



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

HENRIQUE DE SOUZA VIEIRA

**ESTUDO COMPARATIVO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS
EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS COM
CORDIA ECALYCVLATA E BIOCURATIVO**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título
de Mestre(a) em Pesquisa e
desenvolvimento – Biotecnologia
Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Rosana Rossi Ferreira

**Botucatu
2015**

Henrique de Souza Vieira

**ESTUDO COMPARATIVO DE CITOCINAS ANTI-
INFLAMATÓRIAS EM CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS CULTIVADAS COM *CORDIA*
ECALYCVLATA E BIOCURATIVO**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a)
em Pesquisa e desenvolvimento –
Biotecnologia Médica.

Orientador (a): Prof(a).Dr(a). Rosana Rossi Ferreira

Botucatu
2015

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, meu salvador e criador de todas as coisas, só a Ele há Honra a Glória e o Louvor e sem Ele todo este trabalho não existiria, pois foi quem me deu a sabedoria e conhecimento para realizá-lo e dedico também há meus pais, irmã, toda a família e amigos que estiverem comigo em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a **DEUS**, o único e suficiente salvador da minha vida que me deu sabedoria e conhecimento e oportunidade para realizar este trabalho de maneira digna. Obrigado Senhor.

Aos meus pais, **Celso e Selma** que não medem esforços para me darem as melhores condições de estudos e são meu porto seguro. Obrigado pela educação e por me ensinar o caminho que devo seguir e por sempre estarem comigo. Em toda minha vida agradeço a Deus por ter me dado vocês. A minha irmã **Beatriz** por me aturar com minhas manias e chatices e estar sempre ao meu lado.

A todos **meus familiares**, por me apoiarem e estarem comigo, me dando forças para lutar pelos meus sonhos e alegrarem-se com minhas conquistas.

Meu amigo e cunhado **Evandro Lima**, que me ajudou com as traduções e pelo apoio sempre.

À Profa. Dra. **Rosana Rossi Ferreira**, pela pessoa que é, pelo cuidado de mãe, amizade e oportunidade que me deu, pelos grandes e sábios conselhos, pelos ensinamentos e por acreditar em mim. Agradeço a Deus por colocar uma pessoa tão especial em minha vida. Obrigado por tudo Ro.

À Profa. Dra. **Elenice Deffune**, por estar disposta a ensinar e nunca negar seu vasto conhecimento. E que apesar de todas as dificuldades imposta pela vida, continua sempre alegre e com desejo de sempre fazer o melhor. Obrigado por acreditar em mim e confiar no meu trabalho.

À **Josy Vicentini Campanhã de Oliveira**, uma amiga que irei levar pro resto da vida, continue sendo essa pessoa maravilhosa que é. Já tenho a certeza que será uma mãe fantástica e o Henrique (que nome lindo) será muito amado por todos. Obrigado por sempre me ajudar.

À todos que passaram pelo laboratório de engenharia celular **Priscila Murador, Michele Janegtiz Acorci Valério, Mariele Gobo, Regina Avelina, Daniel Jesuino Basseto, Vitória, Woner, Ana Carolina, Natália, Juliana Ravelli e Aline Aun**, sempre lembro de vocês e da alegria que vivemos juntos, obrigado galera pelos momentos de lembranças, aprendi muito com cada um.

À **Thaiane Cristine Evaristo, Helga Caputo Nunes, Ana Cláudia Simões, Heloísa Vicente Garcia, Isabele Silveira Rosa Vanni**, por todas as risadas e pérolas, agradeço todos os dias por ter me dado vocês como amigas, vou levar vocês no meu coração, tamo junto meninas, podem contar comigo sempre.

À toda **equipe do Laboratório de Engenharia Celular, Andrei, Ana Livia, Camila, Juliane, Ondina**, muito obrigado pela amizade de vocês.

Profa. Dra. **Márjorie Golim**, que me ajudou em todos os experimentos e me orientou muito no que fazer em todo o trabalho, muito obrigado pela dedicação, preocupação e amizade.

À **equipe do Laboratório de Citometria de Fluxo: a Léia, Caroline Mitiká, Aline**, pela ajuda com os experimentos análises e pela dedicação com este trabalho e pela amizade, obrigado mais uma vez.

A toda equipe do laboratório de componentes lábeis do Hemocentro, **Gislene, Giovana, Andréa, Priscila, Cida, João e Vera**, pelos dois anos de amizade e trabalho, brigas e muitas alegrias que tivemos juntos, obrigado por tudo que me ensinaram e pelas muitas risadas e músicas nos plantões de sábado.

A todos os amigos do **Hemocentro de Botucatu**, pela amizade e companheirismo.

A todos os **pacientes** que gentilmente participaram desta pesquisa.

Epígrafe

“Conquistas sem riscos são sonhos sem méritos. Ninguém é digno dos sonhos se não usar suas derrotas para cultivá-los”.

O VENDEDOR DE SONHOS
Augusto Cury

RESUMO

VIEIRA, H. S. **Estudo Comparativo de Citocinas Anti-Inflamatórias em Células Tronco Mesenquimais Cultivadas com *Cordia ecalyculata* e Biocurativo**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

Introdução: Diante da constatação clínica de que muitos pacientes não conseguem benefício completo da remissão de ulcerações crônicas venosas de etiologia multifatorial utilizando tratamentos convencionais associados ou não à Fitoterapia, o Setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu estabeleceu desde 2003, um protocolo de produção de curativos bioativos, que interagem com a lesão e estimulam a recuperação da área danificada por indução das células-tronco comissionadas da pele via fatores de crescimento. Através da utilização da Engenharia de Tecidos que consiste na regeneração de órgãos e tecidos, obtidos através da coleta de partes de órgãos ou tecidos do indivíduo, que, dissociados em células, são cultivadas sobre arcabouços ou suportes sintéticos (*scaffolds*). A *Cordia ecalyculata*, conhecida como porangaba, é da família das boraginaceas, é um arbusto cujo principio ativo é a alantoína que possui capacidade anti-inflamatória favorecendo a proliferação celular, acelerando a regeneração da pele lesada, epitelização e a proliferação de novas células. Através do conhecimento popular deste fitoterápico propõe-se para estudo a avaliação da ação anti-inflamatória dos extratos da planta em arcabouços (*scaffolds*) através da liberação de citocinas pro e anti-inflamatórias. **Objetivos:** 1) Comparar os índices de apoptose e viabilidade celular em cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs) 2) quantificar os níveis de citocinas anti-inflamatórias liberadas em culturas de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo na presença de cola de fibrina, gel de plaquetas, quitosana dopada sob a ação de *Cordia ecalyculata*. 3) Criar um banco de citocinas anti-inflamatória e 4) Definir as melhores condições de cultura celular para se obter elevadas concentrações de citocinas anti-inflamatórias; **Material e Método:** foi coletado fragmento de pacientes distintos nos quais o tecido em questão foi rigorosamente submetido aos protocolos de assepsia, dissociação mecânica, isolamento, cultivo celular de CTM-TA. As células foram cultivadas até chegar-se ao número de células necessário para os estudos com a *Cordia*, nas quais sabidamente expressam os marcadores de superfície que as caracterizam como as populações de interesse e deste modo, pode-se proceder ao protocolo de plaqueamento. Os *scaffolds* foram confeccionados segundo protocolos dos curativos bioativos pré-estabelecidos e o preparo do meio de cultura da *Cordia* foi utilizado através da concentração total dos extratos pré-estabelecidos no IQ-Araraquara antes de serem enviados ao Laboratório de Engenharia celular da UNESP de Botucatu. **Resultados e Discussão:** conseguiu-se avaliar que na concentração de 100µg/ml o extrato se mostrou tóxico para célula e que as concentrações de 25 e 50µg/ml puderam colaborar para a liberação de citocinas sem ser tóxica para a célula. Com relação ao biofibrin pode-se observar que as CTMs agem de maneira positiva com o *scaffold* existente na placa. **Conclusão:** As células foram submetidas a diferentes *scaffolds* em dois diferentes tempos de cultura onde se pode que em alguns *scaffolds* a liberação e adaptação das células ocorreram de maneira favorável e que depende do tempo de cultivo para a liberação de algumas citocinas.

Palavras-Chaves: Terapia celular - células tronco – *Cordia ecalyculata*

ABSTRACT

Introduction: In front of the medical finding that many patients can't earn total benefit of multifactor a etiology chronicle venous sorenesses using conventional treatments, relate door not with phitotherapy, the Biotechnology Department of the Botucatu blood center stablished, since 2003, a protocol of bioactive healing production that interface with the sore and stimulate the recover of the damaged area by the introduction of stem cells, commissioned from the skin by growing factors. Using the Tissue Engineering, that consists, in the organ and tissues regeneration, obtained by collection pieces of organs or tissues of the subject, that, dissociated in cells, are cultivated on scaffolds. The *Cordia ecalyculata*, known as porangaba, belongs to the boraginaceas Family, is a a plant, which the active ingredient is the allantoin, that has the anti-inflammatory capacity helping the cell proliferation, boosting the damaged skin recover and epitelization. By the popular knowledge of this phytotherapic, it proposes to study the evaluation of the anti-inflammatory action of the plant extracts in scaffolds by the liberation of pro cytokines and anti-inflammatory. **Objectives:** 1) compare the apoptosis index and the cell feasibility in mesenchymal stem cell culture. 2) Quantify the anti-inflammatory citokines level liberated in mensenchymal stem cell culture isolated in fat tissue in the presence of fibrin glue, platelet gel, and doped chitosan by the action of *Cordia ecalyculata*. 3) Develop a anti-inflammatory citokynes bank. 4) Define the best cell culture conditions to obtain big concentrations of anti-inflammatory citokynes. **Material and Method:** it was collected fragment of distinct patients in which the tissue was rigorously submitted to the asepsis protocol, mechanical dissociation, isolation, CTM-TA cell culture. The cells were cultivated until the needed number to the studies using the *Cordia*, in which is known expresses the surfaces markers that feature them as the interested population and, by this way, it's possible to proceed to the plating protocol. The scaffolds were made following the bioactive healing protocols and the prepare of the culture place was used by the total concentration of extracts, pre-stablished in the IQ-Araraquara, before being sent to the Cell Engineering Lab of UNESP Botucatu. **Results and Discussion:** It was possible to evaluate that, in the concentration of 100µg/ml, the extracted became toxic to the cell and the concentrations of 25 and 50µg/ml could colaborate to the liberation of citokynes without being toxic to the cell. In relation of the biofibrin, we can observate that the CTMs worked a positive way with the scaffold that exists in the plate. **Conclusion:** The cells were submitted to different scaffolds, in to different culture times, where it can realize that in some scaffolds, the liberation and adaptation of the cells worked in an auspicious way, and it depends of the time of cultivation to some citokynes being liberated.

Key words: Cell therapy – stem cell – *Cordia Ecalyculata*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Laboratório de Atividades Complementares	21
FIGURA 2 - Sala de screening, área limpa	22
FIGURA 3 - antessala Nicho 1, área limpa	22
FIGURA 4 - Sala Nicho 1 área limpa	23
FIGURA 5 – Microscópico invertido Zeiss® Axiovert 200 com acoplamento de câmara fotográfica	23
FIGURA 06 – Extratos de <i>Cordia ecalyculata</i> em diferentes solventes enviados pelo IQ-Araraquara para as culturas celulares	24
FIGURA 07 – Técnica de dissociação mecânica do tecido adiposo de pele proveniente de descarte consentido.....	25
FIGURA 08 – Repique das células para frascos de cultura maiores (expansão) 26	
FIGURA 9: Modelo esquemático representando o padrão a ser seguido durante processo de contagem de células na Câmara de Neubauer	27
FIGURA 10: Contador manual. Fonte: Eikonai do Brasil	27
FIGURA 11: Esquema ilustrativo da contagem de viabilidade celular em câmara de Neubauer	28
FIGURA 12 - Citômêtro FACScalibur da marca BD®	29
FIGURA 13 – Esquema mostrando como é realizada a determinação das citocinas utilizando o kit de CBA - BD®	33
FIGURA 14 - Esquema de utilização dos <i>Scaffolds</i> sem a presença do extrato etéreo de <i>Cordia</i>	34
FIGURA 15 - Esquema de utilização de <i>scaffolds</i> com a presença do extrato etéreo de <i>Cordia</i>	35
FIGURA 16 - Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase evidenciando a aderências das CTMs em aumento de 5x	37
FIGURA 17 - Fotomicrografia em microscopia invertida, evidenciando a aderências das CTMs. Aumento 10x.....	37

FIGURA 18 - Fotomicrografia em microscopia invertida, evidenciando a aderências das CTMs. Aumento 20x	38
FIGURA 19 - Fotomicrografia de microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 5x.....	39
FIGURA 20 - Fotomicrografia em microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 10x.....	39
FIGURA 21 - Fotomicrografia em microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 20x	40
FIGURA 22 – Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase de CTMs em confluência \geq que 80%. Aumento de 5x.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** – Monitoramento dos marcadores (CD45,34 e 90) de superfície de CTMs por citometria de fluxo..... 41
- GRÁFICO 2** – Índice de apoptose de culturas de células-tronco mesenquimais (CTMs) em tolerância a *Cordia* 43
- GRÁFICO 3** - Comparação da viabilidade celular de células-Tronco Mesenquimais (CTMs) em tolerância a *Cordia* 44
- GRAFICO 4** - Nível de citocinas liberadas no período de até 18horas em cultura de CTMs sob os scaffolds Biofibrin, gel de plaquetas, quitosana dopada e quitosana. 45
- GRAFICO 5** - Nível de citocinas liberadas no período de até 48horas em cultura de CTMs sob os *scaffolds* Biofibrin, gel de plaquetas, quitosana dopada e quitosana 46
- GRAFICO 6** – Níveis de citocinas IL-8, IL-1beta e IL-6 liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18 e 48 horas na ausência (Controle) e presença do *scaffolds* Gel de plaquetas. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6 47
- GRÁFICO 7** – Níveis de citocinas pró-inflamatórias liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18 e 48 horas na ausência (Controle) e presença do *scaffolds* biofibrin..... 48
- GRÁFICO 8** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18h na ausência de *scaffolds* (Controle) sem *Cordia* e Controles na presença de 03 concentrações de *Cordia* 49
- GRÁFICO 9** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* Biofibrin, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 50

- GRÁFICO 10** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* Biofibrin, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 50
- GRÁFICO 11** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* Gel de Plaquetas, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6 51
- GRÁFICO 12** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* Gel de Plaquetas, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6 52
- GRÁFICO 13** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* *Quitosana dopada*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 53
- GRÁFICO 14** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* *Quitosana dopada*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 53
- GRÁFICO 15** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* *Quitosana*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 54
- GRÁFICO 16** – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* *Quitosana*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações 55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Células-Tronco e Terapia Celular	15
1.2 Citocinas	16
1.3 <i>Cordia Ecalyculata</i>	17
1.4 <i>Scaffold</i> e Biomateriais.....	18
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Instalações.....	20
3.2 Obtenção dos Extratos de <i>Cordia ecalyculata</i>	24
3.3 Obtenção do Tecido Adiposo	24
3.4 Isolamento do Tecido Adiposo	25
3.5 Contagem e Viabilidade Celular.....	26
3.6 Caracterização Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo	29
3.7 Cultura e Expansão das CTMs	30
3.8 Preparo do Meio de Cultura com <i>Cordia ecalyculata</i>	30
3.9 Testes de Apoptose	32
3.10 <i>Scaffolds</i>	32
3.11 Origem dos <i>Scaffolds</i>	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 – Resultados da Cultura Celular de CTMs	36
4.2 Intercorrência na Cultura Celular de CTMs	38
4.3 Caracterização Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo.....	40
4.4 Cultura e Expansão de CTMs.....	41

4.5 Índice de Apoptose e Viabilidade Celular em Células-Tronco Mesenquimais em Tolerância a <i>Cordia</i>	42
4.6 Comparação do Índice de citocinas inflamatórias liberadas em cultura de células-tronco nos diferentes <i>scaffolds</i> sem a ação da <i>Cordia</i> e com a ação da <i>Cordia</i>	44
5 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

O Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu iniciou suas atividades no ano de 1966 com a Disciplina de Semiologia Dermatológica, para no ano seguinte começar as atividades didáticas, docentes e assistenciais. Desde desta época, o desafio de tratar feridas crônicas se impôs. Mesmo com a evolução tecnológica, muitos são os pacientes que apresentam lesões crônicas que podem causar devastadoras repercussões sociopsicológicas (SMELTZER; BARE, 2009). Estima-se que 1 a 3% da população de países em desenvolvimento sofram de ulcerações de membros inferiores, portanto, apresentando alta incidência e prevalência (FERNANDES, 2006). Diante da constatação clínica de que muitos pacientes não conseguem benefício completo da remissão de ulcerações com os tratamentos convencionais associados ou não à Fitoterapia, o Setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu estabeleceu desde 2003, um protocolo de produção de curativos bioativos, que interagem com a lesão e estimulam a recuperação da área danificada por indução das células-tronco comissionadas da pele via fatores de crescimento.

Após validação de dois produtos para a confecção de curativos bioativos, a cola de fibrina e o gel de plaquetas, e sua aprovação pelo CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) para uso em seres humanos, criou-se o ambulatório especializado na Faculdade de Medicina de Botucatu, no intuito de receber pacientes com feridas crônicas de difícil resolução oriundas de diversas regiões do Estado de São Paulo.

Avaliando as co-morbidades que afetam estes pacientes, identificaram-se muitos fatores que contribuem para o aparecimento das feridas crônicas, como hipertensão arterial, diabetes, obesidade, entre outros. Desta forma, existe grande interesse em aprimorar o tratamento desses pacientes, principalmente nos casos mais crônicos com exposição da matriz extracelular subendotelial, no qual o processo de cura se torna mais difícil e lento.

1.1 Células-Tronco e Terapia Celular

As células-tronco são definidas como uma entidade primitiva e indiferenciada, capaz de auto renovação e diferenciação em um ou vários tipos de células diferenciadas que exercem funções específicas. Sendo que uma célula mãe, em divisão mitótica pode gerar uma unidade idêntica e outra identidade distinta. Na medula óssea, Além das células-tronco hematopoiéticas e endoteliais existe uma população rara de células-tronco multipotentes capaz de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como condrócitos, osteócitos, e adipócitos. (MINGUELL; CONGET; ERICES 2000) são apontadas na literatura como a esperança para a terapia de inúmeras doenças. Mas, ao mesmo tempo, possuem aspectos da sua fisiologia e potencial de diferenciação não totalmente esclarecidas. A denominação “mesenquimal” traz uma conotação da origem de tecidos embrionários internos, que não possuem contato direto com o ambiente externo. As Células Tronco Mesenquimais (CTMs) são capazes de restaurar os elementos de infraestrutura tecidual, como o estroma e a matriz extracelular, além de influenciar na diferenciação das outras células-tronco e delas mesmas. Há indícios de que elas sejam pluripotentes e, portanto possam gerar qualquer tipo celular de um organismo. (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008).

A terapia celular é uma definição de um procedimento terapêutico que visa restabelecer a estrutura e a função do tecido por meio da utilização de uma célula ou grupo de populações celulares. Essa atividade está envolvida em tratamentos como trauma, doenças, processos degenerativos, entre outros. Os avanços ocorridos nessa área possibilitaram a criação de uma nova atuação profissional na área de biotecnologia e bioengenharia. As terapias celulares são apontadas como capazes de eliminar filas para transplantes cardíacos, reduzir o tempo de internação e diminuir a morbidade em casos de queimadura graves, entre outros avanços. (MORAES; AUGUSTO; CASTILHO, 2008, SILVA, C. C. et. al, 2009).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem na reconstituição do tecido. Os

curativos bioativos agem como Terapia Celular Indutiva, nas diferentes fases da cicatrização, mas não controlam o processo inflamatório. Alguns fitoterápicos são utilizados com esta finalidade de favorecer o processo de cicatrização. A calêndula é um destes produtos. No entanto, ao ser adicionada ao curativo bioativo observa queixa de dor em vários pacientes, o que geralmente determina o abandono do tratamento.

Vários estudos foram desenvolvidos no Instituto de Química de Araraquara - UNESP sobre o forte caráter antiinflamatório encontrado em uma planta medicinal denominada *Cordia ecalyculata*. O gênero *Cordia* foi descrito por Linnaeus em 1753 e pertence à família *Boraginacea*, a qual conta com cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies difundidas nos trópicos, nas regiões temperadas e árticas (ARREBOLA et al.2004; ASSONUMA, 2009; DIAS, 2004,).

1.2 Citocinas

As citocinas compõem um grupo heterogêneo de polipeptídios que podem ser denominados de peptídeos regulatórios, pois modificam as funções de diferentes tipos celulares. A maioria das citocinas é produzida indutivamente por várias células e tem função imediata, regulando resposta imune e inflamatória e controlando a proliferação e diferenciação celular. A capacidade de uma citocina em aumentar ou inibir a produção de outras citocinas constitui-se em importante sistema regulatório positivo e negativo para as respostas imunes e inflamatórias. As CTMs secretam uma ampla ordem de citocinas como, por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de hepatócitos, entre outros. Estas citocinas podem modular a sua eficácia. O fator de necrose tumoral (TNF) é um exemplo onde se observa a alteração da expressão de citocinas em CTMs. A IL-6 (Interleucina6) por sua vez podem estimular as células progenitoras, a produção de plaquetas e a produção de imunoglobulinas em células B. A IL- 8 (Interleucina 8) é produzida por uma enorme variedade de células (monócitos, linfócitos, células do endotélio ou epitélio, fibroblastos), é um potente quimiotático e ativador de neutrófilos. A IL-10 (Interleucina 10) é um fator que desativa macrófago, e atua nas células dos macrófagos a fim de produzir efeitos inibidores nas células T e natural killer, ela também regula o crescimento e/ou diferenciação das células B. A IL-1 β age como principal citocina pró-inflamatória, a IL-12p70 é uma citocina reguladora humoral e adquirida,

regulando assim a resposta inflamatória tanto de anticorpos como de células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; KINDT, T. J.; GOLDSBY, R.A; OSBORNE, B. A, 2008). É possível que citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF) induzam o organismo a criar uma série de respostas como febre, aumento do sono e da síntese de proteínas pelo fígado, redução da ingestão de água e de alimentos, aumento da liberação de corticosteroides, diminuição da atividade do cotidiano e da interatividade social. Essas alterações ocorrem na tentativa de acelerar as reações enzimáticas defensivas, reduzir a replicação de patógenos, aumentar a proliferação de células imunes, imobilizar a área que foi lesada e conservar energia (KRAYCHETE; CALASANS; LEAL, 2006). Ao analisar os níveis dessas moléculas, pode-se saber em que estágio está à inflamação.

1.3 *Cordia ecalyculata*

A *Cordia ecalyculata*, conhecida como porangaba, chá-de-bugre ou café-do-mato, é um arbusto cujo tamanho varia de oito a doze metros. Produz uma fruta vermelha que pode ser usada para substituir chá ou café. Tem sido empregada em muitos produtos já disponibilizados para comércio como diuréticos que auxiliam na redução de peso.

O gênero *Cordia*, representado por 26 espécies no Estado de São Paulo, também tem sido usado na medicina popular, como tônico anti-inflamatório, cicatrizante, supressor de apetite, na perda de peso, e no tratamento de picada de cobra, úlceras gástricas e obesidade (ARREBOLA et al., 2004; SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S, 2009).

Um dos princípios ativos contidos na planta, a alantoina, possui capacidade anti-inflamatória que favorece a proliferação celular acelerando a regeneração da pele lesada, a epitelização e a proliferação de novas células. Também age nos vasos linfáticos, promovendo uma drenagem que auxilia no combate à celulite. Por ser diurética, também auxilia na eliminação do excesso de líquido (SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S, 2009).

Estudos realizados no Instituto de Química de Araraquara - UNESP culminaram com a purificação do princípio ativo desta planta para estudos *in*

vitro. Portanto o presente trabalho se justifica unindo duas fortes tendências da tecnologia atual: uso de novos fármacos e a terapia celular.

1.4 Scaffolds e Biomateriais

Todo material utilizado para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos, são conhecidos como biomateriais. Estes devem possuir a capacidade de permanecer em contato com tecido vivo e recompor partes lesadas do organismo, ou ainda, auxiliar na recuperação. Podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluídos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo (BOATENG JS; et. al, 2008). Os biomateriais podem ser produtos metálicos, cerâmicos, poliméricos sintéticos ou naturais, destacando-se o colágeno purificado, as fibras proteicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados.

Os biomateriais podem ser a base de polímeros sendo classificados de duas maneiras: como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários. Os bioestáveis são utilizados na substituição do tecido lesado sem um tempo definido, portanto deve obrigatoriamente obter características físico-químicas e mecânicas de maneira semelhante à função do tecido lesado. Já os bioabsorvíveis são aqueles que se degradam facilmente como é o caso da quitosana (CATHERINE M KOLF; ELIZABETH CHO, 2007; DADALTI, P; et.al., 2007).

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina e que designa um polissacarídeo abundante na natureza. A quitosana é um polissacarídeo que se origina através da desacetilação parcial de quitina. Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis originados por fontes naturais renováveis. A literatura costuma aceitar materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o acético e o fórmico, como sendo quitosana (FRASER, J.K. et. al, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Comparar os índices de apoptose e viabilidade celular em cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs) e os níveis de citocinas anti-inflamatórias liberadas em culturas de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo na presença de cola de fibrina, gel de plaquetas, quitosana dopada e extratos de *Cordia ecalyculata*.

2.2 Objetivos Específicos

- Quantificar os níveis das citocinas liberadas em cultura de CTMs expostos a diferentes concentrações de extratos de *Cordia ecalyculata* em fase bruta, aquosa, hexânica, etérea.
- Criar um banco de citocinas anti-inflamatória;
- Definir as melhores condições de cultura celular para se obter elevadas concentrações de citocinas anti-inflamatórias;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Instalações

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Celular (LEC) do Hemocentro de Botucatu - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP. Para o processamento do tecido Adiposo, cultivo das células e obtenção e preparo dos *scaffolds* foi utilizada a área limpa e para os demais testes foi utilizado o LAC (Laboratório de Atividades Complementares).

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, as atividades tiveram um crescimento favorável, o que pode ser observado através das três diferentes linhas de atuação, a saber: diferenciação de células-tronco de diferentes espécies, obtenção de anticorpos monoclonais murinos e produção de curativos bioativos com foco na terapêutica humana. Essas três linhas de pesquisa ocupam uma área correspondente a 1200m² classificados nas categorias:

1. Laboratório de Atividades Complementares (LAC) onde são desenvolvidas as atividades de viabilidade celular, contagem celular, técnica de ELISA, preparo de tampões, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, preparo de pools de plasma e plaquetas para posterior produção de biocurativos, imunofenotipagem, técnicas de hemaglutinação, entre outras (FIGURA 1).



Fonte: SILVA, R. A. M, 2010

FIGURA 1- Laboratório de Atividades Complementares.

2. Área Limpa classificação 10.000. Trata-se de Laboratório de contenção de nível III de segurança, P3 ou BSL-3. Tal área possui ar filtrado sob pressão positiva com filtros HEPA, vestiário específico para colocação de equipamentos de proteção individual (EPIs) de circulação interna, mantendo-se um nível de esterilidade e segurança com amostras ali processadas. Dentro dessa área encontra-se equipada e em funcionamento a chamada área de *screening* (FIGURA 2) a qual se constitui de uma ante-sala dos três ambientes (nichos) de cultura celular com ar filtrado individualizado. Em todos os ambientes (nichos) existem duas sala: microscopia (FIGURA 3), seguida da área de manipulação estéril (FIGURA 4). Em um dos nichos existe um microscópio celular invertido com contraste de fase acoplado de câmara fotográfica onde se obteve as imagens das culturas deste trabalho (FIGURA 5).

Em cada nicho são desenvolvidas atividades relacionadas a cada uma das 03 linhas de pesquisa do laboratório.



Fonte: Arquivo pessoal, 2012.

FIGURA 2 - Sala de screening, área limpa.



Fonte: NUNES, H. C, 2012.

FIGURA 3 - antessala Nicho 1, área limpa



Fonte: NUNES, H. C, 2012.

FIGURA 4 - Sala Nicho 1 área limpa



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012.

FIGURA 5 – Microscópio invertido Zeiss® Axiovert 200 com acoplamento de câmara fotográfica.

3.2 Obtenção dos Extratos de *Cordia ecalyculata*

Os extratos de *Cordia ecalyculata* foram obtidos pelo Instituto de Química de Araraquara - UNESP através de purificações dos extratos secos segundo ASSONUMA, 2009. Estes extratos culminaram na obtenção das amostras em diferentes solventes. São eles: Fase Bruta (FB); Fase Aquosa (FA), Fase Hexânica (FH) e Fase Etérea (FE) (FIGURA 06).

Após essa obtenção, os mesmos foram enviados ao Laboratório de Engenharia celular para os testes de cultura celular.



Fonte: arquivo pessoal, 2013

FIGURA 06 – Extratos de *Cordia ecalyculata* em diferentes solventes enviados pelo IQ-Araraquara para as culturas celulares

3.3 Obtenção de Tecido Adiposo

Para a obtenção de CTMs, foi utilizado tecido adiposo, que é fonte de células-tronco adultas multipotentes podendo se diferenciar em uma linhagem mesenquimal (MIYAZAKI et al., 2005; SOUTO et al., 2006).

O fragmento de tecido adiposo foi obtido de pacientes programados para cirurgias bariátricas eletivas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC FMB - UNESP) pela Disciplina de Cirurgia Plástica.

Os pacientes foram abordados no pré-operatório e convidados a participar do projeto. Os dados dos pacientes foram tratados com extremo sigilo, não

havendo divulgação das informações obtidas dos mesmos, que foi firmado por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Descarte Consentido.

3.4 Isolamento de Tecido Adiposo

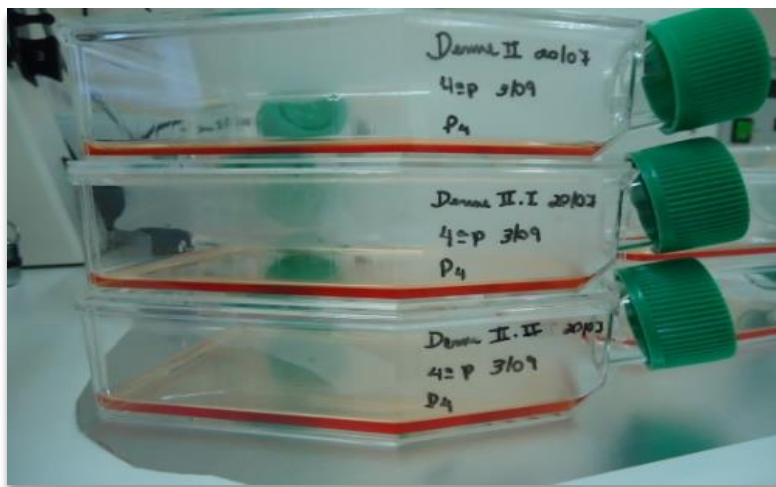
Após notificação do consentimento do paciente no centro cirúrgico do HC FMB - UNESP, na data do procedimento, o fragmento de tecido adiposo foi coletado em tubo cônico esterilizado contendo solução salina (NaCl) a 0,9%. O material foi transportado com segurança para o Laboratório de Engenharia Celular, onde foi pesado e posteriormente dissociado em ambiente de capela de fluxo laminar, em área limpa. As dissociações foram realizadas utilizando protocolos estabelecidos pelo Laboratório, que optou pela dissociação mecânica para a separação das diferentes camadas da pele: tecido adiposo, derme e epiderme. Nesta, foi utilizado um instrumento denominado *cell scraper* que remove as células de forma mecânica. O tecido adiposo foi utilizado para este projeto e a derme e epiderme para demais projetos em andamento no mesmo laboratório. A FIGURA 07 representa a dissecação das diferentes camadas do tecido para posterior isolamento e amplificação das CTMs.



Fonte: Evaristo, T.C., 2011

FIGURA 07 – Técnica de dissociação mecânica do tecido adiposo de pele proveniente de descarte consentido.

Após as células atingirem uma confluência maior ou igual a 80% do frasco de cultura, as mesmas foram repicadas, posteriormente removidas com o uso da tripsina e re-plaqueadas em frascos maiores de cultura, possibilitando um aumento no número de células (expansão) a cada procedimento realizado (FIGURA 08).



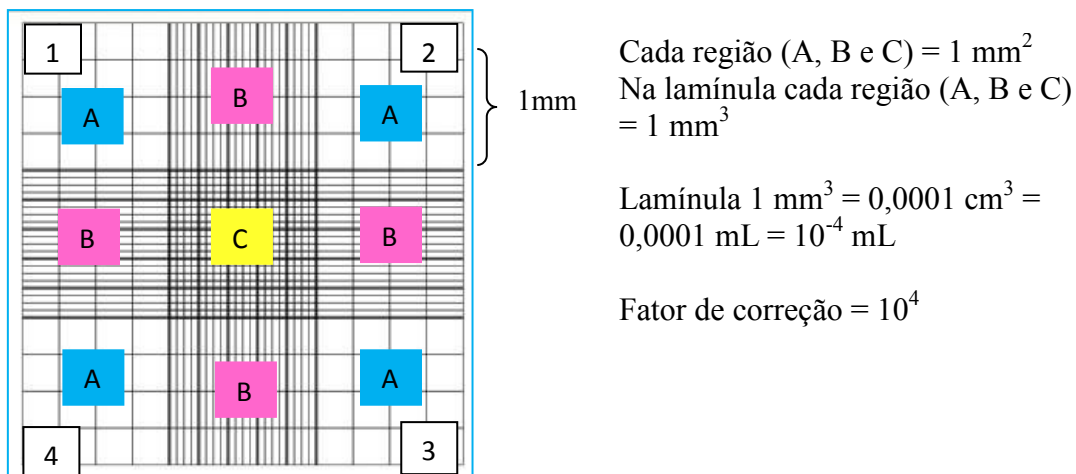
Fonte: NUNES, H.C, 2013

FIGURA 08 – Repique das células para frascos de cultura maiores (expansão)

3.5 Contagem e Viabilidade Celular

São parâmetros essenciais na prática da cultura celular. Este procedimento foi realizado ao final de cada processo, a cada tripzinização ou qualquer procedimento que se necessite saber se a quantidade de células é satisfatória para que se dê continuidade e se estas ainda se mantêm viáveis, mesmo após processos físico, químico e mecânico, que podem causar algum dano celular.

Para que a realização desta metodologia utilizou-se a contagem manual em câmara de Neubauer, que consiste em, após o isolamento ou procedimento realizado, diluir as células em meio de cultura e separar uma alíquota para contagem. A esta alíquota foi adicionado igual volume de corante azul de Tripán, onde as células coradas de azul foram consideradas não viáveis. Isto porque, com a morte celular, as membranas se rompem incorporando o corante. As células não coradas e refringentes foram consideradas viáveis, pois mantiveram suas membranas íntegras. A câmara de Neubauer apresenta a seguinte disposição:



Fonte: Instituto de Física de São Paulo, USP. <http://web.if.usp.br/ifusp/>

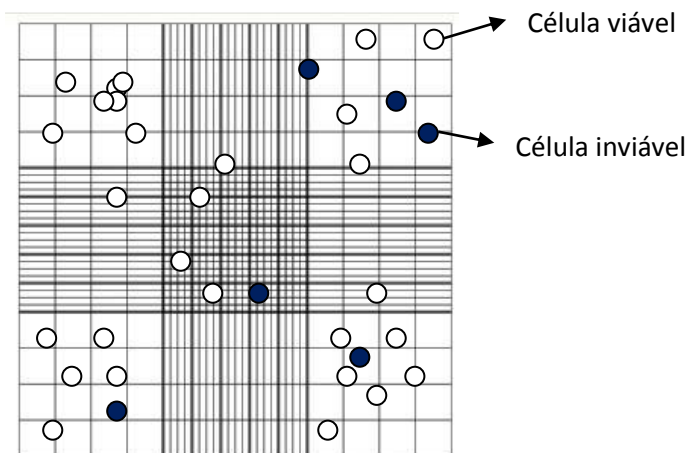
FIGURA 9: Modelo esquemático representando o padrão a ser seguido durante processo de contagem de células na Câmara de Neubauer.

A câmara é disposta em quatro quadrantes sendo cada um com uma área de 1 mm^2 no qual ocorre a contagem celular. A numeração dos quadrantes indica o sentido da contagem que é realizada com auxílio de um contador manual.



FIGURA 10: Contador manual. Fonte: Eikonol do Brasil.

<http://www.eikonol.ind.br/empresa.php>



Fonte: <http://www.probluehosting.net/astechireland/category/carl-roth-catalog/cell-counters>.

FIGURA 11: Esquema ilustrativo da contagem de viabilidade celular em câmara de Neubauer.

As células que se encontram dentro de cada quadrante são contadas, as que se dispõem entre a linha do quadrante e a cruz tracejada não são contadas, assim como os grupos de células são descartados ou contados como uma única célula.

Após a última centrifugação das células coletadas das placas de cultura, o *pellet* de células foi ressuspenso em 3 ml de meio de cultura e homogeneizado. Retirou-se uma alíquota de 30 μ L e esta foi colocada em um tubo de hemólise, adicionado 30 μ L de azul de Tripán e homogeneizado com a ajuda de uma pipeta.

A câmara é preenchida com esta mistura e no microscópio procede-se ao seguinte protocolo de contagem: total de células vivas nos 4 quadrantes, ou, se a quantidade de células em cada quadrante for maior que 100, conta-se o primeiro quadrante e multiplica-se por 4. Faz-se o mesmo com as células mortas e depois se calcula o total geral.

Número de células/mL = n° de células contadas/ n° de quadrantes contados x Diluição x Fator de correção da câmara (10^4).

3.6 Caracterização Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo

Nesta primeira etapa, as células obtidas e quantificadas tiveram seu perfil fenotípico pré-plaqueamento estudado. Esta metodologia foi realizada por citometria de fluxo utilizando equipamento FACScalibur da marca BD (FIGURA 12) com leitura através de *software* CellQuest Pro[®] em parceria com o Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu - UNESP. Foram escolhidos marcadores positivos e negativos para o tipo celular utilizado nos experimentos. O QUADRO 1 especifica os marcadores utilizados.



Fonte: Arquivo Pessoal, 2012

FIGURA 12 - Citômetro FACScalibur da marca BD[®]

QUADRO 1 – Marcadores de superfície de CTM e resultados esperados

Marcador	Resultado esperado
CD90	CTMs: Positivo
CD45	CTMs: Negativo
CD34	CTMs: Negativo

3.7 Cultura e Expansão das CTMs

As CTMs já fenotipicamente caracterizadas, foram plaqueadas na concentração de 1×10^6 células por frasco e mantidas em meio específico *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos (100 U/mL de penicilina sódica e 100 mg/mL de estreptomicina) (FRASER et al., 2006).

Os frascos de cultura foram mantidos em estufa de CO₂ a 5%, 37°C e ambiente com umidade controlada, onde foram observadas diariamente por microscopia invertida e registros fotográficos foram realizados. Quando a confluência das células apresentou-se maior ou igual a 80%, as mesmas foram retiradas do frasco de cultura, quantificadas e congeladas para a constituição do banco de células para estudo. Uma vez constatado o número suficiente de ampolas de congelamento para o experimento, as mesmas foram descongeladas e re-plaqueadas para o estudo propriamente dito.

3.8 Preparo do Meio de Cultura com *Cordia ecalyculata*

1ª Fase: Estudo dos 04 extratos de *Cordia ecalyculata* incorporados ao meio de cultura para os testes de apoptose

Os extratos de *Cordia* foram estudados em 03 concentrações: 25, 50, 100µg/ml sendo incorporados ao meio de cultura. O QUADRO 2 mostra os volumes utilizados para esta etapa.

QUADRO 2: Volumes utilizados dos diferentes extratos, meio de cultura e suspensão celular para a cultura de CTMs e *Cordia*.

Concentração	Tipo de Extrato	Volume do extrato (μL)	Volume de meio de cultura (μL)	Volume da suspensão celular (μL)
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bruto (FB)	25	8975	1.000
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bruto (FB)	50	8950	1.000
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bruto (FB)	100	8900	1.000
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Aquoso (FA)	15	8985	1.000
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Aquoso (FA)	29	8971	1.000
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Aquoso (FA)	58	8949	1.000
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Hexanico (FH)	24	8976	1.000
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Hexanico (FH)	47	8953	1.000
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Hexanico (FH)	94	8949	1.000
25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Etérea (FE)	24	8976	1.000
50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Etérea (FE)	49	8951	1.000
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Etérea (FE)	98	8902	1.000

2ª Fase: Estudo da fase etérea de *Cordia ecalyculata* incorporados ao meio de cultura para confecção dos *scaffolds*

Devido aos resultados do teste de apoptose (mostrados no capítulo Resultados e Discussão) foi padronizado o uso da fase etérea da *Cordia* para a confecção dos *scaffolds* e os testes com as citocinas, também nas concentrações de 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O extrato etéreo da *Cordia* foi diluído no meio de cultura com volume e concentrações de acordo com o que foi definido, filtrado em MILLEX GV 0,22 μm e adicionado soro fetal bovino 10 %.

Após o preparo do meio de cultura com *Cordia*, 5 ml do meio foi adicionado em cada *scaffold*. O QUADRO 3 exemplifica os volumes utilizados.

QUADRO 3 – Volumes para preparo dos meios de cultura suplementado com *Cordia ecalyculata*

Fase etérea	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Fase etérea com <i>Cordia</i>	125 µL	250 µL	500 µL
Meio de cultura	44875 µL	44750 µL	44500 µL
Soro Fetal Bovino	5000 µL	5000 µL	5000 µL

3.9 Testes de Apoptose

Depois de decorridas 48 horas de cultura foram utilizadas a enzima tripsina para que as células aderidas se soltassem do frasco e pudesse ser verificado o índice de apoptose, testando as células com o anticorpo anti-caspase-3. Foi utilizado o kit “*PE – Conjugated Monoclonal Active Caspase-3 Antibody Apoptoses Kit*” – BD Pharmingen®.

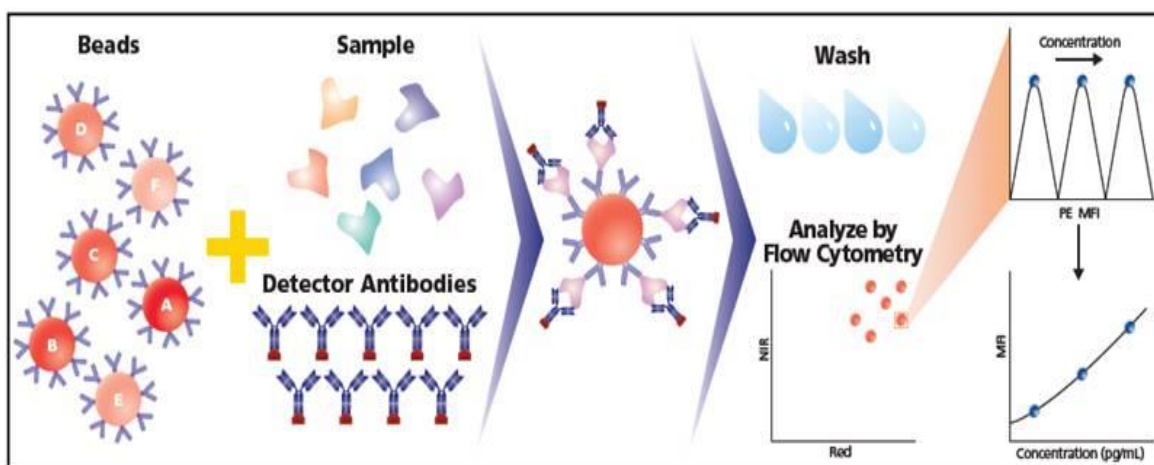
As células foram lavadas com 1 ml e centrifugadas a 2400 rpm por 5 minutos. O *pellet* de células foi ressuspensão com 100 µL da solução de permeabilização incubados por 15 minutos a Temperatura ambiente. Após nova lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em 20 µL do anticorpo e 100 µL da solução de permeabilização; Após nova incubação, as células foram lavadas e a leitura foi realizada por citometria de fluxo.

3.10 Scaffolds

Os *scaffolds* desenvolvidos durante o presente trabalho foram:

1. Cola de fibrina (Biofibrin)
2. Gel de plaquetas
3. Quitosana dopada com hormônios plaquetários
4. Quitosana

O experimento consiste, por sua vez, em obter o *scaffold* e plaquear células sob essa estrutura. As células ali plaqueadas interagem com os scaffolds, utilizando-os para o seu crescimento e desenvolvimento. Esse desenvolvimento foi monitorado quantificando as citocinas ali presentes em dois momentos: após 18hs e após 48 horas. Vencidos estes períodos, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior análise das citocinas pelo kit CBA (Cytometric Bead Array - BD[®]), que tem como princípio determinar e quantificar quais citocinas estão presentes na amostra (FIGURA 13).



Fonte: <http://www.bdbiosciences.com/instruments/facsscalibur/features/applications.jsp>

FIGURA 13 – Esquema mostrando como é realizada a determinação das citocinas utilizando o kit de CBA - BD[®].

3.11 Origem dos *Scaffolds*

A cola de fibrina foi produzida a partir de um *pool* de bolsas de plasma fresco congelado isogrupo, submetidas a controle de qualidade. Ao plasma foram adicionados trombina humana purificada e gluconato de cálcio. Volumes micrométricos são combinados em proporções (as mesmas para a obtenção dos curativos bioativos) uma vez que todo processo ocorre em condições de esterilidade. Por fim, após o processo de gelificação do *scaffold*, que leva em média 1 às 2h em fluxo laminar, células na quantidade de 1×10^5 céls/ml foram plaqueadas em meio de cultura específico, evitando assim o ressecamento e sofrimento celular.

O gel de plaquetas foi produzido a partir de *pools* de bolsas de concentrado de plaquetas e os mesmos componentes da cola de fibrina. O mesmo processo foi realizado

para a confecção deste *scaffold*.

Para obtenção do *scaffold* de quitosana é necessário um tempo maior de preparado onde a quitosana purificada (Sigma®) obtida da carapaça de crustáceos foi adicionada a um becker contendo água destilada e ácido acético (Synth®) pH 4,0. Essa mistura foi homogeneizada e permaneceu sob agitação constante durante 24h, obtendo assim quitosana *in natura*, que foi armazenada na geladeira para obtenção do *scaffolds*.

A quitosana dopada com hormônios plaquetários foi realizada com *pool* de plaquetas na proporção de 10% do volume total.

Ex: 40 mL de quitosana *in natura* + 4 mL de *pool* de plaquetas isogrupo com hormônios plaquetários.

Para melhor entendimento do *design* experimental, a figura abaixo mostra de forma esquemática como os *scaffolds* foram dispostos *sem a utilização da Cordia* e *com a utilização da Cordia* (FIGURA 14 e 15).

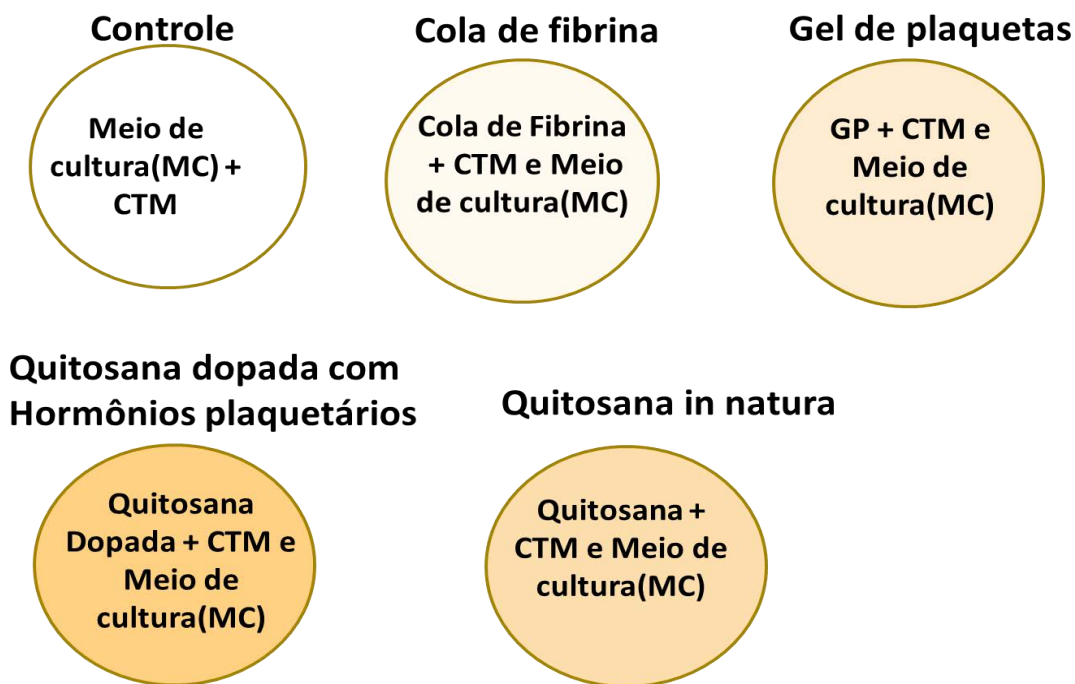


FIGURA 14 - Esquema de utilização dos *Scaffolds* sem a presença do extrato etéreo de *Cordia*

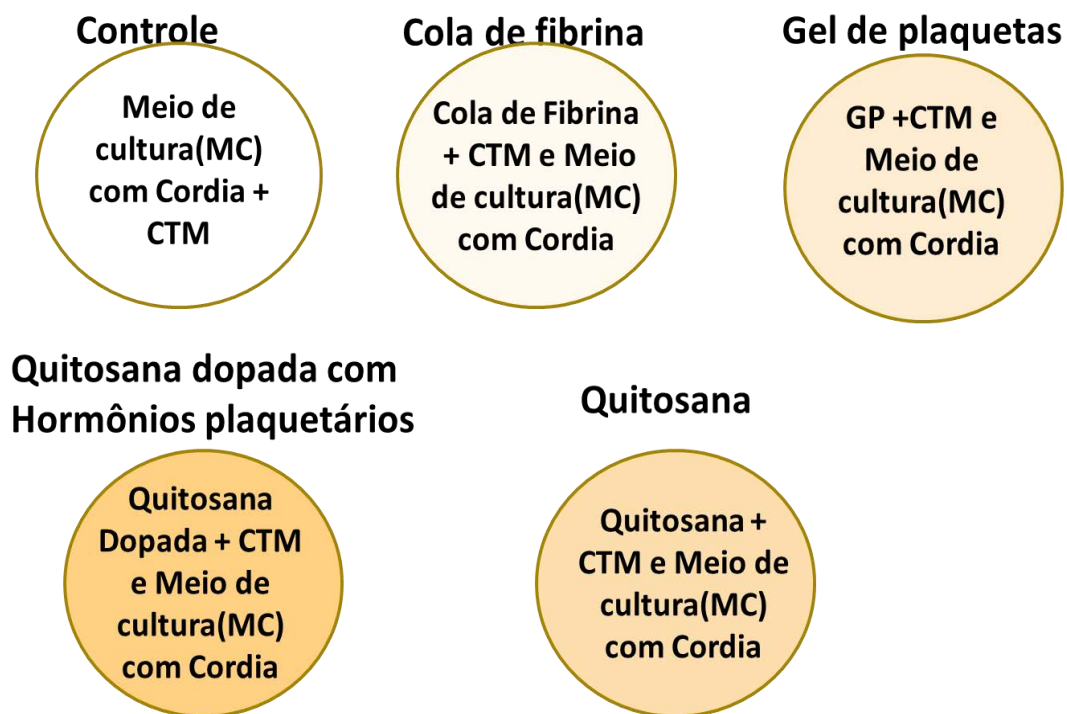


FIGURA 15 - Esquema de utilização de *scaffolds* com a presença do extrato etéreo de *Cordia*

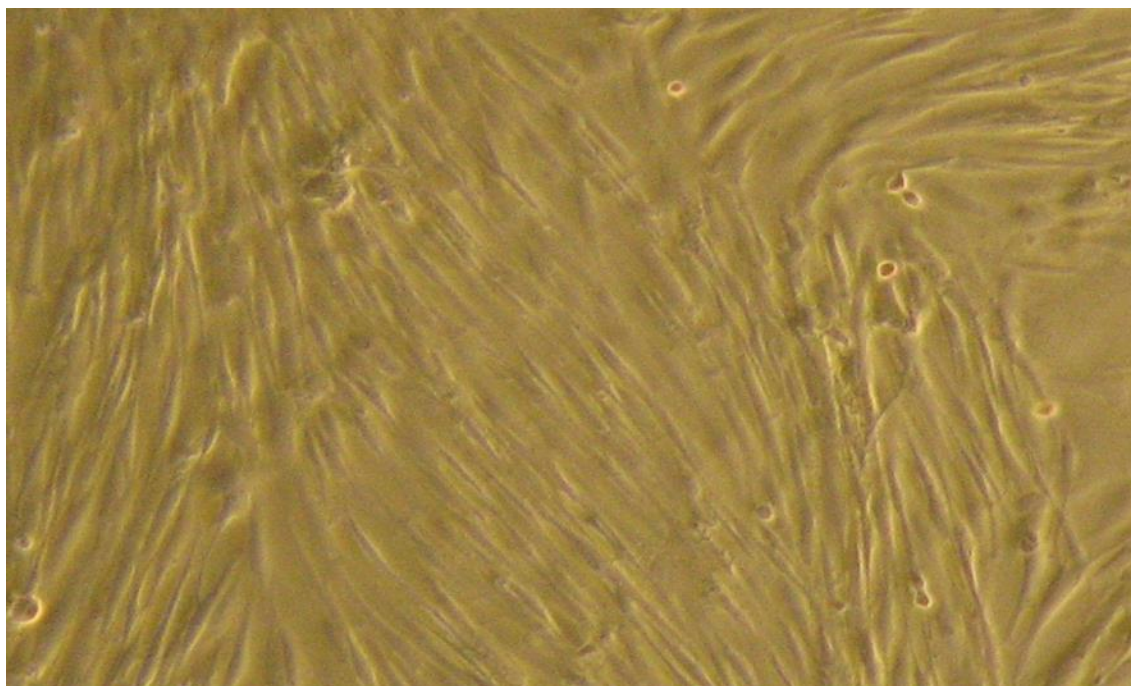
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de plantas medicinais como fonte de novos fármacos vem crescendo muito no mundo, devido ao fato de muitas plantas ainda não terem seus efeitos estudados, pois grande parte da população usa plantas medicinais de forma empírica e sem o conhecimento científico (FOGLIO et al., 2006; SILVA; CARVALHO, 2004).

Existem vários trabalhos na literatura onde plantas são utilizadas para o tratamento de patologias, porem são escassos os registros utilizando a *Cordia*. Assim, trata-se de estudo inédito que visa estabelecer quais os efeitos desta planta sobre as células, na tentativa de se verificar o seu possível efeito anti-inflamatório. Porem, em se tratando de estudo inédito, não existe como comparar a sua possível eficácia na ação anti-inflamatória com resultados previamente descritos na literatura, o que torna este trabalho bastante relevante.

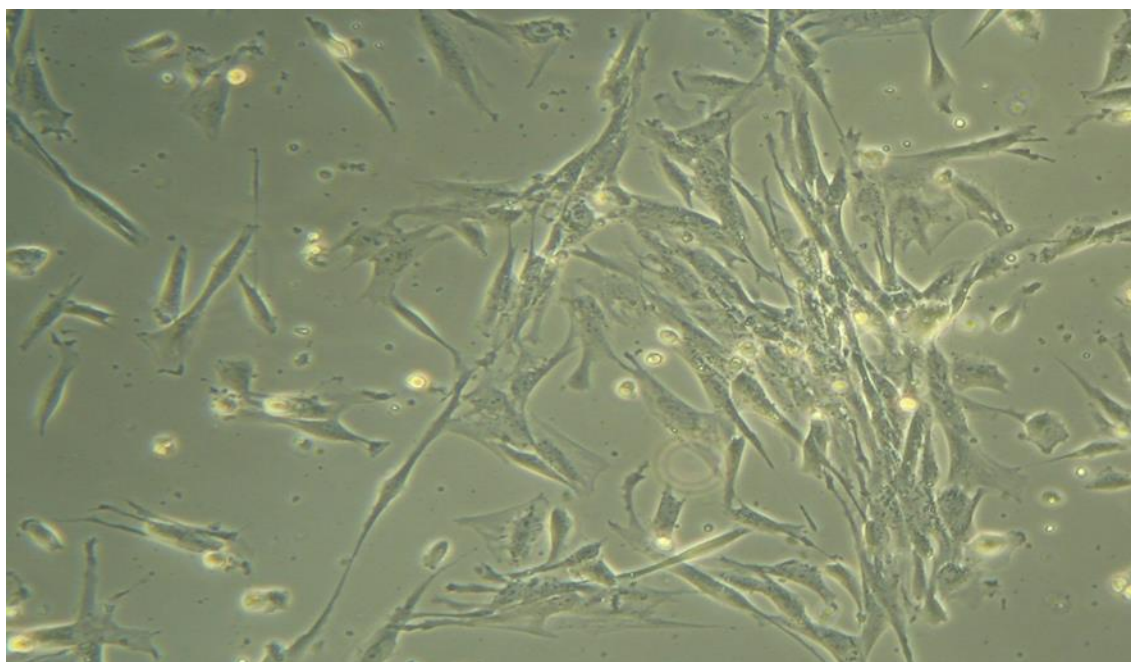
4.1 Resultados da Cultura Celular de CTMs

Com a dissociação de 1 grama de tecido adiposo obtido, o rendimento das células isoladas foi de $2,4 \times 10^3$ células/mm³ com viabilidade de 75%. Com estes resultados, as células foram plaqueadas para amplificação em meio de cultura DMEM F-12. As amostras foram observadas diariamente por microscopia invertida em contraste de fase, para verificar a confluência das mesmas. As CTMs apresentaram características típicas como a aderência ao plástico evidenciada (FIGURAS 16, 17 e 18).



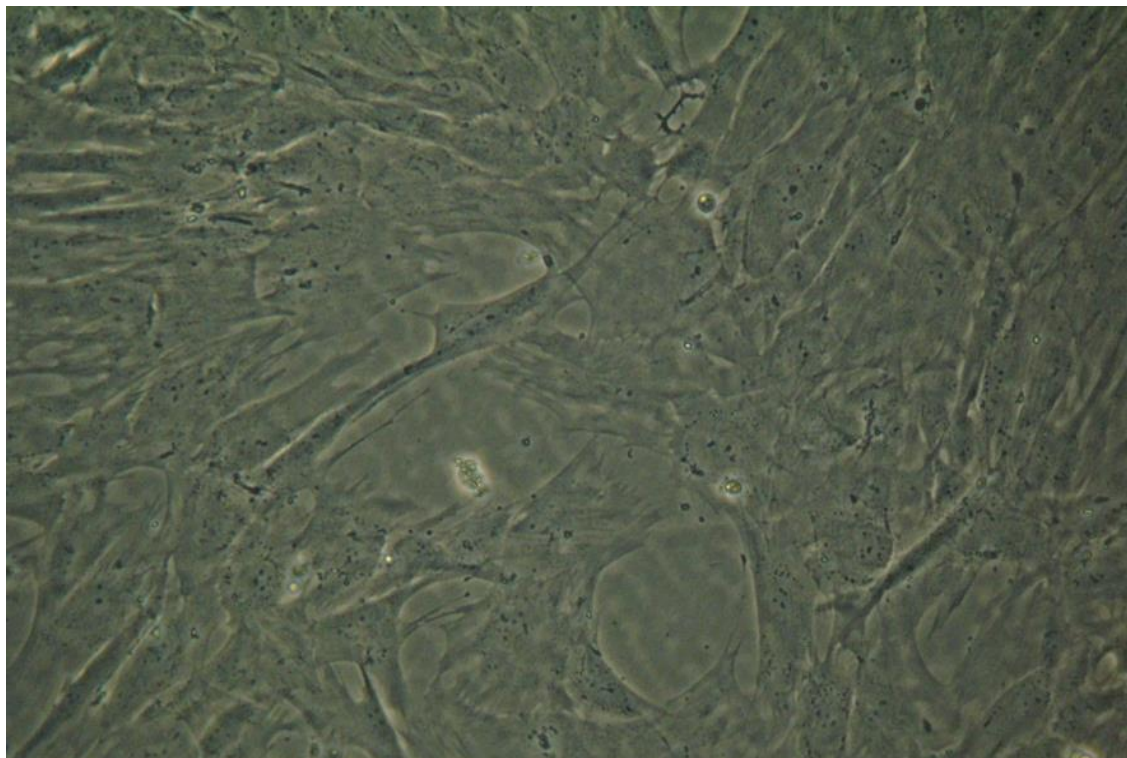
Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

FIGURA 16 - Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase evidenciando a aderências das CTMs em aumento de 5x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

FIGURA 17 - Fotomicrografia em microscopia invertida, evidenciando a aderências das CTMs. Aumento 10x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

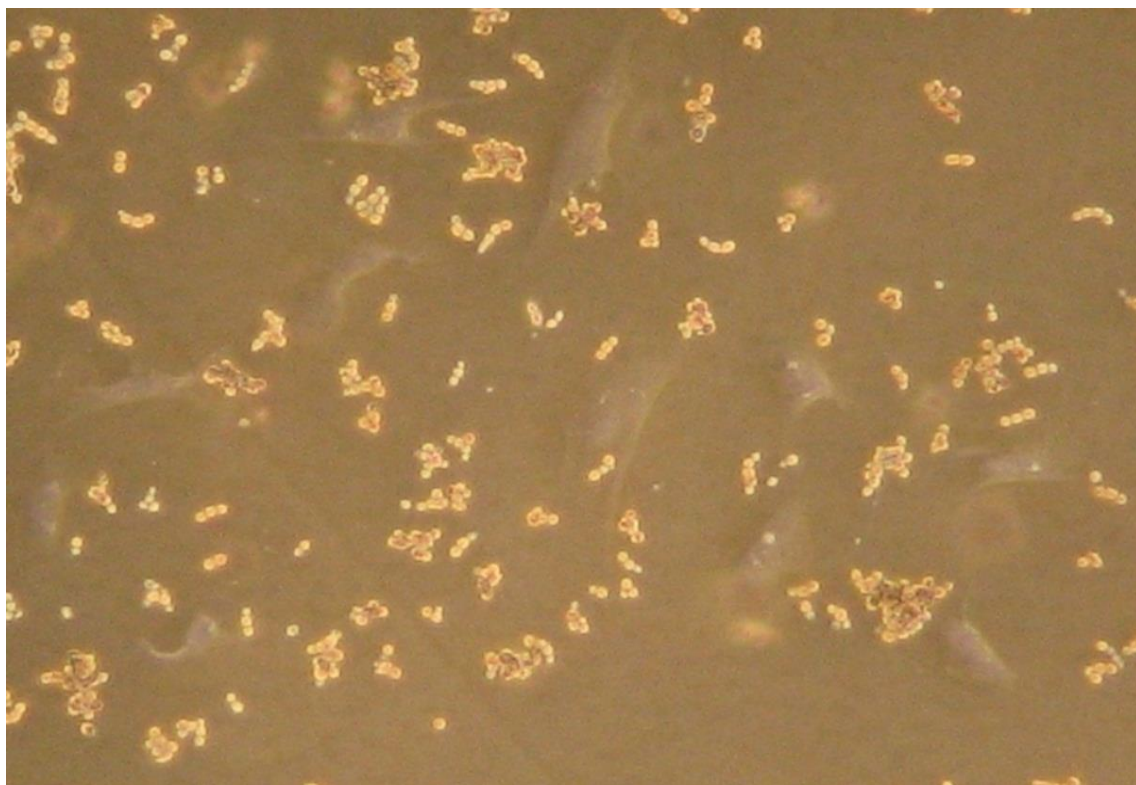
FIGURA 18 - Fotomicrografia em microscopia invertida, evidenciando a aderências das CTMs. Aumento 20x.

4.2 Intercorrência na Cultura Celular de CTMs

Desde que houve a introdução dos antibióticos nos meios de cultura, um dos maiores problemas foi equacionado, porém jamais eliminado: a contaminação. Esta contaminação pode vir do próprio espécime, do material, dos meios utilizados e da manipulação indevida.

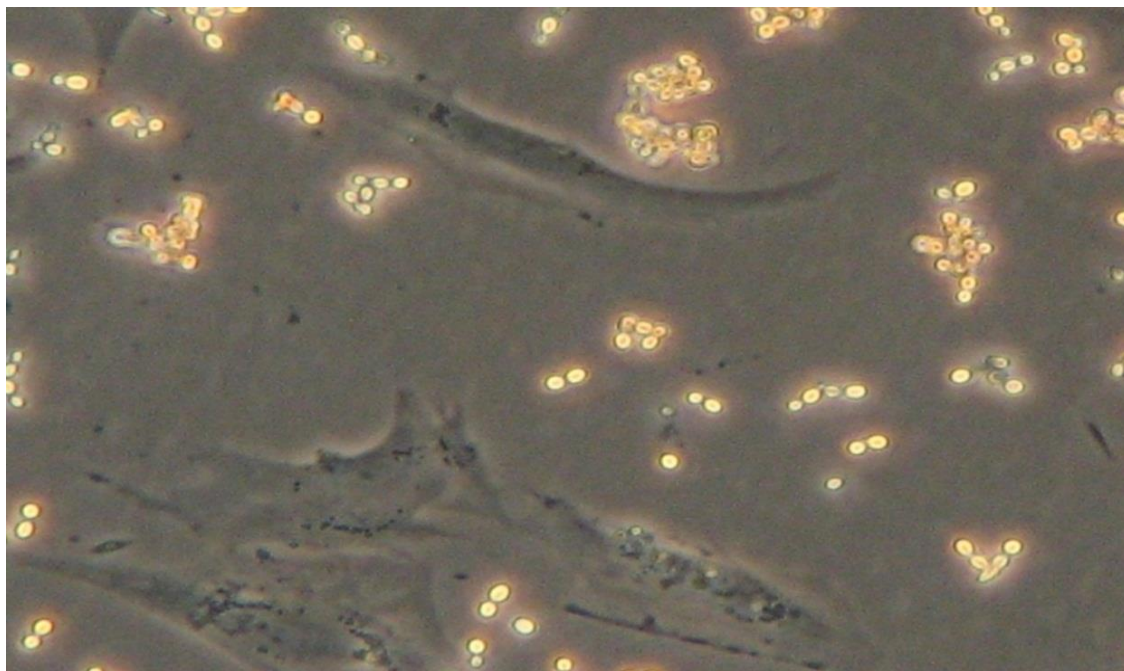
Levando-se em consideração o uso de material humano proveniente de cirurgia, e em especial, fragmento de pele, o controle da contaminação foi um dos problemas enfrentados neste trabalho. O maior empecilho encontrado foi a contaminação por leveduras, identificada em três das oito amostras processadas, o que levou à perda do protocolo, tendo sido necessário o reinício do mesmo.

As FIGURAS 19, 20 e 21 representam fotos dos primeiros ensaios onde são observadas células aderidas recobertas por leveduras. Podem-se observar as CTMs aderidas no fundo do frasco e as leveduras, como pequenas esferas brilhantes, não aderidas, formando cachos ou correntes.



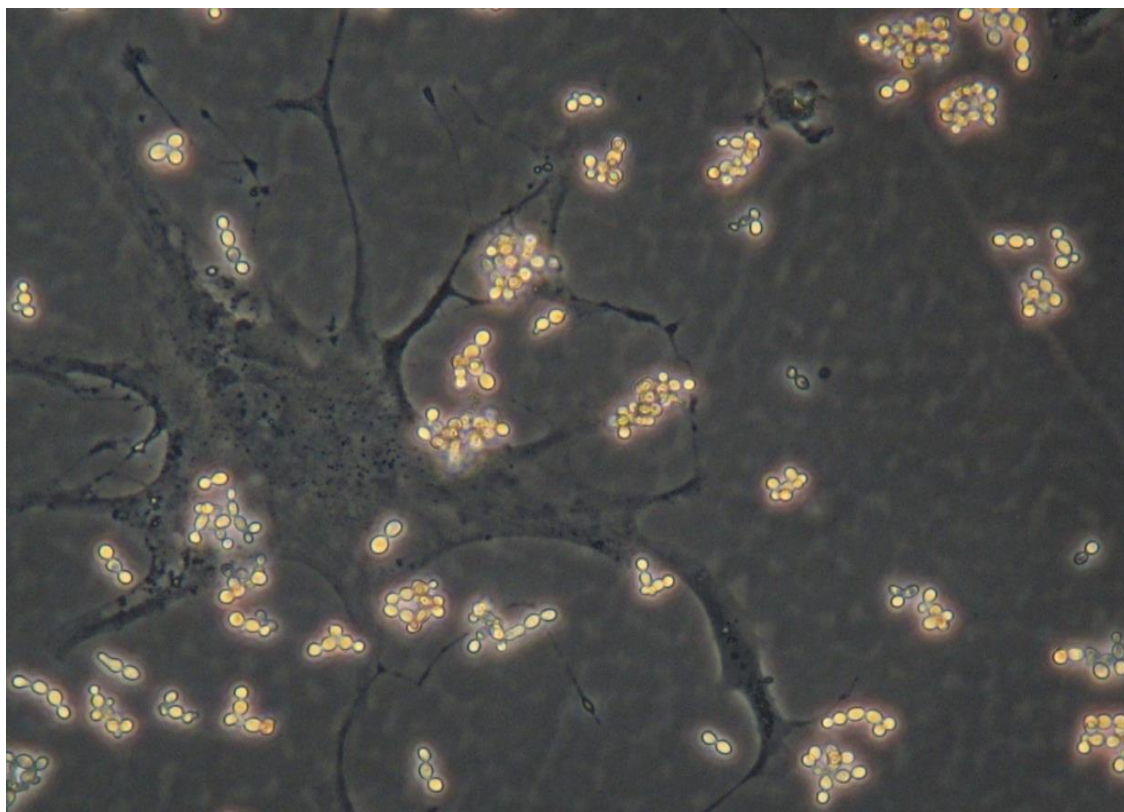
Fonte: Arquivo pessoal, 2013

FIGURA 19 - Fotomicrografia de microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 5x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2013

FIGURA 20 - Fotomicrografia em microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 10x.



Fonte: Arquivo pessoal, 2013.

FIGURA 21 - Fotomicrografia em microscopia invertida evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Aumento 20x.

4.3 Caracterização Fenotípica das Células por Citometria de Fluxo

Na primeira parte do experimento, antes de serem adicionados os extratos de *Cordia ecalyculata*, foi separada uma alíquota para análise em citometria, para comprovar se o perfil das células em questão são CTMs. Foram analisados os perfis das células antes e após expansão em cultura. A citometria de fluxo identificou o perfil esperado quanto à imunofenotipagem utilizando os marcadores CD45, CD34 e CD90. Como podem ser observadas no gráfico 1, as curvas de CD45 (panleucocitário) e CD34 são decrescentes enquanto que a curva do CD90, marcador mais específico de CTMs de tecido adiposo, é crescente. À medida que ocorrem as passagens, a cultura funciona como um método de *purging* eliminando as células aderentes mononucleares que expressam CD45, pois sua duplicação *in vitro* é limitada, o que determina a diminuição progressiva deste marcador. Quanto ao marcador CD34, na amostra original pode-se encontrar um número maior representado pelos pericitos e células endoteliais,

que mantidos em meio desfavorável (o meio de cultura é para amplificação de CTMs), também entram no processo de *purging* sendo eliminados da cultura. Durante este período, crescem de maneira favorável, pela presença do meio de cultura específico, as CTMs que expressam o CD90. (GRÁFICO 1).

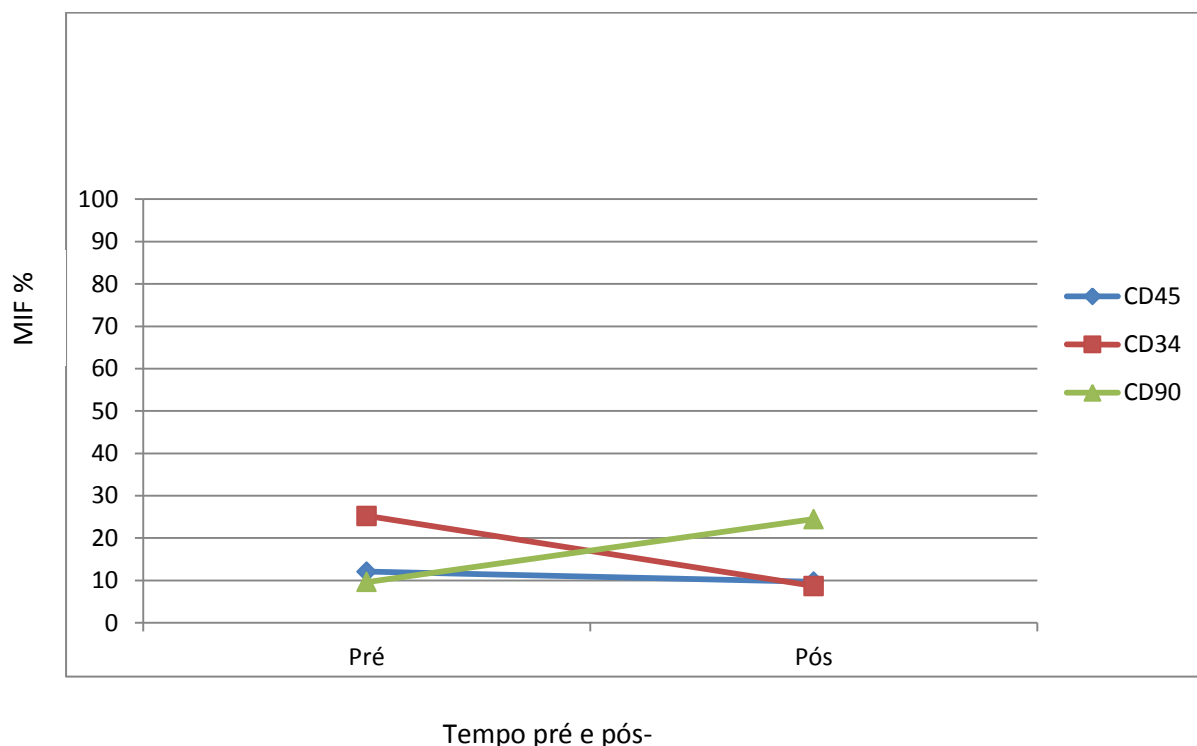
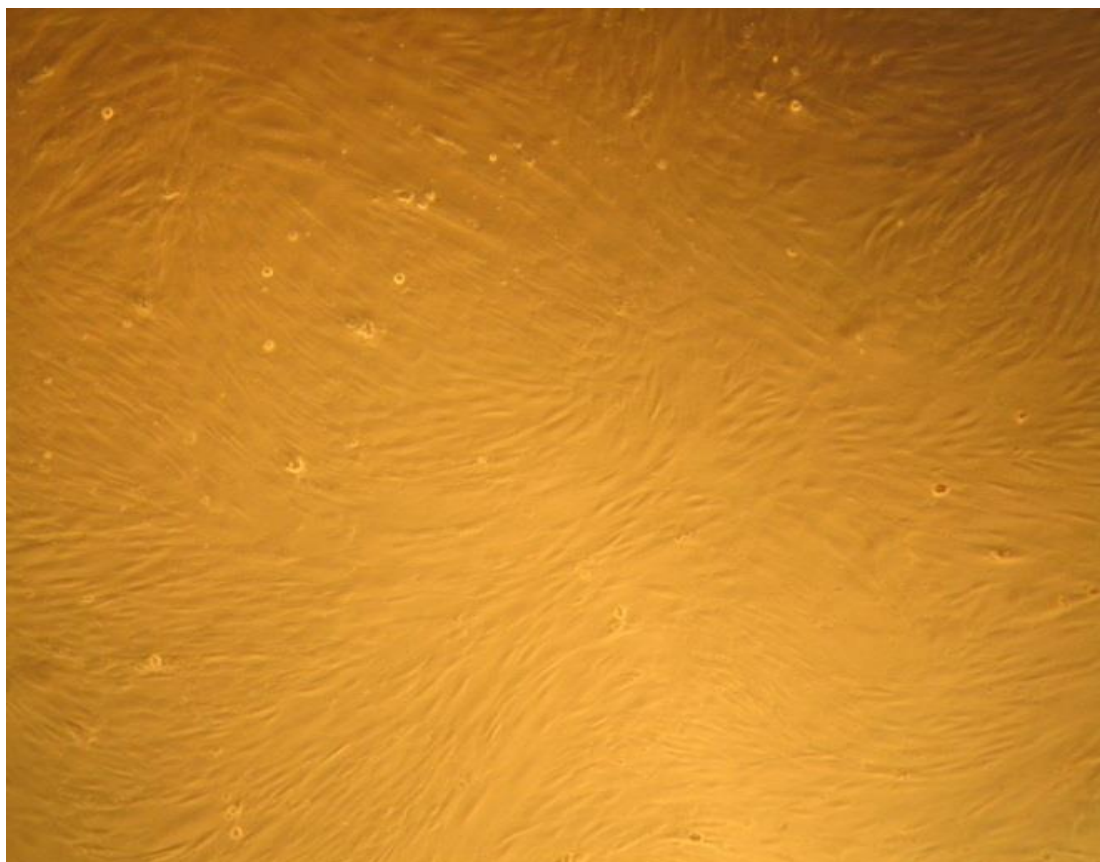


GRÁFICO 1 – Monitoramento dos marcadores (CD45,34 e 90) de superfície de CTMs por citometria de fluxo

4.4 Cultura e Expansão de CTMs

Durante todo o período de amplificação das CTMs em cultura, o procedimento foi monitorado por microscopia invertida em contraste de fase com auxílio de microscópio Zeiss® Axiovert 200 com sistema de foto-documentação, que possibilitou registro das imagens da confluência das células, como apresentado na FIGURA 22.



Fonte: Arquivo pessoal, 2014.

FIGURA 22 – Fotomicrografia em microscopia de contraste de fase de CTMs em confluência \geq que 80%. Aumento de 5x.

4.5 Índice de Apoptose e Viabilidade Celular em Células-Tronco Mesenquimais em Tolerância a *Cordia*

De acordo com os resultados evidenciados no GRÁFICO 2, nota-se que as CTMs apresentaram maiores índices de apoptose nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ na presença do extrato de *Cordia* na Fase Etérea (FE).

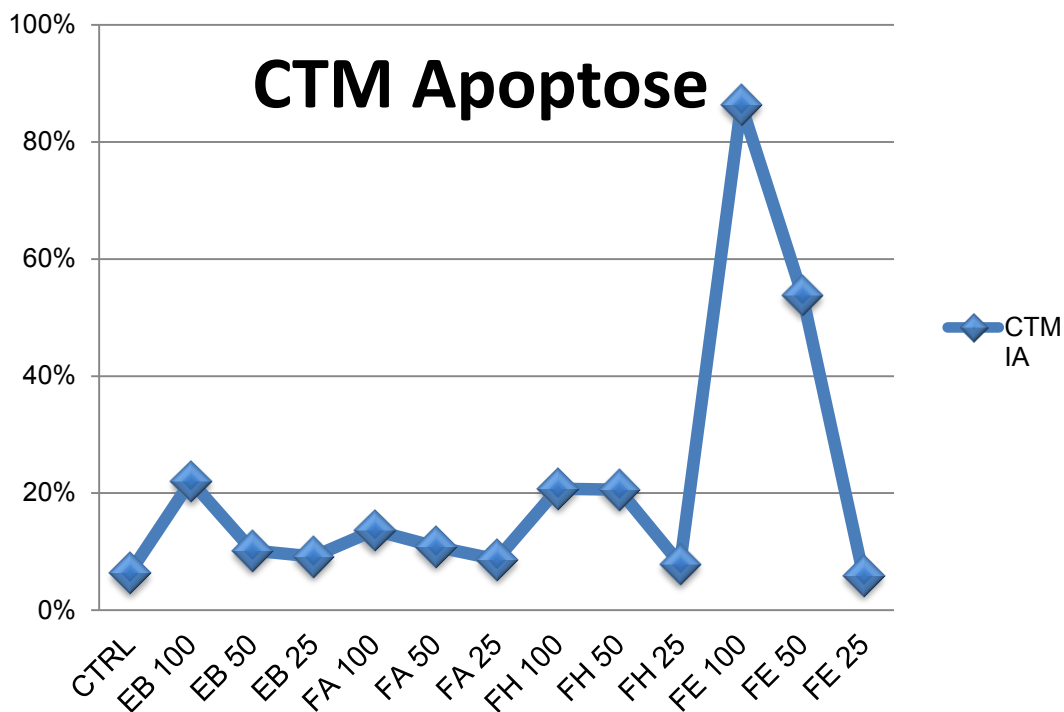


GRÁFICO 2 – Índice de apoptose de culturas de células-tronco mesenquimais (CTMs) em tolerância a *Cordia*

Nota-se no GRAFICO 2 que o maior pico de apoptose ocorre para os extratos da fase etérea (FE) na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, estabelecendo-se totalmente na concentração de 25 $\mu\text{g/ml}$. O índice de viabilidade celular identificado no GRÁFICO 3 é compatível com os resultados de apoptose analisados no GRÁFICO 2, pois se verifica que a viabilidade celular para a FE na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ fica próximo a zero, restabelecendo-se em seguida para a concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$.

CTM Viabilidade

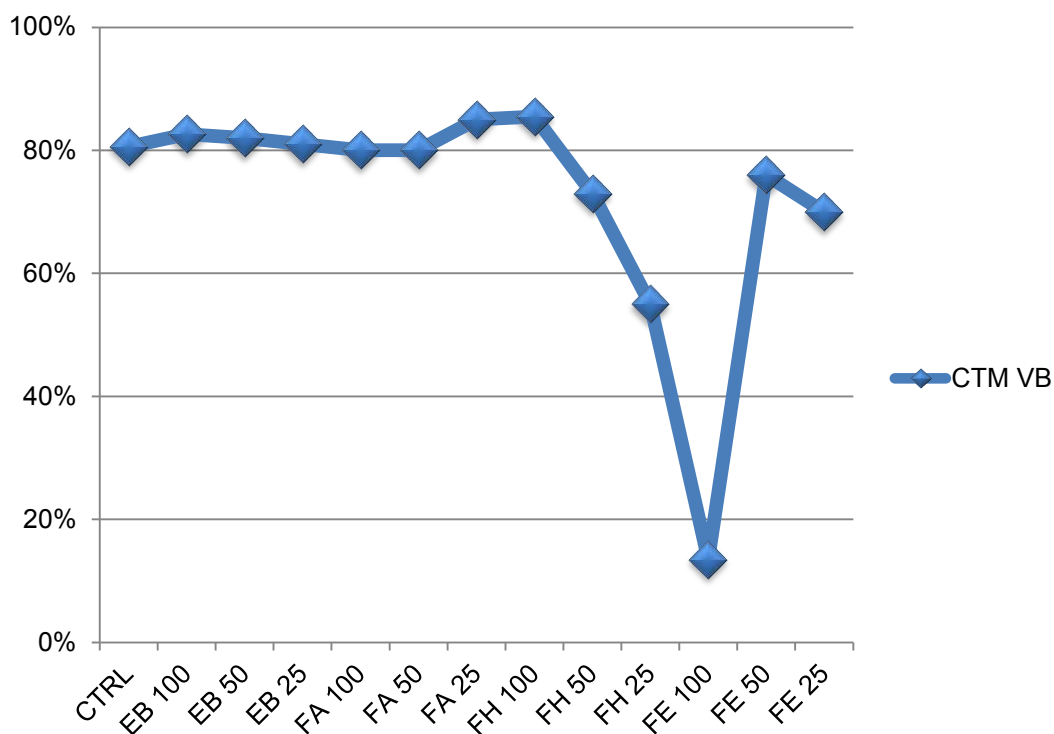


GRÁFICO 3 - Comparação da viabilidade celular de células-Tronco Mesenquimais (CTMs) em tolerância a *Cordia*

4.6 Comparação do Índice de citocinas inflamatórias liberadas em cultura de células-tronco nos diferentes *scaffolds* sem a ação da *Cordia* e com a ação da *Cordia*

A decisão de se utilizar os extratos da Fase etérea nas concentrações de 100, 50 e 25 $\mu\text{g/ml}$ se deu pelo fato de que foi a única fase que provocou, por parte da célula, efeitos adversos como a apoptose e a perda da viabilidade celular na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$, conseguindo um restabelecimento destes efeitos nas concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$ e 25 $\mu\text{g/ml}$. Teoricamente, estas situações adversas promovem nas células a liberação de grande quantidade de citocinas inflamatórias. Foi nesta linha de pensamento que se resolveu utilizar esta fase dos extratos para verificar os possíveis efeitos anti-inflamatórios da *Cordia*.

O uso da fitoterapia ou medicina alternativa constitui uma abordagem atrativa para o tratamento de vários distúrbios inflamatórios. De acordo com Calixto, 2004, trabalhando com *Cordia verbenácea*, também pertencente à família Boraginácea, ressalta que esta planta tem sido amplamente utilizada em decocção e infusões para tratamento de processos inflamatórios na medicina popular.

Geralmente as citocinas são classificadas em pró ou anti-inflamatórias dependendo da via que influenciam o processo inflamatório. Resumindo, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-18) podem estar envolvidas na iniciação e amplificação do processo inflamatório, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) modulam negativamente esses eventos. (CALIXTO. et. al., 2004).

O GRÁFICO 4 mostra o comportamento das células cultivadas sob os *scaffolds* em relação à liberação de citocinas ocorridas no período de 18hs na ausência de *Cordia*.

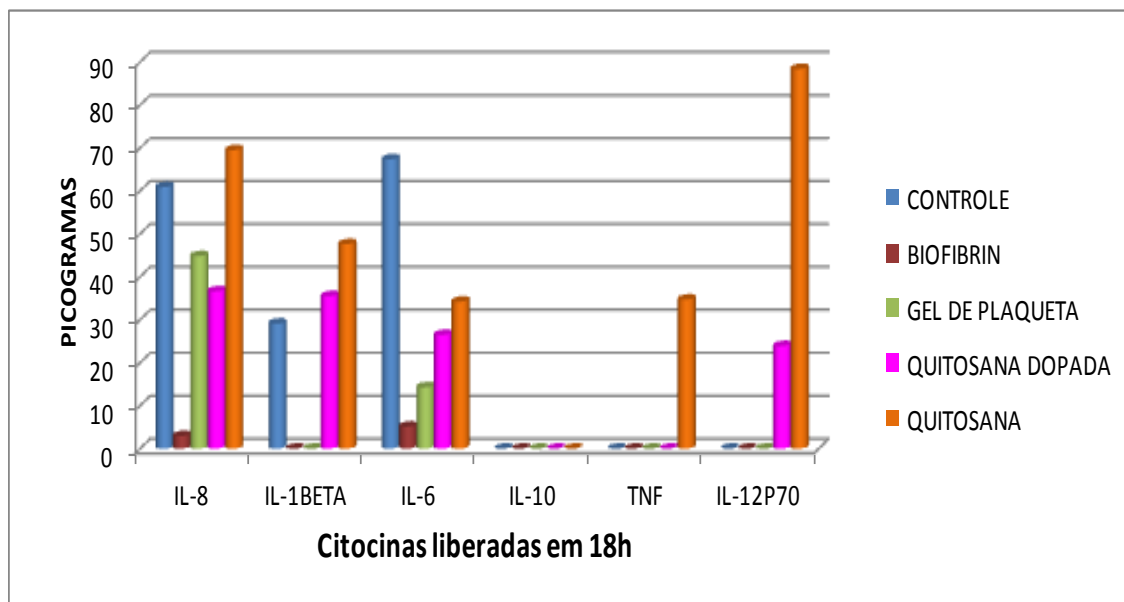


GRAFICO 4 - Nível de citocinas liberadas no período de até 18horas em cultura de CTMs sob os scaffolds biofibrin, gel de plaquetas, quitosana dopada e quitosana.

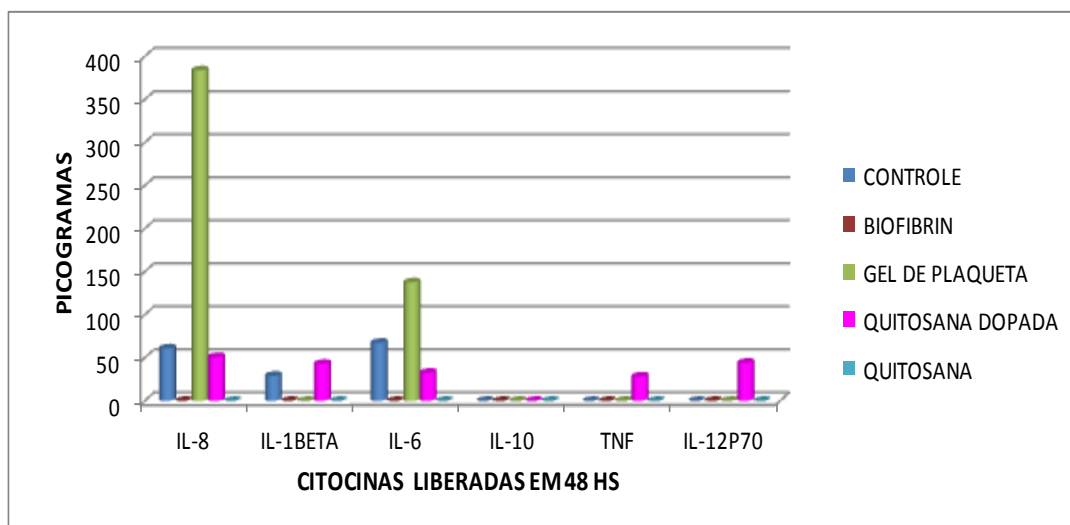


GRAFICO 5 - Nível de citocinas liberadas no período de até 48 horas em cultura de CTMs sob os *scaffolds* biofibrin, gel de plaquetas, quitosana dopada e quitosana.

O GRÁFICO 4 mostra que, no período de até 18h, as citocinas IL-8, IL 1 β e IL-6 tiveram uma liberação expressiva em todos os *scaffolds* utilizados. Porém nota-se que, na situação onde o *scaffold* foi o biofibrin, o nível de liberação das três citocinas foi muito menor, tanto em comparação com o Controle, como também para os *scaffolds* gel de plaquetas e quitosana dopada.

A proliferação celular *in vitro* difere daquela *in vivo*, pois por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular. Sua adesão célula-célula e célula-matriz são reduzidas por não possuir características como heterogeneidade e arquitetura tridimensional de um tecido *in vivo*, pois seu meio nutricional e hormonal foram modificados (MORAES, AUGUSTO & CASTILHO, 2007). Assim, os resultados demonstram que a presença dos *scaffolds* diminuiu o sofrimento celular no período de adaptação de seu desenvolvimento *in vitro* e o biofibrin foi o *scaffold* que melhor interagiu com as células seguido do gel de plaquetas e da quitosana dopada. Já para o *scaffold* constituído somente pelo polímero quitosana verificou-se altos níveis de liberação das citocinas pró-inflamatórias.

Para as citocinas medidas após o período de 48 horas (GRAFICO 5) chama a atenção os níveis de IL-8 e IL-6 nas culturas com o *scaffolds* gel de plaquetas. Este *scaffold* é constituído a partir de concentrados de plaquetas que tiveram suas membranas rompidas, permitindo a extrusão dos grânulos plaquetários. Estes são importantes reservatórios de potentes mediadores químicos como serotonina, catecolaminas, fator IV plaquetário, fibrinogênio, plasminogênio, fibronectina, trombospondina, e também Fator de Crescimento plaquetário. Além disso, possui muitas enzimas lisossomais como proteases e fosfatases e é uma fonte de cátions divalentes com Cálcio e Magnésio. Assim, pode-se inferir que estas moléculas iniciem um processo de sinalização celular estimulando, principalmente a IL-8 que é responsável pela estimulação de moléculas de adesão no contato célula-célula. O GRÁFICO 6 evidência o alto nível de IL-8 no período de 48h pós-plaqueamento, reforçando está hipótese.

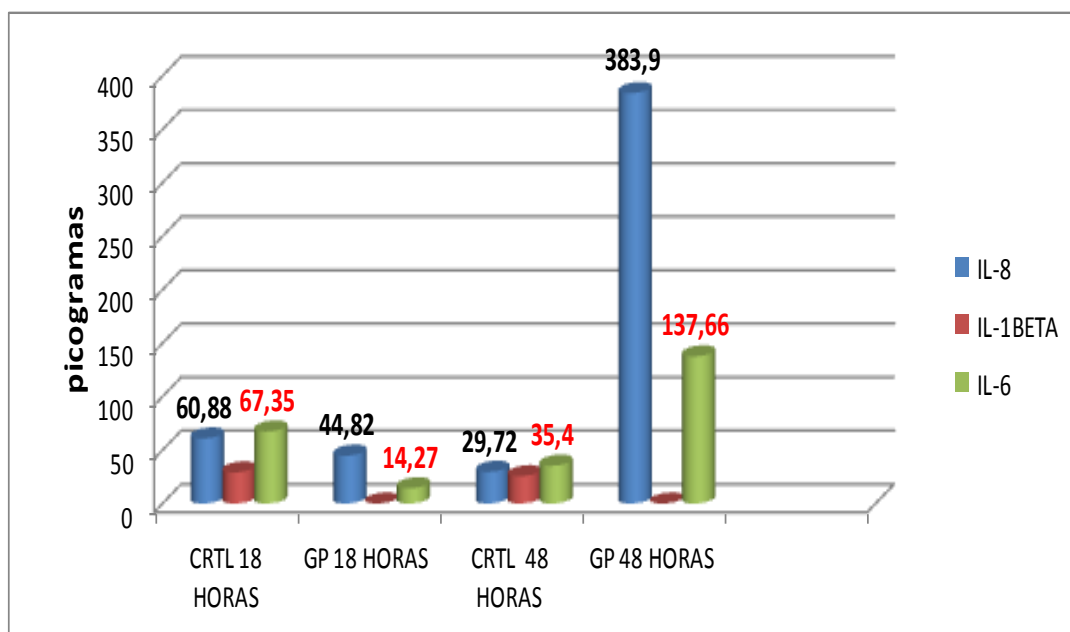


GRAFICO 6 – Níveis de citocinas IL-8, IL-1beta e IL-6 liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18 e 48 horas na ausência (controle) e presença do *scaffolds* Gel de plaquetas. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6.

No GRÁFICO 7 pode-se analisar, de forma mais clara, a atuação do *scaffold* constituído de proteínas plasmáticas, o biofibrin, no cultivo das CTMs nos períodos de 18 e 48 horas. Observa-se que as interleucinas pró-inflamatórias tiveram seus níveis praticamente zerados, o que sugere que as CTMs já após 18 horas de plaquamento, interagiu de forma positiva com o arcabouço existente na placa de cultura.

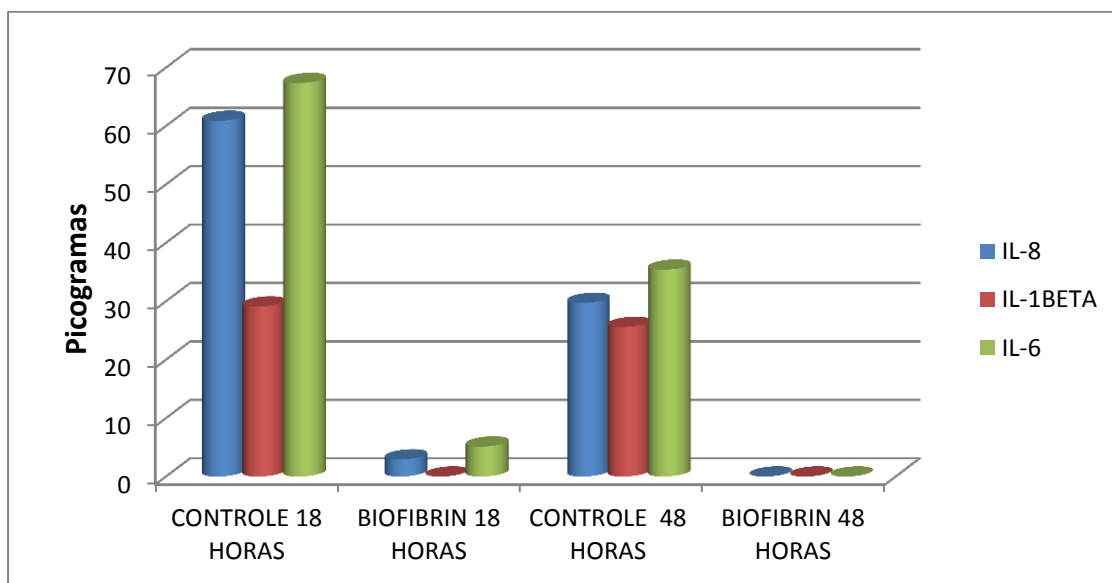


GRÁFICO 7 – Níveis de citocinas pró-inflamatórias liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18 e 48 horas na ausência (Controle) e presença do *scaffolds* biofibrin.

O GRÁFICO 8 mostra os níveis das citocinas nas culturas sem a utilização dos *scaffolds*, ou seja, somente os controles, na ausência e na presença de *Cordia* nas 03 concentrações estudadas no período de 18 horas. Verifica-se que, na situação onde as células são colocadas em cultura após todo o processo de dissociação tecidual, as interleucinas IL-8 e IL-6 estão em níveis altos. Porém, quando a *Cordia* foi adicionada ao meio de cultura, esses níveis foram reduzidos pela metade. Tanto a IL-8 como a IL-6 são importantes marcadores inflamatórios, sugere-se que a presença da *Cordia* no meio de cultura reduziu a expressão das mesmas em pelo menos 50%. Também se pode verificar que, na presença da concentração de 50µg/ml de *Cordia*, essa redução foi ainda maior.

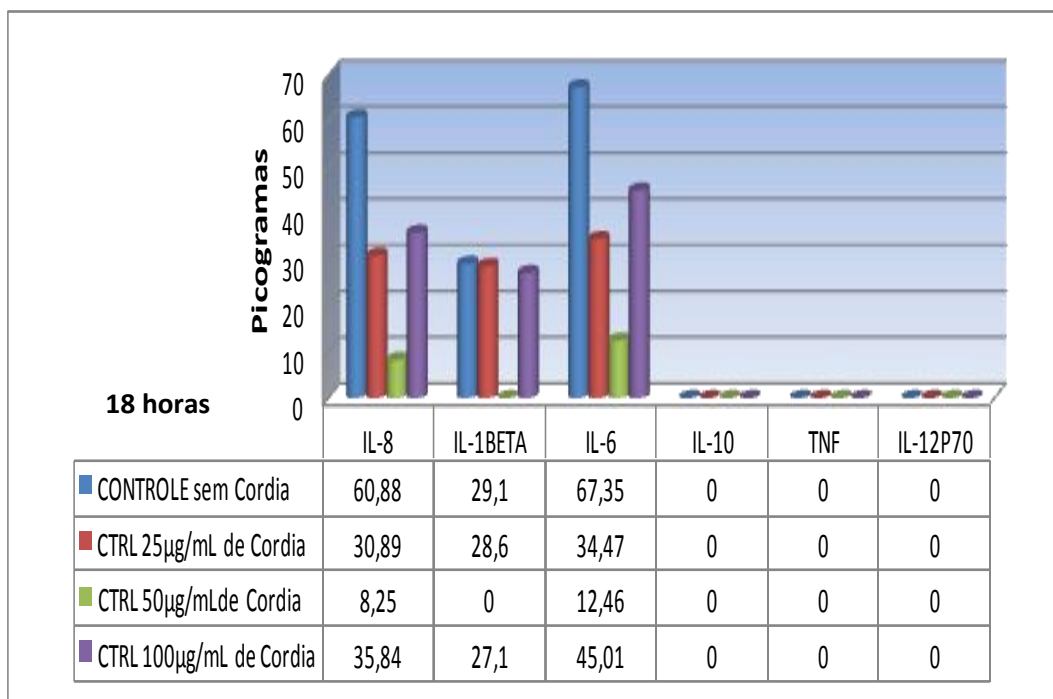


GRÁFICO 8 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs nos períodos de 18h na ausência de *scaffolds* (controle) sem *Cordia* e controles na presença de 03 concentrações de *Cordia*.

O próximo gráfico (GRAFICO 9) mostra o comportamento das CTMs em cultura sem *scaffold* (controle) e com o *scaffold* biofibrin onde as citocinas foram medidas no período de 18hs. Aqui, foi adicionado ao meio de cultura concentrações diferentes de *Cordia* – extrato fase etérea. Neste experimento, todas as culturas tinham *Cordia*, porém em concentrações diferentes. Assim, a avaliação fica a cargo do papel do *scaffold* para o desenvolvimento celular, mostrando que, na concentração de 25µg/mL, o nível das citocinas liberadas foi o menor quando comparado ao controle na mesma concentração. O mesmo parece não ter ocorrido com a concentração de 50µg/mL. Já na concentração de 100µg/mL verifica-se um aumento, principalmente para IL-8 e IL-6. Esse resultado nos remete a lembrar do GRÁFICO 2 (Apoptose) e do GRÁFICO 3 (viabilidade celular) que mostram que a concentração de 100µg/mL de *Cordia* na Fase etérea é tóxica para a célula matando aproximadamente 90% delas. O GRÁFICO 10 mostra que em 48 horas a citocina pró-inflamatória IL-1β não é mais liberada com exceção da cultura com 100µg/mL de *Cordia e scaffold*

biofibrin. As citocinas IL-8 e IL-6 todas tiveram seus níveis aumentados com o período de 48 horas.

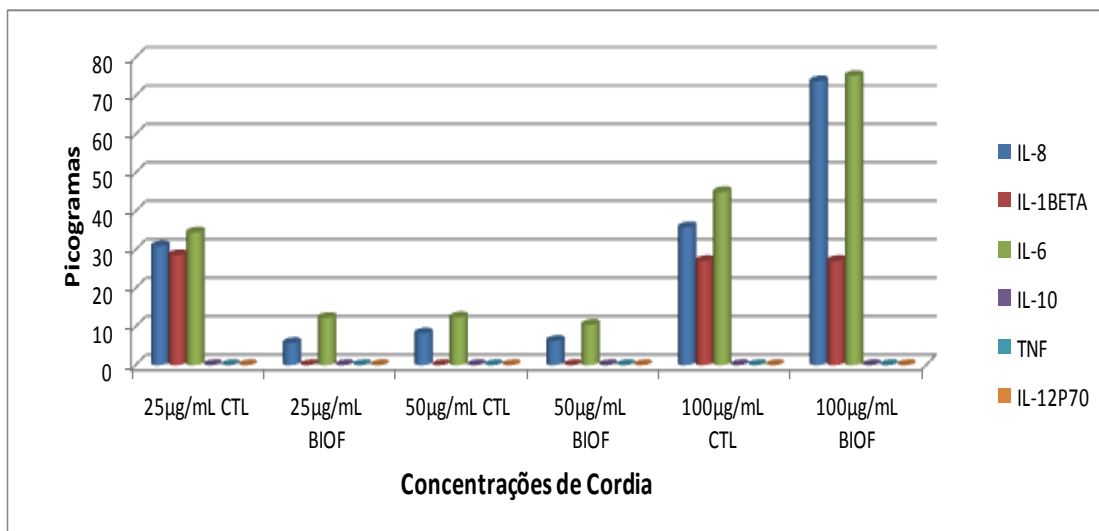


GRÁFICO 9 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* biofibrin, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

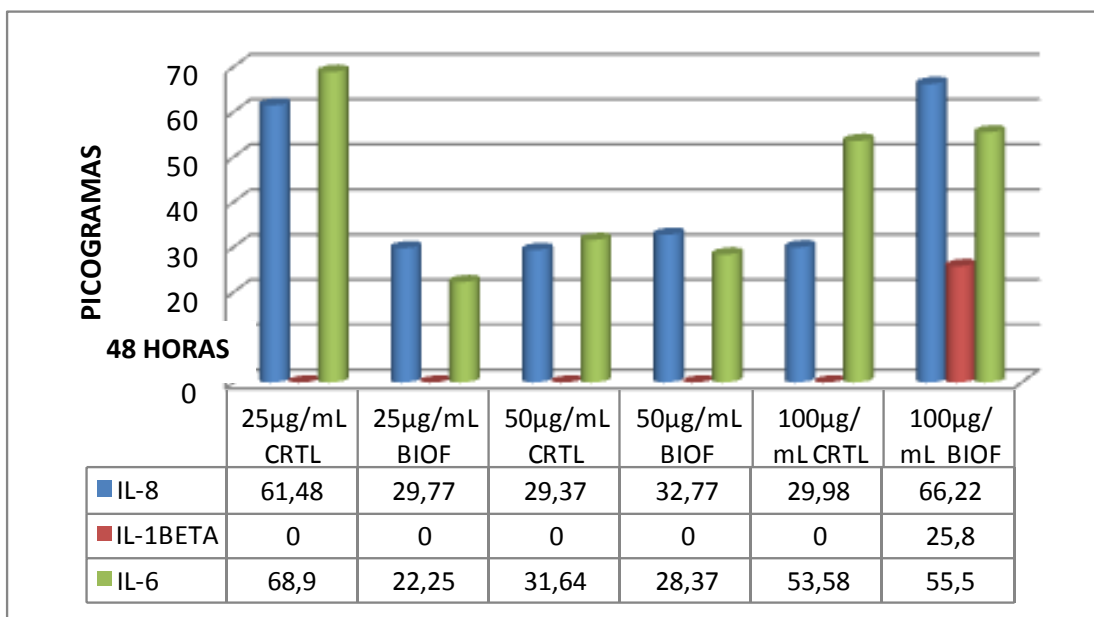


GRÁFICO 10 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* biofibrin, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

No *scaffold* gel de plaquetas cujo meio de cultura foi incorporado a *Cordia*, a liberação da IL-8 no período de 18 horas foi significativamente maior quando comparado com o controle nas concentrações de 25 e 50µg/ml de *Cordia*. A IL-1beta esteve presente somente no controle de 25µg/ml (sem *scaffold*) não sendo evidenciada na presença dos *scaffolds* para as concentrações de 25 e 50µg/ml e, ainda, na concentração de 100µg/ml de *Cordia*. Ao comparar este Gráfico 11 com o Gráfico 6 que mostra a atuação do *scaffold* Gel de Plaquetas na ausência da *Cordia*, nota-se que houve um ligeiro aumento dos níveis de IL-8 para as concentrações de 25µg/mL e 50µg/mL de *Cordia*. Este aumento foi ainda mais pronunciado para os níveis de citocinas determinados após 48 horas (GRÁFICO 12)

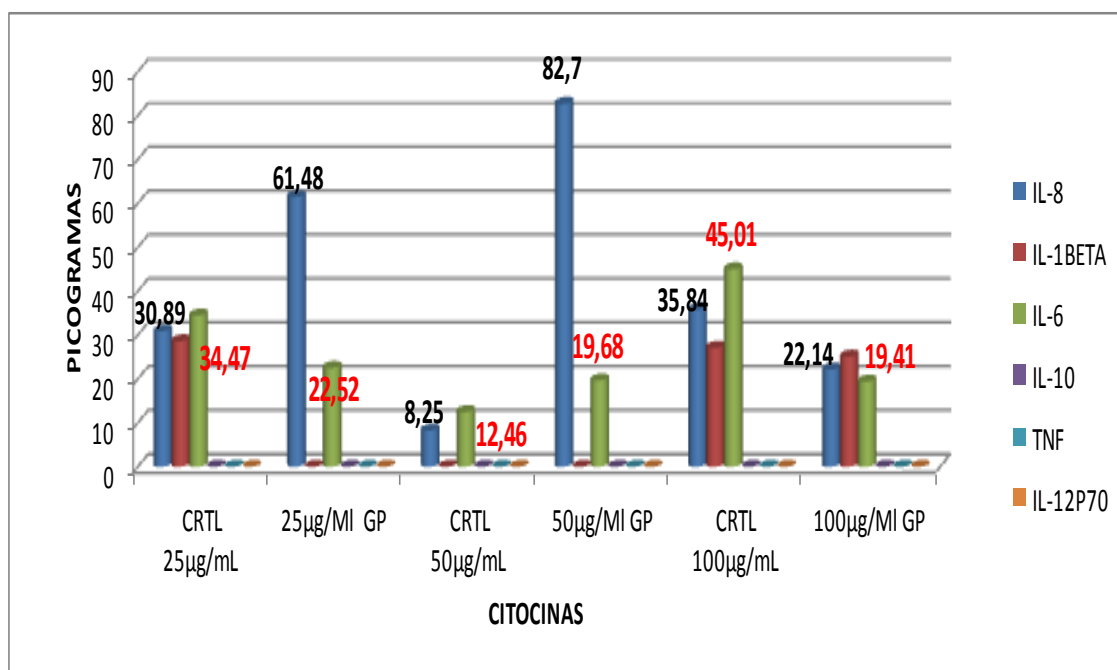


GRÁFICO 11 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (controle) e com o *scaffold* Gel de Plaquetas, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6.

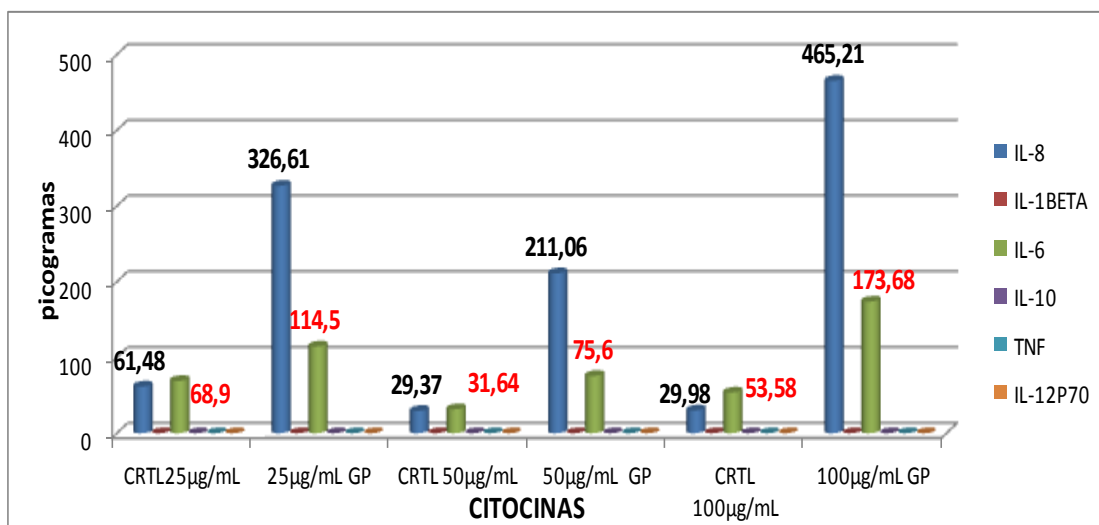


GRÁFICO 12 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (controle) e com o *scaffold* Gel de Plaquetas, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações. Os dados inseridos ao final de cada barra de histograma referem-se às citocinas IL-8 e IL-6.

Com relação ao *scaffold* utilizando-se o polímero quitosana desacetilada dopada com concentrado de plaquetas e todas as culturas celulares ocorreram na presença da *Cordia*, nota-se que nas concentrações de 25µg/ml e 50µg/ml de *Cordia*, onde as células apresentaram boa viabilidade celular, houve aumento dos níveis de citocinas inclusive da citocina IL-12P70 quando comparado com seu respectivo controle. A única concentração que esses níveis foram menores foi na de 100µg/ml, porém pode-se sugerir que isto ocorreu devido á morte celular (GRÁFICO 13). Já para o período de 48 horas, a liberação de IL-1β não é evidenciada (GRAFICO 14).

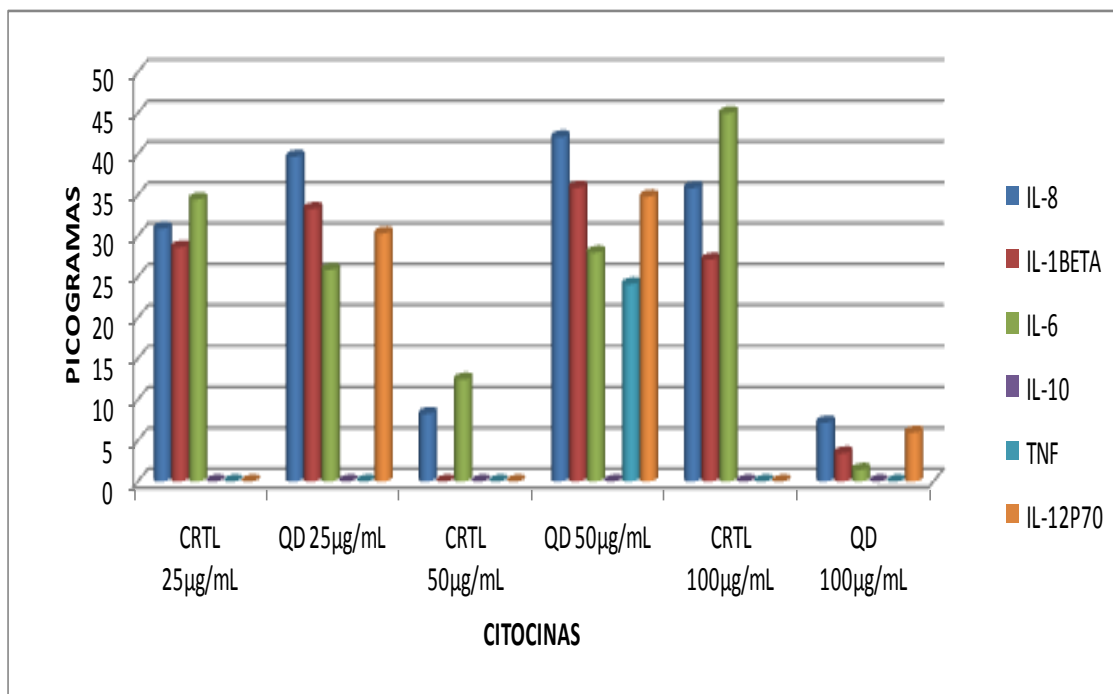


GRÁFICO 13 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (controle) e com o *scaffold Quitosana dopada*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

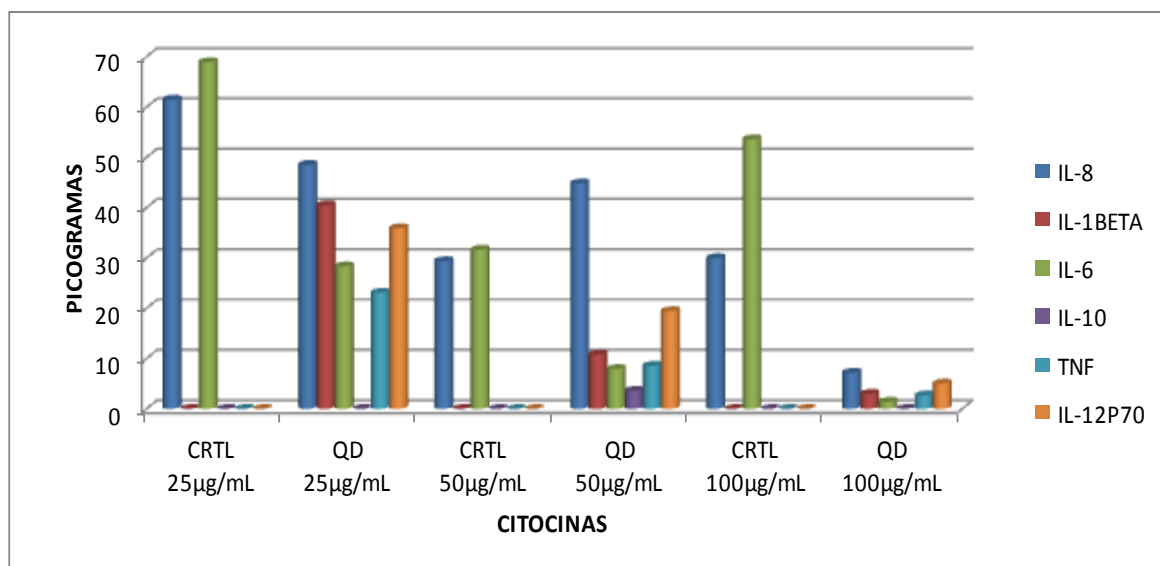


GRÁFICO 14 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (controle) e com o *scaffold Quitosana dopada*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

Ao se utilizar como *scaffold* o polímero quitosana sem dopagem nenhuma, verificou-se o aparecimento de níveis altos de TNF α já na concentração de 25 μ g/ml, o que ainda não havia ocorridos para os outros *scaffolds*. Seu aparecimento sugere de forma incontestável o meio adverso em que a célula esta inserida (GOMES, MACEDO NETO & BISPO, 2009). Com relação aos resultados para o *scaffold* quitosana na concentração de 50 μ g/ml, esta análise precisou ser descartada devido à ausência de leitura pelo citômetro. O mesmo ocorreu para a concentração de 25 μ g/mL no período de 48 horas (GRAFICO 16).

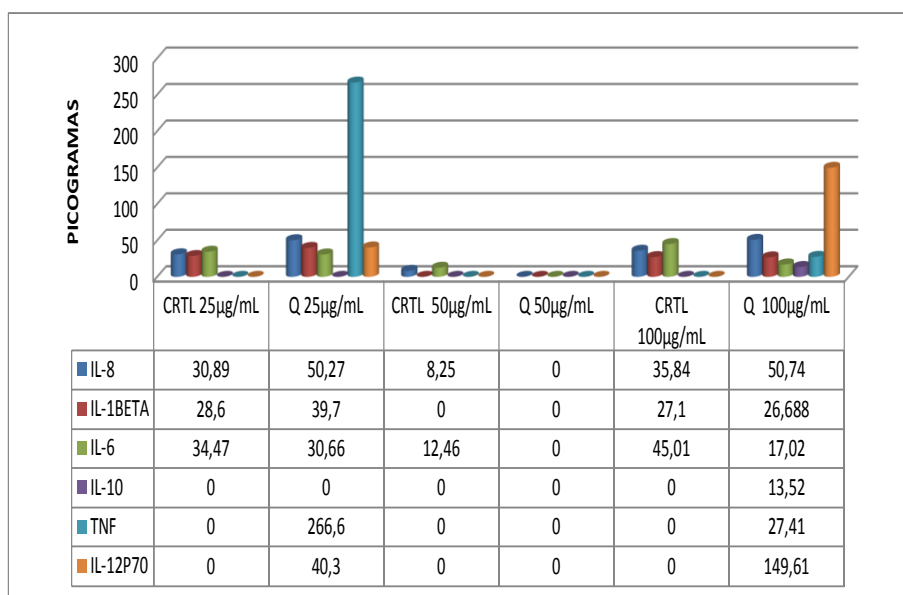


GRÁFICO 15 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **18h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold* Quitosana, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

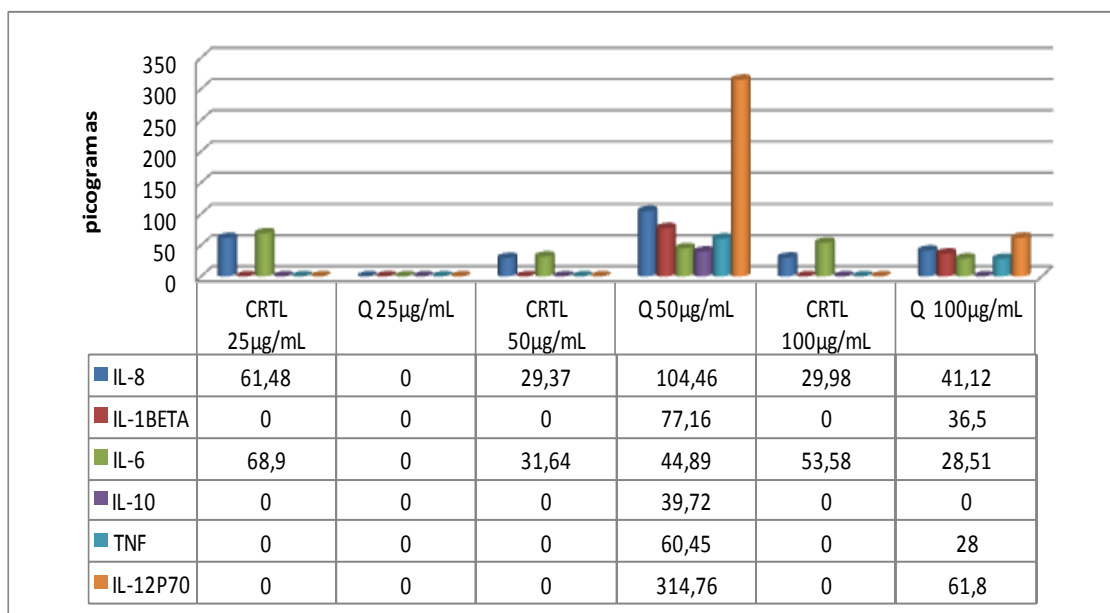


GRÁFICO 16 – Níveis de citocinas liberadas na cultura primária de CTMs no período de **48h** na ausência de *scaffolds* (Controle) e com o *scaffold Quitosana*, todos com *Cordia* presente no meio de cultura em 03 concentrações.

Desde muito tempo, os produtos naturais, notavelmente os originados de plantas, tem sido uma importante fonte de agentes terapêuticos. De 25 % a 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivadas de produtos naturais (CALIXTO, J. B, 2005). A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos (SIMÕES et al., 2007).

Alguns estudos, que utilizaram outras espécies do gênero *Cordia* apresentaram resultados que reforçam a utilização da *Cordia ecalyculata* e de outras plantas do mesmo gênero devido seu alto potencial anti-inflamatório (CALIXTO, 2004; BARROSO & OLIVEIRA, 2009; PARISOTTO, 2011). Além disso, a *Cordia* faz parte da família das *Boraginaceae*, na qual também está inserido o Confrei (*Symphitum officinale*), fitoterápico já comercializado pelas suas propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, cicatrizante, emoliente, antisséptica, bactericida e fungicida. Recentemente o Brasil tem apresentado produtos inovadores de origem fitoterápica como o Acheflan® da indústria Aché, oriundo da atividade anti-inflamatória da Erva-Baleeira (*Cordia Verbenacea*).

Com relação à *Cordia ecalyculata* *vell.*, comercializada para fins de emagrecimento conhecido como Pholia Magra, estudos recentes baseados em resultados do levantamento em bases de dados mostraram que há poucos estudos sobre essas plantas, apesar de haver grande comercialização. Não há comprovação científica destes efeitos e são necessários mais estudos pré-clínicos, clínicos e toxicológicos que certifiquem a efetividade e a segurança no uso destas plantas como emagrecedoras (PELIZZA, 2010).

Com base nos estudos apresentados, e face à comprovação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *Cordia ecalyculata*, tem-se como perspectiva futura a incorporação dos mesmos à base dos produtos produzidos no Laboratório de Engenharia Celular denominados como Biocurativos já utilizados para tratamento de úlceras crônicas e lesões de pele.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foram apontadas as seguintes conclusões:

- Foi verificado que as culturas celulares obtidas na ausência e presença de extrato etéreo de *Cordia* foram Células Tronco Mesenquimais (CTMs) comprovadas por fenotipagem com marcadores específicos pelo método de Citometria de Fluxo;
- Para a incorporação da *Cordia* aos meios de cultura foi escolhida a Fase etérea da planta por se obter, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml situações bastante distintas em relação a apoptose e à viabilidade celular. A FE 100 µg/ml promove apoptose de 90% das células, porém a FE 25 µg/ml demonstra índices de apoptose próximos à zero;
- Na utilização do *scaffold* biofibrin em meio com ausência de *Cordia*, os níveis de citocinas IL-8 e IL-6 praticamente zeraram, podendo sugerir que as CTMs interagiram de forma positiva com o arcabouço existente na placa de cultura.
- Na utilização do *scaffold* gel de Plaquetas em meio com ausência de *Cordia*, nota-se uma diminuição não significativa em 18 horas para as citocinas IL-8 e IL-6, Já para o período de 48 horas elas aumentaram significativamente.
- Os *scaffolds* de quitosana dopada e quitosana induziram as células a liberarem quantidades significativas das interleucinas pró-inflamatórias. Isso demonstra que esses polímeros conferem efeitos adversos ao ambiente celular, dificultando as células no processo de adesão celular.
- A detecção das citocinas no período de 18 horas mostrou que as mesmas tem seu pico de liberação entre 18 e 36 horas, sendo o período de 48 horas já tardio para verificar esses parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Citocinas. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier., p. 269-79, 2008.

ARREBOLA, M. R. B. et al. Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero *Cordia*. (*Boraginaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 57-65, 2004.

ASSONUMA, M. M. **Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* vell (chá-de-bugre)**.2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Química, Universidade Paulista - Araraquara, p. 29-32, 2009.

BARROSO, I. C. E; OLIVEIRA, F. Caracterização farmacognóstica dos frutos de *Cordia sellowiana* chama de *Cordia myxa*L. (*Boraginacea e Jussieu*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.19, n.2a, p. 458-470. 2009.

BOATENG JS; ET AL. **Wound healing dressings and drug delivery systems: a review**. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97 (8); 2008.

CALIXTO, JB; CAMPOS, MM; OTUKI, MF; SANTOS, ARS. Anti-inflammatory compounds of plants origin. Part II, Modulation of Pro-inflammatory cytokines, Chemokines and Adhesion molecules. **Planta Med**, 70: 93-103, 2004.

CALIXTO, J.B. Twenty five years of research on medicinal plants in Latin América a Personal Review. **J. Ethnopharmacol.**, 100, p.131-134. 2005.

CATHERINE M K.; ELIZABETH C.; ROCKY S T.; **Mesenchymal stromal cells Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation Cartilage Biology and Orthopedics Branch,**

National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Fevereiro, 2007.

DADALTI, P; et al. **Substitutos biológicos da pele**. *Rev Bras de Medicina*: 64 (7). Jul 2007. Disponível em: http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?id_materia=3603&fase=imprime. Acesso em 25 de Setembro, 2014.

DIAS, T. G. **Estudo farmacognóstico de Porangaba (*Cordia ecalyculata Vell. Boraginaceae*) e identificação de adulterações**. 2004. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p. 147, 2004..

FERNANDES, L. P. **Úlcera venosa do membro inferior: avaliação clínica e pelo mapeamento dúplex venoso**. 2006. Tese (Doutorado em Cirurgia) UNESP, Botucatu – SP, p. 70-85, 2006..

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm>. Acesso em: 01 jun. 2014.

FRASER, J. K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n. 4, p. 35-7, 2006.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R.A; OSBORNE, B. A. Citocinas. In: WANG, X. M.; RICKERTE, K. C.; GARCIA. **Imunologia de Kuby**. Porto Alegre: Editora Artmed.6ed, p. 350, 2008.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; LEAL, C. M. V. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.46, n.3, p.53-60, Jun. 2006.

GOMES, M.A.M.; MACEDO NETO, N.C.; BISPO, I. G. A – Interleucina-6, Molecula de adesão intercelular-1 e Microalbuminuria na avaliação da lesão endotelial:Revisão de literatura. **Revista SOCERJ**, 22(6): 398-403, 2009.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n. 8, p. 881-7, Aug. 2000.

MIYAZAKI, T. et al. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. **Differentiation**, v. 73, n. 12, p. 69-78, 2005.

MORAES, A. M.; SUAZO, C. A. T. Meios de cultura para células animais. In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P., CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais, de biofármacos a terapia gênica**. São Paulo: Editora Rocca, p. 466-9, 2008.

PARISOTTO, E. B. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenacea***. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, p 61-70, 2011.

PELIZZA, M.C Uso de cereus sp. e cordia ecalyculata vell. como emagrecedores : uma revisão. 2010. <http://hdl.handle.net/10183/26826> , Acesso em 22 de Janeiro, 2015.

SILVA, C. C. et. al. Autologous mesenchymal stem cells culture from adipose tissue for treatment of facial rhytids. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 36, n. 4, p. 289-90, 2009.

SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 127, n. 1, p. 445-50, Oct. 2009.

SILVA M. C.; CARVALHO J. C. T; Plantas Medicinais. In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios, aspectos químicos farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmed, p. 480, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVIC, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ed., 2007.

SMELTZER, S. C; BARE, B. G. Doença crônica e incapacidade. In:_____. **Brunner & Suddarth: Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 136-9, 2009..

SOUTO, L. R. M. et al. Model for humans kin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis. **Med. J. São Paulo**, v. 124, n. 2, p. 71-6, 2006.