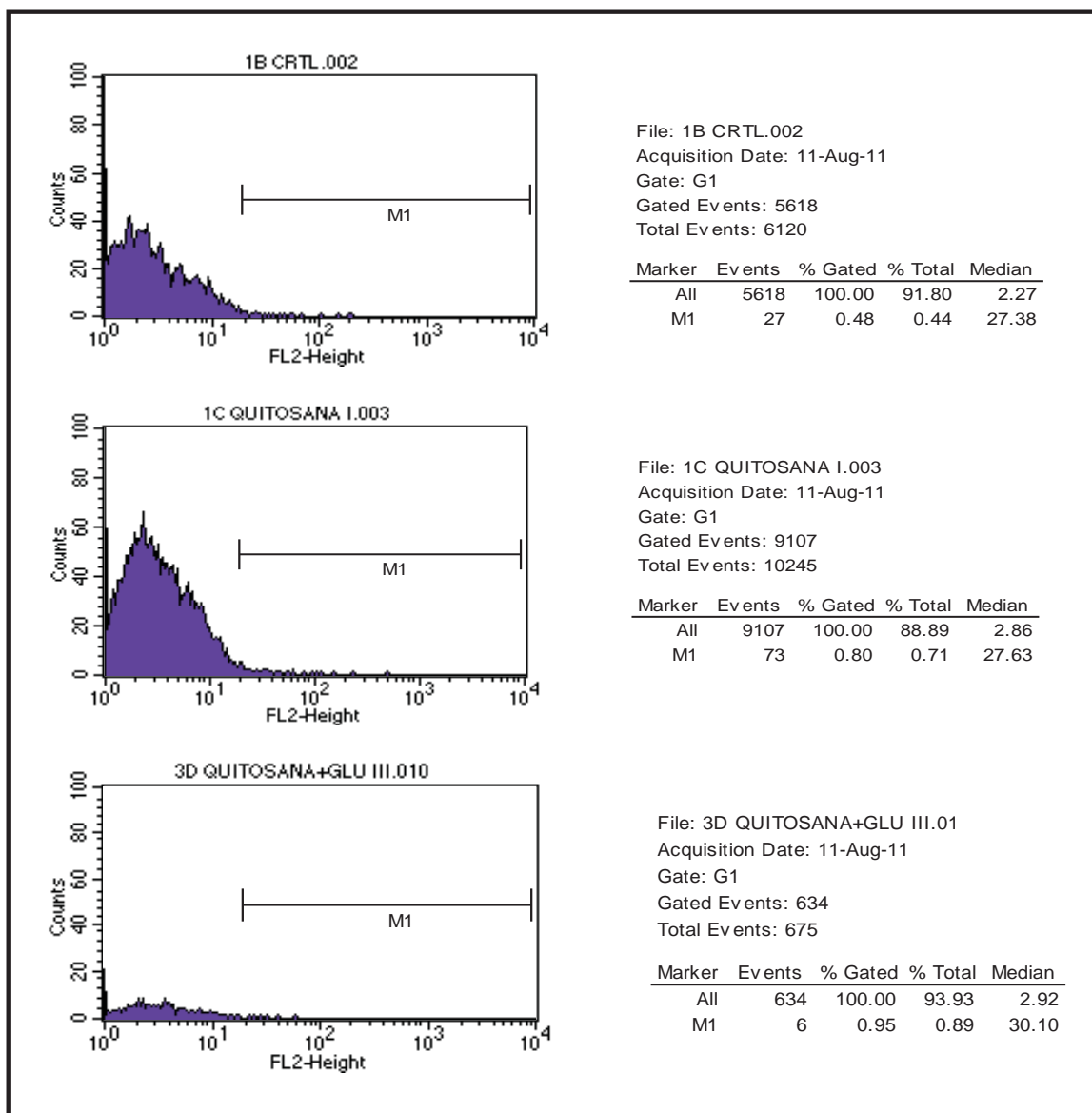


Figura42: Resultado da citometria de fluxo utilizando Anti-Caspase-3.

- **Anexina-V/Iodeto de Propídio**

A avaliação da citotoxicidade induzida pela exposição celular às membranas foi medida pelo Kit de Anexina-V/PI. Os testes foram realizados com todos os subgrupos dos dois grupos elencados no estudo, em triplicata. A utilização de outro método determinante para avaliação da citotoxicidade celular encontrou-se necessário para determinar possível apoptose induzida por uma via independente das Caspases. Os resultados foram nitidamente satisfatórios, visto que houve ausência de indução à Necrose, (demonstrado do quadrante I), ausência de citotoxicidade, (demonstrado pela alta viabilidade celular no quadrante II) e ausência de indução à apoptose celular (demonstrado no quadrante III), em todas as amostras. Na avaliação por CF, ao utilizarmos o Kit contendo a Anexina e o PI, pode-se obter quatro perfis distintos. Os perfis são apresentados na tabela abaixo.<sup>54</sup>

**Tabela 8:** Respostas da detecção da exposição das FS por citometria de fluxo usando Anexina-V e

Perfis	Interpretação
1. Expressão negativa de Anexina-V e PI	Células Viáveis
2. Expressão positiva de Anexina-V e Negativa de PI	Células nos estágios precoces de Apoptose
3. Expressão negativa de Anexina-V e positiva de PI	Necrose celular
4. Expressão positiva de Anexina -V e PI	Estágios finais de apoptose

Fonte: Adaptado de Guilherme, G. 2006.

Os resultados da citometria de fluxo podem ser visualizados nos *dot-plots* abaixo. (Figuras 43 a 49).

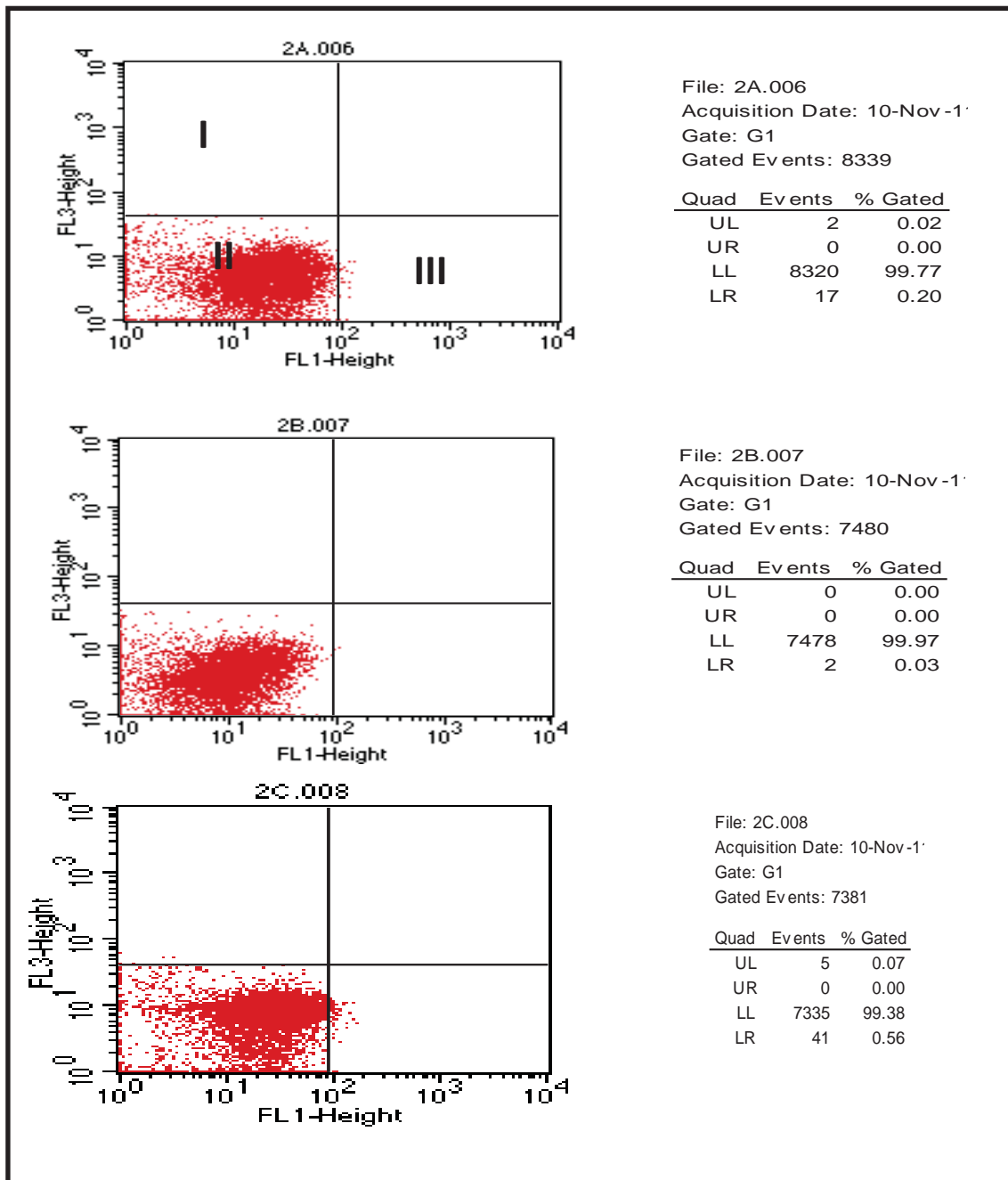


Figura 43: Resultado da citometria de fluxo para o teste de Anexina/PI: controles negativos.

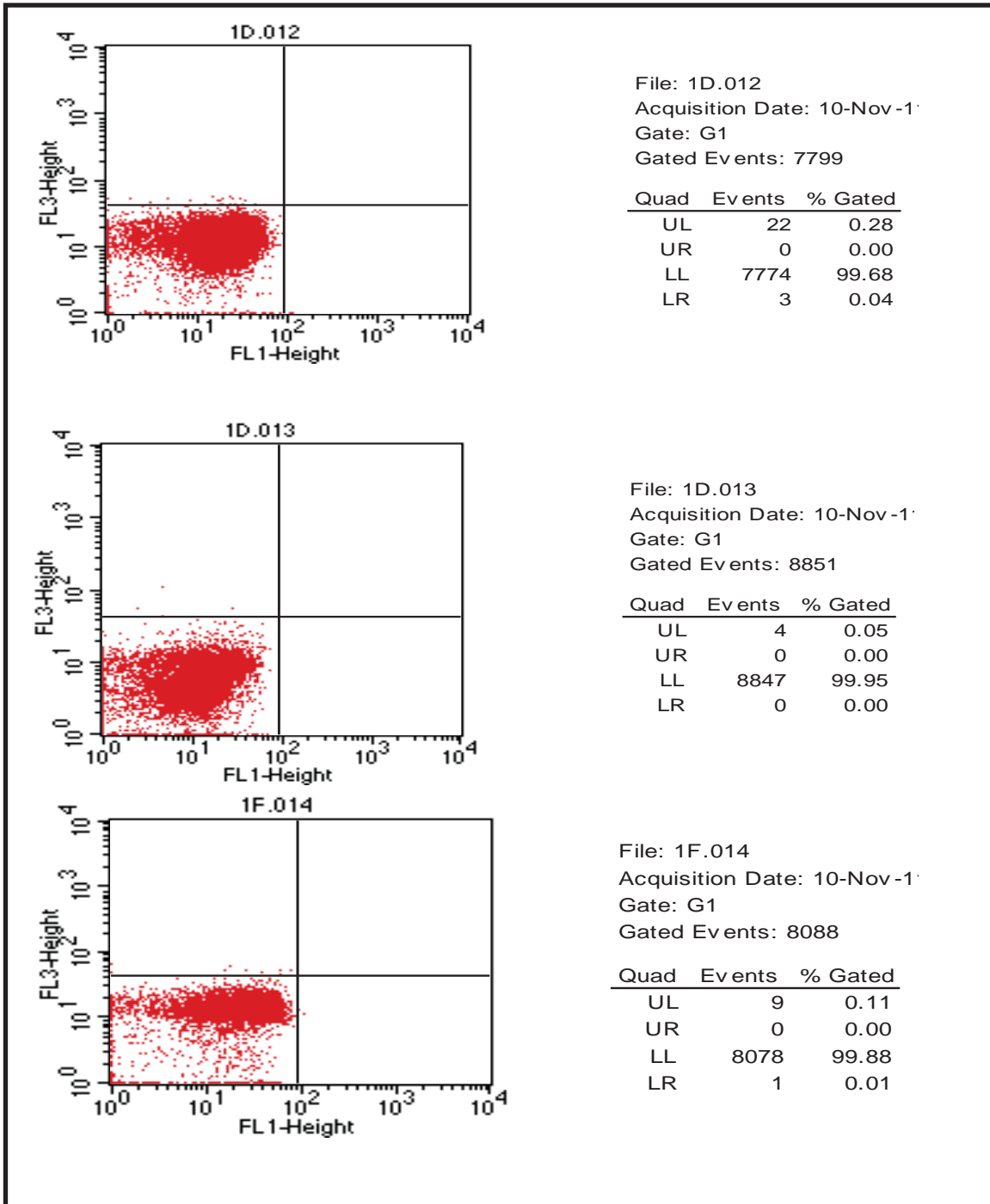


Figura 44: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo "Quitosana 3%".



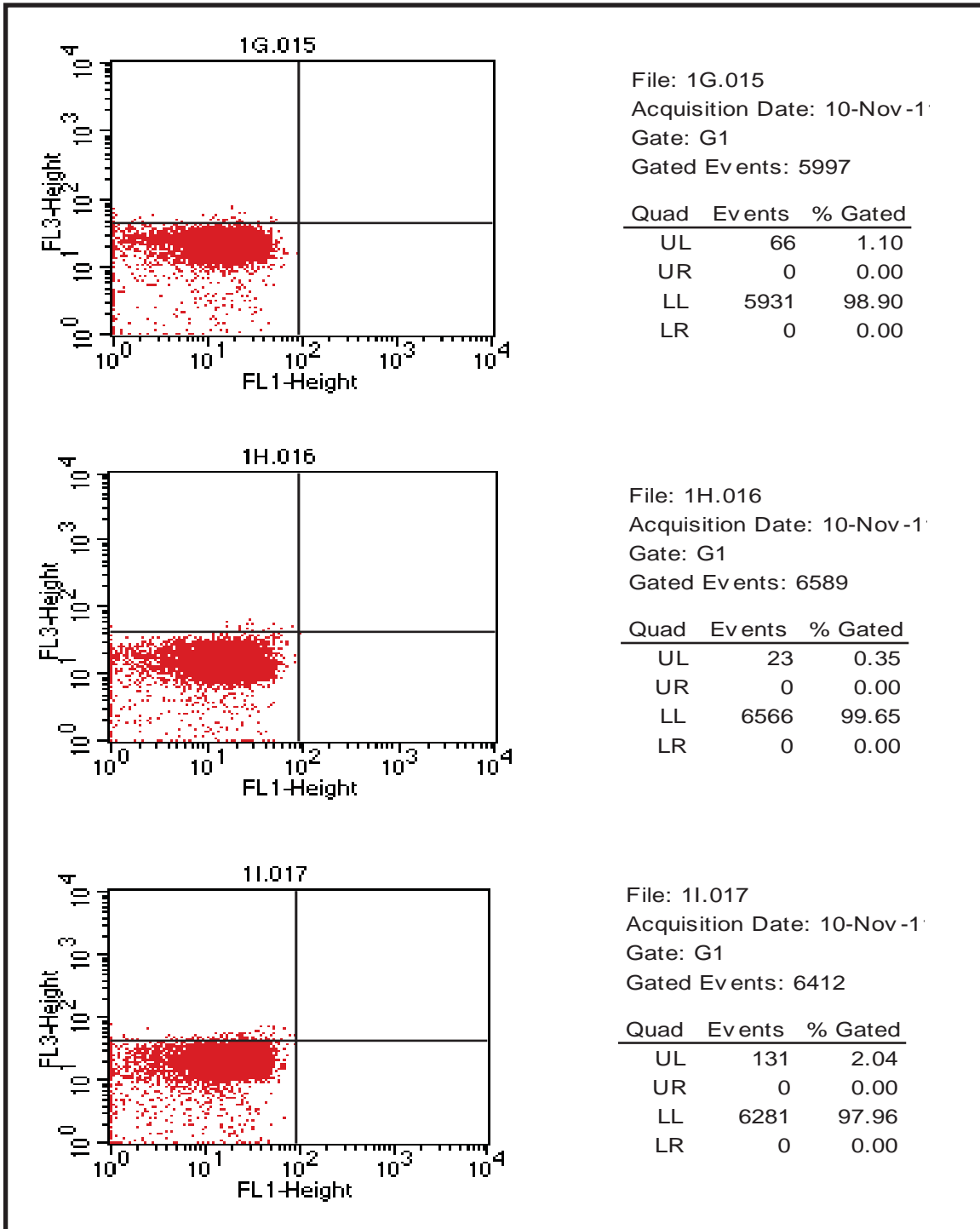


Figura 45: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo "Quitossana 4%".

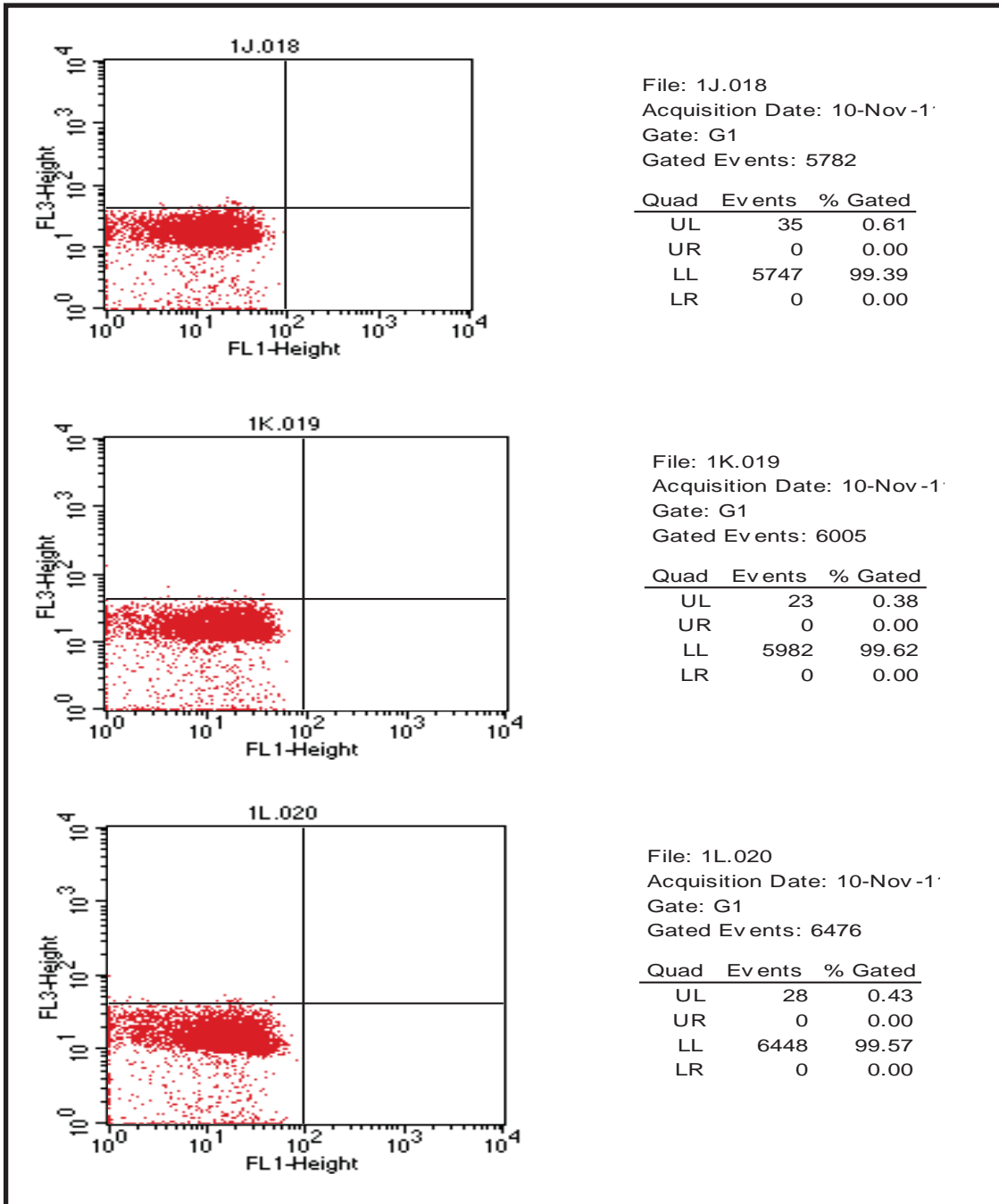


Figura 46: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo "Quitosana Dopada 3%".

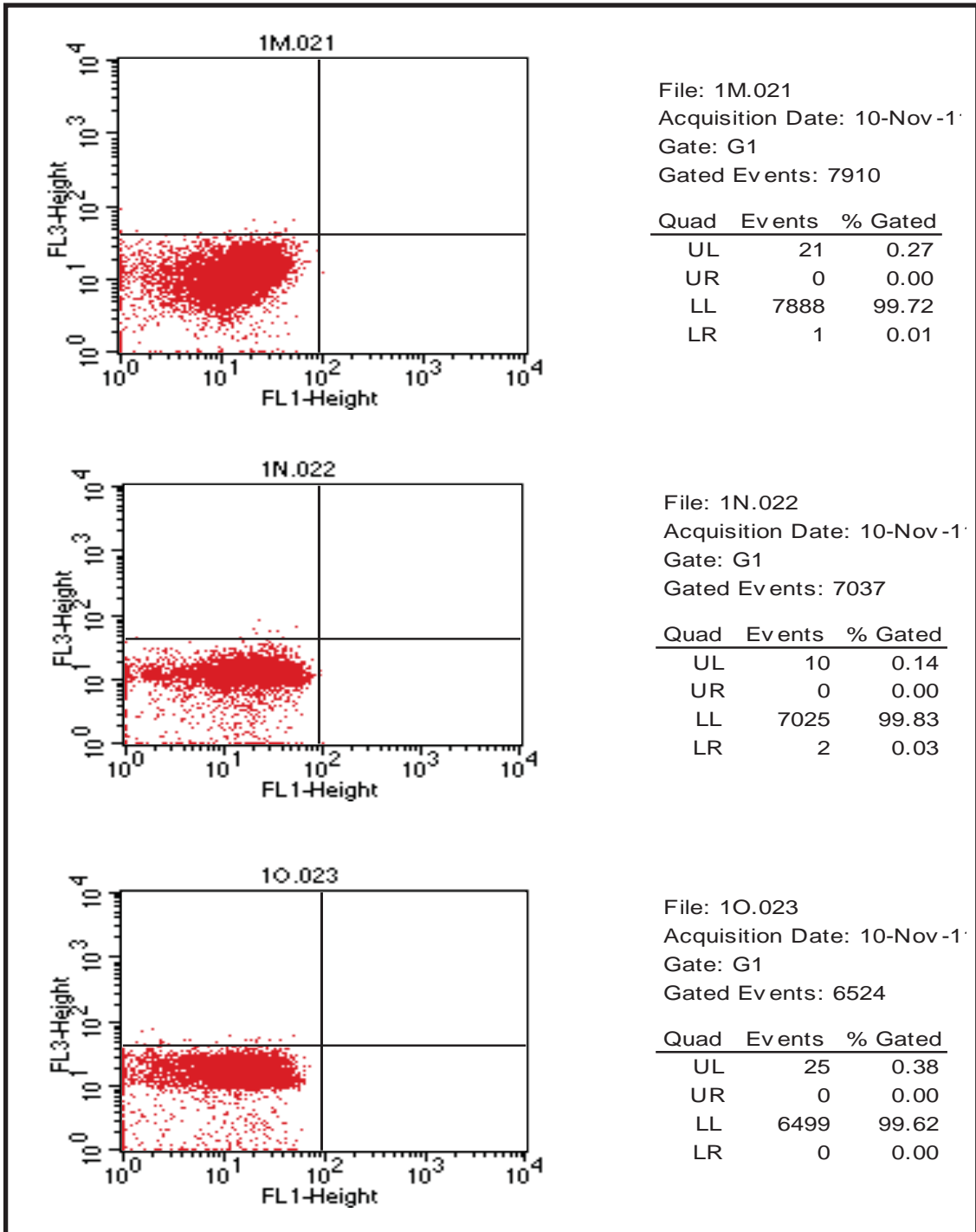


Figura 47: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana Dopada 4%”.

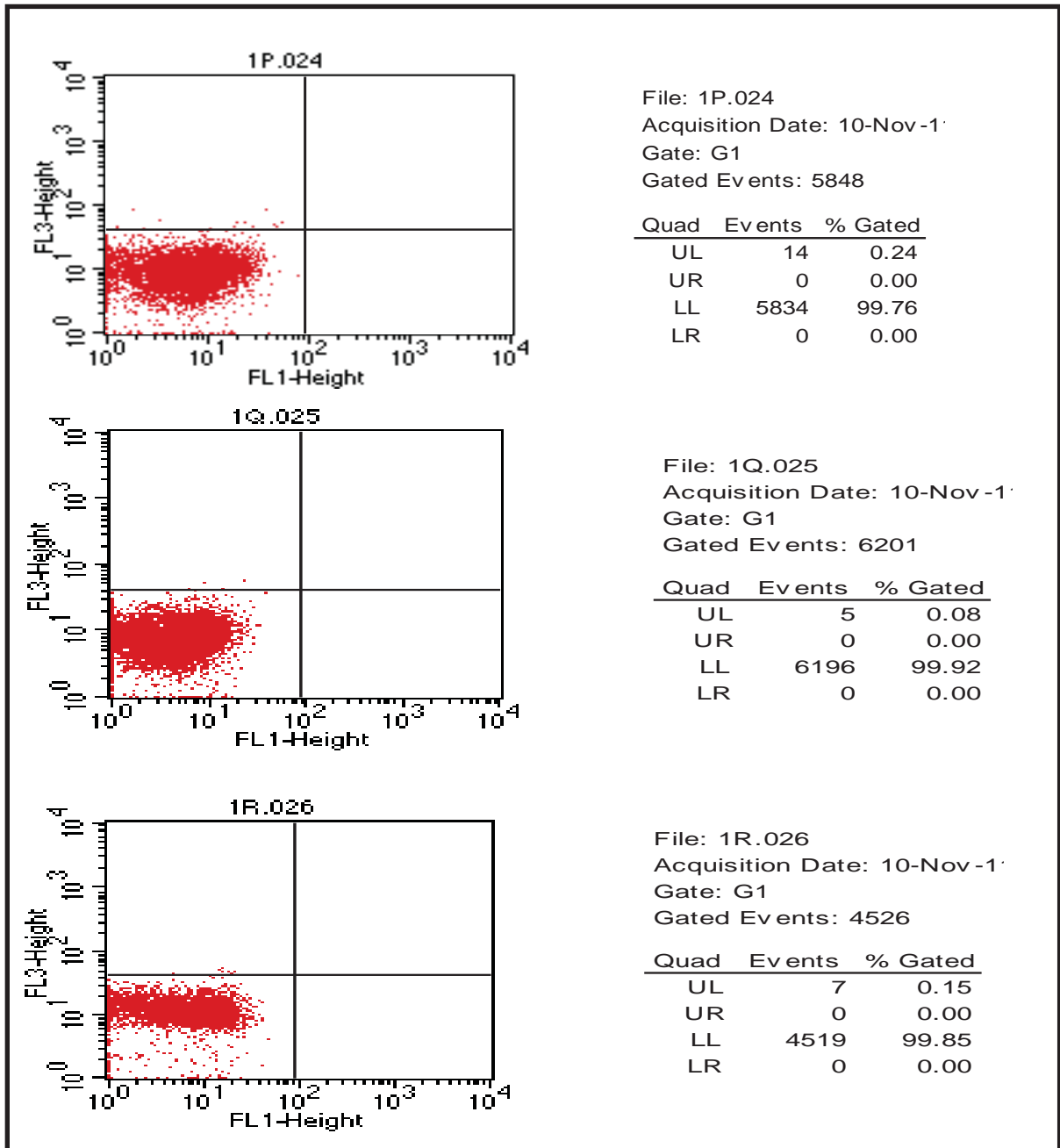


Figura 48: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitossana 4% em maior concentração” (20g de quitossana/1L de ácido).

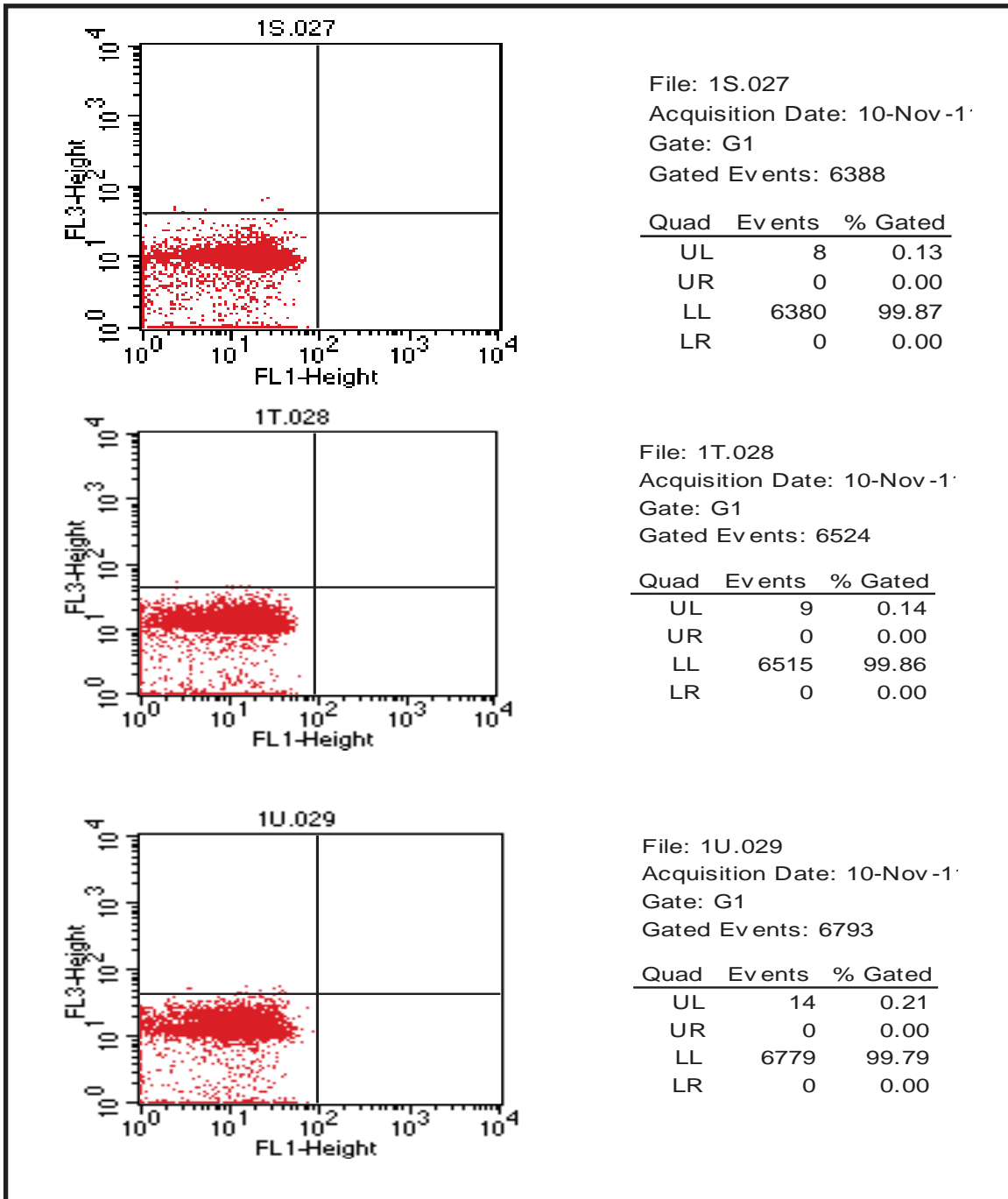


Figura49: Resultado da CF para o teste de Anexina/PI: subgrupo “Quitosana Dopada 4% em maior concentração” (20g de quitosana/1L de ácido).

#### IV.4 Modelo *in vivo*

##### IV.4.1 Implante *in vivo* dos segmentos de membrana: dorso

Nesta etapa objetivou-se verificar a toxicidade residual da membrana em relação ao organismo após o implante. Transcorridos dois dias, observou-se processo inflamatório, evidenciados pela presença de rubor, calor e edema (Figura 50). Na figura 51, observa-se eliminação de um dos enxertos no lado posterior direito (referente à quitosana não dopada), após sete dias do implante no coelho 1, e eliminação de um enxerto de cada lado no coelho 2. Evidenciou-se processo inflamatório pertinente.



**Figura 50:** Processo inflamatório pós – operatório.

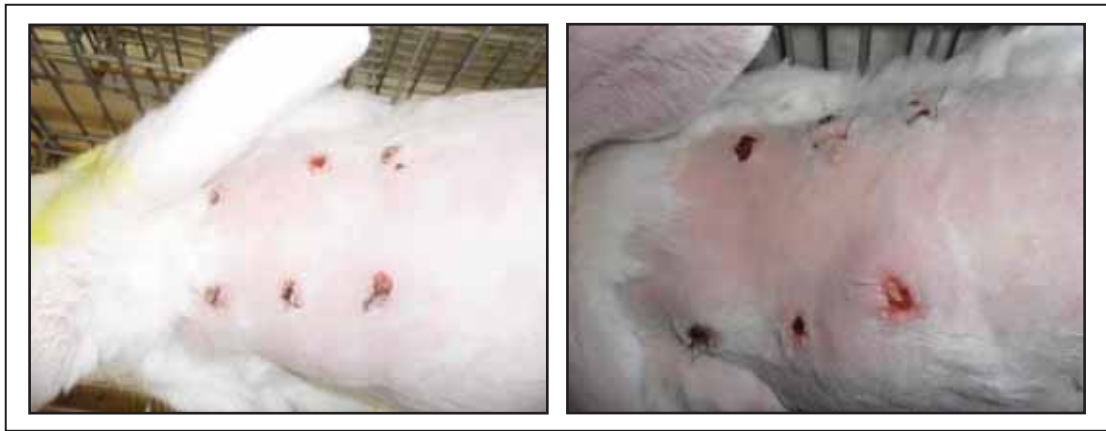


**Figura 51:** Implante dorsal da membrana, *in vivo*. Na esquerda, implante após sete dias no coelho1. Na direita, implante após sete dias no coelho2.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

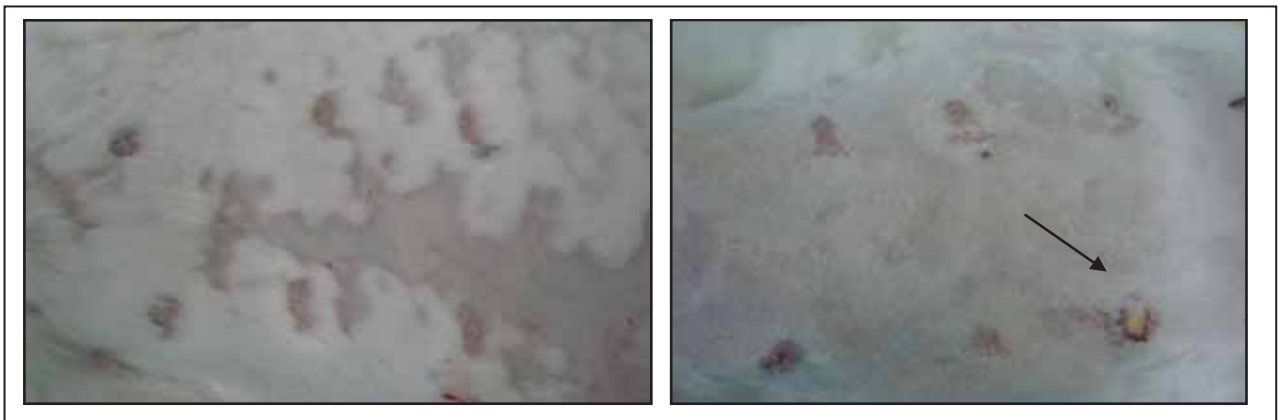
Após 14 dias do procedimento cirúrgico, observou-se a expulsão dos implantes localizados no lado posterior direito do coelho1. Os segmentos presentes no lado esquerdo (quitosana dopada) apresentaram-se em expulsão tardia, comparados aos do lado direito (quitosana não dopada). No animal 2, observou-se a permanência de dois enxertos, um de

cada lado. Ainda que macroscopicamente, a evolução dos resultados apresentou-se como pouco satisfatória. A figura 52 retrata a evolução dos animais em 14 dias.



**Figura 52:** Implante dorsal da membrana, in vivo após 14 dias. Na esquerda, coelho 1. Na direita, coelho 2.  
Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

Após 21 dias foi realizada a eutanásia dos animais. Observou-se a formação de um abscesso na terceira amostra do lado esquerdo do coelho 2, e a permanência de uma das amostras do mesmo lado no mesmo animal. O aspecto macroscópico do momento pré-eutanásia é demonstrado a seguir (Figura 53).



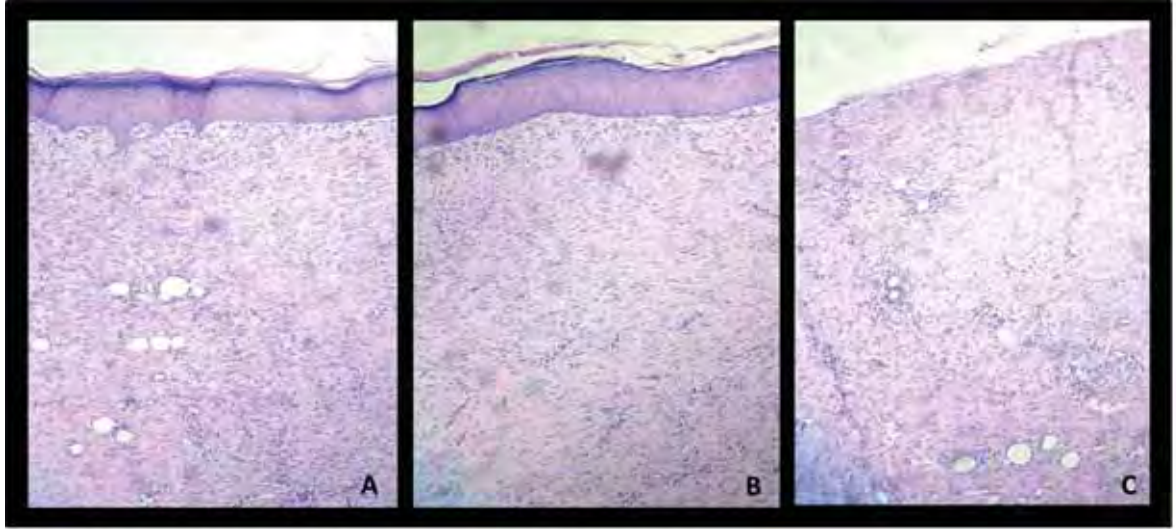
**Figura 53:** Implante dorsal da membrana, in vivo após 21 dias. Na esquerda, coelho 1. Na direita, coelho 2 com formação de abscesso do lado esquerdo do implante.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

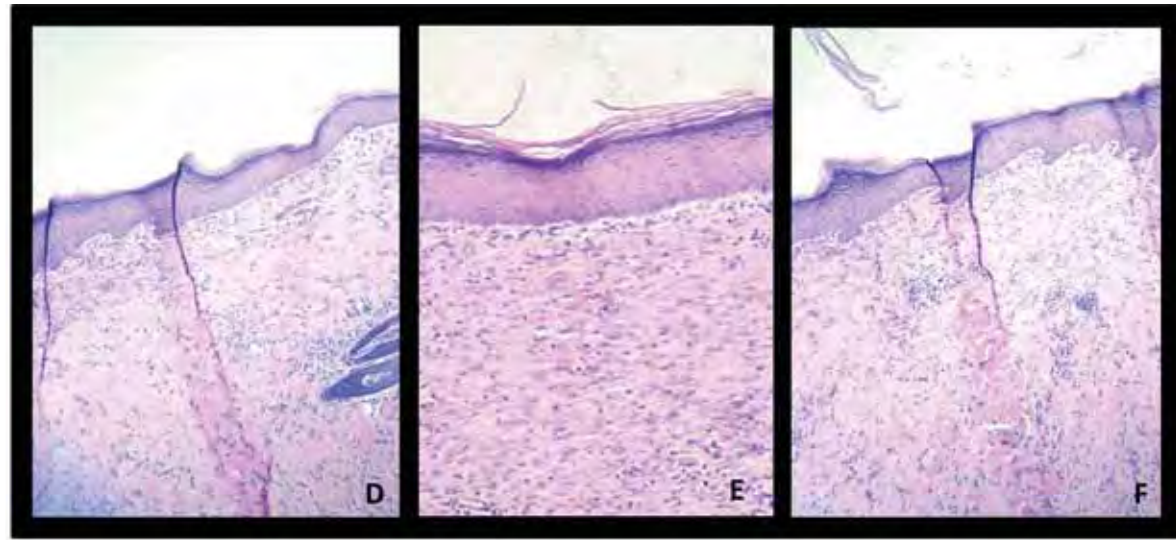
- **Avaliação histomorfológica das amostras: dorso**

A avaliação histomorfológica das lâminas foi realizada no Departamento de Patologia da FMB. A análise realizada teve caráter semi-quantitativo, demonstrado em cruces levando em consideração os parâmetros já descritos. Os aspectos histomorfológicos estão registrados nas Figuras 54 e 55. A tabela 9 demonstra o conjunto dos resultados analisados. A infiltração de fibroblastos foi menor em uma amostra (coe1DOP esq II). Os cortes histológicos das amostras da membrana de quitosana não apresentam edema. As membranas dopadas estimularam a presença de PMN de forma mais expressiva quando comparado com a membrana de quitosana não dopada. Acrescenta-se o fato de que no animal 2, houve a formação de abscesso. Quanto à presença de vasos, o escore apresenta-se nitidamente diferente. Nas membranas dopadas o escore de vasos varia entre ++/+++ enquanto que nas membranas de quitosana não dopadas +. A ulceração do tecido epitelial foi evidenciada exclusivamente nas membranas dopadas, apontando para um processo de rejeição levando-se em consideração os demais parâmetros analisados. Na amostra (coelho 2 dop esquerda III) houve a formação de abscesso e conseqüente presença de necrose e bactérias. A presença de macrófagos (++) foi registrada na amostra do coelho 1 que recebeu a membrana de quitosana não dopada (Tabela 9).





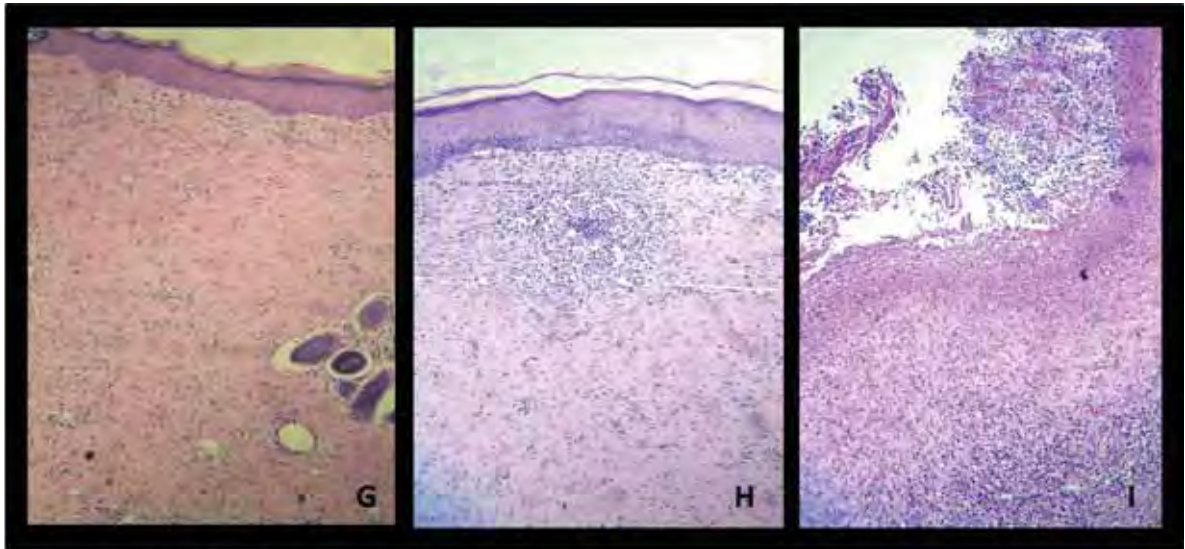
A :Coe 1 Dop Esq 1;B: Coe 1 Dop Esq 2; C:Coe 1 Dop Esq 3.



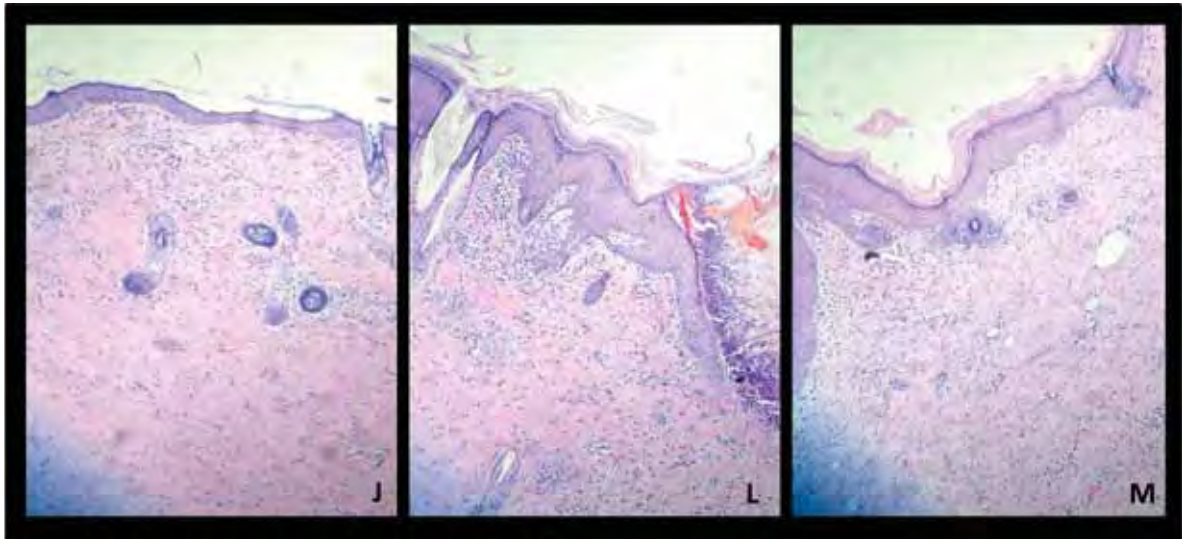
D: Coe 1 Quit Dir 1; E: Coe 1 Quit Dir 2; F: Coe 1 Quit dir 3.

**Figura 54:** Resultados histologia coelho 1. Coloração H&E. Aumento 100x.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2012



G: Coe 2 Dop Esq 1; H: Coe 2 Dop Esq 2; I: Coe 2 Dop Esq 3.



J: Coe 2 Quit Dir 1; L: Coe 2 Quit dir 2; M: Coe 2 Quit dir 3.

**Figura 55:** Resultados Histologia coelho 2. Coloração H&E. Aumento 100x.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

**Tabela 9:** Avaliação histomorfológica das amostras *in vivo*.

LÂMINAS	Fibroblastos	Edema	PMN	Vasos	Hemácias	Ulceração	Necrose	Bactérias	Macrófagos
Coe1DOP Esq 2-I	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
Coe-1- DOP-ESq 2-II	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
Coe1DOP Esq-2III	+++	++	+++	+++	++	<b>Presente</b>	Ausente	0	0
Coe1DOP Esq-2 IV	+++	++	+++	++	++	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
Coe1QUIT DIR-2	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-2 II	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-2 III	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-2 IV	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-3 I	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-3 II	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-3 III	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-3 IV	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-3 I	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-3 II	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-3 III	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-3 IV	+++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe1QUIT DIR-1 I	+++++	0	++++	+	0	Ausente	Ausente	0	++
Coe1QUIT DIR-3 II	+++++	0	++++	+	0	Ausente	Ausente	0	++
Coe1QUIT DIR-3 III	+++++	0	++++	+	0	Ausente	Ausente	0	++
Coe1QUIT DIR-3 IV	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-1 I	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-1 II	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-1 III	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-1 IV	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-2 I	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-2 II	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2QUIT DIR-2 III	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0

ESq1 I									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq1 II									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq1 III									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq1 IV									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq2 I									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq2 II									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq2 III									
Coe2DOP	+++	+	++	+	+	Ausente	Ausente	0	0
ESq2 IV									
Coe1DOP	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
ESq1 I									
Coe1DOP	++++	0	++	+	0	Ausente	Ausente	0	0
ESq1 II									
Coe1DOP	+++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
ESq1 III									
Coe1DOP	+++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
ESq1 IV									
Coe1DOP	++++	0	++	+	+	Ausente	Ausente	0	+
ESq I									
Coe1DOP	++++	0	++	+	+	Ausente	Ausente	0	+
ES1 II									
Coe1DOP	++++	0	++	+	+	Ausente	Ausente	0	+
ESq1 III									
Coe1DOP	++++	0	++	+	+	Ausente	Ausente	0	+
ESq IV									
Coe2DOP	++	+++	++++	++	+	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	++	0
ESq3 3B									
Coe2DOP	++	+++	++++	++	+	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	++	0
ESq3 3a									
Coe2DOP	++	+++	++++	++	+	<b>Presente</b>	<b>Presente</b>	++	0
ESq2c 3c									
Coe1DOP	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
ESq2 I									
Coe1DOP	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
ESq2 II									
Coe1DOP	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
ESq2 II									
Coe1DOPE	++++	++	++	+++	+	<b>Presente</b>	Ausente	0	+
Sq2 II									

#### IV.4.2 Piloto do implante *in vivo* dos segmentos de membrana: bexiga

No único implante realizado em bexiga, observa-se resultado pouco satisfatório, macroscopicamente, visto a presença de uma massa enrijecida no local do implante, após o sacrifício do animal. Os animais permaneceram 21 dias com o implante sendo ausentes episódios de febre e infecção relatados (Figura 56).



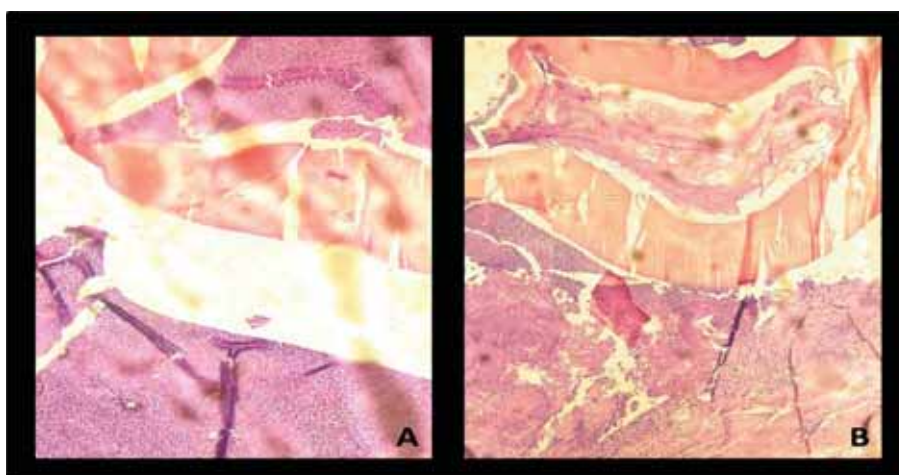
**Figura 56:** Piloto do implante *in vivo* do segmento de membrana em bexiga. Aspecto macroscópico.

Fotos: Arquivo Pessoal, 2011

- **Avaliação histomorfológica das amostras: bexiga**

Observou-se ausência de bactérias, necrose, ulceração e hemácias. Foram encontrados focos de macrófagos, PMN, edema e fibroblastos apontando para processo inflamatório. (Figura 57).

Não houve a degradação da membrana de quitosana conforme descrita em muitos trabalhos<sup>15,16,17</sup>. Em contraposição, Kim *et al*, 2011<sup>79</sup> comparam a quitosana com outros polímeros disponíveis no mercado, analisando a resposta imune e a biodegradação *in vivo*, em aplicações neurológicas em ratos. Os resultados encontrados neste piloto corroboram os dados destes autores que observam que a massa de quitosana é identificável até 6 meses depois da aplicação. Houve aumento da resposta imune e inflamatória sem alterar o perfil de degradação. Estes resultados demonstram que a quitosana é um biomaterial relativamente inerte que não provoca uma resposta imune crônica sendo adequada para aplicações de longo prazo<sup>79</sup>.



**Figura 57:** Resultado histologia piloto implante in vivo: Bexiga. Em “A”, membrana de quitosana ao meio. Aumento de 100x. Em “B”, aumento de 50x. Coloração H&E.

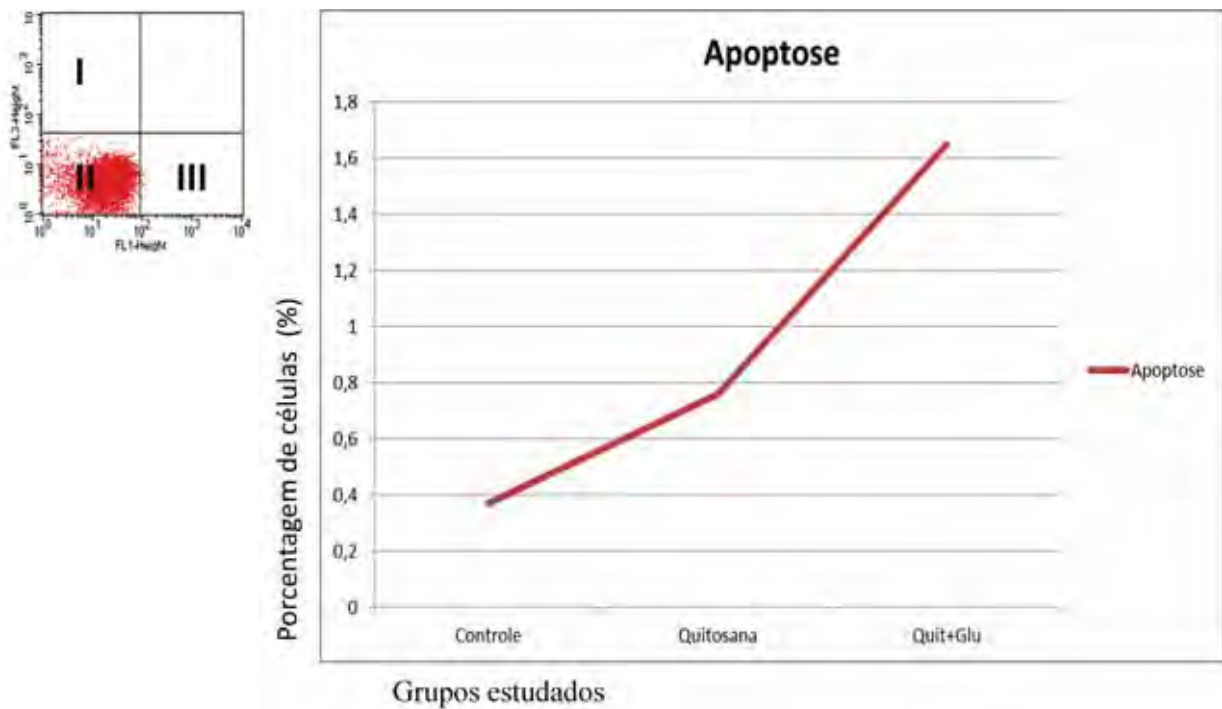
Fotos: Arquivo Pessoal, 2012

## IV.5 Análise Estatística

### IV.5.1 Testes de toxicidade residual dos *scaffolds*: Caspase-3 e Anexina-V/Iodeto de Propídio

- Caspase-3

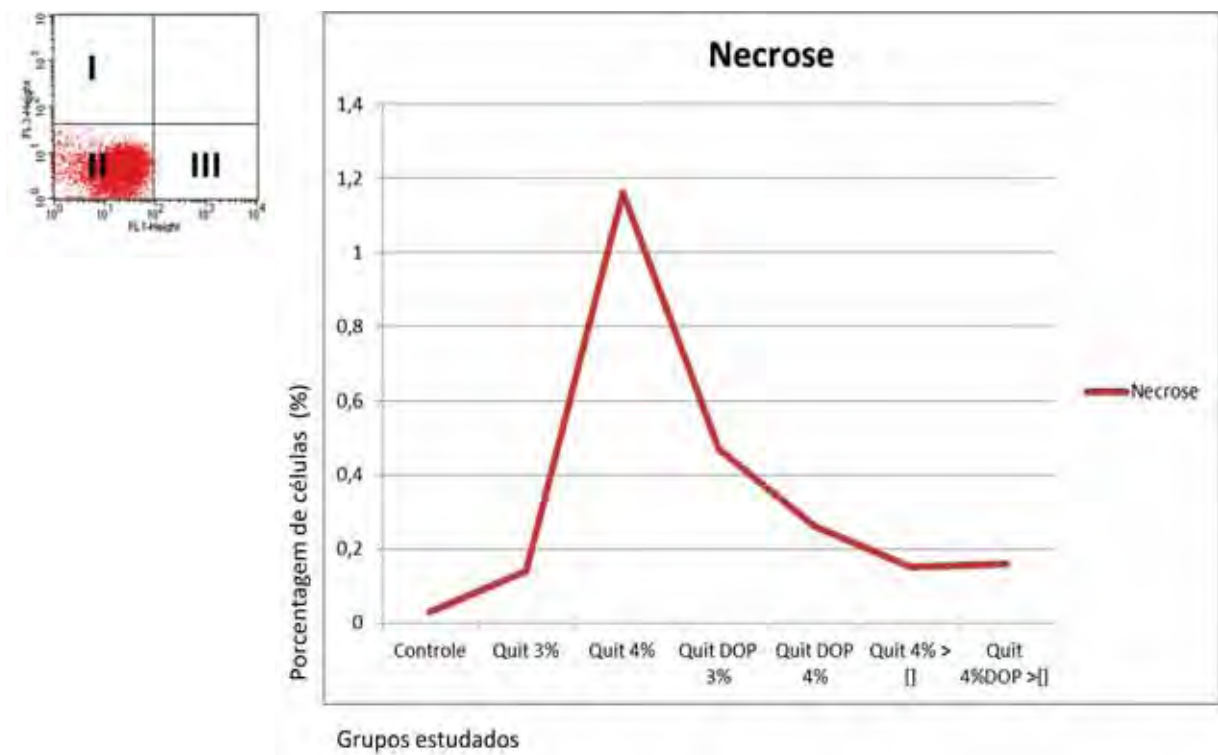
No gráfico 1 são mostrados os resultados referentes à apoptose induzida pela via das caspases nos testes em quitosana pura e quitosana contendo solução de glutaraldeído 0,25%. Níveis significativamente aumentados foram detectados na amostra contendo glutaraldeído, evidenciando a alta toxicidade desse composto.



**Gráfico 1:** Resultados referentes à apoptose induzida pela via das caspases nos testes em “Quitosana pura” e “Quitosana contendo solução de glutaraldeído 0,25%”. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

- Anexina V

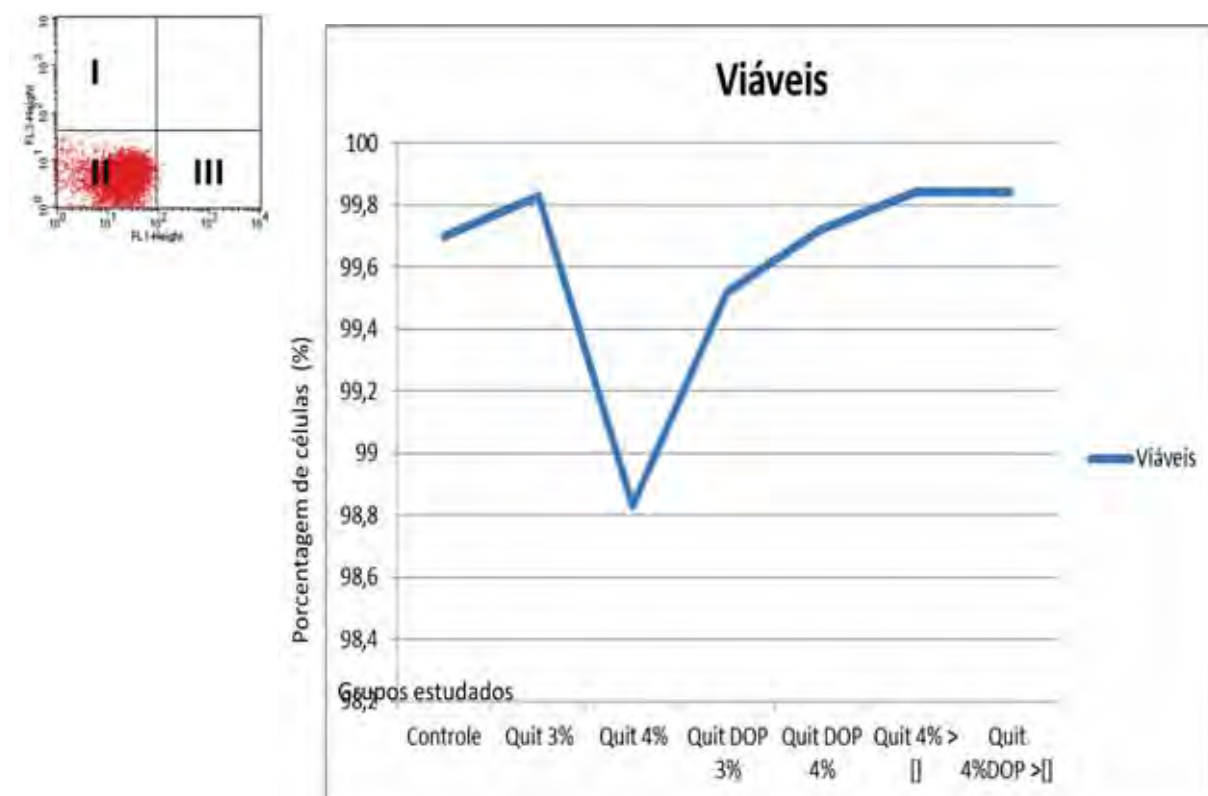
No gráfico 2 são mostrados os resultados referentes à necrose celular (quadrante I nos *dot plots*), expressa pelo PI, conjugado no kit de Anexina, quando em contato com as membranas dos subgrupos elencados no estudo. Observou-se, de forma geral, ausência de indução à necrose, sendo os resultados considerados significativos ( $p < 0,0115$ ). O subgrupo “Quitosana 4%” demonstrou o maior desvio-padrão em relação aos outros subgrupos, apresentando indícios de um possível início de indução à necrose, visto o deslocamento vertical da massa celular nos *dot plots*.



**Gráfico 2:** Resultados referentes à necrose celular, expressa pelo PI, quando em contato com as membranas dos subgrupos elencados no estudo. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

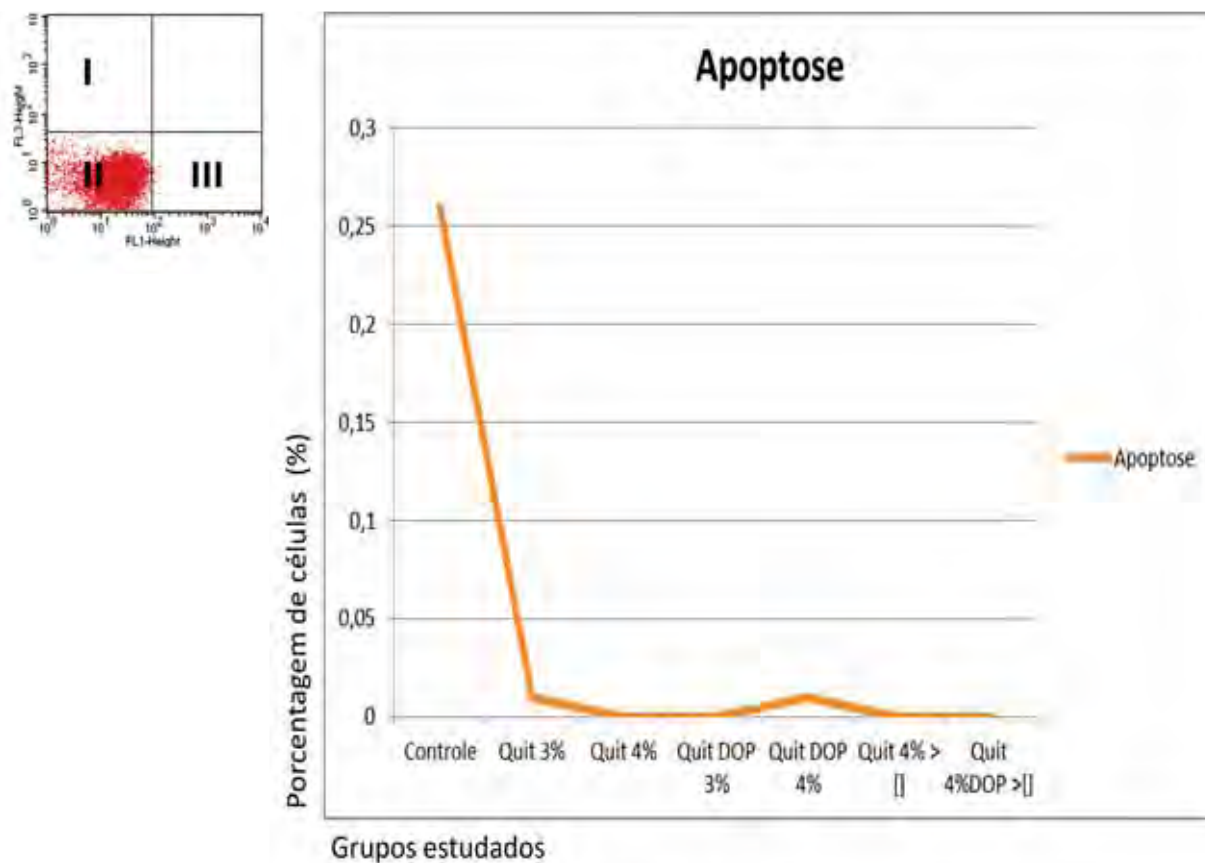


No gráfico 3 são mostrados os resultados referentes a viabilidade celular (quadrante II dos *dot-plots*) quando em contato com a membrana de quitosana, nos seis subgrupos elencados no estudo, a partir do teste de Anexina V/PI. Puderam-se observar resultados com alto nível de significância ( $p < 0,0192$ ), especificamente quando se comparou o subgrupo “Quitosana 4%” com os subgrupos “Quitosana 4% em maior concentração” e “Quitosana 4% dopada em maior concentração”.



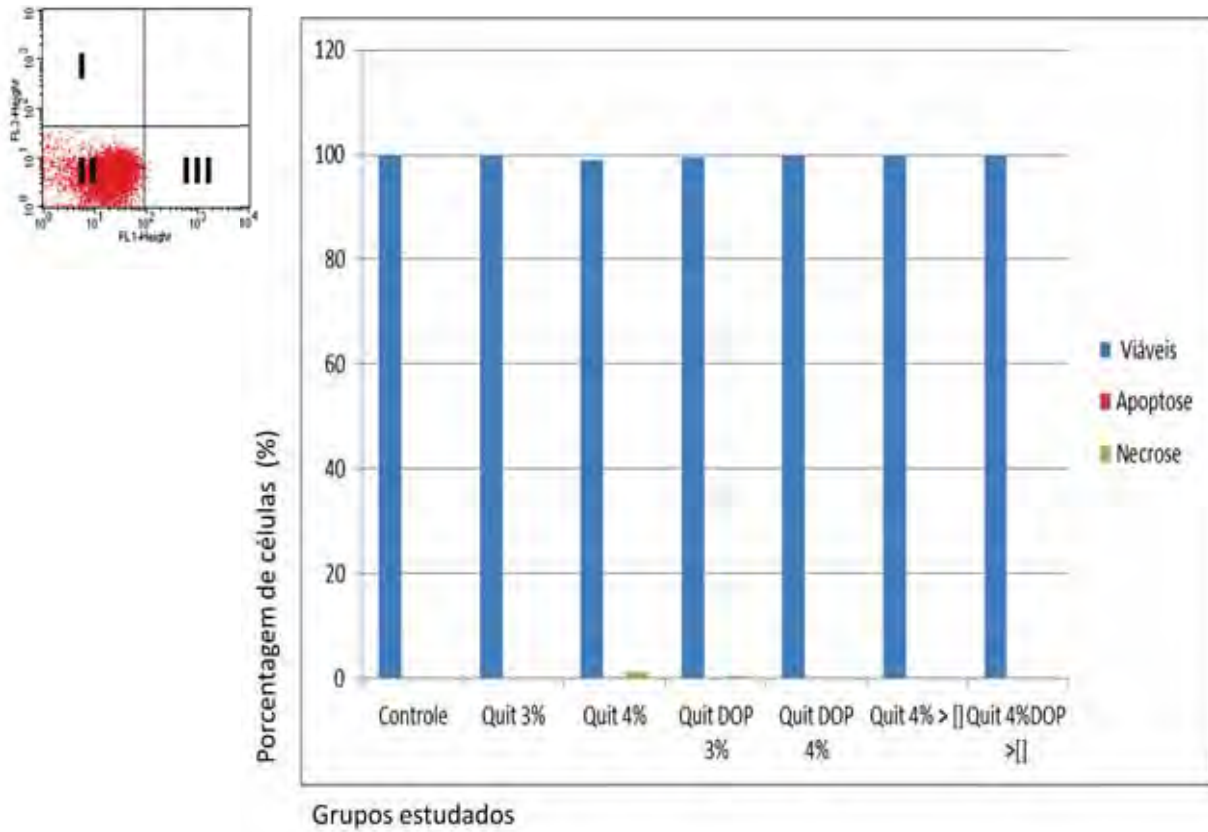
**Gráfico 3:** Resultados referentes à viabilidade celular quando em contato com a membrana de quitosana, a partir do teste de Anexina V/PI. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

No gráfico 4 são mostrados os resultados referentes à apoptose celular induzida quando em contato com as membranas pertencentes aos seis subgrupos elencados (quadrante III nos *dot plots*). Devido a ausência de indução a apoptose em todos os subgrupos se apresentar de forma muito semelhante, não houve diferença significativa ( $p = 0,0691$  ou  $p > 0,05$ ) entre os resultados nesse caso, demonstrando o perfil homogêneo para todas as amostras.



**Gráfico 4:** Resultados referentes à apoptose celular induzida quando em contato com as membranas pertencentes aos seis subgrupos elencados. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

No gráfico 5 são mostrados os resultados provenientes do cruzamento entre as três variáveis: necrose, células viáveis e apoptose; referindo-se aos quadrantes I, II e III nos *dot plots*, respectivamente. Ao compararmos concomitantemente as variáveis, observou-se diferença considerada extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) entre as células viáveis e células em apoptose/necrose, demonstrando a ausência de citotoxicidade do polímero quando em contato com células de músculo liso de coelhos.



**Gráfico 5:** Resultados provenientes do cruzamento entre as três variáveis: necrose, células viáveis e apoptose. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio-padrão.

## V. Conclusões

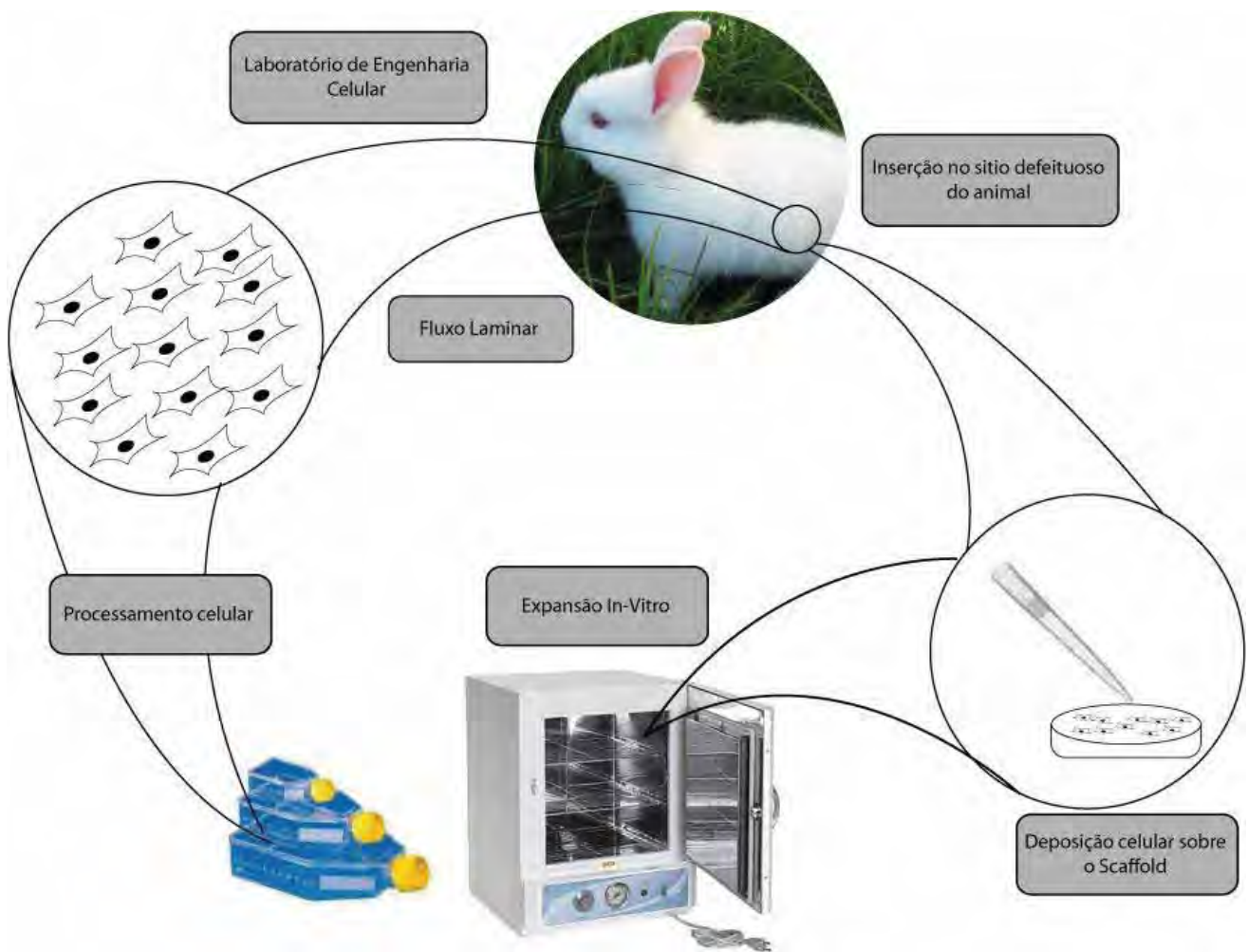
- ✓ Foi padronizada a produção de membranas com diferentes composições, variando a concentração de ácido e quitosana adicionados;
- ✓ Os protocolos de obtenção, processamento e amplificação das células de músculo liso foram delineados com reprodutibilidade. As células musculares foram primeiramente caracterizadas fenotipicamente pelo método de CF, com o anticorpo de especificidade antiCD-90. A validação foi realizada por ICQ com os anticorpos HHF35, 1A4 e *Alpha-Smooth Muscle Actin (alpha-SMA) Antibody* apresentando positividade para as células de músculo.
- ✓ A análise de toxicidade utilizando teste de viabilidade e índice de apoptose por Anti-Caspase-3 em citometria de fluxo, aponta ausência de apoptose celular, quando em contato com as membranas, induzida pela Via da Caspase-3. A utilização da solução de glutaraldeído a 0,25% confirmou-se inviável devido à extrema toxicidade induzida pelo produto.
- ✓ Foi possível comprovar a adesão das células ao *scaffold* com e sem a utilização do fator promotor de adesão Puramatrix e nanocristais Qdot®. As células aderiram à parede do *scaffold* e foram observadas no teste de imunofluorescência.
- ✓ Foi possível realizar avaliação das atividades antimicrobiana e antifúngica da membrana, embora a metodologia utilizada possa ser considerada insatisfatória devida sua inespecificidade em testes com o polímero proposto.
- ✓ Foi possível a reprodutibilidade de um modelo de membrana a ser utilizado em procedimento cirúrgico.
- ✓ Os protocolos de implantação *in vivo* foram considerados insatisfatórios, demonstrando a necessidade de estudo do potencial imunogênico da membrana.

## **Perspectivas**

1. Implantar novas membranas, com diferentes concentrações, na bexiga dos animais.
2. Estudar potencial imunogênico da membrana.
3. Realizar estudo específico da avaliação antifúngica e antimicrobiana da membrana.
4. Aplicar células de músculo liso autólogas na membrana e inseri-las novamente nos animais, constituindo a terapia celular propriamente dita.

## **Proposta de inserção de células autólogas: terapia celular propriamente dita**

Para a montagem do modelo proposto, retira-se uma amostra da túnica muscular vesical por uma pequena incisão, sendo toda a manipulação do tecido em questão realizada em capela de fluxo laminar. O conteúdo celular será processado e as células expandidas *in vitro*. As membranas serão produzidas e submetidas à esterilização pelo método *Sterrad*<sup>®</sup>. Na superfície das membranas serão depositadas  $1 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup> do polímero, padronizados previamente. Após a aplicação, a matriz contendo as células será colocada em placa de seis poços, não aderente e deixada em estufa por duas horas para a concretização da adesão celular inicial ao *scaffold* (segundo POP do laboratório de Engenharia celular). Transcorrido o tempo, será adicionado meio de cultura próprio para músculo liso. O conjunto será mantido em estufa de CO<sub>2</sub>, com umidade controlada a 37°C até que a completa adesão celular ao *scaffold* seja realizada. O monitoramento será realizado por microscópio invertido Axiovert 200<sup>®</sup>, Zeiss<sup>™</sup> até o momento da cirurgia. Previamente ao procedimento cirúrgico será utilizado um transdutor de pressão de água, que possibilitará a determinação da pressão vesical inicial e final, pressão abdominal inicial e final, pressão detrusora máxima, capacidade e complacência vesicais. O conjunto será aplicado sobre a submucosa vesical de coelho. O desenvolvimento de cada animal será avaliado, sendo nova análise urodinâmica realizada previamente à eutanásia dos animais. O tecido referente ao local do implante será retirado após 30 dias para realização de avaliação histomorfológica. Os segmentos serão avaliados quanto à presença ou ausência de implante, fibrose, processo inflamatório, reação de corpo estranho e calcificação. Os animais serão submetidos à avaliação dos aspectos macroscópicos, anatomopatológicos e urodinâmicos da bexiga (estudo cistométrico). A idealização proposta é evidenciada a seguir. (figura 58).



**Figura 58:** Etapas de construção do modelo envolvendo os princípios da Terapia celular propriamente dita.

## Referências

1. GEORGE, N.J.R.; O'REILLY, P.H.; BERNARD, R.J. High pressure chronic retention. *Br Med J*, v. 282, p. 1780-1783, 1983.
2. McGUIRE, E.J.; WOODSIDE, J.R.; BORDEN, T. A.; WEISS R.M. Prognostic value of urodynamic testing in mielodysplastic patients. *J Urol*, v. 126, n.2, p.205-209, 1981.
3. LAPIDES, J.; DIOKONO, A.; LOWE, B.S.; KALISH, M.D. Followup on unsterile, intermittent self-catheterization. *Trans Am Assoc Genitourin Surg*, v. 9, p.29-32, 1973.
4. NOVICK, A.C., STRAFFON, R.A., BANOWSKY, L.H., et al. Experimental bladder substitution using biodegradable graft of natural tissue. *Urology*, v.10, p.118-27, 1977.
5. JACOBINO, M. A., Sociedade Brasileira de urologia. Disponível em <<http://www.sbu.org.br/>> São Paulo, Brasil. Acesso em: 10/02/2011.
6. FENG, C., Xu Y M, Fu Q, Zhu W D, Cui L, Chen J. Evaluation of the biocompatibility and mechanical properties of naturally derived synthetic scaffolds for urethral reconstruction. *Biomed Mater Res*. 2010; 94A:317 - 25.
7. TANAGHO, E.A.; McAninch, J.W.; *Urologia Geral*, 13ª edição, p.6, 1992.
8. HELMUS, M. H., Tweden K. *Materials Selection*. In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. New York: CRC Press; 1995. pt A, v.1, p. 27 - 59.
9. Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos- Engenharia de Tecidos. Disponível em: <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/engtecidos.htm> Minas Gerais, Brasil. Acesso em: 11/04/2010.
10. KAWACHI, E. Y., Bertrand C A, dos Reis R R, Alves O L. *Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar*. *Quim Nova*. 2000; 23: 518 – 22.
11. AHMED, E.A., Mohamed AEH, Ashraf T. Hafez. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int*. 2004; 94: 1132–5.
12. CHESTER, J.K., Atala A. *Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine*. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1113-25.
13. SANTOS Jr., A. *Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico*. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 150p.
14. MARK, J.E. e CALVERT, P.D. *Biomimetic, hybrid and in situ composites*. *Materials Science and Engineering: C*, v.1, n.3, p.59-173, 1994.

15. TÖRMÄLÄ, P.; POHJONEN, T. e ROKKANEN, P. *Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (Part H)*, v.212, p.101-111, 1998.
16. GLEESON, M., GRIFFITH, D. P *The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. J. Urol.*, v.148, p. 1377-82, 1992.
17. CHANDY, T.; SHARMA, C. P. *Chitosan matrix for oral sustained delivery of ampicilin. biomaterial*, v. 12, n. 12, p. 65-70, 1993.
18. MUZZARELLI, R. A. A.; *Chitin Chemistry, 1<sup>st</sup> ed.*, Pergamon Press Ltd: Oxford, 1978.
19. KUBOTA, N.; Tastumoto, N.; Sano, T.; Toya, K.; *Carbohydr. Res.* 2000, 324, 268.
20. KAFETZOULOS, D.; Martinov, A.; Bouriotis, V. *Em Chitin Enzymology; Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, 1993, p. 147.*
21. SINGLA, A. K.; Chawla, M.; *J. Pharm. Pharmacol.* 2001, 53, 1047.
22. LE DUNG, P.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Desbrières, J.; *Carbohydr. Polym.* 1994, 24, 209.
23. TONHI, E; PLEPIS, A. M. G.; *Química Nova* 2002, 25, 943.
24. HIRANO, S.; *Biotechnology. Annual Research.* 2, 237-258, 1996.
25. CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. e QUEIROZ, D.C. *Quitosana – A fibra do futuro, Padetec, 1999. 124p.*
26. D'AMICO, EA. *Fisiologia Plaquetária. In: Maffei FHA. et al. Doenças vasculares periféricas. 4<sup>a</sup>ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.*
27. ABRAMS, CS; Plow, EF. *The molecular basis of platelet function. In: Hoffman, R. et al. Hematology: basic principles and practice. 5 ed. 2008.*
28. ROMAN, P. and BOLTA, Z. *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft-tissue injuries Acta Dermatoven APA Vol 16, 2007, No 4.*
29. BOATENG, J.S.; et al. *Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. Journal of pharmaceutical sciences, 2008; 97 (8).*
30. GOBO-OLIVEIRA, M. *Estudo comparativo de gel de plaquetas home made versus hidrocolóide no processo de cicatrização de úlceras crônicas de etiologia venosa. 2011 [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.*
31. KUMAR, V.; Abbas AK. *Fausto N. Robbins e Cotran. Patologia – bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.*



32. LENHARO, A; Cosso F; Magalhães D; Menezes, HHM. *Plasma rico em plaquetas. In: Pontual, MAB; Magini, RS. Plasma rico em plaqueta – PRP e fatores de crescimento. São Paulo: Livraria Santos, 2004.*
33. KAMYKOWSKI, J., Carlton P, Sehgal S, Storrie B. *Quantitative immunofluorescence mapping reveals little functional coclustering of proteins within platelet {alpha}-granules. Blood. 2011 Aug 4;118(5):1370-3.*
34. ROBACK, J.D.; et al. *Technical Manual. 16<sup>th</sup>. AABB, 2008.*
35. MOROZ, A. *Avaliação de novas propostas em arcabouços tridimensionais (3D) para cultura de células-tronco mesenquimais e condrogênese Tese. Botucatu: Universidade Estadual Paulista; 2009.*
36. DI FLORA, D; *Determinação da forma farmacêutica do gel de plaquetas por estudos de estabilidade e reologia. 2009. [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.*
37. NAVARRO, E. C.; *Curativos Bioativos: Estudo da forma farmacêutica, vida de prateleira e controle de qualidade, 2008. [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.*
38. KORSTANJE, R.; O'Brien, P.C.M.; Yang, F.; Rens, W.A.; Bosma, A.. *Complete homology maps of the rabbit (Oryctolagus cuniculus) and human by reciprocal chromosome painting. Cytogenet Cell Genet 86:317–322 (1999).*
39. VAN lith, h.a.,a l.f.m. van ZUTPHEN,a and m.a. ferguson-smithc.
40. LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI Z. *Apoptosis, autophagy and more. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology v.36, p. 2405-2419, 2004.*
41. GUIMARÃES C.A.; LINDEM,R. *Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. Eur. J. Biochem. v.271, p.1638-1650, 2004.*
42. BAEHRECKE, E.H. *How Death Shapes Life During Development. Nature Reviews Molecular Cell Biology v.3, p.779-787, 2002.*
43. VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. *Cell Death in Development. Cell v.96,p.245-254, 1999.*
44. JACOBSON MD, Weil M, Raff MC. *Programmed cell death in animal development. Cell. 1997 Feb 7;88(3):347-54.*
45. HUPPERTZ B, Frank HG, Kaufmann P. *The apoptosis cascade--morphological and immunohistochemical methods for its visualization. Anat Embryol (Berl). 1999 Jul;200(1):1-18.*
46. OVERBEEKE R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. *Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis. 1998 Mar;3(2):115-21.*

47. GUILHERME, G.R.B. *Comparação do índice Apoptótico Progressivo em cultura de condrócitos*, 2006.
48. COHEN, G. M. *Caspases: the executioners of apoptosis*. *Biochem J.* v. 326, p.1-16, 1997.
49. ALNEMRI, E.S.; LIVINGSTON, D.J.; NICHOLSON, D.W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N.A.; WONG, W.W.; YUAN, J. *Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature*. *Cell* v.87, p. 171, 1996.
50. GERKE, V.; MOSS, S.E. *Annexins; From structure to function*. *Physiol. Rev.* V.82, p.331-371, 2002.
51. SEATON, B.A.; DEDMAN, J.R. *Annexins*. *BioMetals* v. 11, p. 399-404, 1998.
52. BEVERS, E. M.; COMFURIUS, P.; DEKKERS, D.W.C.; ZWAAL, R.F.A. *lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells*. *Biochimica et Biophysica Acta* v.1439, p.317-330, 1999.
53. KAUFFMANN, P.; FRANK, H.G.; HUPPERTZ, B. *The apoptosis Cascade – morfological and imunohistochemical methods for its visualization*. *Anat. Embryol.* v. 200, p.1-18, 1999.
54. [Classificação internacional: de doenças e problemas relacionados à saúde](#) *Cid-10*, v. 1.2000.
55. FRANCO, D.; Gonçalves, L. F. *Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado*. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2007.
56. GOISSIS G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. *Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts*. *Artif Organs*. 2000; 24: 217-23.
57. SINGLA, A. K.; Chawla, M.; *J. Pharm. Pharmacol.* 2001, 53, 1047.
58. QIN, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. *Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs*. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 1-33, 2004.
59. SINHA, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S.; *Int. J. Pharm.* 274, 2004.
60. KHAN T., Peh K., Ch`ng H., “Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods”, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 5 (3), 205–212, 2001.
61. SIGNINI, R., “Estudo das relações estruturas/propriedades de quitina e quitosana”, 2002. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos- USP- São Paulo.

62. FRAGA, A.F. Martins, F. B.; Rigo, E. C. S.; Boschi, A. O. *Ensaio mecânico de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio*. 2006.
63. Companhia Brasileira de esterilização. Disponível em: [http://www.embraester.com.br/embraester/asp/main\\_PPH.asp](http://www.embraester.com.br/embraester/asp/main_PPH.asp). São Paulo, Brasil. Acesso em: 11/09/2011.
64. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [<http://www.anvisa.gov.br>]. Brasília. *Manual de controle Interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos*[Documento online]. 2006 [Acesso em 04 jan 2011]. Disponível em:[http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas\\_public\\_teste\\_sensibilidade.pdf](http://www.anvisa.gov.br/reblas/reblas_public_teste_sensibilidade.pdf)
65. ALVARADO, L.G. *Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas*, 2011. [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.
66. BD™ PuraMatrix™ Peptide Hydrogel Guidelines for use catalog number 354250 BD/Biosciences. Disponível em: [http://www.puramatrix.com/protocol\\_pdfs/PuraMatrix\\_Guidelines.pdf](http://www.puramatrix.com/protocol_pdfs/PuraMatrix_Guidelines.pdf). Acesso em: 25/10/2011.
67. BERTANHA, M. *Estruturação ex-vivo de vasos sanguíneos a partir da diferenciação de células tronco de coelhos*. 2011. [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.
68. BEPPU, M. M., ARRUDA, E. J. e SANTANA, C.C. *Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana*. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. - Out/Dez – 1999.
69. EVARISTO, T.C. *Modelo Experimental de neotraquéia em coelho utilizando técnicas de engenharia de tecidos*. 2011 [Dissertação] Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu, São Paulo.
70. WU W., CHENG, X, ZHAO Y., CHEN, F. FENG, X, MAO, T. *Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: experimental study in rabbits*. *Artif Organs* 2007; 31(11):826-50.
71. ROH J.L., KIM DH, RHA K.S., SUNG M.W., KIM K.H., Park C.L. *Benefits and risks of mitomycin use in the traumatized tracheal mucosa*. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2007; 136:459-63.
72. NAKAGISHI Y., MORIMOTO Y., FUJITA M. OZEKI Y., MAEHARA T., KIKUCHI M. *Rabbit model of airway stenosis induced by scraping of the tracheal mucosa*. *Laryngoscope* 2005; 115: 1087-92.
73. GODFREY, K. A.M. *Statistic in practice. Comparing the means of several groups*. *N Engl J Med*. 1985; 313:450-6.

74. CLETO, N. G; Alves, FC ; Inácio, JC ; Vieira, HS ; SOARES, C. T. ; Nascimento, D.C ; CAMARGO, E. A.; Salvadori, DMF; FERREIRA, R. R. ; DEFFUNE, E. . *Cell Therapy in the Healing of Chronic Wounds*. In: P.R. Fernandes; P.J. Bártolo; J. Folgado; F.H. Rodrigues; R.B.Ruben; H. Almeida; M.R.Dias. (Org.). *Proceedings of II International Conference on Tissue Engineering*. 1<sup>a</sup> ed. Lisboa: IST Press, 2011, v. 1, p. 275-278.
75. COTELLE, S. & FÉRARD, J.F. (1999) *Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34: 246-255.
76. KOLF, C. M., Cho, E. and Tuan, R. S. *Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Research & Therapy* 2007.
77. SHAPIRO, H. M. *Practical Flow Cytometry*, 3rd. ed. New York: Wiley-Liss, Inc., 1995.
78. STROME S E, Sansville E A, Mann D. *A mechanistic perspective of monoclonal in 113redef therapy beyond target – related effects*. *The Oncologist*. 2007; 12: 1084 – 95.
79. Kim H, Tator CH, Shoichet MS. *Chitosan implants in the rat spinal cord: biocompatibility and biodegradation*. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Jun; 15; 97(4):395-404.

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JOSÉ DE SOUZA CARVALHO"  
FACULDADE DE BOTUCATU



Associação Brasileira de Experimentação em Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JOSÉ DE SOUZA CARVALHO"

# Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 868-2011) Proposta de modelo experimental de ampliação vesical em coelhos utilizando técnicas de engenharia de tecidos em scaffold de Quitosana, a ser conduzido por Regina Avelina de Moraes da Silva, orientada pela Profª. Drª. Elenice Deffune, co-orientada pelo Prof. Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, com a colaboração de Leandro Garcia Alvarado e Priscila Murador, com o apoio técnico de Carlos Roberto Gonçalves Lima, Ednelson Henrique Bianchi e José Lucas de Carvalho, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "coelhos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 31/03/2011.

*Maria Rosa Bet Moraes Silva*  
Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA

*Alberto Santos Capelluppi*  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário da CEEA

### JUSTIFICATIVA DE ALTERAÇÃO NO TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Declaramos que o Projeto de Pesquisa "Proposta de modelo experimental de ampliação vesical em coelhos utilizando técnicas de engenharia de tecidos em scaffold de quitosana"

aprovado pelo CEP em 31/03/2011, teve seu título alterado para " Utilização de técnicas de Engenharia de Tecidos para validação do uso do scaffold de Quitosana em ampliação vesical de coelhos", sem nenhuma alteração no seu conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

A presente alteração foi efetuada somente para adequação do título da Dissertação de Mestrado.

Botucatu, 30/01/2012

Nome/Assinatura do(a) aluno(a) Regino Avelino de Moraes da Silva

Nome/Assinatura do(a) orientador (a) [Assinatura]

Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento- Biotecnologia Médica.

**Preencher formulário em 2 vias e protocolar no respectivo CEP**

Comissão Especial em Pesquisa  
Comissão de Controle Financeiro e Administrativo  
14/02/12  
[Assinatura]  
Secretaria de Administração