

“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU – HEMOCENTRO

**EXPANSÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS UROTELIAIS EM
SCAFFOLDS 3D**

Regina Avelina de Moraes da Silva

Botucatu
2010

Regina Avelina de Moraes da Silva

**EXPANSÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS UROTELIAIS EM
SCAFFOLDS 3D**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP campus de Botucatu como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biomédicas.

Orientador (a): Dra. Elenice Deffune
Co-orientador (a): Ms. Priscila Murador

Botucatu
2010

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

Silva, Regina Avelina de Moraes da.

Expansão *ex vivo* de células uroteliais em *scaffolds* 3D / Regina Avelina de Moraes da Silva. - Botucatu, 2010.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

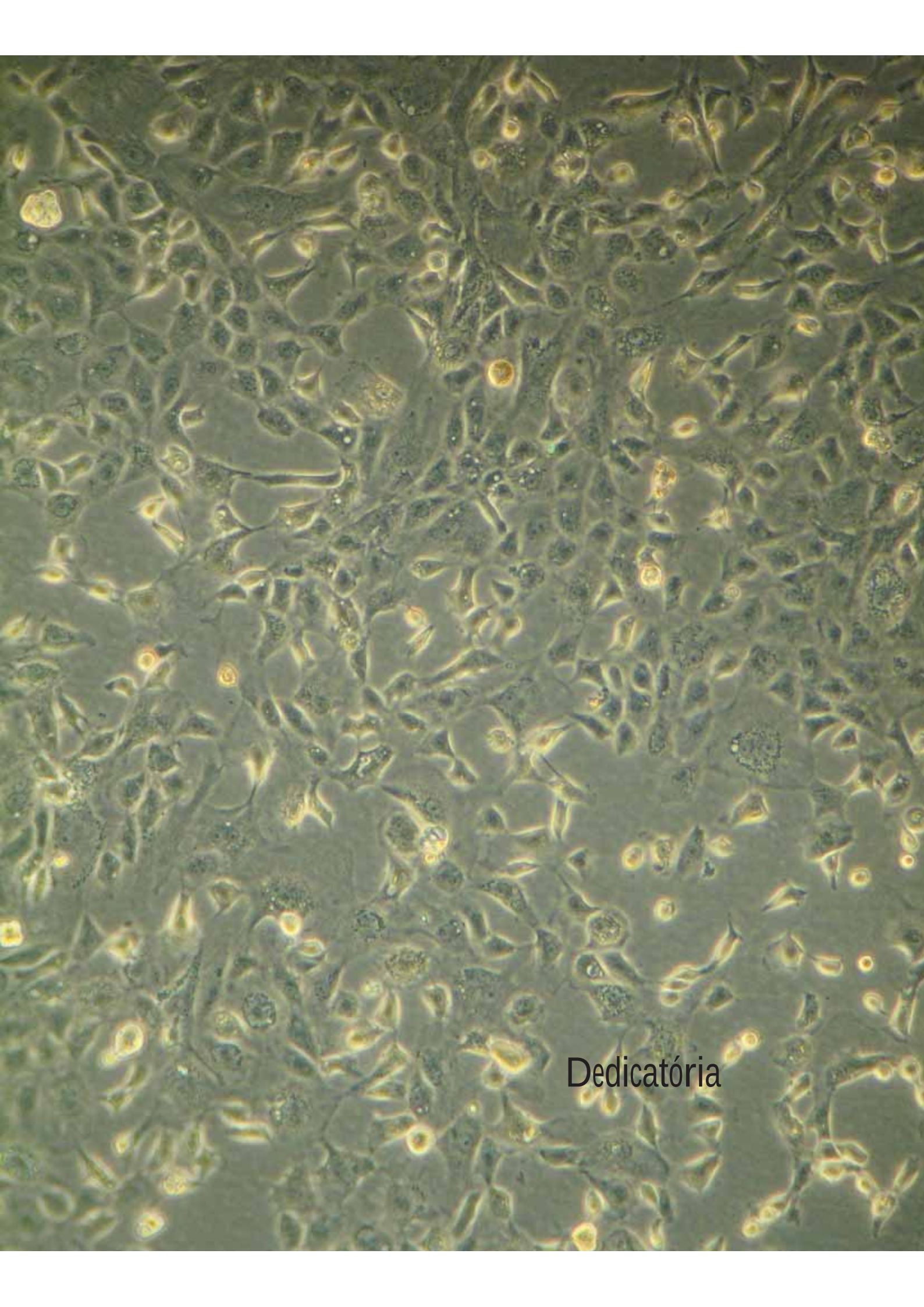
Orientador: Elenice Deffune

Co-orientador: Priscila Murador

Capes: 20303025

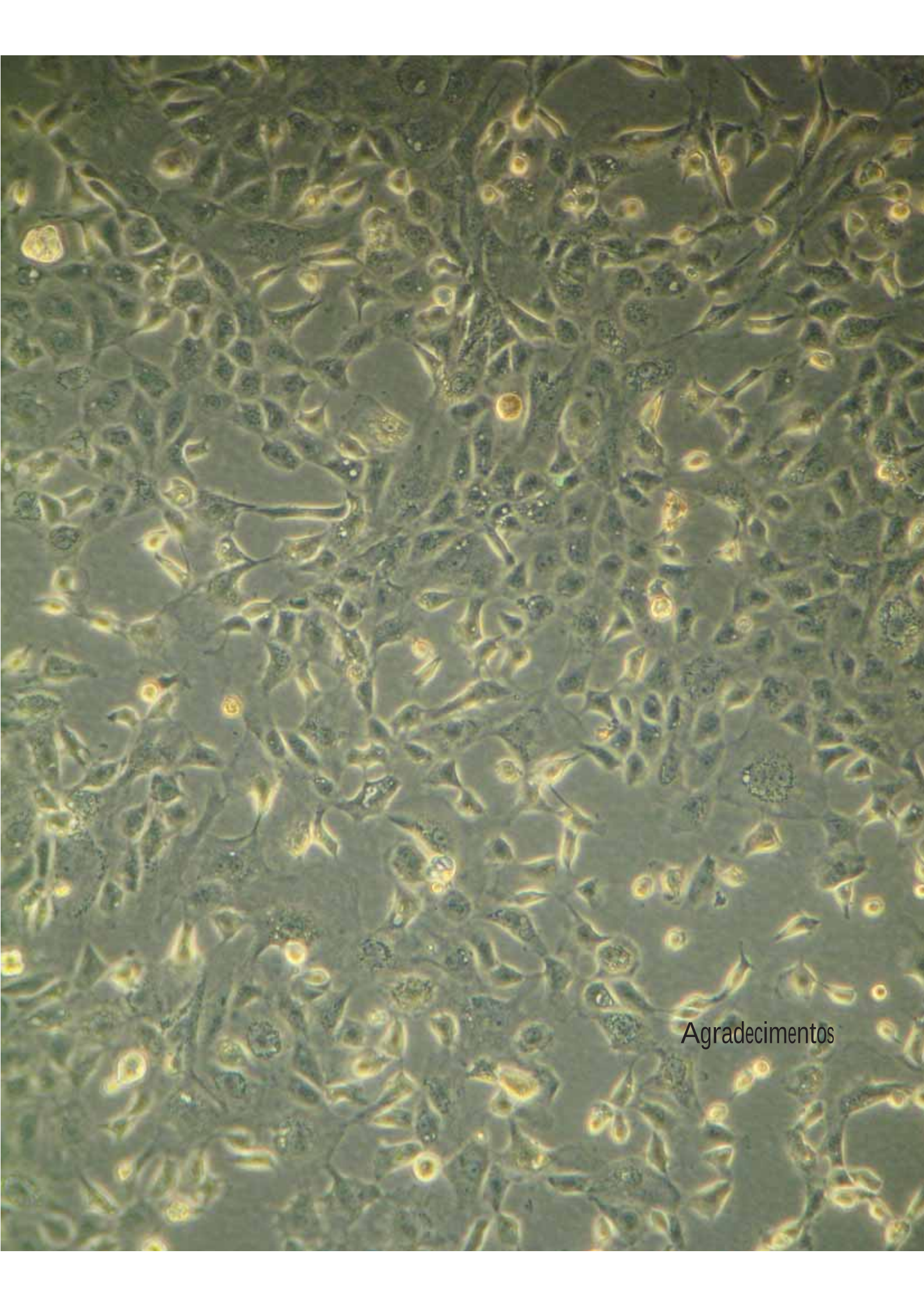
1.Urotélio 2. Medicina regenerativa.

Palavras-chave: Urotélio; Medicina Regenerativa; Terapia Celular;
Bioengenharia; Neo-uretra; Scaffolds 3D; Biomateriais.



Dedicatória

Dedico essa monografia a Deus e à minha família.



Agradecimentos

Agradecimentos

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

À Dra. Elenice Deffune, minha orientadora, pela confiança depositada em minha pessoa durante a execução desse trabalho. Pela oportunidade de me deixar fazer parte da equipe do Laboratório de Engenharia Celular e, portanto, a oportunidade de aprender a crescer como profissional e como pessoa. Obrigada pelos ensinamentos e pela oportunidade de conviver com uma pessoa de tamanha intelectualidade e sabedoria. Além de minha orientadora é alguém por quem tenho extrema admiração. Mais uma vez, o meu muito obrigado.

Ao Dr. Fernando Almeida e sua equipe; incluindo Letícia de Sá Barreto e Ricardo Pimenta Bertolla, ambos da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pelo encaminhamento ao Laboratório de Engenharia celular e o ponto de partida deste trabalho. Agradeço a oportunidade e confiança depositadas em mim.

Ao Dr. José Carlos Souza Trindade Filho pelo apoio e incentivo em relação à pesquisa proposta neste trabalho. Obrigada.

À Dra. Rosana Rossi Ferreira, pelo auxílio em todos os momentos solicitados, pelos ensinamentos sobre os demais projetos desenvolvidos no laboratório e pela pessoa que demonstra ser, sempre transparecendo otimismo por mais que o momento não o esteja.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luís Felisbino pelo auxílio e disponibilidade de seu laboratório para a realização das atividades propostas no trabalho e pela sua equipe, especialmente ao Andrei Moroz, pelo auxílio na execução deste, o meu muito obrigado.

À Priscila Murador, minha co-orientadora, exemplo de dedicação e disciplina. Alguém que me ensinou demais, não apenas em matéria profissional, mas em matéria pessoal. É, sem dúvida, uma grande amiga da qual a amizade vou levar ao longo de minha vida.

À Josy Campanhã Vicentini de Oliveira, pelo pronto auxílio sempre que solicitado, pela sua amizade e por me aturar todos esses dias. É alguém por quem tenho muito carinho.

À Aline Aun, Flávia Nogueira e Henrique Vieira. Vocês três foram pessoas essenciais no meu aprendizado aqui. Mesmo todos nós estando num contexto profissional parecido, aprendi muito com vocês e agradeço pela alegria e momentos de descontração que vocês me propuseram. Muito obrigada.

À Thaiane Evaristo. Muito obrigada pela ajuda, pelos conselhos, pela companhia, pelos momentos de descontração e pelos ensinamentos. Saiba que sua disciplina, organização e competência me serviram, e muito, de modelo para realização deste trabalho. Obrigada.

À Juliana Ravelli e Paula Scatena. Além de colegas de sala se tornaram verdadeiras amigas e companhias de todos os dias. Incrivelmente prestativas e prontas para qualquer imprevisto. Muito obrigada.

À Michele Janegitz Acorci Valério pela ajuda e pelo seu jeito tranquilo de ser. Sem dúvidas me mostrou que a calma e a serenidade é que contam em um bom profissional.

À Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves por me auxiliar na estruturação do trabalho e me doar um pouco de sua experiência.

A toda equipe do Laboratório de Engenharia celular. Todos, sem exceção, me ensinaram tudo o que foi indagado e foram sempre solícitos, jamais deixando de me ajudar em, sequer, uma mínima dúvida que tive ao longo desse tempo. O trabalho em equipe e a união de todos aqui é o que determina nosso sucesso. Sem vocês esse trabalho não teria saído do papel. Muito obrigada: Alexandro Fagner, Aline Del´Vescovo, Ângelo Govone, Armando, Daniel Jesuíno, Fátima Guimarães (Tata), Gabriel Santos, Gabrielle Reinoldes, Juliane Campos, Leandro Alvarado, Mariele Gobo, Márjorie Golim, Ondina Cotrim, Regiane Olimpio, Renan Padron, Renato Colenci, Vitória Souza, Woner Mion.

Ao Carlinhos e ao Ednelson pela dedicação, disponibilidade e paciência em todas as coletas de bexiga realizadas.

À equipe da graduação do IB, pela paciência em minhas inúmeras visitas durante a composição deste trabalho.

Aos funcionários do Hemocentro: Cléo, Esmite, Rita, Janice e Parré sempre prestativos.

Aos meus pais, Felisberto Pedro da Silva e Teresinha de Moraes da Silva, por serem exímios exemplos de perseverança, honestidade, caráter, e serem um dos pilares mais importantes de sustentação da minha vida. Meu muito obrigado por sempre apoiarem minhas decisões, me proporcionarem condições para meu crescimento pessoal e profissional e por eu ter o amor e o carinho de vocês constantemente. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus irmãos, Raphael Eduardo e Júlia Renata. O elo que nos une vai muito além dos outros que podemos imaginar. E é isso que faz com que não sejamos apenas amigos e companheiros, mas que sejamos sempre unidos, ou seja, que sejamos irmãos. Amo vocês.

Aos meus avós Elvira, José e Maria, por serem um motivo a mais para eu acordar todos os dias e me sentir feliz. 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 vem do fundo do meu coração e é infinito.

À minha família por inteiro. A qual foi, é e sempre será responsável pelo caráter que tenho, e pelas minhas 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 e, portanto, também terem sua parcela de responsabilidade pelo que sou hoje. Meu muito obrigado.

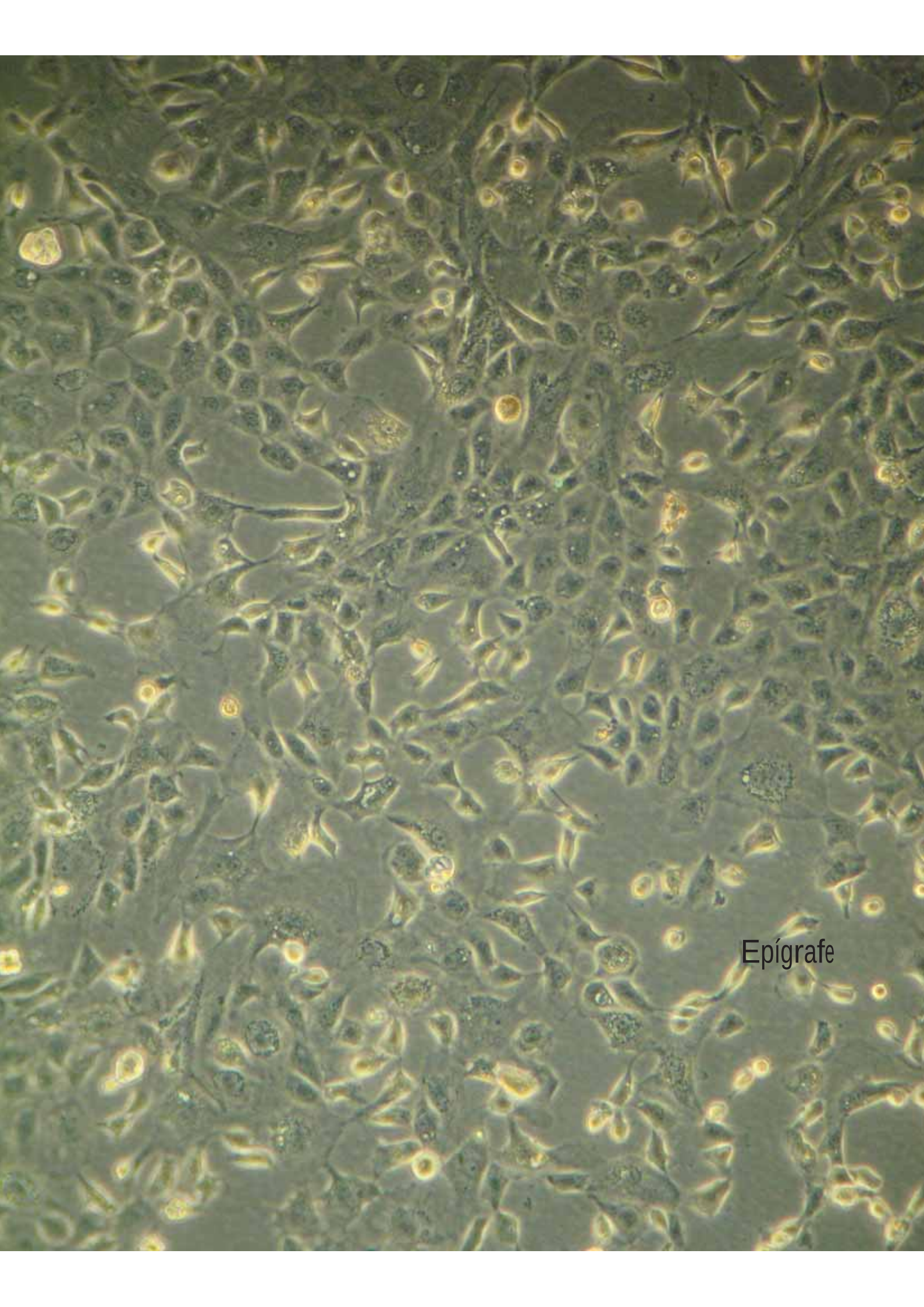
À Letícia, Renata, César e Márcia, pelos momentos de descontração desfrutados juntos. Vocês também são parte da minha família.

À minha segunda família, minha república, onde passei momentos inesquecíveis, bons e ruins ao lado de pessoas maravilhosas. Amo cada uma do seu jeito; em especial: Vanessa (Mixinga); Ana Carolina (Prof); Mariana (Pistolão); Tamara (Raitec); Natasha (Flácida); Camila (Mosquete); Natália (Montana); Maria Júlia (Joelminha); Gabriela (Premonição); Patrícia (Made-in), Pedro Bisson (Xú).

A toda turma da Biomedicina XLIII na qual fiz amigos que levarei para toda a vida. Em especial: Denise (Diarista); Mariana (Massa); Marianna (Kafa) e Martina (Isva).

Aos animais sacrificados para a realização deste trabalho.

A todas as demais pessoas que me ajudaram de alguma maneira nesse momento de minha jornada. Meu muito obrigado.



Epígrafe

“A serenidade é o teto da alma que pede o serviço por solução”

André Luís

Lista de Figuras

- Figura 1 - Princípio da Engenharia Tecidual: Expansão celular em matriz biodegradável e reimplantação no sítio defeituoso do paciente.Pág.23.
- Figura 2 – Gel de Plaquetas preparado no próprio Laboratório de Engenharia Celular visto macroscopicamente. Pág. 25.
- Figura 3 – Matriz acelular de aorta suína descelularizada para implantação das células uroteliais, aderidas ao gel de plaquetas, em seu interior..... Pág 26.
- Figura 4 - A bexiga e seu epitélio de transição ou urotélio. Esta figura mostra as características histológicas do epitélio da bexiga. É a presença de áreas modificadas de membrana celular denominadas placas que permite a plasticidade do tecido urotelial.....Pág.28.
- Figura 5 - Laboratório convencional ou *standard* - Laboratório de Atividades Complementares (LAC). Pág.37.
- Figura 6 - Área Limpa- área de *screening*. Pág. 37.
- Figura 7 – Área Limpa- Ambiente de Microscopia. Pág. 38.
- Figura 8 – Área Limpa- Área de manipulação Estéril. Pág. 38.
- Figura 9 – Etapa de dissociação mecânica do tecido urotelial.Em **A**, dissociação mecânica de bexiga de coelho com auxílio de cell scraper.....Pág. 41.
- Figura 10 – Pellet de células uroteliais formado após centrifugação das mesmas junto ao meio de cultura para realização de contagem celular..... Pág. 41.

Figura 11 - Ampolas na caixa (gaveta) de criopreservação. Compõem o Banco de Células presente no Laboratório de Engenharia celular.....	43
Figura 12 - Em A , material utilizado. Sonda uretral, fragmento de aorta, pinça estéril, placa de Petri. Em B , inserção da sonda uretral pela luz da aorta.....	46
Figura 13 – Em A , passagem da sonda uretral. Em B , Sonda totalmente atravessada. Em C , Fixação de uma das extremidades para implantação das células / células e gel.	47
Figura 14 - Em A , Nó cirúrgico impedindo transbordamento. Em B , Extremidade totalmente fechada. Em C , Implantação das células / células e gel.....	48
Figura 15 - Em A , modelo de neo-uretra contendo urotélio formado. Em B , vemos aorta apenas com as células e aorta com células e gel mantidos sob condições específicas em meio de cultura DMEM F12.	49
Figura 16 - Em A , vemos células em início de adesão. Objetiva de 100x. Em B , vemos células em adesão na objetiva de 200x. Em C , vemos células já aderidas apresentando globosidades características das células epiteliais. Objetiva de 200x.....	51
Figura 17 - Cultura de urotélio em plena expansão. Em D , Células epiteliais em início de adesão, objetiva de 100x. Em E , Células Epitelióides agrupadas delimitando um verdadeiro tecido ou monocamada, objetiva de 100x.....	52
Figura 18 - Em F , Células uroteliais em maior confluência, objetiva de 100x. Em G , Células uroteliais em aumento de 200x.....	52
Figura 19 - Urotélio com coloração H&E (Hematoxilina e Eosina). Em A temos uma objetiva de 100x. Em B , destaca-se formação epitelióide, em que as células permanecem ligadas por junções intercelulares. Objetiva de 200x.....	53

Figura 20 - Células apresentando resultado negativo para Anti-vimentina. Em C , vemos alguns focos celulares na objetiva de 100x. Em D , vemos focos maiores, com as células apresentando aspecto de epitélio.....	54
Figura 21 - Células uroteliais em <i>scaffold</i> -gel. Por apresentarem - se em estrutura 3D, fixadas ao gel, sua visualização é dificultada. Objetiva 100x.....	55
Figura 22 - Em A , células uroteliais implantadas no <i>scaffold</i> 3D ou Gel de Plaquetas, objetiva de 50X ph1. Em B , as células implantadas apresentam aspecto fibroblastóide, objetiva de 100x.....	56
Figura 23 - Em A vemos aorta descelularizada com células uroteliais encapsuladas em gel.....	58
Figura 24 - Em B , vemos urotélio depositado na porção interna na aorta, sem a presença de gel. As fotos apresentam-se em aumento de 200x Ph2	58
Figura 25 - Em C , vemos células aderidas ao suporte em coloração de Hematoxilina e Eosina.	58
Figura 26 - Em D , vemos células aderidas em coloração Tricromo de Masson, com finalidade de distinguir células do tecido conjuntivo circundante. Aumento 200 x Ph2.	58
Figura 27 - Células uroteliais aderidas delimitando o contorno da aorta. Coloração Tricromo de Masson 100x.....	59

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medicina Regenerativa	20
1.2 Terapia Celular.....	20
1.3 Engenharia Tecidual.....	21
1.4 Bioengenharia.....	23
1.5 Biomateriais.....	23
1.6 <i>Scaffolds</i> utilizados.....	24
1.7 Urotélio: Histologia e Embriologia.....	26
1.8 Justificativa.....	28

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2 Objetivos Específicos.....	31

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações.....	33
3.2 Animais.....	37
3.3 Isolamento da bexiga	37
3.4 Expansão <i>ex vivo</i> do urotélio.....	40
3.5 Criopreservação do Tecido.....	40
3.6 Decelularização.....	41
3.7 Implantação das células nos <i>Scaffolds</i>	42
3.8 Implantação das células na aorta.....	42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultura de células uroteliais.....	49
4.2 Implantação das células no <i>Scaffolds</i>	53
4.2.1 Implantação das células no <i>Scaffold</i> – gel.....	53
4.2.2 Implantação das células no <i>scaffold</i> – aorta.....	55
4.3 Histologia dos complexos <i>células – Scaffold</i> e <i>células em gel-Scaffold</i>	55

5.CONCLUSÕES.....	59
6. PERSPECTIVAS.....	61
7.REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

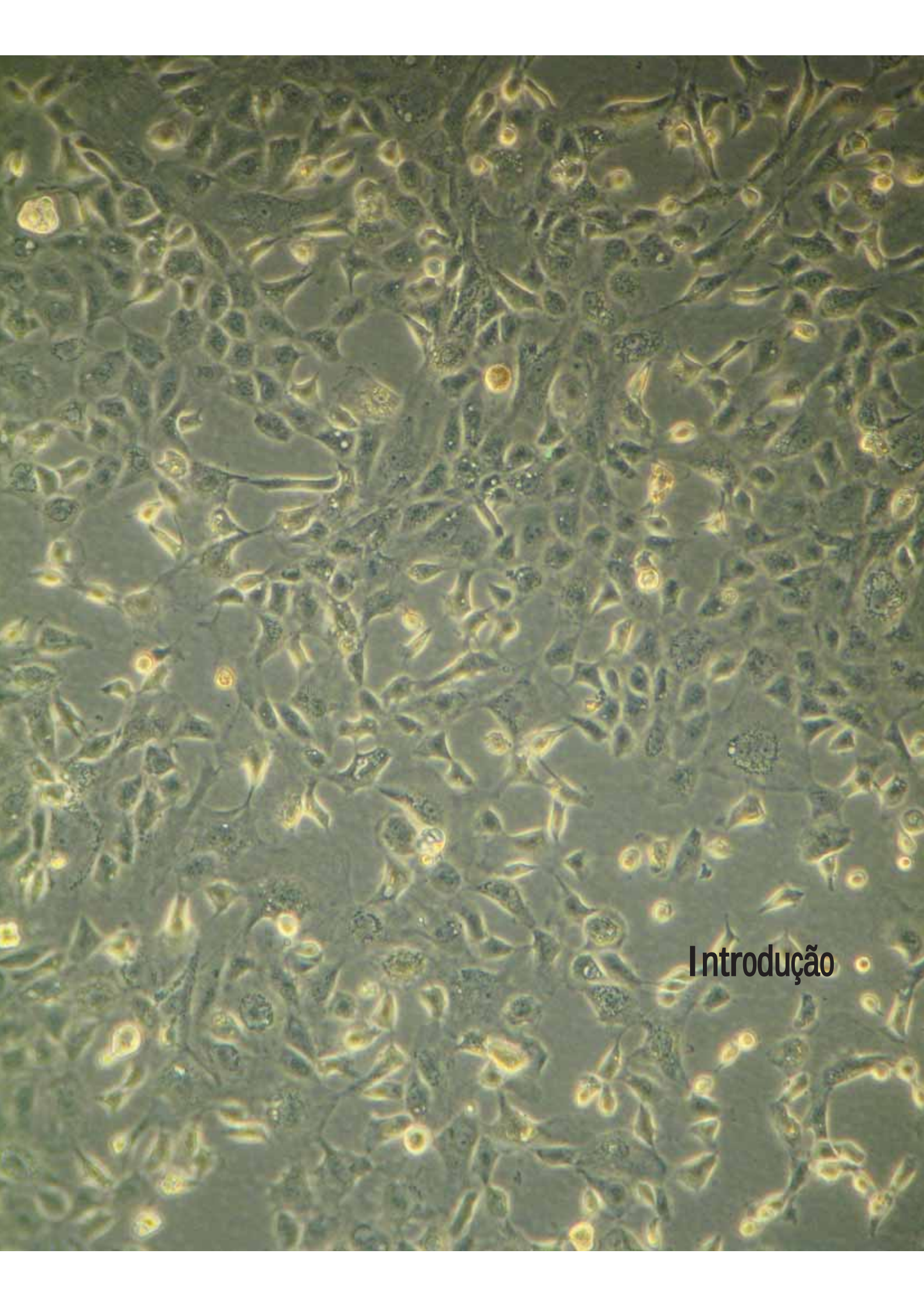
Malformações e possíveis lesões no sistema urogenital podem ser advindas do período embrionário. Essas lesões também são causadas por armas de fogo, armas brancas e em acidentes; onde ocorre o rompimento da uretra. Diante do exposto, o objetivo foi analisar a contribuição da engenharia de tecidos na construção de neo-uretra, desenvolvida por bioengenharia. Foi realizada a expansão *ex vivo* de células uroteliais em *scaffolds* 3D (gel de plaquetas e matriz acelular de aorta suína) para avaliar a contribuição desta técnica na construção da neo-uretra. Manualmente, foi feita a dissociação mecânica da parede interna da bexiga de 10 coelhos da raça North Folk, com peso entre 2,5 a 3,0Kg. Após a dissociação foi centrifugado o conteúdo celular e obtido um *pellet* de células uroteliais. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura DMEM F12 e as células foram mantidas em cultura por 15 dias. Mediante análise imunohistoquímica foi caracterizada a cultura urotelial. As células foram então implantadas em *scaffold* - gel de plaquetas. Em contrapartida, em um segundo experimento, utilizando matriz acelular de aorta suína, foram implantadas células uroteliais, e células uroteliais em gel de plaquetas, na parede interna do *scaffold* - aorta, com espaço de fixação delimitado por uma sonda uretral. Os complexos *sonda* - células - aorta e *sonda* - células em gel de plaquetas - aorta, foram selados com auxílio de fio cirúrgico e mantidos em meio de cultura e estufa sob condições adequadas por 12 dias, para posterior análise histológica de adesão das células do urotélio aos *scaffolds*. Mediante observação em microscópio óptico, foi observado o crescimento das células no *scaffold* gel de plaquetas, passando de monocamada à estrutura tridimensional. No experimento contendo a matriz acelular de aorta suína com gel de plaquetas, observou-se uma pequena quantidade de células aderidas ao *scaffold*- aorta. No entanto, no experimento realizado apenas com as células uroteliais e a matriz de aorta suína, pudemos observar a adesão das células uroteliais à parede interna da aorta. As técnicas de medicina regenerativa para a produção de neo-estruturas a serem, futuramente, transplantadas são hoje um avanço na medicina e prometem auxiliar e aumentar a qualidade de vida de muitos pacientes.

Palavras-chave: Urotélio, Bioengenharia, Medicina Regenerativa, Terapia celular, *Scaffold* 3D, Neo-uretra.

ABSTRACT

Malformations and possible damages to the urogenital system can be originated in the embryonic period. Moreover, fire guns, knives and accidents, where there is the disruption of the urethra, also cause these lesions. The objective was to analyze the contribution of tissue engineering in the construction of neo-urethra, developed by bioengineering. We performed an urothelial *ex vivo* expansion of cells in 3D scaffolds (platelet gel matrix and acellular porcine aorta) to assess the contribution of this technique in the construction of a neo-urethra. Mechanical dissociation was made of the inner wall of 10 North Folk rabbit's bladder, weighing 2.5 to 3.0 kg. After dissociation the cell content was centrifuged and obtained a pellet of urothelial cells. The pellet was resuspended in culture medium DMEM F12 and cells were maintained in culture for 15 days. Immunohistochemical analysis characterized the urothelial culture. The cells were then implanted in the scaffold - platelet gel. In a second experiment using aortic porcine acellular matrix were implanted urothelial cells alone and urothelial cells on platelet gel, on the inner wall of the scaffold - aorta, with space for setting bordered by a urethral probe. The complex *probe - cells - aorta* and *probe - cells in platelet gel - aorta*, were sealed with suture material and culture were maintained in a humidified 37°C incubator with 5% CO₂ in air for 12 days to subsequent histological analysis of urothelium cell adhesion to the scaffolds. By observation under an optical microscope, we could see the growth of cells in the scaffold platelet gel, from a monolayer in to a three-dimensional structure. In the acellular porcine aortic matrix containing the platelet gel, we could observe a few quantity of urothelial cells adhered. However with the acellular porcine aortic matrix in which was implanted only the urothelial cells, we have obtained adhesion to the wall.

Key words: urothelium, bioengineering, regenerative medicine, cellular therapy, scaffold 3D, Neo-urethra.



Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Medicina Regenerativa

A medicina regenerativa é uma área em crescente expansão no Brasil e no mundo, a qual procura controlar e ampliar a capacidade natural de regeneração dos tecidos, utilizando-se de ferramentas como a bioengenharia e a terapia celular. Tanto a bioengenharia quanto a terapia celular visam à substituição de tecidos lesados estrutura ou funcionalmente, apresentando um caráter terapêutico. A medicina regenerativa utiliza células, fatores de proliferação e biomateriais os quais propiciam condições para o próprio organismo reparar órgãos e tecidos lesados. Sem dúvida, podemos afirmar que a medicina regenerativa se apresenta hoje como uma das áreas mais promissoras na pesquisa biomédica^{1, 2}.

1.2 Terapia celular

Na terapia celular, uns dos ramos da medicina regenerativa, evidenciam-se três vertentes terapêuticas. A vertente condutiva que se refere ao restabelecimento autônomo das células através de estímulo externo. A vertente indutiva que é aquela em que fatores de crescimento são adicionados à célula para que esta se regenere. E a terceira vertente consiste na terapia celular propriamente dita, na qual células-tronco são utilizadas para regeneração tecidual. Essas possuem a capacidade de exercer o papel das células danificadas com a mesma qualidade, pois detêm a capacidade de auto-renovação e o potencial para se diferenciarem em outros tipos celulares, constituindo novos tecidos. As células-tronco mesenquimais são utilizadas para repor ou reparar tecidos lesados ou destruídos, por exemplo, em doenças neurológicas (doença de Parkinson), diabetes, insuficiência cardíaca e infarto. A terapia celular, portanto, tem por objetivo a utilização de células para o tratamento de doenças, sendo que o seu principal foco atual é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células ou tecidos lesados ou perdidos, para restaurar sua função³.

1.3 Engenharia Tecidual

A Engenharia de Tecidos 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. A engenharia de tecidos 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. Resumidamente, para se criar um tecido substituto vivo, um número mínimo de células pode ser colhido do paciente, idealmente, por técnica de biópsia, e então cultivado em laboratório. Após o cultivo dessas células, essas podem então ser aplicadas. Para a expansão utiliza-se uma matriz (BIOMATERIAL - *scaffold*) tridimensional, natural ou sintética, na presença de fatores de crescimento e diferenciação. Se as células estiverem providas com as condições e sinais adequados para sua viabilidade, estas 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 (Figura 1). O biomaterial ou matriz tridimensional é uma estrutura biodegradável, a qual, supostamente, deve sofrer uma posterior degradação para prevenir riscos futuros devido à presença de um corpo estranho ao organismo. Já as células utilizadas, por serem do próprio paciente (autólogas) não apresentariam nenhum risco, pois não haveria a possibilidade de nenhuma resposta de rejeição imune ao tecido implantado⁴.

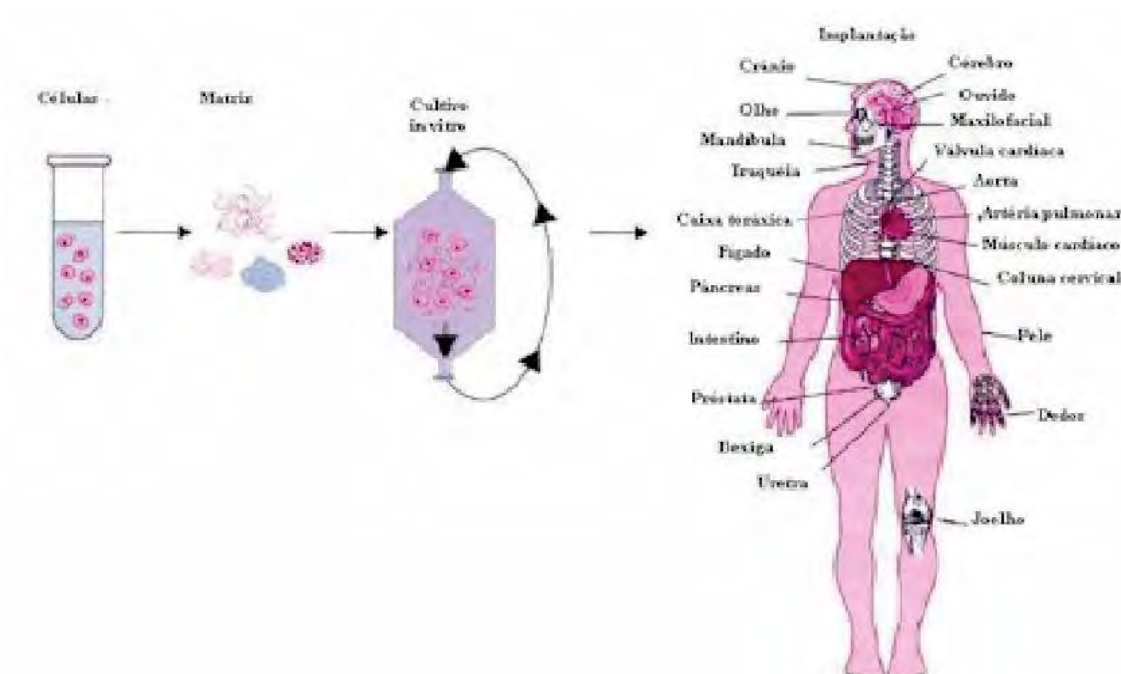


Figura adaptada de Langer (2000)

(Acesso em 11/04/2010 <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/engtecidos.htm>).

Figura 1: Princípio da Engenharia Tecidual: Expansão celular em matriz biodegradável e reimplantação no sítio defeituoso do paciente.

- As células podem ser específicas, células-tronco ou embrionárias. Elas ainda podem ser autólogas ou alogênicas.
- A matriz pode ser natural ou sintética. Ela ainda pode ser fibrosa, uma espuma ou capsular.
- Culturas *in vitro* podem ser estáticas, com agitação ou sob condições dinâmicas de fluxo.

1.4 Bioengenharia

Bioengenharia é uma ciência fortemente interdisciplinar, cujos pilares são sustentados por três ciências fundamentais: Ciências da Vida (Medicina, Biologia, Fisioterapia, entre outras), Ciências Físicas (Matemática, Física e Química) e Engenharia. A pesquisa em Bioengenharia abraça uma vasta gama de projetos, desde órgãos artificiais, instrumentação médica e biomateriais, até modelos matemáticos para simular os sistemas cardiovascular, respiratório, muscular, entre outros. Em bioengenharia, os tecidos desenvolvidos são artificiais e, geralmente, produtos do crescimento celular sobre um substrato ou base de ancoragem (*scaffold*) biodegradável⁵.

No Brasil, Goissis e colaboradores⁶ desenvolveram uma matriz acelular de aorta suína que, em tese, apresentaria elasticidade e permitiria o crescimento de mucosa uretral em seu interior, também apresentando a vantagem de ser acelular após tratamento. Tal modelo seria uma pequena amostra do que a bioengenharia pode nos proporcionar.

1.5 Biomateriais

Cada vez mais existe a busca do homem por padrões superiores de vida e uma possível longevidade, o que nos instiga ao desenvolvimento de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos, sejam eles vitimados por lesões, traumas ou patogenias. 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 suficiente²⁸.

O sucesso de trabalhos desenvolvidos com biomateriais não só viabilizará a fixação do dispositivo no local de implantação, mas também pode permitir 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 anfitrião²⁹.

Os biomateriais devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos. Tais características caracterizam a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para estes fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros³⁰.

1.6 Scaffolds utilizados

Os *scaffolds* ou arcabouços 3D são estruturas que conferem sustentação mecânica, proteção, sustentabilidade³¹ e condições para que as células constituam um ambiente tridimensional, ao produzirem sua matriz extracelular; sendo que esse ambiente apresente interatividade célula-matriz.

Neste trabalho um dos *scaffolds* utilizados foi o chamado gel de plaquetas, o qual é produzido a partir de hemocomponentes no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. Tal procedimento foi executado de acordo com os Procedimentos Operacionais Padrão deste mesmo laboratório.

O gel funcionou como um arcabouço para o desenvolvimento das células uroteliais, como uma espécie de “andaime” para estas se apoiarem. (Figura 2).



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 2: Gel de Plaquetas com células visto macroscopicamente.

Outro *scaffold* utilizado foi a matriz acelar de aorta suína. É importante ressaltar que esta se tornou acelar após passar pelo processo de decelularização, o qual irá ser detalhado a seguir. Por se apresentar em formato cilíndrico, a matriz se assemelha à estrutura da uretra e, além do mais, seu uso também pode ser justificado devido à facilidade de sua obtenção. A aorta utilizada no experimento foi obtida a partir do trabalho *Avaliação histofisiológica da matriz heteróloga acelar como scaffold para as células uroteliais e fibras musculares lisas para implante em uretra de coelhos* realizado pela doutoranda e co-orientadora deste trabalho, Priscila Murador, de acordo com o protocolo nº699/08 aprovado pela comissão de ética em experimentação animal.(Figura 3).



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 3: Matriz Acelar de aorta suína.

1.7 Urotélio: Histologia e embriologia

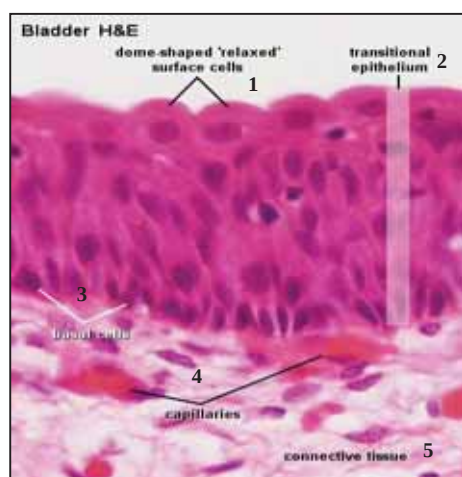
A bexiga deriva do seio urogenital e do mesênquima esplâncnico adjacente. O epitélio da parte terminal da uretra deriva do ectoderma superficial. O tecido conjuntivo e o músculo liso da uretra originam-se, em ambos os sexos, do mesênquima esplâncnico adjacente⁷.

O urotélio é um epitélio de transição especializado que 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. O epitélio de transição ou urotélio apresenta duas características especiais: a) forma uma barreira osmótica entre a urina hipertônica e os líquidos teciduais, b) suas células possuem também uma grande reserva de membrana de superfície, a qual retorna à sua posição quando a bexiga está distendida⁸.

Ross (1993) afirma que, a característica principal do epitélio de transição é a presença de áreas modificadas de membrana celular denominadas placas. Estas placas, que medem cerca de 12nm, são mais espessas que a membrana normal. Aparentam ser relativamente rígidas e, com métodos especiais de coloração negativa para visualização ao microscópio eletrônico, vê-se que são constituídas por subunidades hexagonais. Quando a bexiga está vazia, as placas se dobram para dentro, ocupando o espaço da superfície da célula; quando a bexiga está distendida, as placas voltam para superfície. Acredita-se que os filamentos unidos à superfície inferior da placa evitem o estiramento excessivo das placas e participem da sua ação de dobrar-se para dentro quando a bexiga está vazia. O urotélio funciona da seguinte maneira: as células mais superficiais do epitélio de transição respondem pela barreira osmótica entre a urina e os fluidos teciduais. Nestas células, a membrana plasmática, em contato com a urina, é especializada, apresentando placas espessas separadas por faixas de membrana mais delgada. Quando a bexiga é esvaziada, a membrana se dobra nas regiões delgadas e as placas se invaginam, formando vesículas fusiformes, que permanecem próximo à superfície celular. Ao se encher novamente, as vesículas citoplasmáticas fusiformes se transformam em placas que se inserem na membrana, aumentando a superfície das células. Esta membrana plasmática especial é sintetizada no aparelho de Golgi e é composta por cerebrosídeos (principal componente da fração dos lipídeos polares)⁹.

O urotélio seria, portanto, a interface entre a luz do trato urinário e os tecidos subjacentes. A camada mais superficial é composta por células largas e hexagonais conectadas por junções muito próximas. Abaixo dessa camada superficial existem a camada de células intermediárias e a camada de células basais, conectadas à membrana basal. A região entre o urotélio e a camada de músculo liso é denominada de suburotélio que é composto por vasos sanguíneos, fibroblastos (incluindo as células intersticiais envolvidas por uma matriz de colágeno) e os nervos¹⁰.

Assim sendo, denomina-se o urotélio “epitélio de transição” devido ao fato deste sofrer uma distensão e assemelhar-se então a um epitélio estratificado pavimentoso, e como afirmado anteriormente, essa distensão é justificada pela característica de plasticidade do tecido urotelial. Além dessa qualidade, apresenta-se também como uma interface entre agentes patogênicos e mecanismos defensivos, intitulado-se como a primeira linha de defesa da bexiga urinária¹¹(Figura 4).



Adaptado de: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Epithelia/Images/blad042he.jpg>
Acessado em 26/01/2010.

Figura 4: Aspecto das diferentes camadas do urotélio 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.

1.8 Justificativa

Estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) registram que 1% da população mundial masculina desenvolve estenose de uretra. Uma série de complicações advindas deste problema pode ser listada, entre elas, as infecções de repetição e o uso de sondas. Do ponto de vista anatomopatológico, na maioria das vezes existe a deposição de grande quantidade de material fibrótico no local da estenose que impede o fluxo urinário. As causas determinantes da estenose de uretra são multi fatoriais destacando-se: infecções de repetição, anomalias congênitas e as estenoses. Segundo o Ministério da Saúde registram-se em média 1,5 milhões de casos novos/ano no Brasil, sendo considerado o “calcanhar de Aquiles” da urologia. O sistema urogenital está susceptível a possíveis malformações e lesões desde o período embrionário. No entanto, esses tecidos poderiam ser reparados utilizando-se técnicas de engenharia tecidual, possibilitando a reconstrução dos tecidos lesionados, garantindo-lhes a preservação de sua estrutura e função e a ampliação da qualidade de vida dos pacientes tratados¹².

No campo da Urologia, problemas relacionados às malformações congênitas como hipospádia, epispádia e estenose uretral são recorrentes. Nesses casos, a bioengenharia, a engenharia de tecidos e a terapia celular têm sido cada vez mais requisitadas visando solucionar estes problemas de âmbito social através da substituição dos tecidos lesados por outros cuja estrutura e função sejam equivalentes aos tecidos saudáveis. O que instiga diversos pesquisadores é a busca por soluções práticas e economicamente viáveis para a resolução de tais problemas. Muitas alternativas têm sido estudadas ao longo dos anos e, cada vez mais, vê-se a evolução dos possíveis tratamentos oferecidos. Contudo, ainda há empecilhos existentes pelo caminho. A falta de material suficiente para o transplante originário da área genital seria um destes obstáculos. Sendo assim, o uso de alternativas como os tecidos livres de outras partes do corpo, foi evidenciado¹³.

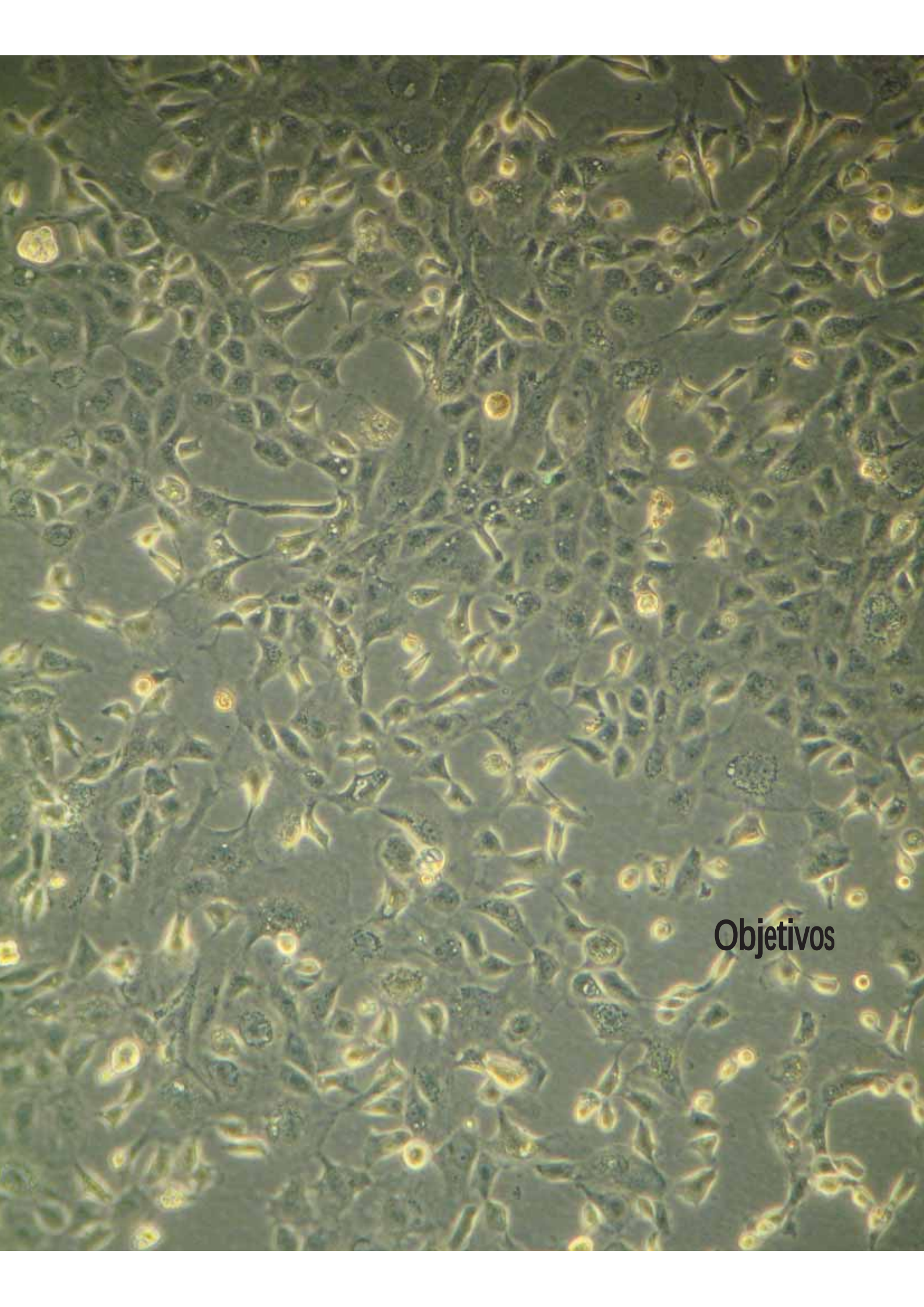
Os enxertos de pele extragenital, de espessura total ou parcial foram alguns dos materiais testados, mas apresentaram resultados insatisfatórios devido à retração significativa, à formação de estenoses e o aparecimento de fístulas^{14, 15}. Sendo assim, destacaram-se ainda as pesquisas utilizando biomateriais acelulares como *scaffolds* na reconstrução uretral: submucosa intestinal, mucosa vesical, colágeno bovino, colágeno vesical e artéria^{16, 17}. No entanto, alguns desses biomateriais como as mucosas vesicais e bucais apresentaram desvantagens, como por exemplo,

o espessamento e a tendência de prolapso da mucosa vesical ou a necessidade de cirurgia oral no caso da mucosa bucal^{18, 19, 20}.

Para minimizar estas morbidades vários estudos experimentais utilizando materiais diversos estão sendo testados^{21, 22}. No Brasil foi desenvolvida por Goissis e colaboradores²³ uma matriz acelular de aorta que, além de apresentar certa elasticidade permitiria o crescimento da mucosa uretral em seu interior. Outros biomateriais também têm sido avaliados. O uso do SIS (*small intestine submucosa*) não mostrou-se efetivo quando implantado na uretra²⁴.

Recentemente, Atala vem desenvolvendo engenharia tecidual para bexiga, com a formação de “neo-bexigas” *in vitro*²⁵.

O tratamento de patologias relacionadas à uretra é crítico e é um dos maiores desafios da urologia, embora vários métodos para solucionar estes problemas têm sido relatados até o momento. A engenharia de tecidos traz, portanto, novas esperanças para reconstrução da uretra e para a melhoria da qualidade de vida desses pacientes. Nesse trabalho a cultura de células uroteliais representa uma etapa primordial para a resolução de problemas urológicos, tais como a cistite intersticial, a hipospádia ou a estenose uretral e a epispádia, visto que a camada urotelial reveste a superfície interna da uretra e é responsável por uma série de funções indispensáveis ao bom funcionamento do organismo como um todo.



Objetivos

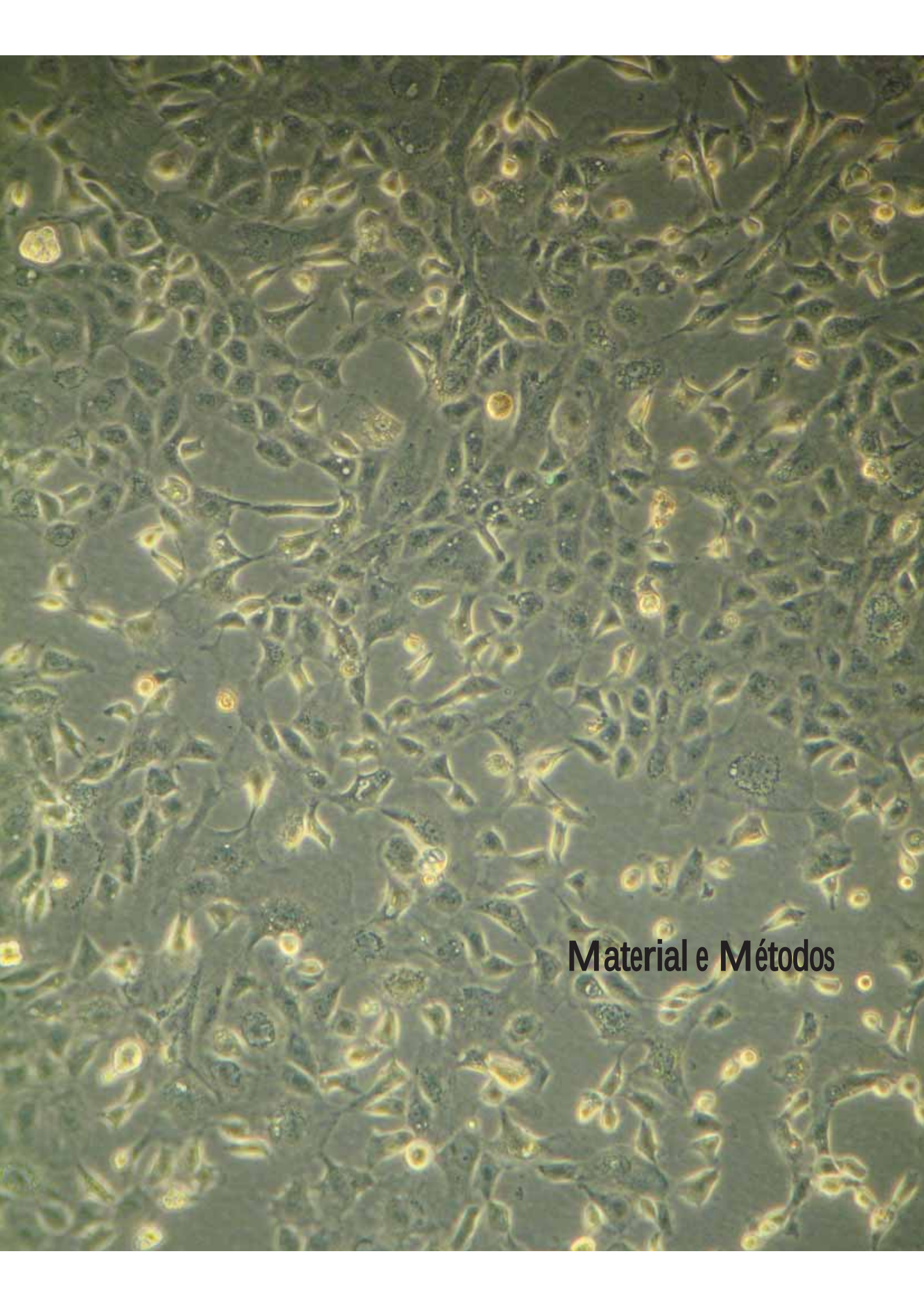
2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Analisar a contribuição da engenharia de tecidos na construção de neo-uretra.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar expansão *in vitro* das células uroteliais.
- Padronizar a técnica de cultivo de células uroteliais de coelho em *scaffold* 3D para posterior formação de neo-uretra, desenvolvida por bioengenharia.
- Promover a adesão das células junto ao tecido biodegradável (*scaffold* - gel de plaquetas).
- Promover a adesão das células junto ao tecido biodegradável (parede interna do *scaffold* - matriz acelular de aorta suína) que irá compor a neo-uretra.



Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Instalações

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Celular, pertencente ao Hemocentro da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu.

O Laboratório de Engenharia Celular 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 1200m² classificados em três categorias:

1- 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 e SDS-PAGE, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, *Western blotting*, Imunodifusão (*Ouchterlony*), imunofenotipagem, técnicas de hemaglutinação, entre outras (Figura 3).

2- 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 EPIs de circulação interna para diferenciar de aventais de circulação convencional em corredores ou em outros laboratórios. Dentro dessa área encontra-se equipada e em funcionamento a chamada área de *screening* (Figura 4) a qual constitui-se de uma ante-sala dos três nichos de cultura celular com ar filtrado individualizado. Em todos os nichos existem dois ambientes: microscopia (Figura 5) seguida da área de manipulação estéril propriamente dita (Figura 6).

No primeiro nicho são desenvolvidas atividades relacionadas à diferenciação de células tronco; no segundo nicho estão as pesquisas relacionadas à produção de anticorpos monoclonais murinos e no terceiro nicho são desenvolvidas as atividades das pesquisas com os curativos bioativos.

3- Laboratório de contenção de nível III de segurança, P3 ou BSL-3 dentro da classificação internacional do matiz da OMS de laboratórios segundo a periculosidade, presença ou não de medidas preventivas e de vacinação além do risco para o meio ambiente e para o homem. Nesta área o conceito laboratorial diferenciado tem sistema de ar filtrado com filtros *bag in-bag out* e pressão negativa. A contenção de entrada começa pela existência de outro laboratório, que corresponde ao LAC, seguido de vestiário de barreira com colocação de roupas insufláveis e uso obrigatório de ar comandado. Todo o ar respirado pela equipe do laboratório deve vir exclusivamente do sistema de ar no dorso do manipulador. A totalidade do ar interno passa por filtros de saída que garantem a filtração do tipo ULPA. Esta área encontra-se em fase de acabamento. Terá o destino de cultivo de células-tronco de pacientes que possam ter algum vírus do tipo Hepatite B, C ou mesmo HIV e que tenham a necessidade de se beneficiar da terapia celular com diferenciação *ex vivo*.



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 5: Laboratório convencional ou *standard* - Laboratório de Atividades Complementares (LAC).



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 6: Área Limpa- área de *screening*.



Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 7: Área Limpa-Ambiente de Microscopia em A e B.



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 8: Área Limpa-Área de manipulação Estéril.

3.2 Animais

A utilização de animais neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, como consta no protocolo nº 779/2010, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal previamente estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). Os animais em questão não foram utilizados apenas para este projeto. Demais estruturas e/ou órgãos tais como traquéia, gordura, medula óssea, entre outros, foram aproveitados por projetos previamente aprovados pelo comitê de ética em outras especialidades da Faculdade de Medicina de Botucatu e que também foram ou estão sendo desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Celular.

Foram utilizados 10 coelhos machos da raça North Folk com peso variando de 2,5 a 3,0 Kg, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para obtenção de suas bexigas e, conseqüentemente, do tecido urotelial presente nas mesmas.

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.

3.3 Isolamento da Bexiga

Este trabalho levou em consideração a Engenharia Celular aplicada ao tecido urotelial. Os coelhos foram utilizados para obtenção de sua bexiga e posterior cultura de epitélio de transição ou urotélio. A obtenção do fragmento de tecido urotelial foi realizada através da biópsia deste órgão.

A cultura de tecido urotelial de bexiga de coelho corresponde a uma etapa do projeto, já em andamento, intitulado Avaliação histológica da matriz heteróloga acelular como *scaffold* para células uroteliais e fibras musculares lisas para implante em uretra de coelhos, cuja autoria é da doutoranda do Laboratório de Engenharia Celular e co-orientadora deste projeto, Priscila Murador. Os animais foram submetidos à biópsia no mesmo tempo anestésico com intuito de minimizar o estresse cirúrgico.

As bexigas foram retiradas integralmente e 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 tecidual foi transferida para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, local este, onde foram feitos os procedimentos devidos para a obtenção das células do urotélio e todo o processamento do tecido em questão. O processamento do órgão do animal foi feito de acordo com as normas padronizadas nos Procedimentos Operacionais Padrão (POP) do Laboratório de Engenharia Celular²⁶.

A bexiga foi então lavada repetidas vezes com solução fisiológica estéril e meio HEPES com antibióticos e antimicóticos (Invitrogen®) e, com o auxílio de uma pinça estéril, foi feita a exposição de sua parede interna. Após tal exposição, o epitélio de transição sofreu dissociação mecânica. Esse procedimento foi realizado com o auxílio de uma ferramenta de trabalho denominada de *cell scraper* (Figura 9). 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 desprendido foi sugado 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 de 3×10^6 células/ml. (Figura 10). O sobrenadante foi então aspirado e o *pellet* ressuspendido em 1ml do meio de cultura DMEM F12 (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium*) Invitrogen®. Foi retirada, então, uma alíquota de 30µL para realização de contagem e viabilidade celular em corante Tripan Blue (Invitrogen®).



Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 9: Dissociação Mecânica da parede interna da bexiga (urotélío) com, auxílio de *cell scraper*.

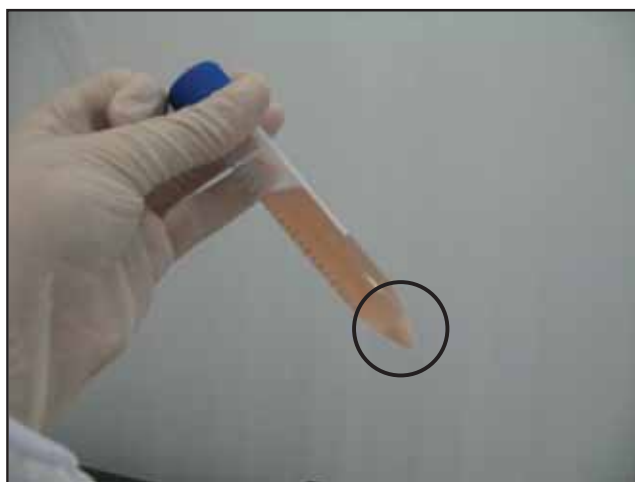


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 10: *Pellet* de células uroteliais após realização da dissociação mecânica com auxílio de *cell scraper* e centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos.

3.4 Expansão *ex vivo* do urotélio

Após obtenção das células cujo teste de viabilidade foi considerado satisfatório (acima de 80%), as células foram colocadas em frascos de cultura de superfície de crescimento de 25cm², com plástico *Tissue treated*, contendo 6mL de meio de cultura DMEM F12 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) (Invitrogen®), antibióticos (Invitrogen ®) e antimicóticos (Invitrogen ®), aminoácidos essenciais e não essenciais (MEM amino acids solution Invitrogen®). Durante todo o período de cultura as células foram mantidas em estufa de 37°C em uma atmosfera úmida controlada a 5% de CO₂ e 95% de ar.

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 CO₂. 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 Dimetilsulfóxido-DMSO (LGC Biotechnology TM), 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 morte²⁷.

No caso das células uroteliais, após a dissociação mecânica da parede interna da bexiga realizada com auxílio de *cell scraper*, as células foram lavadas com meio HEPES e centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos. Houve então a formação de um *pellet* no fundo do tubo. Em seguida, as células foram ressuspensas em DMSO a 10% SFB. A amostra foi homogeneizada, transferida para criotubo, devidamente identificado, e rapidamente armazenada a -80°C . Após sete dias no freezer -80°C as ampolas contendo as células foram transferidas para *containers* de nitrogênio líquido. Assim sendo, as ampolas congeladas foram então registradas no Banco de Células do Laboratório de Engenharia Celular para posterior utilização nas demais etapas do trabalho ou em trabalhos futuros envolvendo urotélio.

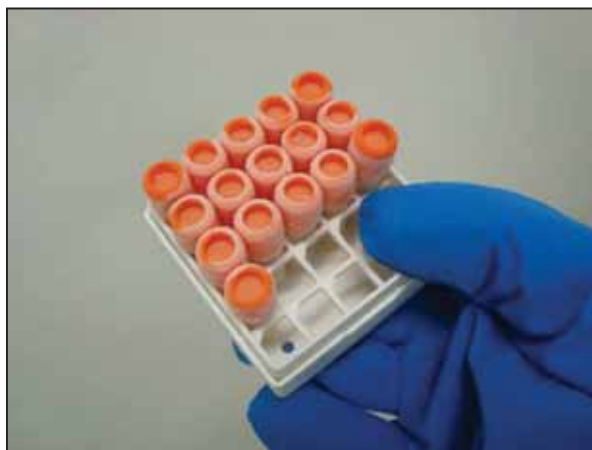


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 11: Ampolas na caixa (gaveta) de criopreservação. Compõem o Banco de Células presente no Laboratório de Engenharia celular

3.6 Decelularização

A decelularização é uma técnica responsável pela remoção de todo o material celular e nuclear, preservando a composição, atividade biológica e integridade mecânica da matriz extracelular restante^{30, 31}. Além disso, as substâncias utilizadas neste processo precisam ainda ter mínimo efeito residual, para não inibir o crescimento celular após implantação da matriz no organismo³¹. Existem diversos protocolos para a realização da decelularização, no entanto, o

protocolo mais completo de um processo de decelularização inclui uma combinação de técnicas físicas, químicas e enzimáticas³¹. No trabalho em questão a decelularização foi realizada na aorta suína para que esta fosse, então, utilizada como *scaffold* para a ancoragem das células uroteliais. As aortas utilizadas já foram descelularizadas previamente.

3.7 Implantação das células nos *scaffolds*

A implantação das células nos scaffolds foi realizada em duas etapas: a primeira etapa foi a implantação no gel de plaquetas, fazendo com que estas se posicionassem nos poros existentes neste. A segunda etapa foi entendida pela implantação do ge, com as células uroteliais, na parede interna da matriz acelular de aorta suína.

A primeira etapa foi realizada após a retirada das células da bexiga por dissociação mecânica, seguida de plaqueamento, da manutenção dessas até a obtenção de confluência de aproximadamente 80% e da passagem por tratamento enzimático com tripsina para total desprendimento do fundo do frasco. Ao serem adicionadas ao gel (Figura 13), as células ficaram então suspensas neste, de tal forma que acabaram adquirindo a formação em 3D no *scaffold*. Ao complexo gel-células foi adicionado 1mL de meio de cultura DMEM F12 e este foi mantido em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

Para a realização da segunda etapa utilizou-se fragmentos de aorta suína de 2 a 3cm de comprimento. Após a colocação de uma sonda uretral (Medical's®) atravessando a luz da aorta, foi depositado, entre a superfície externa da sonda e a parede interna da matriz acelular, um gel de plaquetas contendo as células uroteliais. O propósito era a adesão das células à parede interna da aorta, mimetizando a estrutura da uretra.

3.8 Implantação das células na aorta

Como enfatizado anteriormente, na tentativa de encontrar materiais superiores à mucosa vesical e à mucosa bucal, vários estudos experimentais utilizando materiais diversos estão sendo testados. No Brasil foi desenvolvida uma matriz acelular de aorta que, supostamente, apresentaria elasticidade e permitiria o crescimento de mucosa uretral em seu interior.

Visto que a matriz decelularizada apresentaria vantagens por possuir formato cilíndrico e estrutura tubular, semelhantes à estrutura uretral, fez-se então a implantação das células uroteliais na parede interna da aorta. Com auxílio de luvas e pinças estéreis, em fluxo laminar, foi realizado o procedimento de implantação das células e da sonda uretral em dois segmentos diferentes de aorta. Em um primeiro experimento, foram colocadas apenas células entre a superfície externa da sonda e a face interna da aorta, para avaliar se haveria uma possível adesão celular à parede dessa. Em uma segunda tentativa, entretanto, as células foram implantadas à aorta juntamente ao *scaffold*-gel de plaquetas, para avaliar se a estrutura 3D proporcionada pelo gel interferiria na adesão à face interna do *scaffold* - aorta.

Para tanto, foram realizados os seguintes procedimentos:

Após devido processamento para a obtenção do chamado plasma rico em plaquetas (PRP), de acordo com os procedimentos operacionais padrão do Laboratório de Engenharia Celular, em fluxo laminar, com auxílio de luvas estéreis, foi colocado em uma placa de Petri, também estéril, um fragmento de aorta de aproximadamente 2cm de comprimento. Com o auxílio de pinças estéreis foi atravessada uma sonda uretral (Medical's®) pela luz da aorta por onde, supostamente, deve-se passar o fluxo urinário. Com fio cirúrgico não absorvível (PolySuture®) foi então feito um nó cirúrgico e amarrada uma das extremidades da aorta juntamente à sonda para que não houvesse transbordamento do conteúdo celular quando este fosse adicionado. Utilizando pipeta P200 foram adicionadas as células uroteliais, previamente cultivadas, e em seguida, foi realizado o mesmo procedimento na outra extremidade da aorta, para que assim as células ficassem confinadas nesse segmento, não extravasando seu conteúdo para nenhum dos lados. A estrutura foi então preservada em meio de cultura DMEM F12 pelo período de aproximadamente uma semana e em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para posterior análise histológica.

No segundo experimento, com um outro segmento de aorta, foi seguido o mesmo protocolo anterior, porém, com a seguinte peculiaridade: Ao invés de apenas implantar a suspensão de células uroteliais, foi feito no espaço sonda-aorta, o gel de plaquetas contendo essas células. O complexo formado constituiu então o chamado *scaffold* - gel de plaquetas, contendo as células de urotélio, dentro do *scaffold* - matriz de aorta suína. O procedimento para a

realização do gel de plaquetas também foi desenvolvido de acordo com os procedimentos operacionais padrão do laboratório de Engenharia Celular. A outra extremidade também foi fechada e a estrutura formada (contendo gel de plaquetas, células e a aorta) foi mantida da mesma forma que a primeira em meio de cultura e abrigo em estufa. (Figuras 12,13 e 14).



Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 12: Em **A**, material utilizado. Sonda uretral, fragmento de aorta, pinça estéril, placa de Petri. Em **B**, inserção da sonda uretral pela luz da aorta.

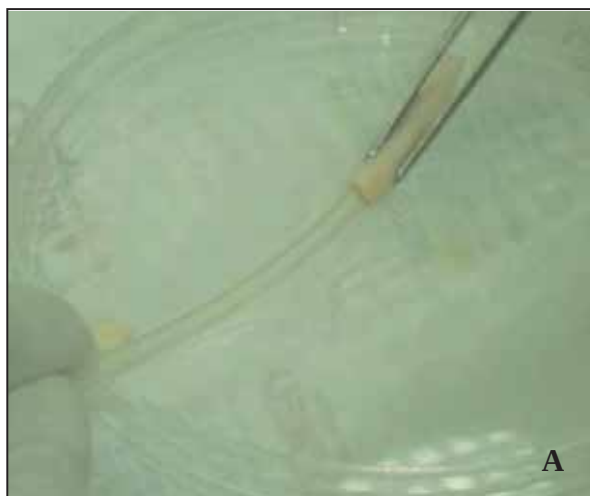


Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

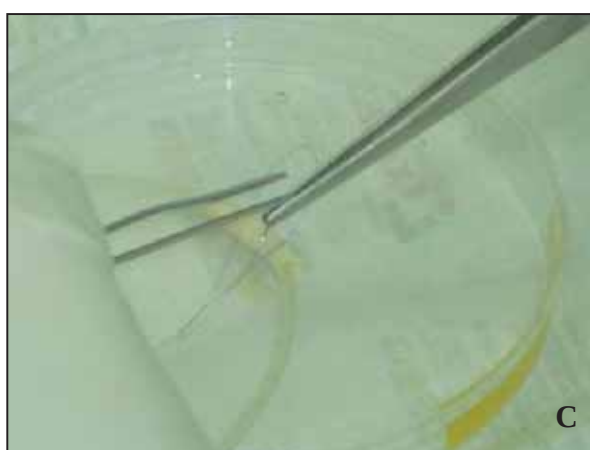


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 13: Em **A**, passagem da sonda uretral. Em **B**, Sonda totalmente atravessada. Em **C**, Fixação de uma das extremidades para implantação das células / células e gel.



Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 14: Em **A**, Nó cirúrgico impedindo transbordamento. Em **B**, Extremidade totalmente fechada. Em **C**, Implantação das células / células e gel.

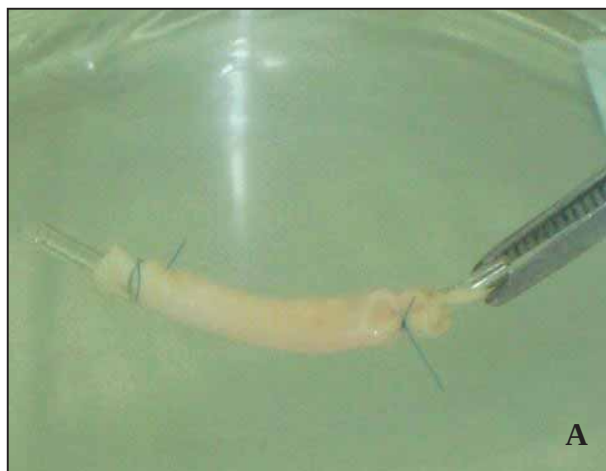


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

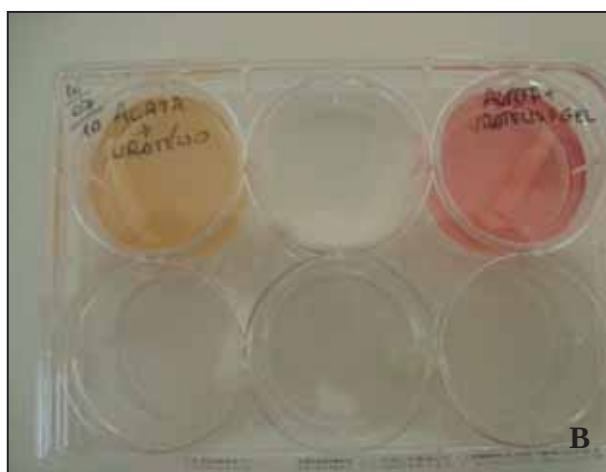
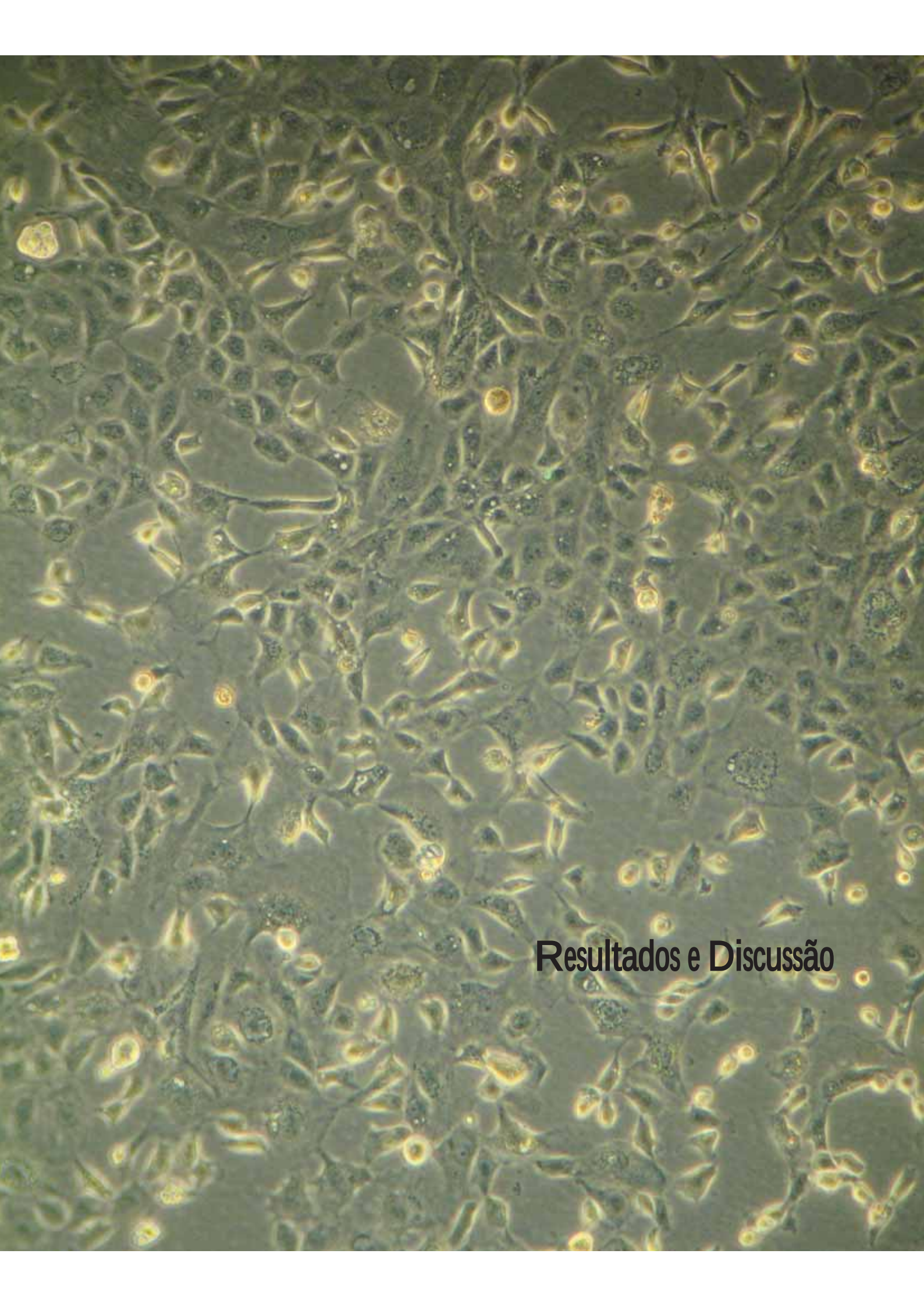


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 15: Em **A**, modelo de neo-uretra contendo urotélio formado. Em **B**, vemos aorta apenas com as células e aorta com células e gel mantidos sob condições específicas em meio de cultura DMEM F12.



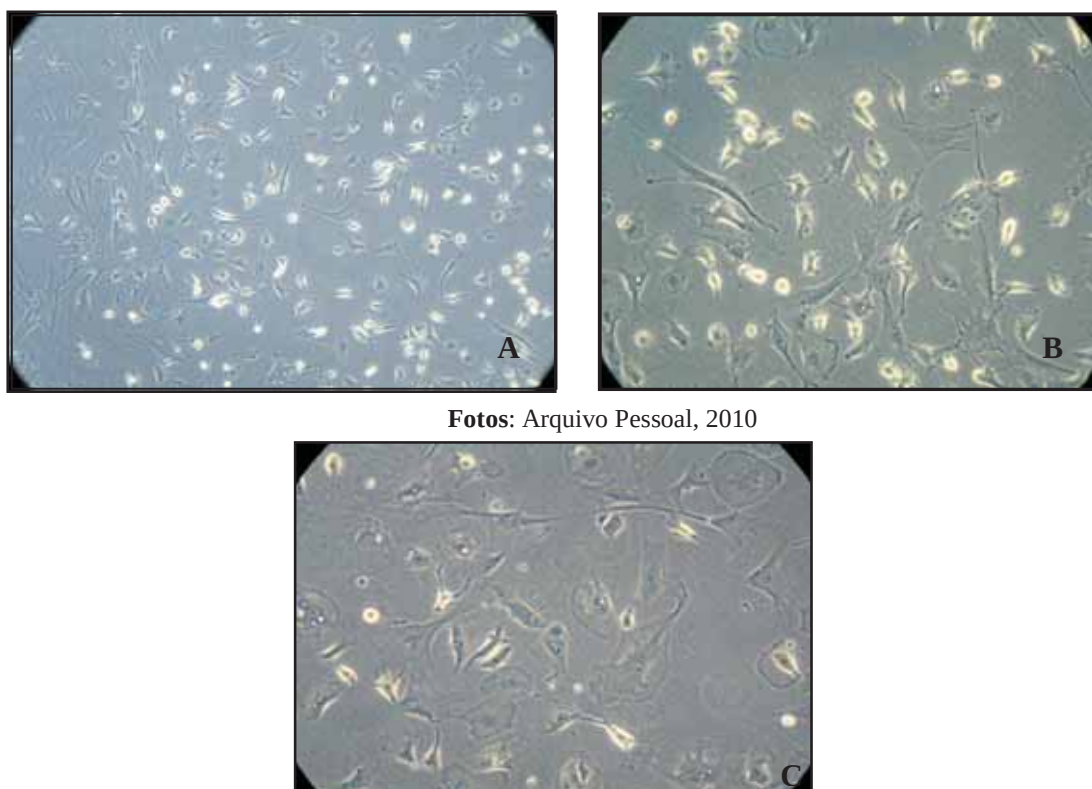
Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Cultura de células uroteliais

Após cinco dias de cultura observou-se o início da adesão celular ao fundo do frasco de cultura. Depois de, aproximadamente, 10 dias de cultura as células já apresentaram viabilidade de 90,7%, constituindo uma monocamada de tecido urotelial.

A cultura primária foi considerada quando as células se tornaram subconfluentes (atingindo 70-80% de confluência na superfície do frasco) após 8-10 dias. Quando atingida essa porcentagem as células foram removidas utilizando tripsina 0,25% (Invitrogen®). As células uroteliais aderidas ao fundo da placa apresentaram globosidades, características do tecido epitelial.



Fotos: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 16: Em A, vemos células em início de adesão. Objetiva de 100x. Em B, vemos células em adesão na objetiva de 200x. Em C, vemos células já aderidas apresentando globosidades características das células epiteliais. Objetiva de 200x.

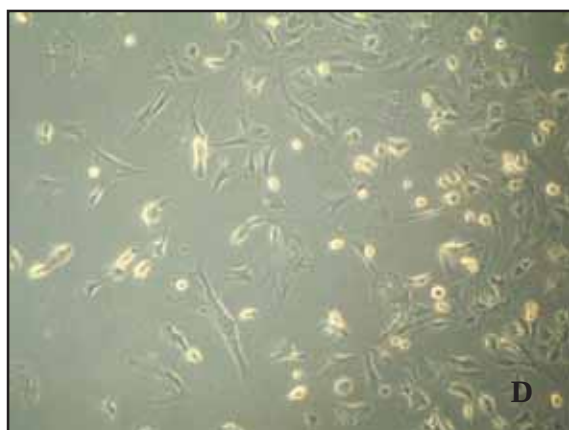


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

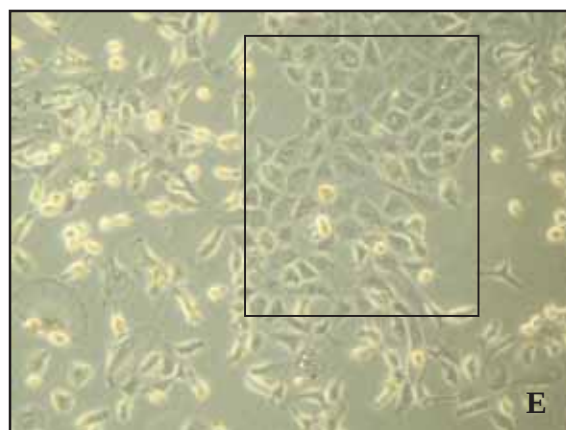


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 17: Cultura de urotélio em plena expansão. Em **D**, Células epiteliais em início de adesão, objetiva de 100x. Em **E**, Células Epitelióides agrupadas delimitando um verdadeiro tecido ou monocamada, objetiva de 100x.

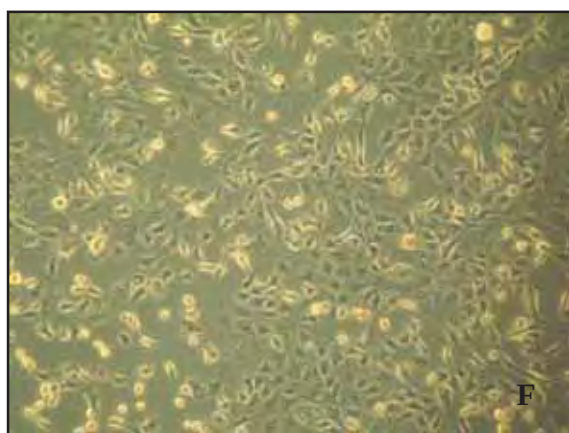


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

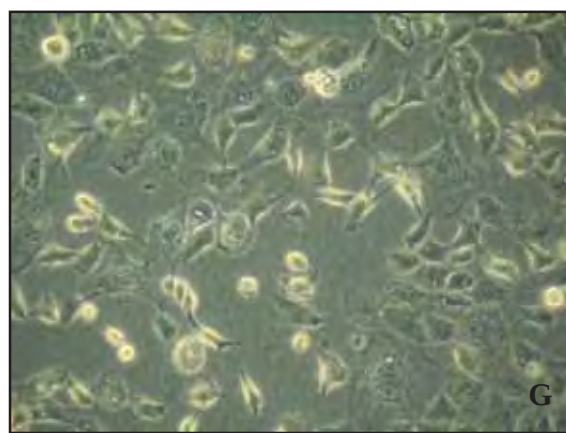


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 18: Em **F**, Células uroteliais em maior confluência, objetiva de 100x. Em **G**, Células uroteliais em aumento de 200x.

Uma parte das células uroteliais foi congelada para compor o banco de células do laboratório. No entanto, novos frascos de cultura foram semeados com a outra parte dessas células, juntamente com placas de Petri contendo lamínulas em seu interior, para que as células crescessem sobre elas. As lamínulas colocadas em placas de Petri, contendo uma fração dessas células, foram deixadas em cultura por dez dias, para que assim, sua superfície pudesse ser totalmente coberta pelas células e a devida coloração do tecido em questão pudesse ser realizada.

Para a devida caracterização do epitélio foi realizada análise histológica com diferentes colorações. Foram utilizadas as colorações Hematoxilina e Eosina (H&E) e foi realizado o teste com Anti-vimentina para analisarmos se as células em questão eram células-tronco mesenquimais ou um tecido epitelial, visto que o teste para anti-vimentina apresenta-se positivo para células-tronco mesenquimais. A Vimentina (52-58 kD) é uma proteína da família filamentosa. Filamentos intermediários são uma característica estrutural importante de células eucarióticas. Eles compõem o citoesqueleto, juntamente com microtúbulos e microfilamentos de actina. Embora a maioria dos filamentos intermediários sejam estruturas estáveis, nos fibroblastos, a vimentina existe como uma estrutura dinâmica. Esse filamento é usado como marcador para tecidos derivados do mesoderma. Tais análises foram realizadas no Instituto de Biociências-IB-UNESP no Departamento de Morfologia em colaboração com a equipe do Prof. Sérgio Felisbino. Após a confirmação histomorfológica do epitélio, a técnica de expansão *ex-vivo* foi padronizada para a etapa subsequente: implantação no gel.

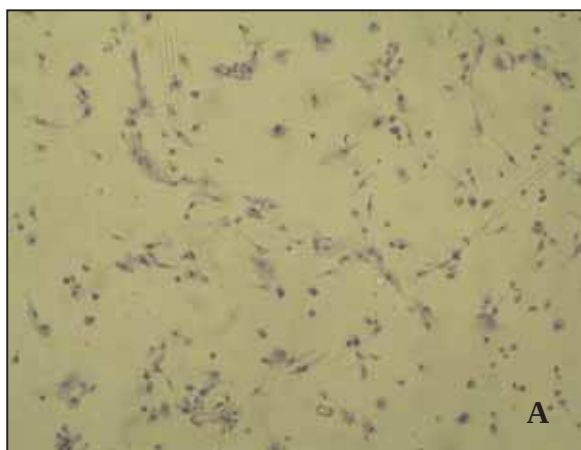


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

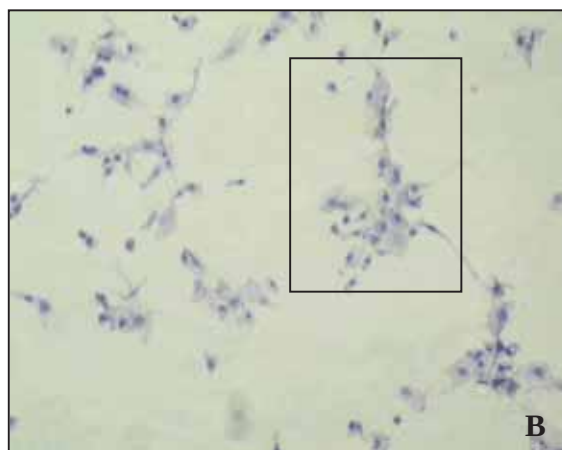


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 19: Urotélio com coloração H&E (Hematoxilina e Eosina). Em **A** temos uma objetiva de 100x. Em **B**, destaca-se formação epitelióide, em que as células permanecem ligadas por junções intercelulares. Objetiva de 200x.

Nas figuras abaixo podemos observar que não houve coloração marrom característica de resultado positivo do teste com Anti-Vimentina. Nesse caso, o resultado foi negativo para Anti-Vimentina, o que sugere que as células em questão não eram células - tronco mesenquimais.

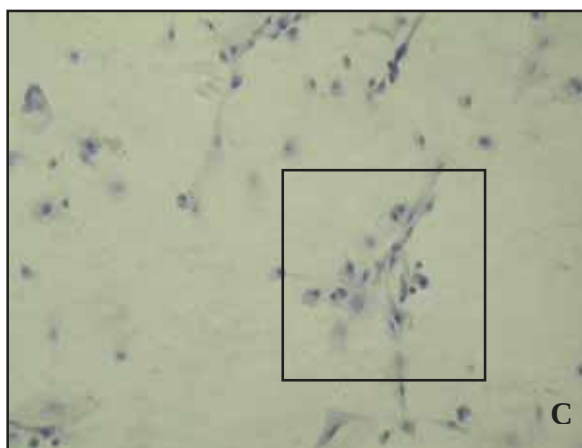


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

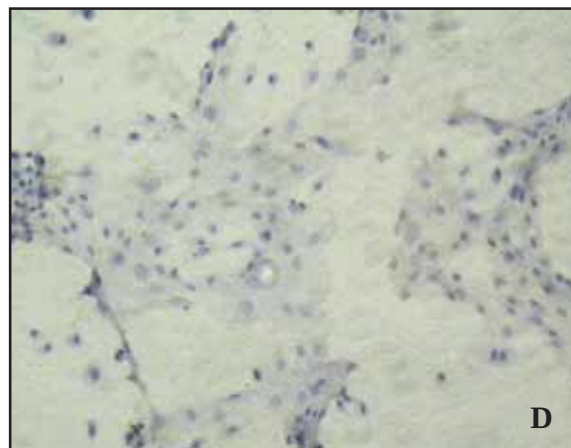


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 20: Células apresentando resultado negativo para Anti-vimentina. Em **C**, vemos alguns focos celulares na objetiva de 100x. Em **D**, vemos focos maiores, com as células apresentando aspecto de epitélio.

4.2 Implantação das células nos *Scaffolds*

A primeira e a segunda etapas foram realizadas independentemente. O que se pretendia analisar era, primordialmente, se as células se incorporariam ao gel de plaquetas e, visto que houve adesão, posteriormente, o propósito era de observar se as células embebidas no gel iriam aderir à parede interna da aorta, compondo assim, a estrutura interna da neo-uretra. Portanto existiriam dois *scaffolds* distintos: o *scaffold* - gel e o *scaffold* - aorta.

4.2.1 Implantação das células no *scaffold* – gel

O *scaffold* - gel é um modelo de fácil obtenção e manutenção, realizado de acordo com os protocolos do laboratório de engenharia celular. As células implantadas foram observadas e seu crescimento acompanhado por microscopia invertida. A documentação do crescimento celular nesse *scaffold* foi dificultada devida sua conformação 3D, a qual, obviamente, não proporcionou a clareza observada na monocamada cultivada anteriormente. (Figura 21).

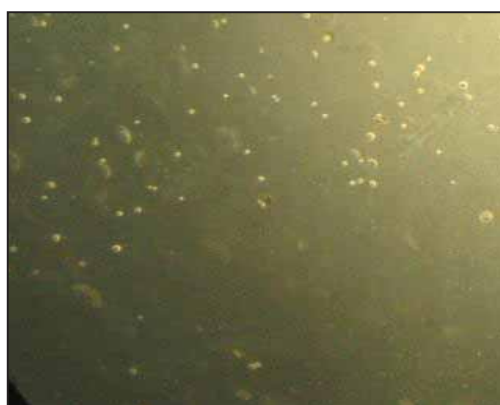


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 21: Células uroteliais em *scaffold*-gel. Por apresentarem - se em estrutura 3D, fixadas ao gel, sua visualização é dificultada. Objetiva 100x.

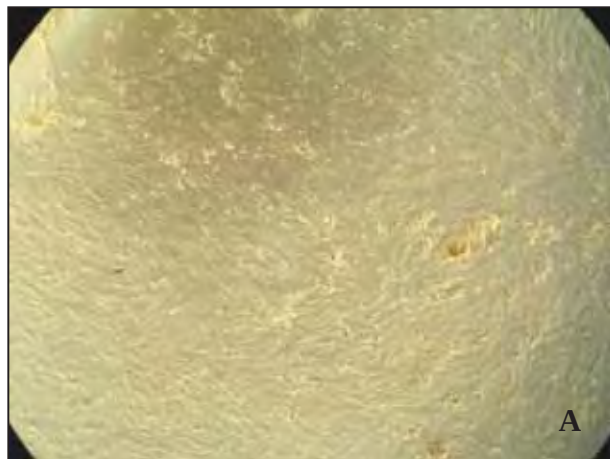


Foto: Arquivo Pessoal, 2010



Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figura 22: Em **A**, células uroteliais implantadas no *scaffold* 3D ou Gel de Plaquetas, objetiva de 50X ph1. Em **B**, as células implantadas apresentam aspecto fibroblástico, objetiva de 100x.

4.2.2 Implantação das células no *scaffold* – aorta

O *scaffold* - aorta também é um modelo de fácil obtenção. Além do mais, após tratamento para decelularização, é um modelo eficaz para a cultura celular, em especial neste caso, devido sua estrutura tubular, a qual se assemelha à forma da uretra.

4.3 Histologia dos complexos células – *scaffold* e células em gel-*scaffold*

Foi realizada a histologia dos complexos contendo as células de urotélio e gel de plaquetas associados e células uroteliais apenas. As figuras a seguir representam os ensaios realizados com a aorta e o urotélio.

A figura 23 nos mostra o ensaio realizado com aorta decelularizada recebendo células uroteliais encapsuladas em gel. A figura 24 representa o urotélio depositado na porção interna da aorta sem a presença de gel como *scaffold*.

A microencapsulação do gel no suporte de aorta inerte não permitiu a absorção do gel pela aorta, ficando o urotélio retido na malha do gel, o que dificulta futuras aplicações *in vivo*. No entanto, quando o urotélio foi aplicado isoladamente na luz da aorta decelularizada, as figuras 25,26 e 27 mostram que as mesmas aderiram ao suporte e permaneceram íntegras.

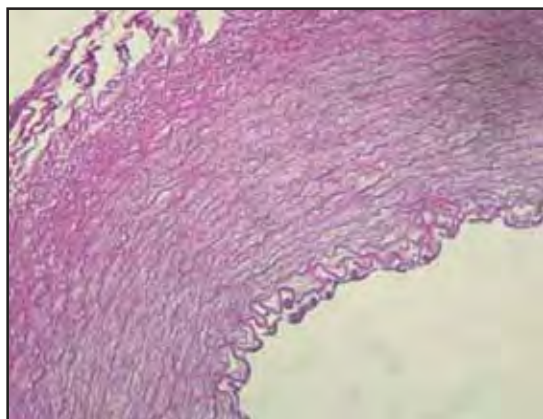


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

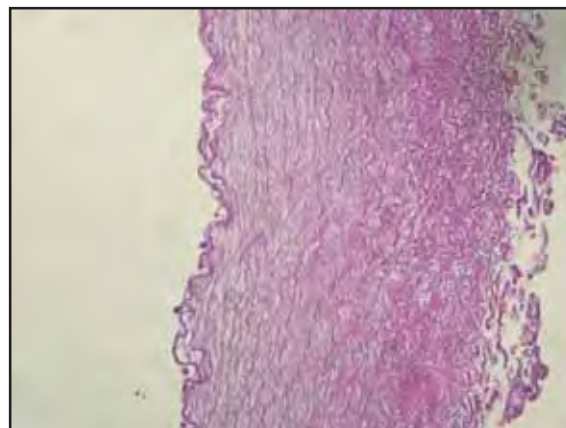


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figuras 23 e 24 : Em **A** vemos aorta descelularizada com células uroteliais encapsuladas em gel. Em **B**, vemos urotélio depositado na porção interna na aorta, sem a presença de gel. Evidenciamos poucas células aderidas. As fotos apresentam-se em aumento de 200x Ph2 .

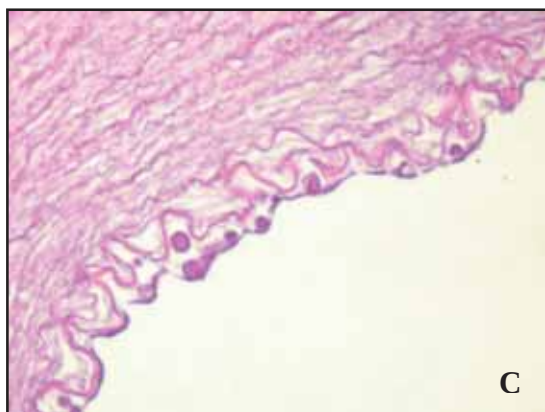


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

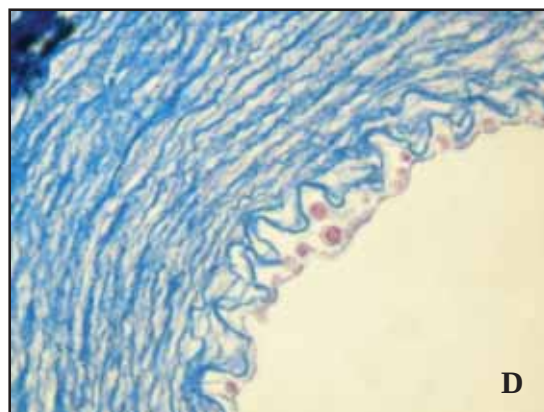


Foto: Arquivo Pessoal, 2010

Figuras 25e 26: Em **C**, vemos células aderidas ao suporte em coloração de Hematoxilina e Eosina. Em **D**, vemos células aderidas em coloração Tricromo de Masson, com finalidade de distinguir células do tecido conjuntivo circundante. Aumento 200 x Ph2.

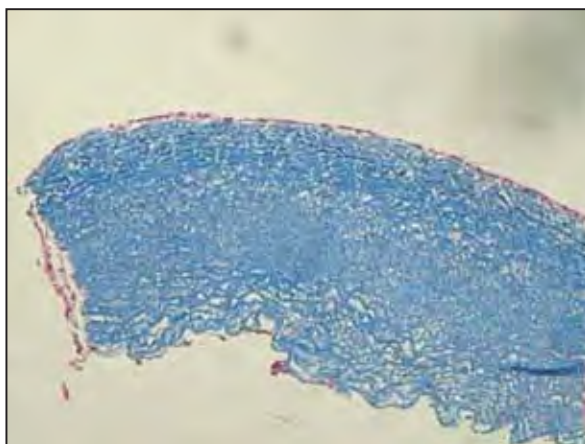
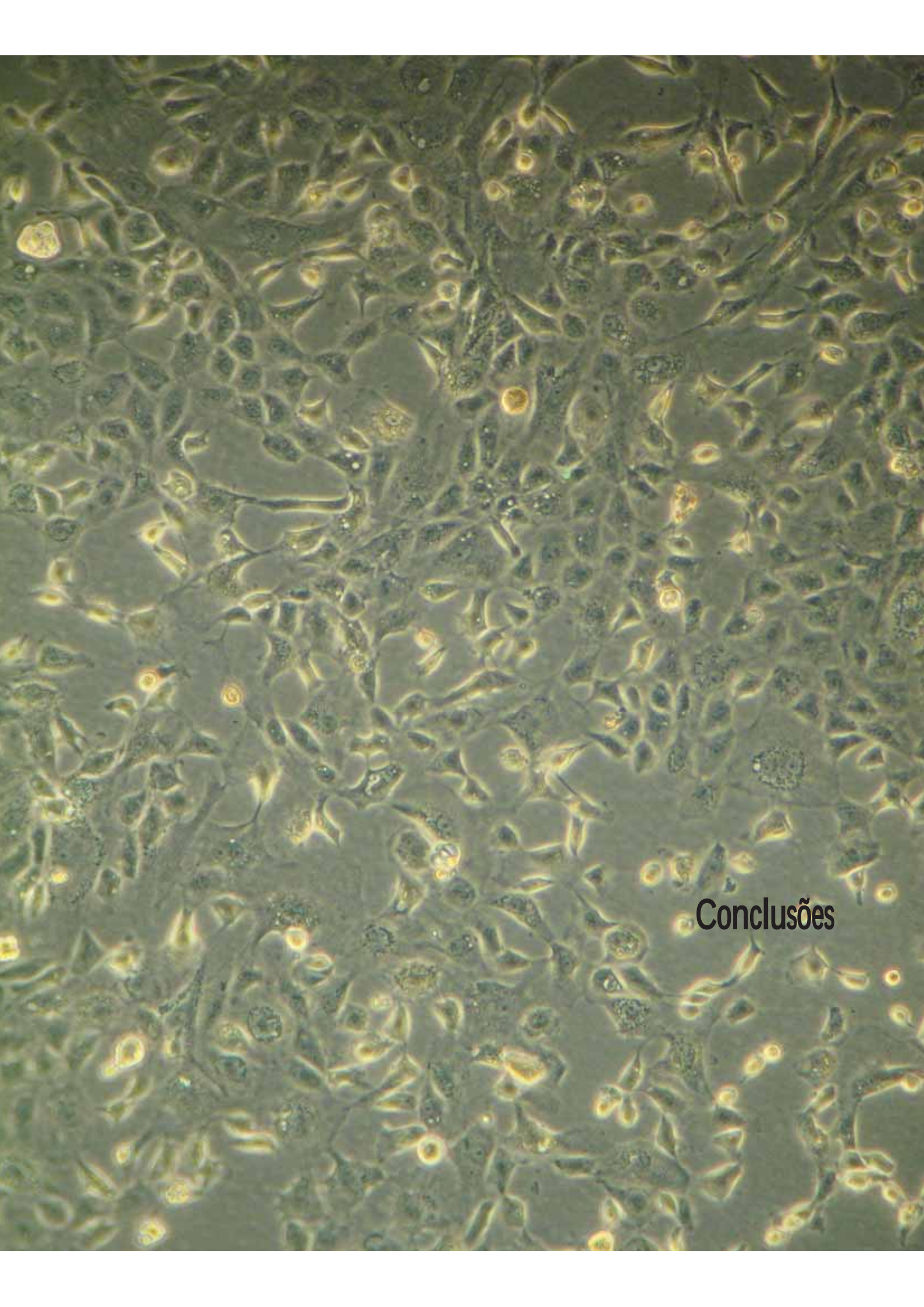


Foto: arquivo pessoal, 2010

Figura 27: Células uroteliais aderidas delimitando o contorno da aorta. Coloração Tricromo de Masson 100x.

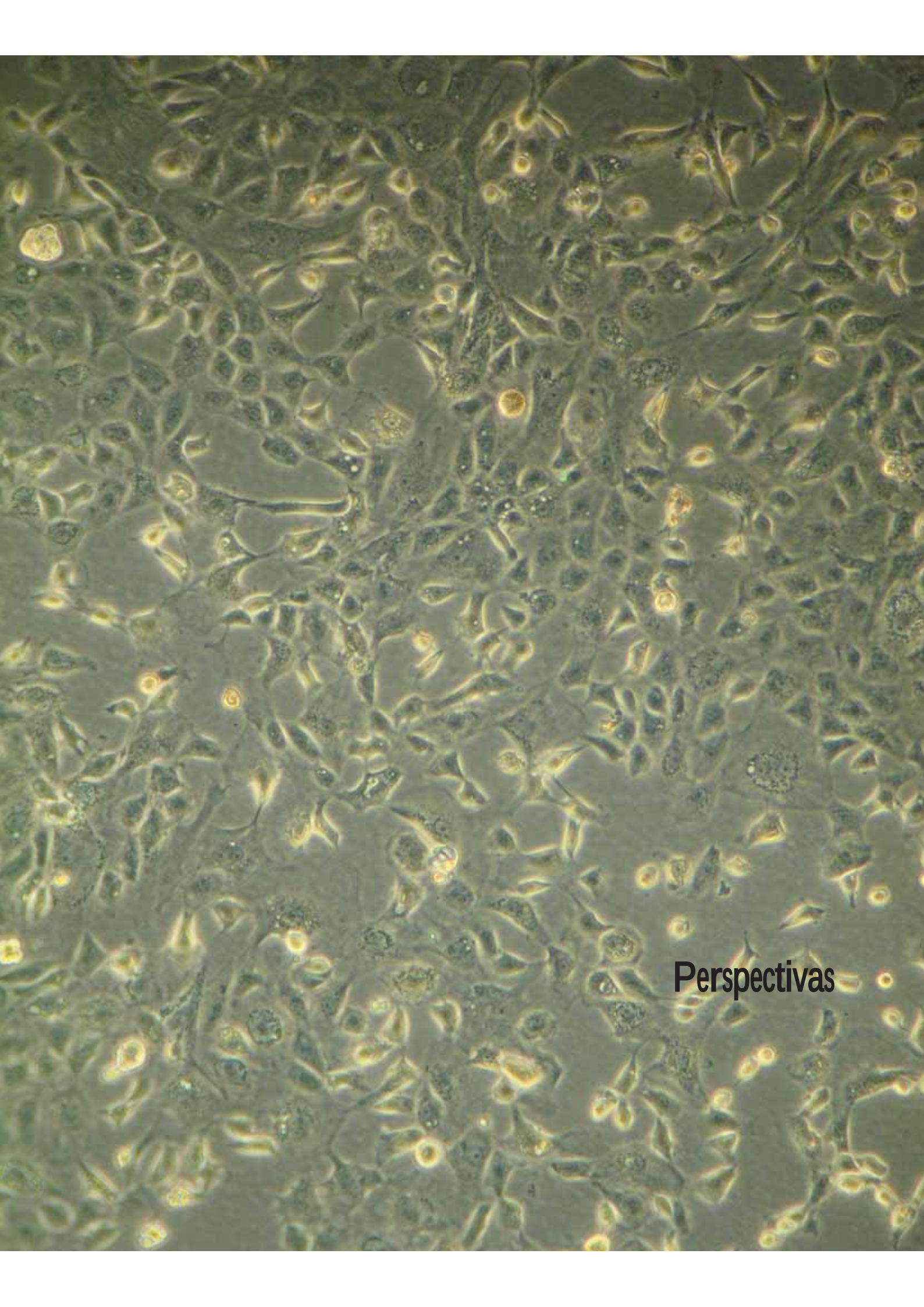


Conclusões

5. Conclusões

Foi possível:

- Isolar e estabelecer expansão *in vitro* de células uroteliais de bexiga de coelho, após realização de dissociação mecânica;
- Padronizar a técnica de cultivo de células uroteliais de coelho em arcabouço 3D ou gel de plaquetas, visto que as células aderiram ao gel e mativeram-se vivas;
- Obter a adesão das células de urotélio junto ao *scaffold* - gel de plaquetas e
- Promover a adesão das células junto ao tecido biodegradável (*scaffold* – matriz acelular de aorta suína) que irá compor a neo-uretra.

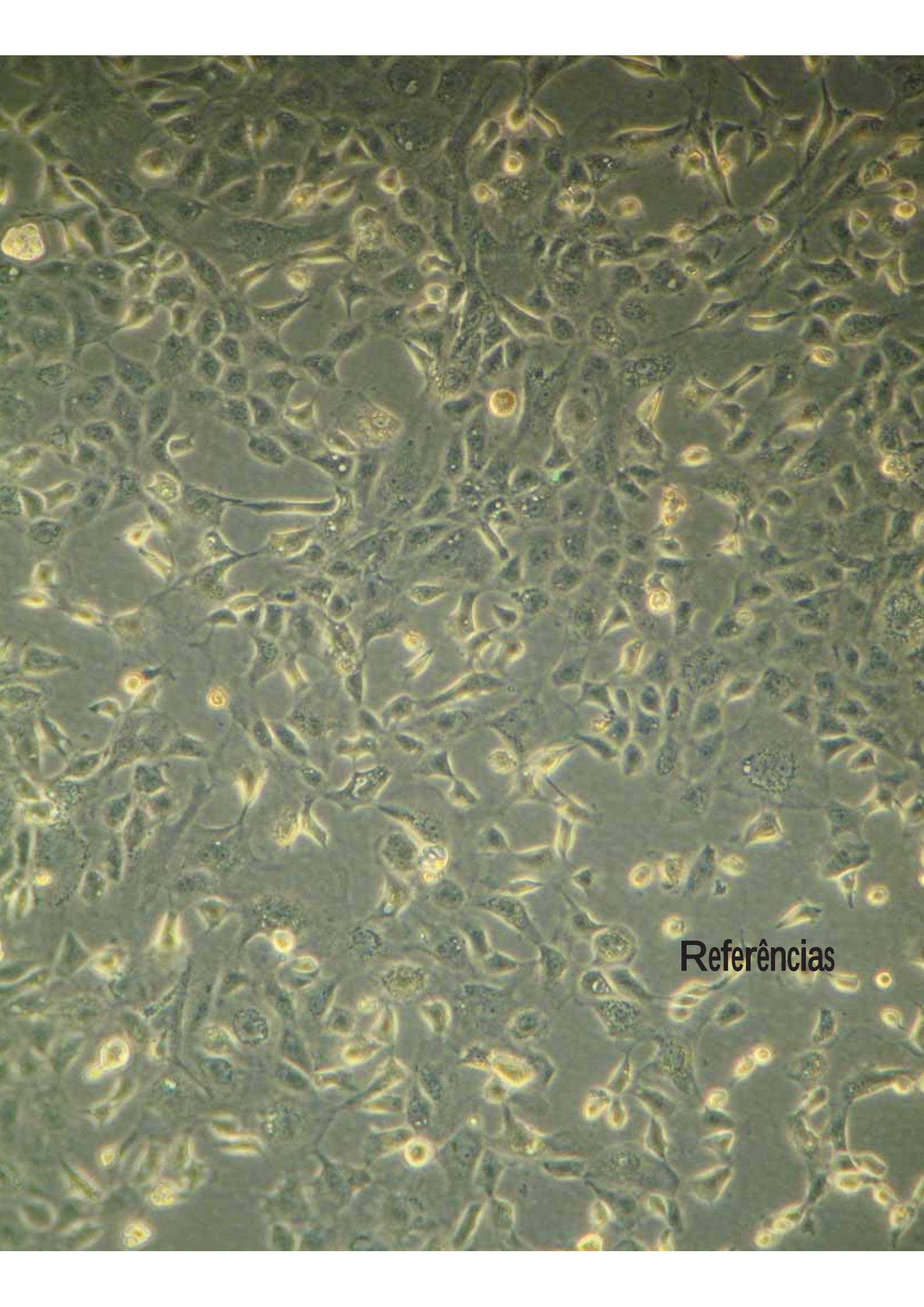


Perspectivas

6. Perspectivas

Pretende-se utilizar a técnica de expansão *ex vivo* de células uroteliais em *scaffold* 3D para auxiliar a geração de implantes artificiais mais eficientemente, como no caso da neo-uretra de coelho desenvolvida por bioengenharia. Além desta proposta, outra possibilidade seria a utilização da técnica de expansão *in vitro* de tecido urotelial para avaliar a possível atuação de drogas utilizadas nos diversos tratamentos de patologias do trato urinário.

A utilização de células uroteliais em um *scaffold* biodegradável é ainda uma alternativa para tratamentos convencionais de problemas urológicos que não obtiveram sucesso até então e, possivelmente, apresentariam sucesso com o transplante.



Referências

7. REFERÊNCIAS

- 1.Drewa T. The Urothelium Cell culture on the starch scaffold. Acta Pol Pharm.2006; 63: 153-5.
- 2.Acesso em 12/5/10 http://www.gmbahia.ufba.br/adm/arquivos/2008_sup1.pdf
Gazeta Médica da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia.UFBA.
3. Zago, M A , The pathophysiology of sickle cell disease: from the genetic mutation to multiorgan disfunction. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. vol.29 no.3 São José do Rio Preto July/Sept. 2007.
- 4.Acesso em: 11/04/2010 <http://www.demet.ufmg.br/docentes/rodrigo/engtecidos.htm>
Laboratório de Engenharia de Polímeros e Compósitos- Engenharia de Tecidos.
- 5.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.
- 6.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.
7. 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.
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. 30. Kawachi,E.,Y. Bertan, C. A., Reis, R.R.,Alves, O.L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma área interdisciplinar. Química Nova.23(4),518-522 (2000).

10. Jâncár J, Slovíková A, Amler E, Krupa P, Kecová H, Planka L, et al. Mechanical response of porous scaffolds for cartilage engineering. *Physiol Res.*2007; 56: 17-25.
11. Moore K L, Persaud T,V N. *Embriologia Clínica* 8a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
12. Ross M H, Rowrell L J. *Histologia texto e altas*. 2a ed. editora médica panamericana, 1993, p.545.
13. Junqueira L C, Carneiro J. *Histologia básica texto e atlas*. 11a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara,2002, p. 387.
14. Birder L A, Kanai A J,Cruz F, Moore K, Fry C H .Is the Urothelium Intelligent? *Neuro Urodyn.*2010; 29:598-602.
15. Acesso em: 26/01/2010
<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/Epithelial/Images/blad042he.jpg>
16. Hiroshi Matsunuma, Hideaki Kagami, Yuji Narita, Ken-Ichiro Hata, Yoshonari Ono, Shinichi Ohshima, Minoru Ueda. *Tissue Engineering*. March 2006, 12(3): 509-518.
17. Slavov C. Urethroplasty with combined free tissue grafts. *Khirurgiia (Sofiia)*. 2006; (6): 23-5.
18. Burbige KA, Hensle TW, Edgerton P. Extragenital split thickness graft for urethral reconstruction. *J Urol*. 1984; 131: 1137-9.
19. Ehrlich RM, Alter G. Split-thickness skin graft urethroplasty and tunica vaginalis flaps for failed hypospadias repairs. *J Urol*. 1996; 155: 131-4.

20. Trindade Filho JCS. Avaliação funcional, morfométrica e histológica da matriz acelular de aorta e da mucosa bucal quando implantados na uretra: estudo experimental no coelho [tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista; 2002.
21. Atala A. Bioengineered tissues for urogenital repair in children. *Pediatr Res*. 2008; 63: 569-75.
22. Burger R A, Muller SC, El-Damanhoury H, Tschakaloff A, Riedmiller H, Hohenfellner R. The bucal mucosal graft for urethral reconstruction: a preliminary report. *J Urol*. 1992; 147: 662-4.
23. Yerkes EB, Adams MC, Miller DA, Brock JW. Coronal cuff: a problem site for buccal mucosal grafts. *J Urol*. 1999; 162: 1442-4.
24. Macedo Jr A, Fichtner J, Fisch M, Srougi M, Hohenfellner R. Novos conceitos em hipospádia: utilização de mucosa bucal para reconstrução de uretra. *Rev Paul Pediatr*. 1997; 15: 14-6.
25. Atala A. Future perspectives in reconstructive surgery using tissue engineering. *Urol Clin North Am*. 1999; 26: 157-65.
26. Chen F, Yoo JJ, Atala A. Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair. *Urology*. 1999; 54: 407-10.
27. 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.
28. Ahmed EA, Mohamed AEH, Ashraf T. Hafez. Urethral replacement: a comparison between small intestinal submucosa grafts and spontaneous regeneration. *BJU Int*. 2004; 94: 1132-5.

29. Chester JK, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1113-25.
30. Faculdade de Medicina. Procedimentos Operacionais padrão para obtenção de meio de cultura. Botucatu : Hemocentro, Laboratório de Engenharia Celular; 2010.
31. Moraes A M, Augusto E F P, Castilho L R. Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia gênica. São Paulo: Rocca; 2008. p.31- 2.
32. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006; 27: 3675-83.
33. Quitzan JG. Avaliação funcional e histológica do enxerto tubular de matriz acelular arterial heteróloga como substituto da uretra em coelhos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2009.