



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

TALITA ISAAC MARTINS

Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para o enriquecimento dos biocurativos.

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

Orientadora: Profa Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2018**

Talita Isaac Martins

Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para enriquecimento dos biocurativos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica), linha de pesquisa: Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Martins, Talita Isaac.

Meio de cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais para enriquecimento dos biocurativos / Talita Isaac Martins. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune
Capes: 31301000

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Células - Cultura e meio de cultura. 3. Curativos biológicos. 4. Citocinas.

Palavras-chave: Citocinas; Curativo; Técnica de cultura de Palavras-chave: Citocinas; Curativo; Técnica de cultura de células.

Talita Isaac Martins

Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para enriquecimento dos biocurativos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Comissão examinadora:

Profa.Dra. Elenice Deffune
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Prof. Dr. Matheus Bertanha
Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp

Profa. Dra. Aparecida Vitória Gonçalves de Souza Mion
Depto. De Anestesia Polivet (Clínica Veterinária)

Botucatu, 26 de Fevereiro de 2018.

Dedicatória:

Dedico essa dissertação a Deus primeiramente, pois é confiando nele que sigo e conquisto meus sonhos, Dedico essa dissertação, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus amados pais Simone Isaac Martins e Luiz Tadeu Bueno Martins, Dedico a toda minha família, aos meus três irmãos e ao meu amado noivo e futuro esposo. Sem eles eu não sou nada e não teria chego onde estou.

Agradecimentos:

Agradeço primeiramente a Deus que é fonte de toda a existência.

Agradeço a minha Família: Minha mãe, Simone Isaac Martins primeiramente por ter me dado à vida e me ajudar, aconselhar, apoiar todos os dias de minha vida é nela em quem eu me espelho e agradeço sempre a Deus pela sua vida. Ao meu Pai Luiz Tadeu Bueno Martins, por sempre estar ao meu lado nos momentos difíceis, apoiando e ajudando no que precisasse. Aos meus irmãos Raphael Isaac Martins, Nathalie Isaac Martins e Lara Isaac Martins, por me aguentar nos momentos de stress e sempre apoiar em tudo. Agradeço demais a minha família pelo incentivo e por tudo.

Agradeço ao meu noivo e futuro marido Alexandre, por me apoiar e querer sempre o meu melhor, me ajudando sempre a evoluir e a ter paciência e calma.

Agradeço aos meus familiares, tias, tios, primos que de alguma forma contribuíram para minha evolução e me ajudaram nessa caminhada da vida.

Agradeço a minha avó Ivani, por sempre fazer de tudo para meu conforto e ajudar sempre da maneira que podia, agradeço sempre pelas palavras de amor e carinho, pela companhia das noites e por estar sempre ao meu lado quando eu preciso e pelo apoio que sempre me deu para evoluir e crescer na vida.

Agradeço as minhas amigas Louise Torres, Lais Ciniciato, Mônica Tassa, Juliana Damada, Larissa Tozin, por me aguentarem reclamando sempre, por me ajudar da maneira delas e por entender meus momentos de ausência.

Agradeço a Dra. Elenice Deffune primeiramente por me receber, pelos ensinamentos, pelas palavras, agradeço pela paciência que ela teve ao me ensinar, agradeço por todos esses dois anos, evolui muito e espero um dia ser a profissional que ela é.

Agradeço as colegas do Laboratório de Engenharia Celular: Ana Lívia, Ana Carolina, Helga, Heloisa pela companhia e pela ajuda.

Agradeço aos meus colegas de Mestrado, que se tornaram de uma forma ou outra uma família: Márcio Tulio – Obrigada por sempre me apoiar em tudo, obrigada por sempre estar ao meu lado e me empurrar para frente com sua alegria e entusiasmo, obrigada por confiar em mim e acreditar que um dia

chegaremos lá e conquistaríamos nossos sonhos. Nadja Arenales Alves: Obrigada pelas caronas, pelas risadas, pelos momentos de descontração e pela calma que sempre me transmitia. Ellen Capello: Obrigada pelas palavras e ensinamentos, obrigada pela companhia e pelo incentivo. Ana Carolina Pasian: Obrigada pela paciência, pelas palavras, por ser mostrar sempre forte nos momentos mais difíceis, Obrigada pelo apoio, por me ensinar o pouco que sabia.

Eu agradeço a Todos por ajudar de uma forma ou de outra, mas finalizo esses agradecimentos, agradecendo a Deus novamente, pois só ele sabe o interior do meu coração, só ele sabe os meus sonhos e objetivos de uma vida e só ele sabe o quanto foi difícil chegar até aqui. Obrigada, Obrigada e Obrigada meu senhor.

“Sejam fortes e corajosos. Não tenham medo nem fiquem apavorados por causa delas, pois o Senhor, o seu Deus, vai com vocês; nunca os deixará, nunca os abandonará”.

Deuteronômio 31:6

Martins, TI. Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para enriquecimento dos biocurativos, 2018.

Resumo

As células tronco mesenquimais tem por definição a autorrenovação, fonte de proliferação e a diferenciação celular em várias linhagens, sendo cartilagem, osso e tecido adiposo. Quanto características funcionais destacam-se cinco características: Suporte estrutural ou arcabouço, controle da inflamação, inibição da apoptose, ação anti-fibrose e por fim a diferenciação, cada um sendo responsável por secretar citocinas e hormônios de crescimento. As plaquetas, os hormônios de crescimento e fase de remodelamento de feridas crônicas abrangem várias etapas, começando pela fase da hemostasia e terminando na fase do remodelamento que vai garantir a força e o fechamento da ferida. Cada fase tem sua importância e secretam também inúmeros fatores de crescimento e citocinas importantes. A linha de curativos biológicos vem sendo desenvolvida há 15 anos no Laboratório de Engenharia Celular. Os resultados com o uso destes biocurativos têm sido excelentes, no entanto observa-se que quanto mais antiga é a lesão, ou maior a idade, maior é também a dificuldade no fechamento da área, e o risco de infecção secundária aumenta. Diante disto, encontrou-se uma oportunidade de melhoria do produto com os avanços no cultivo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, esta técnica propicia a obtenção de diferentes fatores de crescimento que modulam o fechamento de feridas. Uma das etapas do projeto foi avaliar pacientes idosos com feridas crônicas acima de três anos, a média obtida dos hormônios de crescimento comparados com indivíduos saudáveis foi maior em todos os casos, destacando-se o FGF-2 e o PAI-1. Na etapa seguinte Identificou-se maior dificuldade técnica para a quantificação fenotípica das células quando na presença de HDP comparado com SFB, pela formação de macroagregados formados, no entanto, nenhuma modificação do fenótipo esperado foi identificado. A dosagem das citocinas presentes no meio condicionado das CTMh em ambos os grupos estudados: SFB e HDP, mostraram desempenho diferentes, foi realizado *pool* da triplicata experimental realizada para o processamento das amostras. Das seis citocinas dosadas IL1- β , IL-6, IL-8 IL-10, TNF, e IL-12p70, somente as IL-6 e IL-8 tiveram níveis significativos detectados.

Palavras chave: Curativo. Citocinas. Técnica de cultura de células

Martins, TI. Medium of conditioned culture, rich in growth factors secreted by mesenchymal stem cells, for the enrichment of biocuritics, 2018.

Abstract

Mesenchymal stem cells are by definition self-renewal, a source of proliferation and cell differentiation in various strains, being cartilage, bone and adipose tissue. As for functional characteristics, five characteristics stand out: structural support or framework, inflammation control, inhibition of apoptosis, anti-fibrosis action and finally differentiation, each one being responsible for secreting cytokines and growth hormones. Platelets, growth hormones and chronic wound remodeling phase span several stages, beginning with the hemostasis phase and ending at the remodeling phase that will ensure strength and wound closure. Each phase has its importance and also secrete countless important growth factors and cytokines. The line of biological dressings has been developed for 15 years in the Laboratory of Cellular Engineering. The results with the use of these bio-curatives have been excellent, however, it is observed that the older the lesion, or the greater the age, the greater the difficulty in closing the area, and the risk of secondary infection increases. In view of this, there was an opportunity to improve the product with advances in the cultivation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, this technique provides the achievement of different growth factors that modulate the closure of wounds. One of the steps of the project was to evaluate elderly patients with chronic wounds over three years, the average obtained from growth hormones compared to healthy individuals was higher in all cases, especially FGF-2 and PAI-1. In the next step was identified greater technical difficulty for the phenotypic quantification of the cells when in the presence of HDP compared to FBS, by the formation of macroaggregates formed, however, no modification of the expected phenotype was identified. The dosage of the cytokines present in the conditioned medium of the MHT in both groups studied: SFB and HDP, showed different performance, a pool of experimental triplicate was realized for the processing of the samples. Of the six cytokines dosed IL-6, IL-6, IL-8 IL-10, TNF, and IL-12p70, only IL-6 and IL-8 had significant levels detected.

Keywords: Healing. Cytokines. Cell Culture Technique

Lista de Figuras

Figura 1- Características da CTM.....	16
Figura 2- Microscopia invertida de contraste de fase de CTM cultivadas in vitro.....	18
Figura 3- Perfil imunofenotípico mínimo das CTM, por citometria de fluxo.....	18
Figura 4- Características funcionais das CTM e moléculas envolvidas.....	19
Figura 5- Efeitos parácrinos liberados pelas CTM atuantes no remodelamento tecidual.....	20
Figura 6- Fases da ferida e função análoga	21
Figura 7- Representação esquemática da ativação e liberação dos hormônios plaquetários.....	25
Figura 8- Plaquetas e seus fatores/hormônios de crescimento e fases do remodelamento.....	27
Figura 9- Fatores de crescimento derivados de plaquetas.....	29
Figura 10- Diferentes etapas do projeto.....	33
Figura 11- Sistema Luminex – plataforma de monitoramento de fatores de crescimento.....	35
Figura 12- Curvas padrão para cada EGF, Angiopoetin-2, FGF1, FGF2 e VEGF-AA no sistema milipex/luminex.....	36
Figura 13- Comprovantes da aprovação de ambos os projetos pela plataforma Brasil.....	38
Figura 14- Distribuição das cinco amostras de CTMh em placas de 24 wells..	41
Figura 15- Curvas padrão das citocinas determinadas por citometria de fluxo..	43
Figura 16- Plaquetometria da amostra de sangue de portadores de feridas segundo sexo e idade.....	45
Figura 17- Determinação de fatores de crescimento de hormônios derivados de plaquetas em pacientes portadores de feridas crônicas em comparação com valores de indivíduos saudáveis.....	47
Figura 18- Aspecto da cultura amostra 1 de CTMh.....	56
Figura 19- Aspecto da cultura amostra 2 de CTMh.....	58

Figura 20- Aspecto da cultura amostra 3 de CTMh.....	59
Figura 21- Aspecto da cultura amostra 4 de CTMh.....	61
Figura 22- Aspecto representativo da citometria de fluxo.....	62
Figura 23- Determinação das citocinas por citometria de fluxo em meio condicionado.....	64
Figura 24- Diversidade fenotípica da subpopulação de monócitos.....	65
Figura 25- Interação celular, imunidade, inflamação, alteração da parede e secreção de marcadores inflamatórios.....	66

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Células Tronco Mesenquimais: <i>overview</i>	16
1.2. Hormônios Derivados de Plaquetas.....	24
1.3. Fatores de crescimento.....	28
1.4. Revisão sobre Citocinas.....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo geral:.....	32
3.2. Objetivo Específico.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1. Aspectos Éticos e Legais.....	33
4.2. Constituição da soroteca de pacientes portadores de feridas crônicas	34
4.2.1. Produção do Lisado Plaquetário para Obtenção de Hormônios derivados de Plaquetas Humanas.....	37
4.3. Seleção das CTM criopreservadas no banco de células.....	38
4.4. Cultura celular propriamente dita com CTM _h aditivadas com soro fetal bovino X hormônios derivados de plaquetas = obtenção de meio condicionado.....	40
4.5. Determinação de citocinas do Meio Condicionado controle (MC _c) e Meio Condicionado aditivado com HDP (MC _{hdp}) pelo método de Citometria de Fluxo.....	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 - Expansão de CTM em dois diferentes meios: SFB e HDP em 48h, 72h e 7 dias.....	55
5.2- Resultado quanto à Citometria de Fluxo.....	62
5.3- Resultado quanto à Citocinas.....	63
6. CONCLUSÃO.....	68
7. REFERÊNCIAS.....	69

I – Introdução

Células-tronco são definidas na literatura como células primitivas e indiferenciadas, com uma alta capacidade de renovação celular e diferenciação em outros tecidos, exercendo funções específicas. Com isso, uma célula mãe na sua divisão mitótica pode gerar outra célula idêntica a ela¹.

Baseado nesses fatos as células tronco se apresentam como linha de pesquisa com vertentes altamente interessantes. Como célula propriamente dita, as células tronco mesenquimais (CTM) atuam com sua capacidade de reconstrução e remodelamento tecidual. Funcionando como uma biofábrica, secretam inúmeros fatores de crescimento e Citocinas que as tornam agentes importantes no controle do processo inflamatório².

De acordo com a *Science* em 1999, as CTM, foram eleitas como fonte de proliferação e auto-renovação, capacidade de diferenciação em várias linhagens e capacidade de repopular o tecido de origem quando transplantados³.

As células-tronco são divididas em duas grandes classes: embrionárias e adultas. As adultas que são atualmente o foco da atenção das pesquisas, tendo em vista os enormes entraves e consequências na utilização das células tronco embrionárias. As células tronco adultas (CTA) por sua vez se classificam conforme o sítio anatómico obtido, mas de forma geral são divididas em células tronco hematopoiéticas e células tronco mesenquimais (CTM)³.

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são o tipo mais comum de célula tronco, sendo células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação em outros tipos de células sanguíneas. As CTH são responsáveis pela manutenção da hematopoese e geralmente estão em maior quantidade no sangue do cordão umbilical e placentário, no fígado fetal e posteriormente na medula óssea¹.

As CTM podem ser obtidas em diversos tecidos, inclusive no tecido adiposo. A capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais é mais limitada e restrita. Mas tem um importante papel na renovação de células, sendo capaz de se diferenciar em até 3 tecidos diferentes por exemplo:(cartilagem, músculo e osso), participando da homeostase tecidual normal⁴.

Com esse poder de diferenciação e renovação celular, tanto as células-tronco mesenquimais quanto as embrionárias são utilizadas para estudos clínicos e pesquisas³.

O uso terapêutico das CTM tem aumentado de forma progressiva, inclusive para promover o reparo de feridas cutâneas. Isto se dá através de múltiplos mecanismos, entre os quais estão situados os mediadores parácrinos secretados pelas células, que são responsáveis pela maioria dos seus benefícios terapêuticos⁵.

Portanto, as CTM são candidatas promissoras para uso em medicina regenerativa, principalmente por causa de sua multipotência, seu potencial imunomodulador e suas propriedades parácrinas, incluindo o potencial para promover a angiogênese. O acúmulo de evidências sugere que as propriedades inerentes à citoproteção e ao reparo de tecidos, pelas CTM, podem ser melhorados por vários estímulos de pré-condicionamento, implementados antes do transplante das células, ou através de aplicação de produtos⁶.

Resgatando a proposta desta dissertação intitulada “Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para enriquecimento dos biocurativos” podemos destacar dois temas abordados por esta pesquisa: efeitos parácrinos das CTM e o remodelamento tissular. Para tal far-se-á necessária revisão sobre CTM e feridas crônicas.

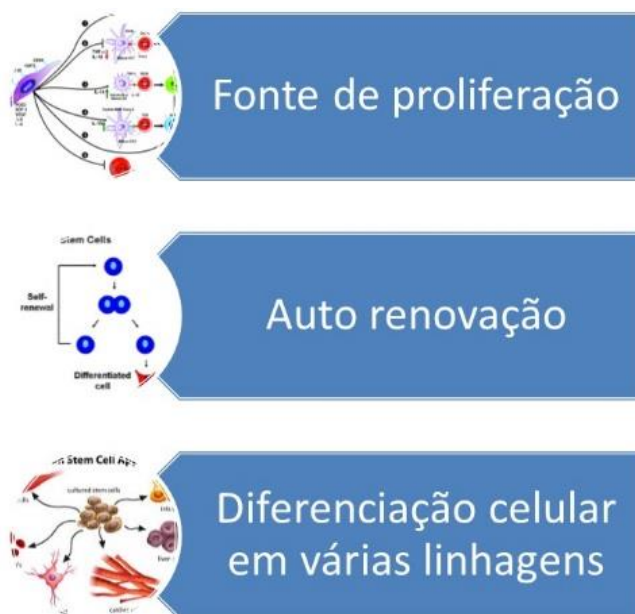
Tendo em vista que o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu (LEC) atua na área de bioprocessos e bioprodutos com a linha de Biocurativos produzidos com plasma fresco congelado e concentrado de plaquetas, promover o *upgrade* dos mesmos é altamente aconselhável. Atualmente o LEC possui três produtos delineados: cola de fibrina de uso externo ou Biofibrin, o gel de plaquetas ou Biogel e o Gel Mix, contendo propriedades da cola de fibrina e enriquecimento com hormônios derivados de plaquetas. Esta dissertação analisará a possibilidade de implementação destes biocurativos com hormônios de crescimento obtidos a partir da cultura de CTM, comparando os fatores de crescimento e ou citocinas obtidas na cultura clássica, na presença de soro fetal bovino, com aquela obtida por enriquecimento com hormônios derivados de plaquetas como substituto do plasma.

1.1- Células Tronco Mesenquimais:

CTM por definição, são aquelas capazes de auto renovação prolongada através de sucessivas divisões mitóticas do tipo assimétrica e passíveis de originar pelo menos um tipo celular em estágio mais avançado de diferenciação⁷.

São células amplamente estudadas possuindo características específicas tanto morfológicas como funcionais e imunofenotípicas. Dentre suas características podem ainda ser listadas a fonte importante de proliferação tecidual, a capacidade de auto renovação e graças a sua capacidade de divisão celular assimétrica, pode além de se auto renovar, se diferenciar em pelo menos três linhagens⁷.

Figura 1 – Características das CTM



Fonte: Modificado de Fonte: Modificado de: What Are Stem Cells? <http://www.massgeneral.org/regenmed/stemcells/whatarestemcells.aspx>⁸.

Fonte: <https://www.google.com.br/search?biw=1242&bih=588&tbm=isch&sa=1&ei=U6YwWuBng7bABJKZoOAI&q=self+renewal+stem+cells&oq=cells+self+renewal>. Acessado em 12/12/2017⁹.

Quanto às características morfológicas, descritas por Pittenger *et al* 1999,

“As células tronco mesenquimais são células multipotentes, que estão presentes na medula adulta, e em diversos outros tecidos, que podem se replicar como células indiferenciadas e que têm potencial para se diferenciar em linhagens de tecidos mesenquimatosos, incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão, músculo e estroma medular. As células que possuem as características das células-tronco mesenquimais humanas foram isoladas dos aspirados de medula de doadores voluntários. Essas células exibiram um fenótipo estável e permaneceram como uma monocamada in vitro, assumem aspecto fibroblastóide sempre aderente ao plástico. Essas CTM adultas podem ser induzidas a se diferenciar exclusivamente nas linhagens adipocíticas, condrocíticas ou osteocíticas. Foram identificadas células-tronco individuais que, quando expandidas para colônias, mantiveram o potencial de multilineagem”³.

Diante desta descrição, ficou estabelecido que são propriedades morfológicas obrigatórias das CTM:

1. Comprovada capacidade de adesão à superfície plástica;
2. As células assumem aspecto fibroblastóides e
3. Devem se dividir em pelo menos 3 diferentes linhagens de mesma origem embriológica, por exemplo: cartilagem, osso, tecido adiposo.

Na figura 2 pode ser observada a característica de adesão ao plástico e a formação, aspecto fibroblastóide.

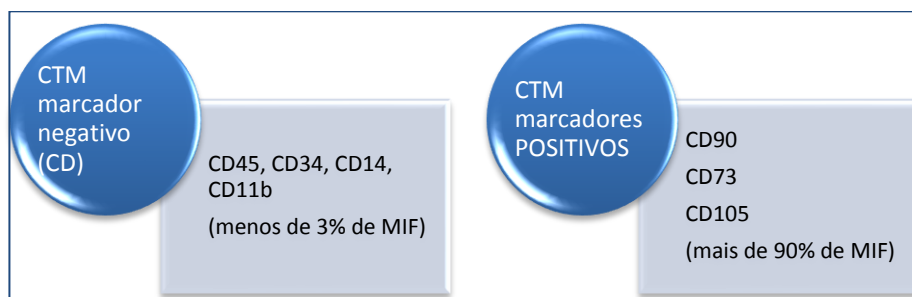
Figura 2 – Microscopia invertida de contraste de fase de CTM cultivada *in vitro*



Fonte: arquivo pessoal, 2018

Quanto às características imunofenóticas, os critérios foram publicados por Dominici *et al*, 2006 na *Cytotherapy* com trabalho intitulado: *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells*, no qual o autor conjuntamente com a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceram critérios de comprovação fenotípica das células usando marcadores fluorescente e técnica de citometria de fluxo. Pelo estabelecido pelos autores, deve ser estabelecido um conjunto de marcadores positivos e negativos como por exemplo: CD45, CD34 e CD11b como marcadores negativos de CTM e como positivos, CD90, CD73, CD105 entre outros^{10, 11}.

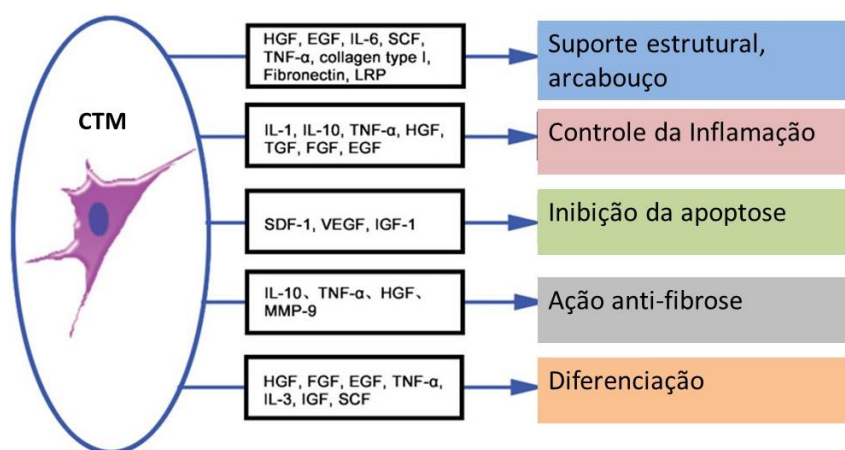
Figura 3 – Perfil imunofenotípico mínimo das CTM, por citometria de fluxo.



Fonte: arquivo pessoal, 2018

O aspecto funcional das CTM tem sido amplamente estudado por inúmeros autores^{12,13,14}. Didaticamente podemos estabelecer 5 funções diferenciadas: servir de suporte estrutural ou arcabouço para os tecidos, controlar a inflamação, inibir a apoptose, ação anti-fibrótica e diferenciação celular. O esquema abaixo representa todas estas funções relacionando-as com as moléculas que interagem em cada etapa.

Figura 4 – Características funcionais das CTM e moléculas envolvidas



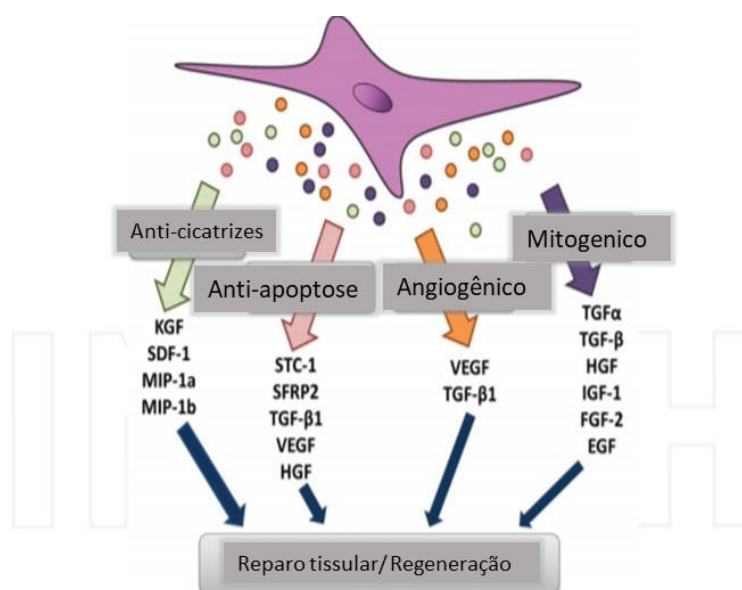
Fonte : Adaptado de *Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells*. November 2010. Cellular & molecular immunology 8(1):19-22 DOI 10.1038/cmi.2010.57¹⁵

Relacionados às características de suporte estrutural e de arcabouço são listados diferentes hormônios e fatores tais como: *hepatocyte growth factor* (HGF), *epidermal growth factor* (EGF), interleucina6 (IL6), *stem cell factor* (SCF), *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), colágeno tipo I, *fibronectin* e *liver regulation protein* (LRP). No controle da inflamação as moléculas mais envolvidas são as interleucinas1 (IL-1), IL-10, seguido do TNF α , HGF, *transforming growth factor* (TGF), *fibroblast growth factor* (FGF) e EGF, este último envolvido no suporte e diferenciação celular. Na inibição da apoptose encontram-se relacionados: *stromal cell-derived factor-1* (SDF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Na diferenciação celular, vários fatores estão

representados e já foram citados nas etapas anteriores, além da interleucina 13 (IL-3)¹⁵.

Em 2016, no trabalho publicado por Yogambha Ramaswamy aborda 4 das principais características das CTM relacionadas com o remodelamento tecidual: a ação antifibrótica, antiapoptótica, a angiogênese e a mitogênese, descrevendo e listando os fatores envolvidos como se vê na figura 5.

Figura 5 – Efeitos parácrinos liberados pelas CTM, atuantes no remodelamento tecidual.



Fonte: Adaptado de StemCells for BoneRegeneration: Role ofTrophicFactorsYogambhaRamaswamy, Khoon S Lim, HalaZreiqatandZufu Lu. StemCells for BoneRegeneration: Role ofTrophicFactors <http://dx.doi.org/10.5772/63357>¹⁶

Diante das evidências científicas apresentadas, este trabalho foi elaborado com o objetivo de delinear provável melhoramento a partir das moléculas secretadas pelas CTM em cultura *in vitro*.

O remodelamento tecidual é a chave mestra do processo de cicatrização das feridas. Trata-se de um processo complexo envolvendo células e eventos bioquímicos. Sendo que se entende por reparação de uma ferida o esforço dos tecidos para restaurar a normalidade de sua função e sua integridade estrutural após uma injúria. A regeneração corresponde à perfeita restauração do tecido incluindo sua arquitetura, sem deixar cicatriz visível. Em adultos humanos a precisão da regeneração é prejudicada pela velocidade do reparo. Todo este processo didaticamente é dividido em fases, sabendo-se que este remodelamento

envolve uma casta de trabalho conjunto envolvendo um grande número de diferentes células. Cada “ator” age em uma determinada fase da ferida e tem uma ação definida, com importante interação entre todas as partes ¹⁶.

Figura 6 – Fases da Ferida e função análoga

Fase	Função/Ação
Hemostasia	Parada da hemorragia
Inflamação	Diluição ou neutralização de agentes danosos/agressão
Granulação	Regeneração do tecido conjuntivo danificado
Remodelamento epitelial	Regeneração do tecido epitelial danificado
Contração/Diminuição da ferida	Aproximação das bordas da ferida
Cicatrização/Remodelamento	Garantir a força e o retorno do tecido danificado

Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Fase1: Hemostasia ou coagulação

A coagulação é o primeiro processo de cicatrização das feridas crônicas. Esse processo depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Algumas substâncias vasoativas, proteínas adesivas e fatores de crescimento das plaquetas como (PGDF) e as proteases são liberadas desencadeando assim outras fases da coagulação. A formação do coágulo serve para que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam se fixar através do trombo branco ou *plug* plaquetário, na ferida¹⁷.

Fase 2: Inflamação

Após o ferimento, ocorre a vasoconstrição do tecido proporcionando o fechamento dos vasos lesados (fase da coagulação ou hemostasia). Através do fenômeno chamado de diapedese as células do endotélio perdem sua capacidade de conexão, aumentando a permeabilidade e permitindo que ocorra uma passagem dos elementos sanguíneos para a ferida como o plasma e eritrócitos, formando assim um exsudato¹⁸.

Na fase inflamatória algumas células são importantes como os neutrófilos que são responsáveis pela digestão das bactérias e os monócitos que no tecido se transformam em macrófagos e são responsáveis pela fagocitose das bactérias e restos celulares¹⁸.

O fator de crescimento na fase inflamatória da cicatrização é liberado pelas células epidérmicas e pelas plaquetas¹⁹. Nesta fase diz-se que o papel principal é de *purging* diluindo e neutralizando a ação de agentes danosos e minimizando, desta forma, a agressão tecidual¹⁹.

Fase 3: Proliferação

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento da lesão, ocorrendo à reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. É dividida em três subfases, a primeira subfase é a reepitelização que faz a migração de queratinócitos das bordas das feridas e dos anexos epiteliais. Os fatores de crescimento são os responsáveis pelo aumento de mitoses. A segunda subfase é a fibroplasia, o fibrinogênio do exsudato inflamatório transforma-se em fibrina, formando assim uma rede onde os fibroblastos depositam-se e se multiplicam, secretando componentes proteicos do tecido cicatricial, ocorrendo assim uma intensa proliferação vascular^{17,18}.

A terceira e última subfase é a angiogênese, extremamente importante na oxigenação e nos nutrientes para a cicatrização. No começo da terceira subfase as células endoteliais migram para a região ferida ocorrendo uma proliferação das células endoteliais¹⁹.

Fase 4: Contração da Ferida

É a movimentação das bordas das feridas. Uma ferida tem contrações mesmo quando tem enxertos, que diminuem em 20% do tamanho da ferida. As feridas de tamanho parcial não têm essa fase de contração¹⁷.

Fase 5: Remodelação/Maturação

Corresponde à última fase da cicatrização. Envolve o colágeno e a matriz sendo a etapa responsável pelo aumento da força e pela diminuição do tamanho da ferida e da cicatriz do eritema. A collagenase e outras proteases que são produzidas pelos macrófagos dão a direção correta as fibras colágenas difusas, com isso, há uma diminuição de todos os elementos celulares inclusive dos fibroblastos e alguns elementos do tecido conjuntivo¹⁸.

A remodelação do colágeno leva à melhoria dos componentes das fibras, reabsorção de água são alguns eventos que permitem o aumento da força da cicatrização. Uma cicatrização considerada normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal e não é volumosa¹⁷.

Além das cinco fases da cicatrização ainda existe um processo chamado de cicatrização por primeira e segunda intenção. O de primeira intenção ocorre por aproximação das bordas e utiliza uma menor quantidade de colágeno e seu tempo de recuperação é menor. Já o de segunda intenção que geralmente é ocasionado por feridas crônicas, o processo de aproximação das bordas é menor, sendo assim um procedimento mais lento e com alto risco de inflamações e infecções²⁰.

Alguns fatores podem prejudicar o processo de cicatrização como uma nutrição inadequada, déficit na oxigenação, infecções, inflamações, necrose, ambiente seco, tamanho da ferida, idade do paciente. Qualquer um desses fatores pode prejudicar a cicatrização, levando a uma cicatrização patológica²⁰.

Para auxiliar o processo de cicatrização foram desenvolvidos os curativos bioativos, ou biocurativos, sendo aqueles que liberam substâncias ativas na cicatrização das feridas crônicas. Os biocurativos produzidos no HB a partir de hemocomponentes (Plasma e Plaquetas) ainda estão em estudo, com uma das

formulações já patenteadas. Além desses destacam-se os curativos a base de alginato e quitosana²¹.

O alginato é um polissacarídeo obtido de algas, sendo assim natural. Os biocurativos a base de alginato contém cálcio e tem mostrado uma eficiência satisfatória no tratamento de áreas de feridas e queimaduras²¹.

O alginato pode ser usado também como um gel, que auxilia no trauma e minimiza a dor, alguns estudos relatam que o uso do gel de alginato proporcionou um conforto maior para o paciente e obteve uma melhora em dez dias, comparado com outros curativos não bioativos²¹.

A quitosana é um biopolímero natural hidrofílico, sendo renovável e derivado da quitina, sendo o polissacarídeo mais abundante na terra. A quitosana é um polissacarídeo que se origina através da desacetilação parcial de quitina, e é extraído de alguns crustáceos como o caranguejo e camarões e estimula a proliferação de células, aceleram o processo de cura, provê uma estrutura para o crescimento celular, fornece proteínas para a cicatrização e fortalece o novo tecido, sendo assim útil na utilização de feridas crônicas e no combate as infecções e inflamações, pois a quitosana atua também como um agente anti-inflamatório²¹.

Outra ação benéfica na cicatrização das feridas crônicas são os fatores de crescimento celular, sendo substâncias biologicamente ativas. Algumas pesquisas em andamento que visam a identificação da ação de alguns agentes como: O fator de crescimento derivados das plaquetas (PGDF), Fator transformador (TFG-beta), Fator de crescimento fibroblástico (FGF), Fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e Fator de crescimento epidérmico (EGF)¹⁹.

1.2 Hormônios Derivados de Plaquetas

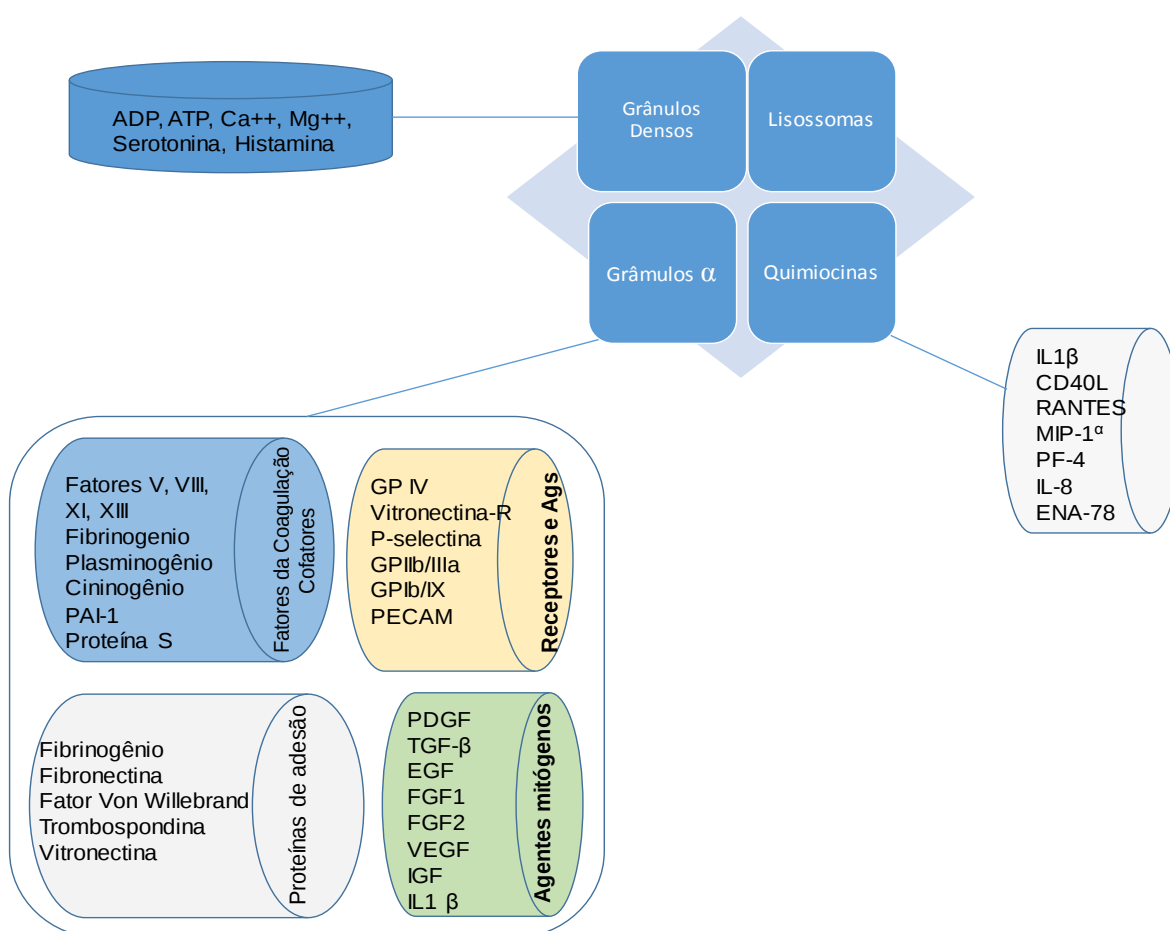
As plaquetas são fragmentos de células anucleadas, que medem aproximadamente 1-3µm apresentando as funções de hemostasia e de angiogênese, respectivamente. Participam do complexo sistema de manutenção da hemostasia, junto com a parede vascular, os fatores de coagulação e o sistema fibrinolítico e também estão presentes nos processos de inflamação e cicatrização das feridas. Em indivíduos normais e adultos as plaquetas tem vida

média de sete dias, são formadas a partir da desfragmentação de uma grande célula na medula óssea, chamada de megacariócito.^{22,23,24}

A trombopoiese é o processo de formação de plaquetas a partir de megacariócitos maduros e sua liberação para a circulação, sendo mediada principalmente pela trombopoietina a qual, sozinha, é a citocina responsável pelas modificações que ocorrem no citoplasma do megacariócito maduro permitindo a liberação de plaquetas na corrente sanguínea²³.

No citosol de cada plaqueta se encontram grânulos, esses grânulos mais densos contem ADP, ATP, serotonina, histamina e cálcio. Já os grânulos α contêm fatores plaquetário como PDGF, VEGF, EGF, TGF- β , fibrinogênio, fibronectina, inibidor I do ativador de plasminogênio (PAI I), fatores V, VIII e fator de von willebrand^{22,23,24}.

Figura 7 – Representação esquemática da ativação e liberação dos Hormônios plaquetários

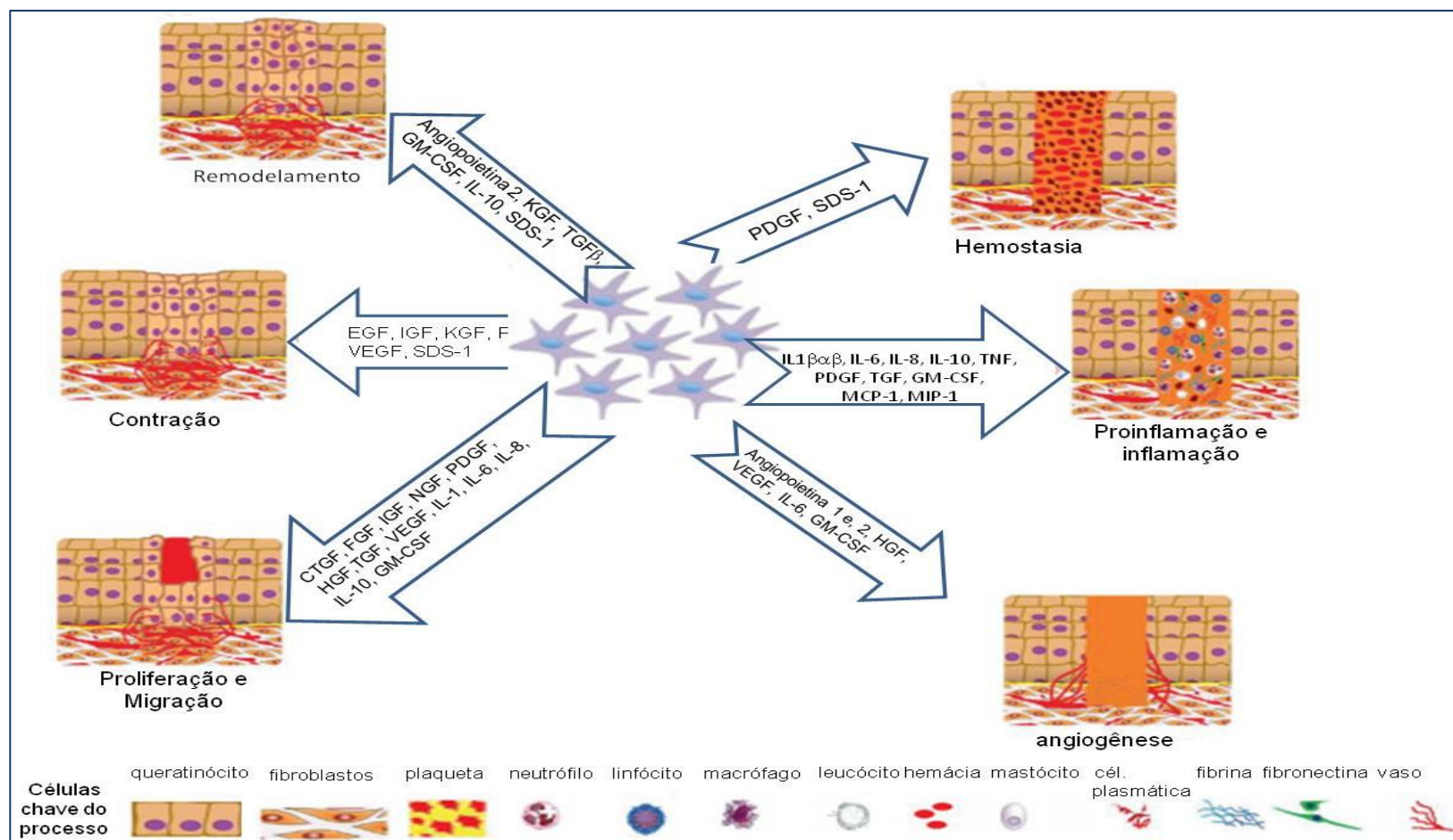


Fonte: Adaptado de Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. Rev. EspCardiol., 2009, 62 (10): 1161-78²³.

A ativação plaquetária estimula a produção de citocinas levando ao processo inflamatório com a ativação dos macrófagos e neutrófilos. Esse processo faz com que fatores de crescimento como o PDGF e o VEGF, FGF, VEGF, EGF atuem ²³.

Para esses ocorrer esse procedimento citado acima, primeiramente ocorre a injúria celular, ou seja, o rompimento do vaso com a perda de sangue, após a injúria as plaquetas serão ativadas para o fechamento do vaso com a ajuda da fibrina, processo chamado de cascata de coagulação. Posteriormente ocorrerá o processo inflamatório com a ativação dos macrófagos e neutrófilos juntamente com os fatores de crescimento PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), que induz e faz com que as células migrem para o local da lesão, processo chamado de Quimiotaxia e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), regulador da angiogênese, promovendo o crescimento dos vasos sanguíneos. Subsequente ocorrerá outros processos como a proliferação dos fibroblastos, granulação, contração da ferida, reepitelização, remodelamento e por último o processo de cicatrização ²⁵.

Figura 8: Plaquetas e seus fatores/hormônios de crescimento e fases de remodelamento.



Fonte: Adaptado de <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/50942.pdf>²⁶. Acesso em 25/11/2017

1.3 Fatores de crescimento:

Os fatores de crescimento têm ampla utilização em diversas áreas estudadas, principalmente no tratamento de lesões e feridas crônicas. A sua eficácia irá depender do número de plaquetas e da concentração dos fatores de crescimento que atuam como transmissores na maioria dos processos de proliferação, diferenciação, quimiotaxia e morfogênese, utilizando os mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos ²⁷.

As plaquetas então secretam alguns fatores de crescimento que são liberados nas áreas lesadas, alguns fatores de crescimento são o PDGF – derivado de plaqueta, EGF – fator de crescimento transformante, EGF – fator de crescimento epidérmico, TGF- α – fator de crescimento transformante α e o VEGF – fator de crescimento endotelial, além de secretar glicoproteínas adesivas como a fibronectina e trombospondina, sendo extremamente importante na matriz celular provisória ^{27,28}.

Os fatores de crescimento também têm um papel importante na ativação da cascata de coagulação, pois juntamente com a ativação das células do parênquima são produzidos numerosos mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos que auxiliam no recrutamento de células inflamatórias como os macrófagos para o local da lesão ²⁸.

Os grânulos α , que estão presentes nas plaquetas são os principais fatores de crescimento que atuam na regeneração do tecido e na cicatrização. Dentre inúmeros fatores de crescimento destacam-se o RANTES, EGF, Angiopoetina-2, FGF-1, FGF-2, VEGF-A, Fator de vonWillebrand, Fibrinogênio, PAI-1, PDGF-AA, seguidos identificados na figura 9:

Figura 9: Fatores de crescimento derivados de plaquetas

Fatores de Crescimento	Definição
RANTES (Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted)	Desempenha o papel de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação. ²¹
EGF (Epidermal Growth Factor)	Induz a formação, proliferação e migração de células endoteliais, como fibroblastos e queratinócitos. ²²
Angiopietina-2	É um regulador da Angiogênese que exerce efeitos sobre as Células Endoteliais. ^{23, 24}
FGF-1 (Fibroblast Growth Factor-1)	Induz a proliferação celular, promove a produção de citocinas para a quimiotaxia de macrófagos e monócitos. ²⁵
FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)	Possui uma atividade angiogênica e mitogênica, são importantes na manutenção das CTM, por serem encontrados na membrana e matriz sub endotelial. ²⁵
VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A)	Regula a Angiogênese, o controle de proliferação, morfogênese, migração e sobrevivência das células endoteliais. Promove o crescimento dos vasos sanguíneos. ²²
PDGF-AA (Platelet-Derived Growth Factor-AA)	Induz a migração celular para o local da lesão – Quimiotaxia. ²²
PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)	É um fator hemostático que funciona como o principal inibidor do ativador de plasminogênio de tecido, inibindo portanto a Fibrinólise. ²⁶
Fibrinogênio	Atua diretamente na ativação da fibrina no local da lesão. ²⁷
Fator Von Willebrand	Atua na ativação plaquetária a fim de aderir-las a parede do vaso, para a formação do tampão plaquetário. ²⁸

Fonte: Fonte: Vanni, IR, 2016²⁵.

1.4 Revisão sobre Citocinas:

CTM relacionam-se com a proliferação de células T e produção de citocinas. Além disto, tem o objetivo de promover a manutenção da homeostasia pela supressão da inflamação permitindo a proliferação células estromais residentes tecidos dependentes, e das células tronco tecido específico estimulando a produção de moléculas da matriz extracelular para a reconstrução dos tecidos e cicatrização de feridas^{29, 30}.

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares e hidrossolúveis, são produzidas por diversos tipos de células em locais lesionados ou por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas. Servem de mediadoras nas reações imunológicas, sendo responsáveis pela comunicação entre leucócitos e entre os leucócitos e outras células³¹.

Células diferentes podem secretar a mesma citocina podendo agir em células variadas, este método é denominado de pleiotropia. Ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas, com frequência as citocinas são formadas em cascatas, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas. Essa substância se ligam a receptores específicos ativando mensageiros intercelulares que regulam a transcrição gênica. Com isso a citocina ativada influencia na diferenciação e na sobrevivência da célula imunológica³¹.

A maioria das citocinas cuja estrutura molecular está definida é chamada de interleucina, o que significa que essas moléculas são produzidas pelos leucócitos e atuam nos leucócitos. Existem dois tipos de citocinas as pró-inflamatórias que aumentam a resposta inflamatória, chamada de (Th1) e a anti-inflamatória que atenua a resposta inflamatória, chamada de (Th2).

Dentro das Th1 temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e FNT (fator de necrose tumoral). As Th2 são IL 4, 10, 13 e FTC (fator transformador de crescimento)³¹.

As citocinas são produzidas em pequenas quantidades em resposta a um estímulo externo, se ligando em receptores de alta afinidade nas células alvo. São atuantes principalmente em mecanismos autócrinos (células próprias) e parácrinos (células vizinhas)³².

As citocinas conduzem a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias (Th1) a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Já as citocinas Th2 minimizam alguns desses efeitos indesejáveis como a insuficiência de múltiplos órgãos ou até a morte^{31,32}.

Na imunidade inata as citocinas mais conhecidas são as células dendríticas e macrófagos ativados que reconhecem os microrganismos. Algumas moléculas virais, como o RNA de filamento duplo aos TLRs das células dendríticas e dos macrófagos são um estímulo para que essas células produzam citocinas. Essas citocinas desempenham diversas funções na defesa do organismo humano, como o TNF, IL1 e as quimiocinas são as principais citocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos e monócitos do sangue para os locais de infecção³².

II - Justificativa

A linha de curativos biológicos vem sendo desenvolvida há 15 anos no Laboratório de Engenharia Celular. Três produtos encontram-se bem formulados com estudos de fase clínica I realizados. Os resultados com o uso destes biocurativos tem sido excelente, no entanto observa-se que quanto mais antiga é a lesão, maior é também a dificuldade no fechamento da área, e o risco de infecção secundária aumenta. Diante disto, encontrou-se uma oportunidade de melhoria do produto com os avanços no cultivo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Esta técnica propicia a obtenção de diferentes fatores de crescimento que modulam o fechamento de feridas. Na literatura, o meio de cultura na qual as CTM foram cultivadas recebe a denominação de meio condicionado.

O meio de cultura destas células, como unidades produtoras de fatores de crescimento sofrerá a modificação de receber como substituto do soro fetal bovino, hormônios derivados de plaquetas humanas para que não ocorra a exposição do paciente, na etapa de estudo de fase clínica à exposição de proteínas animais.

III – Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Obter fatores de crescimento em meio condicionado de CTM de tecido adiposo para implementação dos biocurativos.

3.2. Objetivos Específicos:

1. Expandir Célula Tronco Mesenquimal humana (CTM_h) derivadas de tecido adiposo para a obtenção de fatores de crescimento e obtenção o meio condicionado em condições padrão (MC_p) e customizado com HDP (MC_{hdp}).
2. Obter e dosar citocinas do meio condicionado MC_p e MC_{hdp}, em diferentes tempos: D+48h, D+72h e D+ 7 dias
3. Quantificar fatores de crescimento sérico em grupo de pacientes portadores de feridas crônicas, abertas há mais de 3 anos, pelo método Luminex.

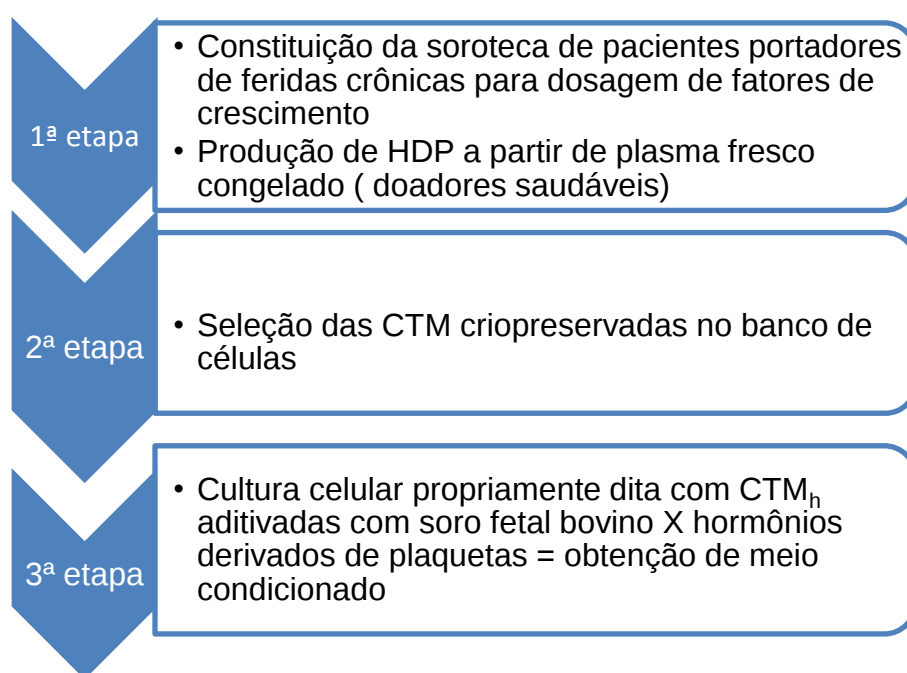
IV – Material e Métodos

4.1 Aspectos Éticos e Legais

Este projeto foi desenvolvido no laboratório de engenharia celular (LEC), associado ao programa de Pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu. O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos cadastrado na Plataforma Brasil, tendo recebido CAAE: 68225717.8.0000.5411

Para o melhor entendimento, o design do trabalho envolveu etapas distintas:

Figura 10 – Diferentes etapas do projeto



Fonte: arquivo pessoal, 2018

4.2- Constituição da soroteca de pacientes portadores de feridas crônicas para dosagem de fatores de crescimento

Esta etapa do trabalho envolveu a co-participação de outro projeto de mestrado, de Isabele Rosa Vanni, realizado em 2017. Foram selecionados 20 pacientes portadores de feridas crônicas, em atendimento no ambulatório de Biocurativo, oriundos das disciplinas de Cirurgia Vascular, Dermatologia, Cirurgia Plástica e Clínica Médica. Após a assinatura do TCLE para participação em pesquisa foi coletado 10 ml de sangue periférico, na ausência de anticoagulante, para desta forma se obter o soro e 1 frasco contendo anticoagulante EDTA para a realização da plaquetometria (n= 20).

As amostras foram processadas no equipamento HORIBA Pentra 60 para a realização da plaquetometria. As amostras que não continha anticoagulante foram colocadas 30 min em banho-maria 37°C para promover a retração do coágulo, centrifugadas e obtido o soro que foi aliquotado em tubos *eppendorfe* congelados a -80°C até a realização do experimento de dosagem.

Os critérios de inclusão para esta etapa era ser maior de 18 anos, de ambos os sexos, portador de feridas crônica há mais de 3 anos aberta independentemente dos tratamentos realizados.

Como critério de exclusão foi listado: ser menor de 18 anos, portador de neoplasia, com ferida infectada e em uso de antibiótico ou estar em tratamento de outra doença sistêmica com uso de quimioterapia ou antibiótico terapia.

Os fatores de crescimento monitorados foram: EGF, FGF1, FGF2, antiangiopoietina2, VEGF-AA, PDGF-AA, RANTES, PAI-1 e Fator Von Willebrand. Foi adquirido kit Multiplex/Luminex Merck®, constituído por microplacas composta com inúmeras *beads* de diferentes tamanhos e fluorescência diferente com anticorpos específicos como marcadores. Trata-se de unidade de multiplexação compacta que executa até 50 testes diferentes em um único volume de reação (microlitros) e lê uma placa de 96 poços em apenas 60 minutos. A leitura é realizada no equipamento MAGPIX® que possui rotinas de autolimpeza e compatibilidade com contas MagPlex®, tornando o instrumento fácil de manusear. O MAGPIX pode ser acoplado a um laptop com a instalação de software xPONENT® 4.2 for MAGPIX® para a realização das leituras.

Segundo Silveira, I., “A tecnologia Luminex é baseada na impregnação microesferas de poliestireno com uma combinação bem regulamentada de dois corantes fluorescentes para fornecer até 100 tipos de tonalidades diferentes que podem ser identificados por sua intensidade de fluorescência. A detecção pode ser melhorada através da utilização de biotina e a sua elevada afinidade com estreptavidina marcada com ficoeritrina”. O leitor Luminex é basicamente um citômetro de fluxo de duas cores onde as *beads* são adsorvidas da microplaca e aspiradas em pequeno volume de detecção da reação, onde é sondado por um laser vermelho e o resultado do ensaio por um laser verde separado, detectando a diferença de cores (Figura 11).

Figura 11 – Sistema Luminex – Plataforma de monitoramento dos Fatores de Crescimento



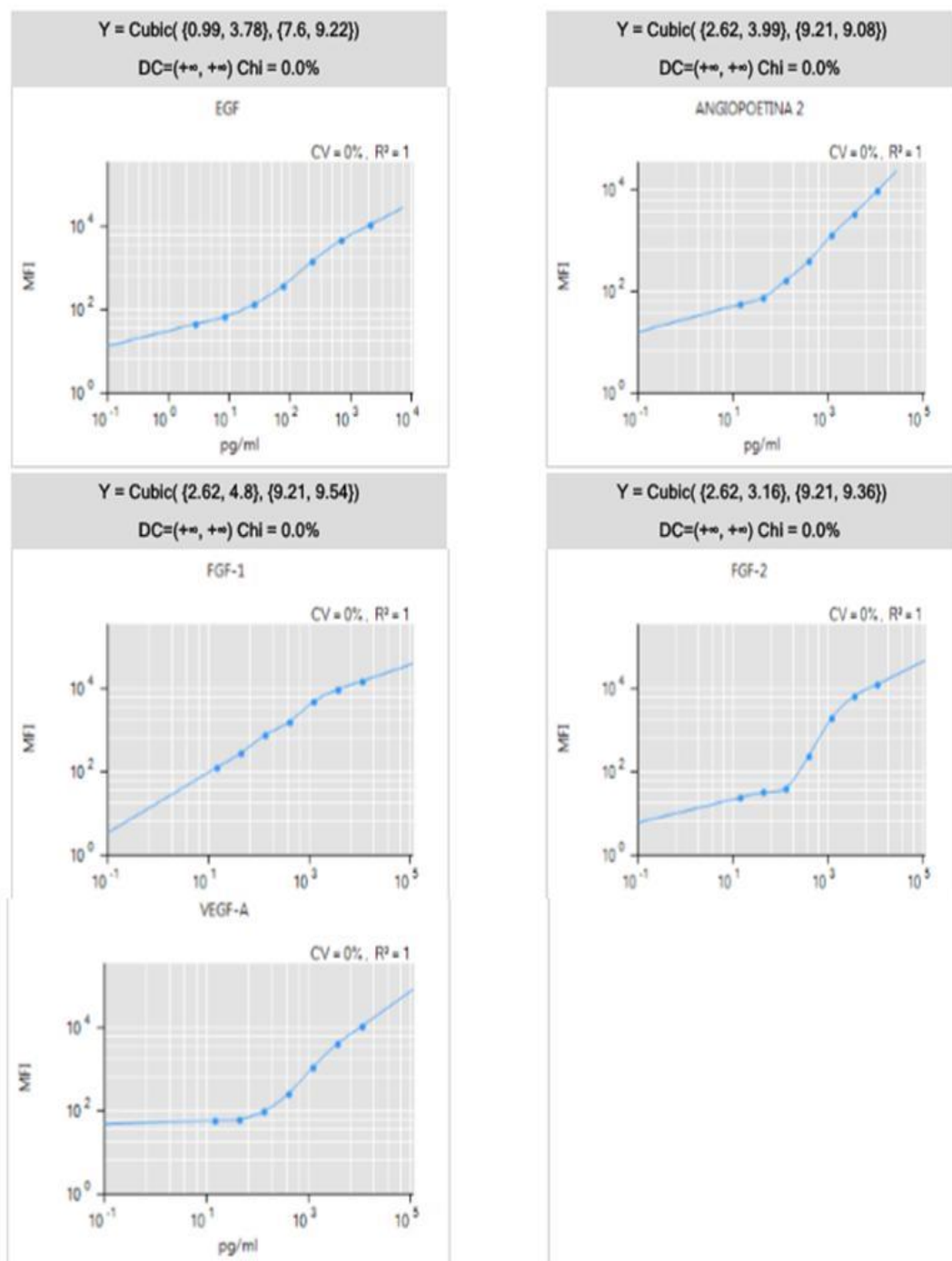
Fonte: Disponível em: <https://www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/protein-detection-quantification/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/>³⁴

Para cada marcador foi realizado a curva padrão e calibração do equipamento. As curvas padrões foram realizadas com 10 amostras de valores conhecidos diluídas ou não, para a validação da efetiva e correta análise da amostra-teste. Afigura abaixo representa a curva padrão dos marcadores: EGF, angiopoetina-2, FGF1 e FGF-2 respectivamente.

Figura 12– Curvas padrão para cada EGF, Angiopoietin-2, FGF1, FGF2 e VEGF-AA no sistema Milliplex/Luminex®



MILLIPLEX Analyst Detail Report



Após a realização de todas as curvas padrão foi realizada a determinação das 20 amostras testes, estabelecendo a planilha com dados de cada paciente, o sexo, a idade e o valor do fator de crescimento encontrado.

4.2.1- Produção do Lisado Plaquetário para Obtenção de Hormônios derivados de Plaquetas Humanas

Da mesma forma foi realizado o *pool* de plasma rico em plaquetas, para a obtenção dos HDP. Este *pool* foi obtido de sangue de doadores saudáveis, e os valores de determinação dos fatores de crescimento foram realizados pelo mesmo método anterior.

Este material foi utilizado de excedente produzido e criopreservado do projeto já encerrado em nome de Isabele Rosa Vani cujo projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética e Pesquisa via cadastramento na Plataforma Brasil, tendo recebido CAAE 45254915.1.0000.5411 e consequente aprovação.

No protocolo desenvolvido por Silveira, I em 2016, foram obtidas amostras de sangue de indivíduos saudáveis (10 doadores de sangue) e processado em Plasma Rico em Plaquetas, Concentrado de Plaquetas e Hormônios derivados de Plaquetas obtidos pela técnica de lisado plaquetário²⁵. A amostra de sangue anticoagulado sofreu 2 centrifugações até a obtenção do concentrado de plaquetas. Este foi ativado com gliconato de cálcio a 10% e adição de epinefrina a 20%. Após a incubação de 1 hora, foi adicionado 1 ml de água destilada e congelado a -80°C. Posteriormente foi descongelado e ultra centrifugado a 80.000g para a eliminação das membranas. O sobrenadante é composto por um conjunto de hormônios derivados de plaquetas. Este é o material que será utilizado para a suplementação do meio de cultura de CTM_h. Será realizado um *pool* das amostras que tiveram melhor desempenho no trabalho de Silveira, I, e após o *pool*, as dosagens de fatores serão realizadas em triplicatas.

Após a definição do *pool* de HDP, o meio de cultura customizado recebeu no lugar do SFB, 20% de HDP. A cultura celular foi conduzida de forma idêntica ao controle.

4.3- Seleção das CTM criopreservadas no banco de células

A primeira etapa correspondeu à seleção das CTM criopreservadas em banco de células no LEC e envolveu trabalho já aprovado pelo CEP de Juliane Campos Inácio, CAAE: 40598215.5.0000.5411 e a aprovação do presente projeto sob código CAAE:68225717.8.0000.5411, ambos na Plataforma Brasil conforme plots da figura 13.

Figura 13 – Comprovantes da aprovação de ambos os projetos pela Plataforma Brasil

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Meio de Cultura condicionado, rico em fatores de crescimento secretado por células tronco mesenquimais, para enriquecimento dos bioativos usados no remodelamento de feridas crônicas.

Pesquisador Responsável: TALITA ISAAC MARTINS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 68225717.8.0000.5411

Submetido em: 08/05/2017

Instituição Proponente: Departamento de Urologia

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção: PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_861171

A

Comitê de Ética FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP

Registrado no Ministério da Saúde em 25 de abril de 1997

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Tecnologia de hibridomas na caracterização fenotípica de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano.

Pesquisador: Juliane de Campos Inácio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40598215.5.0000.5411

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 972.183

Data da Relatoria: 02/03/2015

B

Fonte: arquivo pessoal, 2018

Ambos os projetos estão sob a égide de um projeto “guarda-chuva” financiado pelo Ministério da Saúde/Fundo Nacional de Saúde conveniado com Hospital das Clínicas. Trata-se da proposta SICONV convênio: 034933/2011 cujo objeto é a validação multicêntrica dos hemocomponentes especiais que corresponde à denominação legal (PORTARIA Nº 158, DE 04 DE FEVEREIRO DE 2016 DOU de 05/02/2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37)¹². Observa-se que no artigo 5º encontra-se³³:

Para fins desta Portaria, considera-se:

...

VII – **componentes sanguíneos especiais**: produtos hemoterápicos produzidos a partir de novo processamento de

alguns componentes sanguíneos, como cola de fibrina, gel de plaquetas ou outras manipulações especiais;
VIII – doação autóloga: doação do próprio paciente para seu uso exclusivo;

Quanto aos processos de produção do biocurativo denominado cola de fibrina, esta mesma portaria, no artigo 102 parágrafo 7 prevê:

Art. 102. O CRIO é a fração de plasma insolúvel em frio, obtida a partir do plasma fresco congelado, contendo glicoproteínas de alto peso molecular, principalmente fator VIII, fator de vonWillebrand, fator XIII e fibrinogênio.

§ 7º O crioprecipitado também pode ser utilizado na produção de cola de fibrina³³.

Tendo em vista os relatórios enviados ao Ministério da Saúde (monografias, dissertações e teses desenvolvidas desde 2001 na área de produção e validação de biocurativos, além de se obter, do próprio Ministério da Saúde o financiamento já citado, a legislação vem sendo modulada em função da comprovação da segurança e eficácia dos biocurativos. Nesta mesma portaria válida a partir de agosto de 2016, observa-se a autorização para a produção dos biocurativos com aplicação terapêutica autorizada para uso autólogo, ou seja, coleta-se o plasma, processa-se e produz a cola de fibrina para a formulação utilizada pelo próprio paciente. Vide íntegra do artigo abaixo:

Art. 107. É permitida aos serviços de hemoterapia a produção e utilização de componentes sanguíneos especiais para uso autólogo, como colas de fibrina, gel de plaquetas, entre outros.

No entanto, a legislação ainda é restritiva para uso geral, sem ser o escopo de pesquisa, para o uso alogênico.

Parágrafo único. Não é permitida aos serviços de hemoterapia a produção de componentes sanguíneos especiais para uso alogênico³³.

Tendo identificado um n de cinco amostras cujos doadores puderam ser re-contatados e assinaram o novo TCLE para participação em pesquisa, deu-se início a fase subsequente.

4.4- Cultura celular propriamente dita com CTM_h aditivadas com soro fetal bovino *versus* hormônios derivados de plaquetas = obtenção de meio condicionado

Uma vez identificados os pacientes e em mãos do Termo de Consentimento Livre e esclarecido para Participação em Pesquisa, às células foram descongeladas e colocadas em cultura para a amplificação e coleta do sobrenadante de cultura, aqui denominado de meio condicionado. Foram constituídos 2 grupos de estudo:

1. Meio condicionado controle – MC_c (SFB)
2. Meio condicionada com Hormônio Derivado de Plaquetas - MC_{hdp}

O descongelamento das CTM congeladas (em 4ª e 5ª passagens) foi feito com rápida passagem da ampola de células em banho-maria a 37°C até que o *pellet* se desprenda da ampola, mas sem o descongelamento total da amostra.

A ampola foi levada para ambiente de fluxo laminar e seu conteúdo transferido para frasco cônico de 15 ml, estéril, contendo 15 ml de HEPES (tampão de lavagem em cultura celular). O tubo foi submetido à centrifugação a 1200 rpm durante 10 min. O tampão foi removido por aspiração e o *pellet* ressuspenso em meio de cultura DMEM-F12 aditivado com antibiótico/antimicótico, aminoácidos essenciais e não essenciais, glicose, piruvato de sódio, L-glutamina e 20% de soro fetal. São plaqueadas 10^5 células em frascos T de 25cm².

Estas células receberam a identificação original e foram observadas 3 vezes por semana, por microscopia invertida em contraste de fase para a identificação da confluência celular.

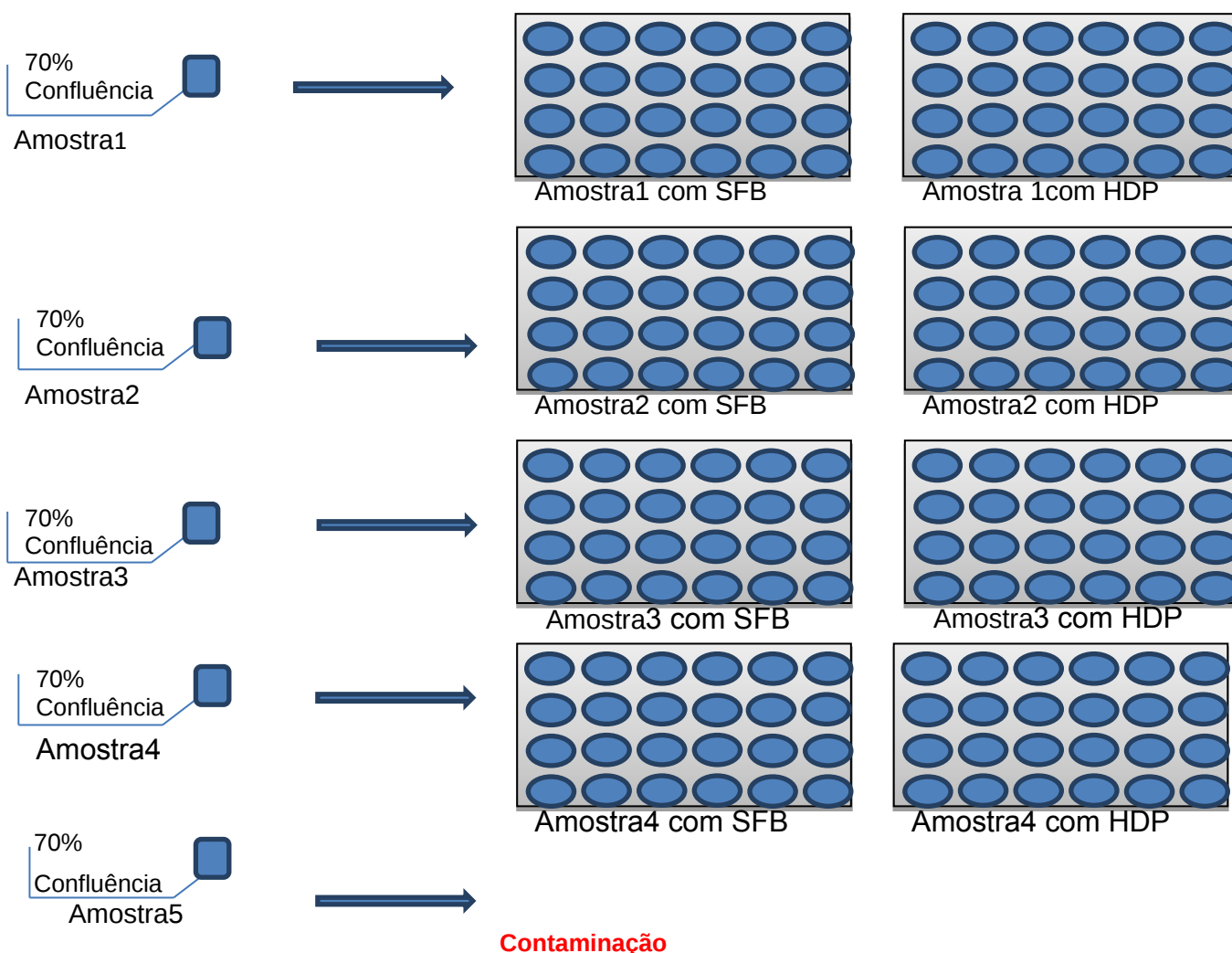
Quando a confluência atingiu 70%, não foi trocado o meio de cultura por 48 horas, para se obter o máximo de fatores de crescimento e citocinas. Após este período, foi feita contagem celular e divisão igualitária das amostras nas placas de 24 poços em triplicata, coletado o sobrenadante em 48h, 72h e 7 dias. No décimo dia foi feito o tratamento enzimático com tripsina-EDTA 0,05% dos poços, para a obtenção das CTM em suspensão e realização da citometria de fluxo. O meio de cultura foi coletado e aliqotado em frascos para criopreservação -80°C. Este

material recebeu a denominação de 1 a 5 em 48h, 72h e 7 dias (MC_c e MC_{hdp}). Esta numeração correspondeu a CTM_h de cada um dos cinco pacientes diferentes. Portanto, no grupo controle teremos: MC_{c1} , MC_{c2} , MC_{c3} , MC_{c4} e MC_{c5} .

Este material corresponde ao denominado grupo controle, com cultivo das células no meio de cultura padronizado internacionalmente como origem animal e com o recrudescimento das doenças priônicas, existem claras limitações para uso deste material como proposta terapêutica. Diante disto, foi padronizada a cultura-controle, aditivada com SFB, como padrão ouro. O meio condicionado coletado no controle foi então denominado de MC_c .

Na cultura experimento o soro feral bovino foi substituído por HDP, na mesma concentração de 20%. O meio condicionado coletado desta etapa foi então denominado de MC_{hdp} .

Figura 14 -Distribuição das cinco amostras de CTM em placas de 24 wells



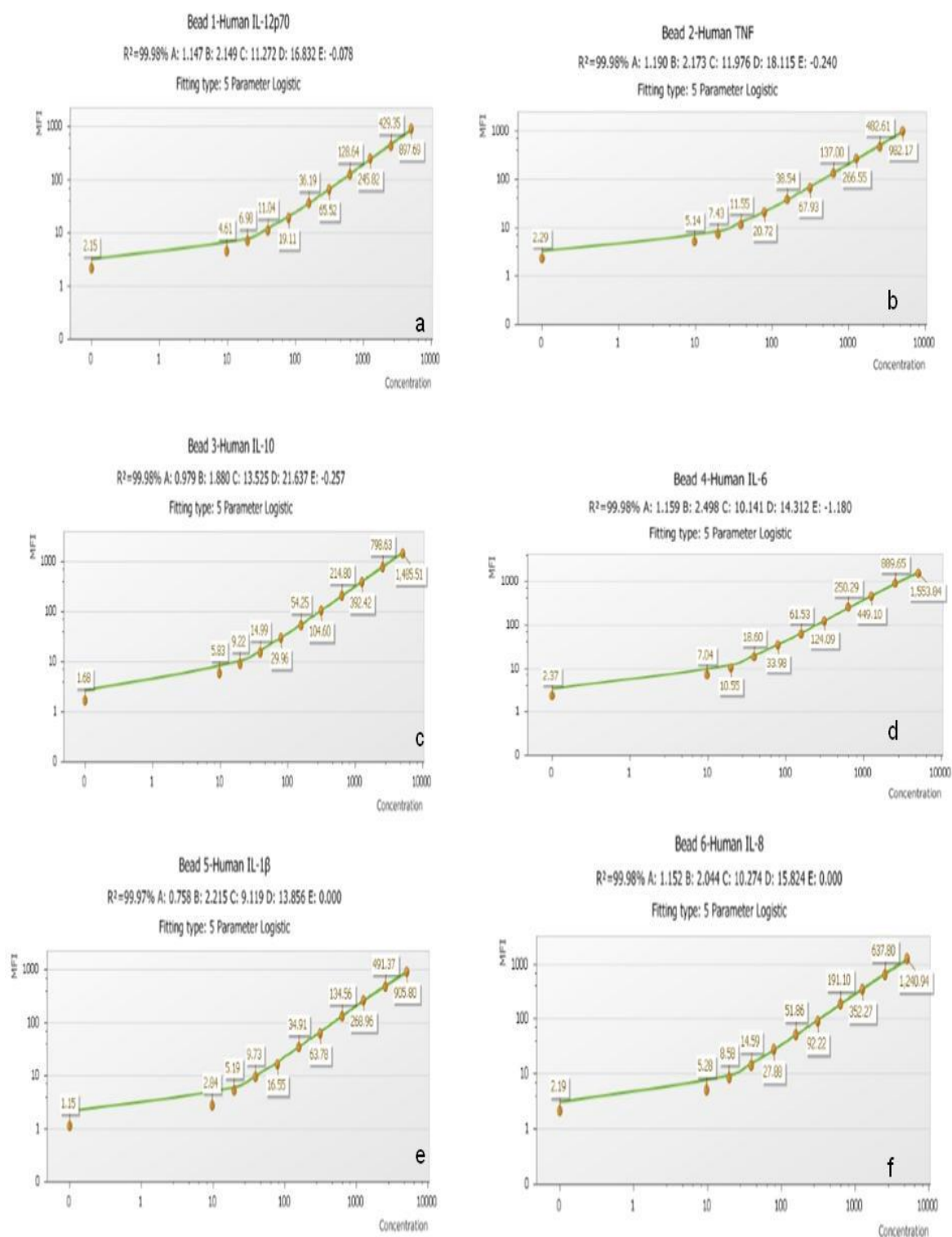
4.5 Determinação de citocinas do Meio Condicionado controle (MC_c) e Meio Condicionado aditivado com HDP (MC_{hdp}) pelo método de Citometria de Fluxo

Foi definido o conjunto de citocinas para a realização da determinação da concentração pelo método de citometria de fluxo. Isto se faz usando o Kit BD® *Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines.*, que mede quantitativamente níveis de interleucina (IL-8), interleucina-1 β , interleucina-6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator tumorigenicidade/necrose (TNF), e interleucina 12p70 (IL-12p70) em amostras individuais³⁵. A vantagem deste método é a dosagem em amostras de sobrenadante de cultura de tecidos, plasma tratado com EDTA(*Ethylenediaminetetraaceticacid*) e soro. No caso, foram utilizados os sobrenadantes de cultura, neste projeto denominado de meio condicionado (MC_c e MC_{hdp}). A leitura foi realizada no citômetro FACs Calibur com software BD CBA .

Trata-se de um método de captura de analitos solúveis através de *beads* de tamanho e fluorescências conhecidas, fornecidas pelo fabricante (BD®). tornando dessa forma passíveis de serem analisados por citometria de fluxo. Cada *bead* de captura específica é conjugada com um anticorpo. Para medir analitos solúveis em um imuno ensaio à base de partículas cada *bead* fornece uma captura de superfície para uma proteína específica e é análogo a um poço revestido individualmente em uma placa de ELISA³⁵.

Na figura 15 são observadas todas as curvas padrão, a exemplo do que foi feito no equipamento MagPix®, com a determinação dos fatores de crescimento. No entanto, aqui, foi a determinação das citocinas, por citometria de fluxo. Observa-se em a curva da IL12-p70, em b TNF α , em c IL-10, em d IL-6; e IL1 β e f IL8.

Figura 15– Curvas padrão das citocinas determinadas por citometria de fluxo



Fonte: arquivo pessoal, 2018.

V- RESULTADO E DISCUSSÃO

A lesão do tecido inicia um complexo processo de reparo, que em algumas situações pode levar à regeneração completa de um tecido. Tanto a regeneração quanto o reparo são orquestrados por uma interação altamente coordenada de diferentes fatores de crescimento e citocinas. Nos últimos anos surgiu uma nova ferramenta terapêutica baseada em uma estratégia biomimética: tecnologia de plasma rico em plaquetas (PRP) com evidências cada vez mais seguras do seu papel no remodelamento tecidual³⁶.

O PRP e hormônios derivados de plaquetas apresentam um suporte para tratamento autólogo e alogênico seguro e econômico para diversas patologias como feridas crônicas, osteoartrite, síndrome do olho seco, entre outras. Essa tecnologia abriu a porta para novas oportunidades de pesquisa e abordagem terapêutica inovadora^{36,37,38,39,40 e 41}.

Desta forma este trabalho se propôs a dosar em situações diferenciadas: fatores de crescimento sérico, em pacientes portadores de feridas crônicas e posteriormente a dosagem de citocinas em meio condicionado.

Na primeira etapa foi constituída a soroteca de pacientes portadores de feridas crônicas e processada a dosagem dos fatores de crescimento (n=40) e a determinação da plaquetometria (n=20), tendo em vista que muitos autores consideram que a quantidade dos hormônios derivados de plaquetas seja numericamente dependente da contagem de plaquetas. Após a realização do hemograma dos 20 pacientes, os dados foram analisados levando-se em consideração sexo e idade. As maiorias dos pacientes tinham idade avançada, sendo uma das características da amostragem de pacientes portadores de feridas crônicas.

Figura 16 - Plaquetometria da amostra de sangue de portadores de feridas segundo sexo e idade

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Contagem de Plaquetas/mm3	
			Pré	CP
1	F	67	184.000	559.000
2	M	69	213.000	382.000
3	M	42	194.000	470.000
4	F	59	133.000	416.000
5	M	50	173.000	533.000
6	F	57	222.000	869.000
7	F	60	200.000	564.000
8	M	41	227.000	1.188.000
9	M	63	123.000	210.000
10	M	65	152.000	310.000
11	F	69	154.000	170.000
12	F	52	166.000	280.000
13	F	59	242.000	376.000
14	M	68	272.000	898.000
15	F	60	299.000	712.000
16	M	54	254.000	476.000
17	F	67	183.000	524.000
18	M	61	204.000	336.000
19	F	47	250.000	474.000
20	F	58	229.000	572.000
Média	11F/9M	58,4	203.700	515.950

Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Após a análise dos casos cuja amostra foi coletada, observou-se que 11 pacientes eram do sexo feminino e 9 pacientes do sexo masculino, com média de idade entre 58,4 anos e contagem plaquetometria de 203.700 pré processamento e 515.950 pós processamento do concentrado de plaquetas (figura 16). De acordo com resultados de Vanni em 2016, não houve relação estatisticamente significativa entre plaquetometria e a dosagem de fatores, no entanto, em seu trabalho original Vanni correlacionou os níveis de fatores de crescimento à idade, fato este não encontrado em pacientes com processo inflamatório crônico²⁵.

O número de pacientes com ferida crônica, em que foram dosados os fatores de crescimento foi de 40. Foram determinados nove fatores de crescimento pela técnica Luminex. O 10º fator seria a dosagem de Fibrinogênio, que foi realizada na dissertação de Isabele Vanni, pelo método cromogênico, pois

a determinação na plataforma Luminex não funcionou. No entanto contingências financeiras impediram a determinação do fibrinogênio nos pacientes portadores de FC. O n variou conforme o hormônio dosado, pois algumas amostras apresentaram o denominado “flag” (erro) para alguns marcadores e foram eliminadas da análise.

Na figura 17 encontram-se os valores da determinação dos fatores de crescimento pelo sistema Luminex/Millipex®. Os valores das linhas (QC1 e QC2) correspondem às amostras de controle de qualidade obrigatórios para as análises. Vanni, 2016, realizou a determinação dos mesmos fatores em Indivíduos saudáveis (n=10) e a média está expressa na figura. Estes valores são diferentes daqueles encontrados nas amostras de pacientes portadores de feridas crônicas e serão apresentados a seguir.

Quanto ao número amostral por fator de crescimento dosado tem-se: EGF, n=35; Angiopoietina-2 n=27; FGF-1 n=30; FGF-2 n=34; VEGF-A n=37; PDGF-AA n=30; RANTES n=30; PAI-1 n=30 e fator Von Willebrand n=31. Como pode ser observado, o VEGF-A foi o fator que determinou menos erros de leitura, sendo válidas 37 respostas das 40 analisadas enquanto que angiopoietina-2 se mostrou como marcador mais sensível dando o maior número de erros de leitura tornando válidas apenas 27 amostras.

Analisando cada um dos fatores, identificamos que para EGF o valor médio encontrado para indivíduos saudáveis (doadores de sangue) foi de 71,6ng/ml e nos portadores de FC, 241ng/ml, ou seja, 3,36 vezes mais. Este fato foi relativamente homogêneo para todos os fatores determinados sendo portanto, sempre maior em portadores de feridas crônicas. A razão entre a dosagem das amostras de pacientes portadores de feridas crônicas e aquele encontrado em indivíduos saudáveis foi diferente para cada um. Para a Angiopoietina-2 a razão foi de 2,48, FGF-1 2,39; FGF-2 8,03; VEGF-A 2,46; PDGF-AA 2,50; RANTES 1,43; PAI-1 4,17 e Fator Von Willebrand 2,30. Destaca-se que os maiores índices foram para FGF-2 e PAI-1 (figura 17) sendo a razão dos valores encontrados em portadores de feridas crônicas/indivíduos saudáveis foi 8 vezes maior para o primeiro marcador e 4 vezes maior para o segundo. Observa-se ainda na figura 17 nos cinco primeiros analitos a unidade se expressa em pg/ml enquanto que para os quatro últimos em ng/ml.

Figura 17: Determinação de Fatores de Crescimento de Hormônios derivados de plaquetas em Pacientes Portadores de Feridas Crônicas em comparação com valores de indivíduos saudáveis.

Analitos Hormônios	EGF pg/ml	ANG.2 pg/ml	FGF-1 pg/ml	FGF-2 pg/ml	VEGF-A pg/ml	PDGF-AA ng/ml	RANTES ng/ml	PAI-1 ng/ml	vWF ng/ml
QC1	100,92	487,46	609,31	462,99	578,73	571,1	224	203,16	4,41
QC2	359,34	1828	2285	1736	2026	525,02	211,84	211,19	24,86
Nº de doadores (Vani, IR, 2016)	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Média	71,685	472,5544	2,623	42,605	332,52	51,451	1885,9	472,55	98,671
Nº FC	35	27	30	34	37	30	30	30	31
Média	241,09	1173,14	6,29	342,09	819,11	129,04	2714,2	1973,26	227,26
Índice FC/D	3,36	2,48	2,39	8,03	2,46	2,50	1,43	4,17	2,30

Fonte: arquivo pessoal, 2018.

Estudos mostram que altos níveis de EGF estão correlacionados com o crescimento e a sobrevivência de progenitores neurais, o que poderia justificar que muitos destes pacientes apresentam lesões extremamente dolorosas⁴². No entanto, outros autores destacam que a ação do EGF é intimamente ligada à presença, e à expressão do receptor (EGFR), e este, diminui com a idade. Diante da constatação que a maioria dos pacientes são de idade mais avançada, é de esperar que este receptor esteja muito diminuído, o que contribuiria com o excesso circulante^{43,44}. Diante deste fato uma das hipóteses é de que esteja ocorrendo a resposta tissular, mas a efetiva ligação do fator de crescimento com seu ligante está impedida, não desencadeando as ações esperadas para o EGF, conhecido por seu papel na promoção da divisão celular e diferenciação celular⁴⁴.

Quanto a angiopoietina-2, corresponde à família das angiopoietinas envolvidas com a germinação, brotamento e ramificação de vasos sanguíneos. Liga-se ao receptor TIE-2, sem necessidade de estímulo e desta forma inibe a angiopoietina-1. Portanto a angiopoietina-2 tem um papel inibidor na regulação da germinação de vasos sanguíneos. Em condições normais envolve-se diretamente com a angiogênese e o processo inflamatório. Trabalhos recentes destacam seu papel na sinalização da via inflamatória⁴⁵. O fato dos pacientes estarem envolvidos em processo inflamatório crônico e não fechamento das lesões e terem a determinação da angiopoietina 2 em média em 1.173,1 pg/ml pode ter como causa, o estímulo inflamatório da Ang-2 associado ao processo de inibição da Ang-1, desta forma, mantém a inflamação, mas não promove a angiogênese.

O sistema de sinalização angiopoietina-TIE é um receptor vascular específico da via tirosino-quinase que é essencial para o desenvolvimento do vaso normal. A Ang-2 tem sua expressão aumentada em condições de hipóxia tissular, como o que ocorre no leito das lesões dos pacientes com feridas crônicas^{46,47}.

Quanto ao FGF-1, a média encontrada em 30 amostras analisadas foi de 6,29 pg/ml, ou seja, 2,39 vezes maior que o valor encontrado por Vanni em indivíduos saudáveis²⁵.

Os fatores de crescimento de fibroblastos, família FGF, possuem 22 membros, todos envolvidos na sinalização celular. O FGF-1 é conhecido como ácido e o FGF2 como básico. São proteínas multifuncionais, envolvidas no processo de diferenciação mesodérmica, indução neural, angiogênese e

remodelamento de feridas. Disfunções na sua produção estão relacionadas a mutações que levam à alteração da organogênese. FGFs estão firmemente ligados ao heparina / heparan sulfato e proteoglicanas, que funcionam para limitar a difusão através da matriz extracelular e servem como cofatores que regulam a especificidade e a afinidade para sinalização do receptor (FGFR). Ao contrário das evidências para o receptor de EGF, não foram encontrados trabalhos na literatura que relacionem declínio ou alteração da quantidade do receptor de FGF (FGFR) com a idade⁴⁸.

Entre os principais fatores de crescimento encontram-se aqueles ligados aos fibroblastos (FGFs), que são constituídos por proteínas de sinalização segregadas que sinalizam os receptores tirosina-quinases e as proteínas não-sinalizadoras intracelulares (iFGFs) que servem como cofatores para canais de sódio. Os FGFs se expressão em todas as células e controlam a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência de diferentes tipos de células. Além disso, os FGFs influenciam a expressão de outros fatores envolvidos na resposta regenerativa. Obter uma melhor compreensão destas atividades do FGF é importante para a modulação apropriada da sinalização do FGF após lesão para evitar cicatrizes anômalas e promover a regeneração de órgãos em humanos⁴⁹.

A subfamília FGF1 compreende tanto o FGF1 como o FGF2. Estes fatores deixam peptídeo sinal clássico que são rapidamente secretados pelas células por translocação através da membrana. Este mecanismo envolve o complexo de chaperona e proteínas ligadas ao cálcio S100A13. Os mecanismos pelos quais os FGFs transitam pela célula não são completamente elucidados, mas são ativadoras dos receptores das proteína-quinases (FGFR) com heparan sulfato e a proteína de choque HSP 90. O FGF1 também se localiza no núcleo e regula o ciclo celular, a diferenciação, sobrevivência e apoptose das células. Níveis elevados de FGF2 tem sido relacionado a muitas neoplasias como de bexiga, próstata, câncer pulmonar de pequenas células (*oat cells*), melanoma, entre outros⁴⁹. Em geral, os FGF segregados funcionam como fatores autócrinos ou parácrinos (FGFs canônicos, também chamados FGFs parácrinos), no entanto, três membros destes FGFs evoluíram para funcionar como fatores endócrinos (FGF15, 19, 21 e 23) com papel essencial no adulto onde eles regulam o fígado, o metabolismo de ácidos biliares, carboidratos e lipídios, além de controlar a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular⁴⁹.

A dosagem do FGF-2 foi 8 vezes maior que aquela do grupo controle. O FGF-2 é conhecido como fator de crescimento multifuncional expresso em embriões e células adultas. Foi inicialmente descoberto na hipófise e cérebros bovinos. Sabe-se, que os membros desta família FGF se vinculam a heparina e possuem amplas atividades mitogênicas e angiogênicas. Esta proteína foi implicada em diversos processos biológicos, como desenvolvimento de membros e do sistema nervoso, cicatrização de feridas e crescimento tumoral.

Principalmente a fração citosólica da proteína é responsável pelos efeitos paracrinos e autocrinos deste FGF. O efeito pró-apoptótico da *over expression* de FGF-2 evidencia a quimiossensibilidade de células MCF-7 (linhagem de câncer de mama). Esses dados demonstram que a expressão de FGF-2 determina *downregulation* da Bcl-2 e promove morte celular programada em células de câncer de mama humano MCF-7^{50, 51, 52}.

A elevação do nível de FGF-2 também está associada ao nível de β 2-microglobulina, anemia e aumento de plasmócito neoplásico na medula óssea, relacionando-se com mieloma múltiplo murino. Sendo que a concentração plasmática de FGF-2 pode ser um indicador útil desta atividade da doença (do mieloma múltiplo)⁵³.

Foram revelados mecanismos de secreção não convencional para vários fatores crescimento, incluindo mediadores proangiogênicos, como fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), citocinas inflamatórias e interleucina 1 α e 1 β ^{54, 55}.

Diversos mecanismos foram propostos para explicar estes processos secretores não convencionais, incluindo secreção lisossômica, rompimento da membrana plasmática, liberação em exosomas, secreção através de transportadores que se localizam membrana plasmática e múltiplos mecanismos foram propostos para indivíduos de altas concentrações não convencionais^{55,56}. Os principais aspectos deste modelo são: (1) translocação direta de FGF-2 do citoplasma através da membrana plasmática na ausência de vesículas de transporte; (2) a independência da translocação da membrana da hidrólise de ATP ou potencial de membrana; (3) processo de translocação da membrana controlada por difusão; e (4) uma “armadilha” molecular extracelular formada por heparan sulfatos que garantem o transporte direcional do FGF-2 no espaço

extracelular⁵⁷. O resultado encontrado nos pacientes portadores de feridas crônicas pode estar relacionado às hipóteses levantadas por estes autores.

Níveis contraditórios de FGF-2 (muito mais baixo) foram encontrados por Larsson et al, 2002 em doadores de sangue, mas ao analisar o trabalho identificamos tecnologias muito diferentes⁵⁸.

Trabalho publicado por Liu, X, em 2014 mostra níveis elevados de FGF-2 em pacientes portadores de doença bipolar evidenciando o papel do fator na neuro plasticidade e fisiopatologia da doença⁵⁹.

Uma das limitações deste trabalho é a correlação existente entre os FGF 1 e 2 e diabetes mellitus⁶⁰. Entre as amostras, 27 delas (27 em 34) eram de pacientes portadores de feridas crônicas tendo como co-morbidade, diabetes mellitus. Destaca-se que entre os demais, o valor médio da concentração não foi expressivamente menor, outras correlações da literatura ligam estes fatores a processos neoplásicos⁶¹.

Desta forma, os elevados índices de FGF-2 encontrados deve estar exercendo uma resposta negativa na proliferação dos queratinócitos induzindo-os a apoptose exagerada. Esta hipótese pode conter um elemento chave em propostas terapêuticas inovadoras, entre elas, inibir a secreção do FGF-2.

De forma surpreendente, a determinação de VEGF-AA e PDGF-AA está aumentada nos pacientes portadores de feridas crônicas. As feridas crônicas têm sido apontadas na literatura como candidatas à terapia com fatores de crescimento pela hipótese de que o estímulo dos componentes faltantes ou disfuncionais levam ao remodelamento das mesmas. Os fatores de crescimento angiogênico podem promover o fechamento de feridas crônicas que exibem hipoxia e comprometimento da vascularização⁶². O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um desses candidatos. Funciona como um mitogênio da célula endotelial⁶³, agente quimiotático⁶⁴ e indutor da permeabilidade vascular⁶⁵. Outros fatores de crescimento angiogênicos, como o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), que já foi discutido e o fator de crescimento transformador β (TGF- β) foram descritos, mas o VEGF é único por seus efeitos em múltiplos componentes da cascata de cicatrização de feridas, incluindo angiogênese e epitelização e deposição de colágeno⁶⁶.

Um dos mecanismos contributivos para o não fechamento pode ser a inibição da proliferação de fibroblastos e a indução de um fenótipo de

senescência prematura induzida pelo estresse celular continuado determinado pela inflamação encontrada em feridas crônicas. Os fibroblastos senescentes exibem um fenótipo degradativo de matriz extracelular que contribui para a cronicidade da ferida⁶⁷. A acumulação de mais de 15% de fibroblastos senescentes foi descrita como um limiar além do qual as feridas tornam-se difíceis de curar. A proporção de células senescentes/não senescentes é, portanto, crítica para a determinação da resposta ao tratamento. As terapias coadjuvantes que modulam essa proporção em favor de células não senescentes aumentando as taxas de cicatrização. Uma série de substituições cutâneas modificadas por tecido que contenha fibroblastos não senescentes liberaram fatores de crescimento e reverteram a atividade antiproliferativa do exsudato crônico da ferida. O reconhecimento do papel da senescência fibroblástica na cronicidade da ferida pode permitir a identificação das feridas que responderão positivamente a esses produtos⁶⁶.

O fibroblasto dérmico é um tipo de célula primária responsável pela síntese e remodelação da matriz extracelular na pele humana. Colágeno tipo I e hialuronatos (glicosaminoglicanas) são componentes principais que têm papéis na fibrose da pele, cicatrização de feridas, tecido remodelação, bem como envelhecimento da pele. Vários estudos relataram citocinas dependentes mudanças na expressão do colágeno ou na produção de hialuronatos. Resultados evidenciam que o PDGF) -AA, PDGF-BB, EGF, TGF -b1, MCP-1, IP-10, IL -1a, IL-1b, e a IL-15 são eficazes tanto na produção do colágeno tipo I como na produção de glicosaminoglicanas enquanto que a RANTES induziu a produção do colágeno I⁶⁸.

A fibrose é conhecida como uma condição patológica freqüente e irreversível que está associada à falência de órgãos. A fibrose tecidual é um processo central em uma variedade de doenças progressivas crônicas, como diabetes, hipertensão e inflamação persistente. Este estado poderia contribuir para lesões crônicas^{66,67,68}.

Os distúrbios fibróticos representam cicatrização anormal de feridas com rotação defeituosa da matriz e folga que conduzem a acumulação excessiva de componentes da matriz extracelular. Uma variedade de fatores de crescimento identificados, citoquinas e miofibroblastos ativados persistentemente têm papéis críticos na patogênese da fibrose. O TGFβ é o principal fator implicado na

resposta fibrótica, que por questões de ordem financeira não foi possível dosar neste trabalho. No entanto, outro fator tem sido citado como crucial na via jusante: o inibidor do ativador do plasminogênio-1, o PAI-1⁶⁹.

Este foi o fator que teve a maior razão entre a determinação sérica em pacientes portadores de feridas crônicas e doadores de sangue representando indivíduos saudáveis (oito vezes maior em pacientes portadores de FC).

A super expressão do PAI-1 reduz a degradação da matriz extracelular através da interferência do sistema de ativação do plasminogênio⁶⁹. De fato, os níveis elevados de PAI-1 inibem a atividade proteolítica do ativador do plasminogênio tecidual e do ativador do plasminogênio da uroquinase, o que poderia contribuir para uma variedade de elementos inflamatórios no local da lesão e na deposição excessiva da matriz formando membranas espessas com necessidade de desbridamento cirúrgico.

Resumidamente podemos afirmar que o PAI-1 é sintetizado em vários tipos de células, incluindo células endoteliais, miócitos cardíacos, megacariócitos, fibroblastos, macrófagos, hepatócitos, miócitos cardíacos, adipócitos, plaquetas e células mesoteliais. PAI-1 é um inibidor da serina-protease (serpin) que funciona como o principal inibidor do ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e uroquinase (uPA), portanto, da fibrinólise (a quebra fisiológica dos coágulos sanguíneos). Pertence à família das serpinas proteases e armazenado de forma expressiva nas plaquetas relacionando-se com os riscos de trombose e aterosclerose.

O aumento de PAI-1 tem sido descrito em síndromes metabólicas, obesidade, câncer e trombose^{70,71,72,73}. Tendo em vista que estas condições estão frequentemente listadas como co-morbidades nos pacientes portadores de feridas crônicas, isto pode justificar os altos índices identificados.

Hohensinner, PJ e colaboradores sugerem que a ativação dos macrófagos afeta diferencialmente a atividade proteolítica dos mesmos. Esta ativação, conduz a uma maior atividade proteolítica principalmente através de proteínas ligadas à membrana incluindo MMP-14 e uPAR / uPA localizadas em filopodias (projeções citoplasmáticas que promovem os *cross-linking* entre as células, ricas em actina). Em contraste, a atividade proteolítica em macrófagos polarizados é controlada pelo aumento da expressão de PAI-1. Além disso, os macrófagos ativados retêm a capacidade de aumentar o PAI-1 e, assim, inibem a atividade proteolítica

dependente da uPA também em uma configuração pró-inflamatória através de mudanças na estrutura do promotor PAI-1.

Os resultados encontrados no presente trabalho com a dosagem de PAI-1, mostrando a *upregulation* (altos níveis) corroboram aqueles citados por Hohensinner, PJ *et al*, 2017. Os dados destes autores indicam uma regulação complexa e variável da atividade proteolítica em subpopulações de macrófagos⁷³.

O FvW faz um *cross linked* com o fator XIIIa da coagulação participando de forma eficaz da formação do coágulo. A fibrina se liga ao fator XIII regulando a expressão do XIIIa e inibindo a reticulação da fibrina, quando expressa em quantidades maiores. A ligação da fibrina ao FGF-2, ao VEGF e IL-1 ajudam a localizar essas proteínas no local do dano tecidual, de modo a promover as respostas das células endoteliais necessárias para a cicatrização de feridas e reparo dos vasos sanguíneos, qualquer alteração nestas interações comprometem a cicatrização.

Sabe-se que o colágeno III é fundamental para a integridade dos vasos sanguíneos implicado na hemostasia via FvW. O arranjo do colágeno III é quase idêntico ao padrão de distribuição do colágeno I, com domínios de interação celular, fibrillogênese e domínios de clivagem enzimática com várias regiões de ligação intermolecular. Essas semelhanças permitem a formação heterotípica de fibrilas com substituição por colágeno I na cicatrização de feridas. A fibrilação de colágeno III assume uma estrutura de "flexi-rod" com zonas flexíveis intercaladas com domínios parecidos a varas, importantes para tecidos flexíveis e distensíveis como a pele. O colágeno III possui dois principais domínios de hemostasia, com motivos de ligação para o fator de von Willebrand, integrina $\alpha 2\beta 1$ entre outros e existem comprovadamente a relação entre ambos⁷⁴.

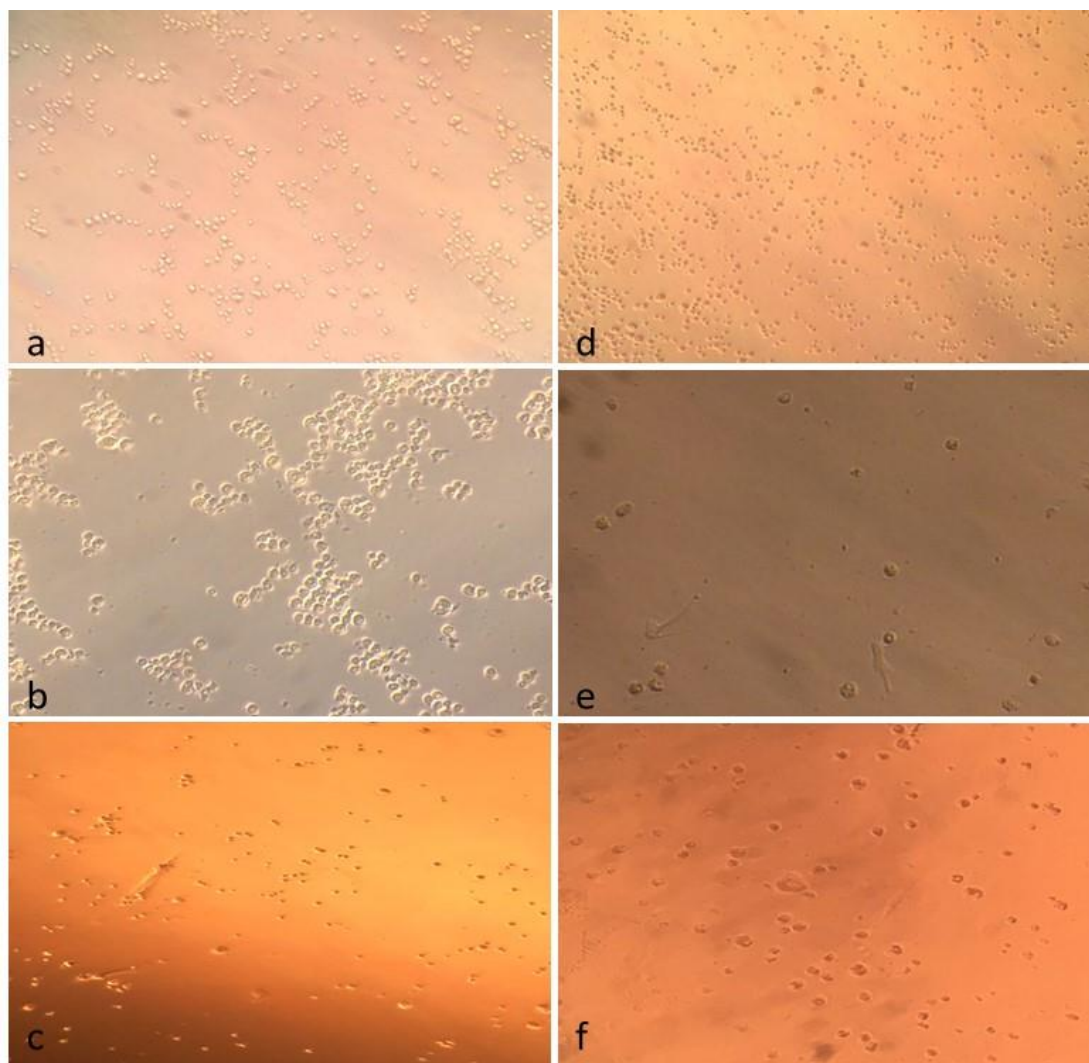
5.1 - Expansão de CTM em dois diferentes meios: SFB e HDP em 48h, 72h e 7dias.

Para a realização da expansão das CTM foram obtidos cinco amostras do banco de célula do laboratório de engenharia celular (LEC), após as amostras serem selecionadas foi feito a expansão em frasco de cultura de 25 cm².

Depois que as amostras atingiram uma confluência de 70% aproximadamente foram divididas nos frascos, todos em triplicata e contendo em cada placa o meio específico, a primeira placa obtinha o meio de Soro Fetal Bovino (SFB) e a segunda placa obtinha o meio de Hormônio Derivado de Plaquetas (HDP). Após a identificação correta das placas de cultura as amostras foram observadas em 48h, 72h e 7dias para análise da confluência em seus respectivos meios e também foi coletado o sobrenadante para a análise das citocinas das CTM_h nos determinados meios. Não houve diferenças expressivas em 48 h de observação tanto para as CTM_h controle, na presença de soro fetal quanto aquelas na presença de HDP, a não ser por um evidente aumento da concentração, observado visualmente, tendo em vista que não foi prevista a contagem celular neste momento (figura 18 a e c).

Na figura 18 pode-se observar nas gravuras identificadas como a, b e c, o desempenho das CTM_h na presença de SFB nos tempos de 48h, 72h e 7 dias respectivamente. Em d, e , e f o mesmo aspecto das células na presença de HDP.

Figura 18 – Aspecto da cultura da amostra 1 de CTM_h na presença de SFB (a,b e c) e HDP (d,e,f) em três diferentes momentos: 48h, 72h e 7 dias respectivamente



Legenda: a, b e c = cultura de CTM_h, amostra 1, na presença de SFB em 48h (a), 72 h(b) e 7 dias (c). Em d,e, e f a mesma disposição para CTM_h na presença de HDP.

Após 72h de cultura observou-se que a amostra 1 com SFB não teve confluência nem aderência, já a amostra 1 com HDP obteve uma pequena aderência e confluência pouco significativa.

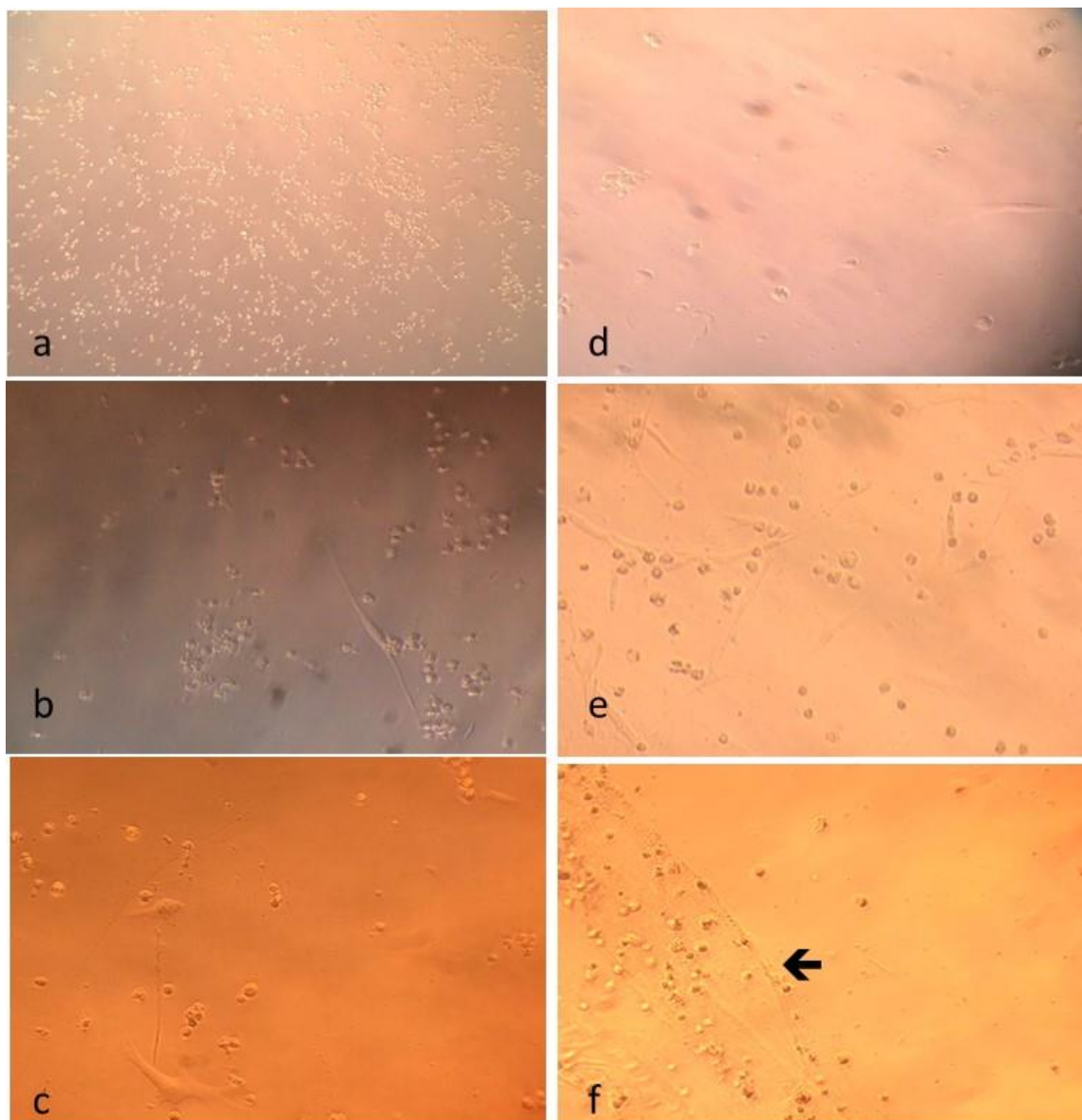
Após sete dias, observou-se que tanto no meio com SFB quanto no meio com HDP a amostra 1 não teve desempenho adequado. Notou-se uma confluência e aderência em ambos os meios, porém essa confluência não foi significativa.

Na amostra 2 após 48h, foi observado uma confluência e aderência no meio com HDP, em contrapartida no meio contendo SFB não houve aderência nem confluência.

Após 72 horas foi observado que tanto para o meio com SFB, quanto para o de HDP houve confluência e aderência. Porém notou-se que no meio contendo HDP a quantidade de aderência das células foi maior e mais significativa quando comparado com o meio contendo SFB.

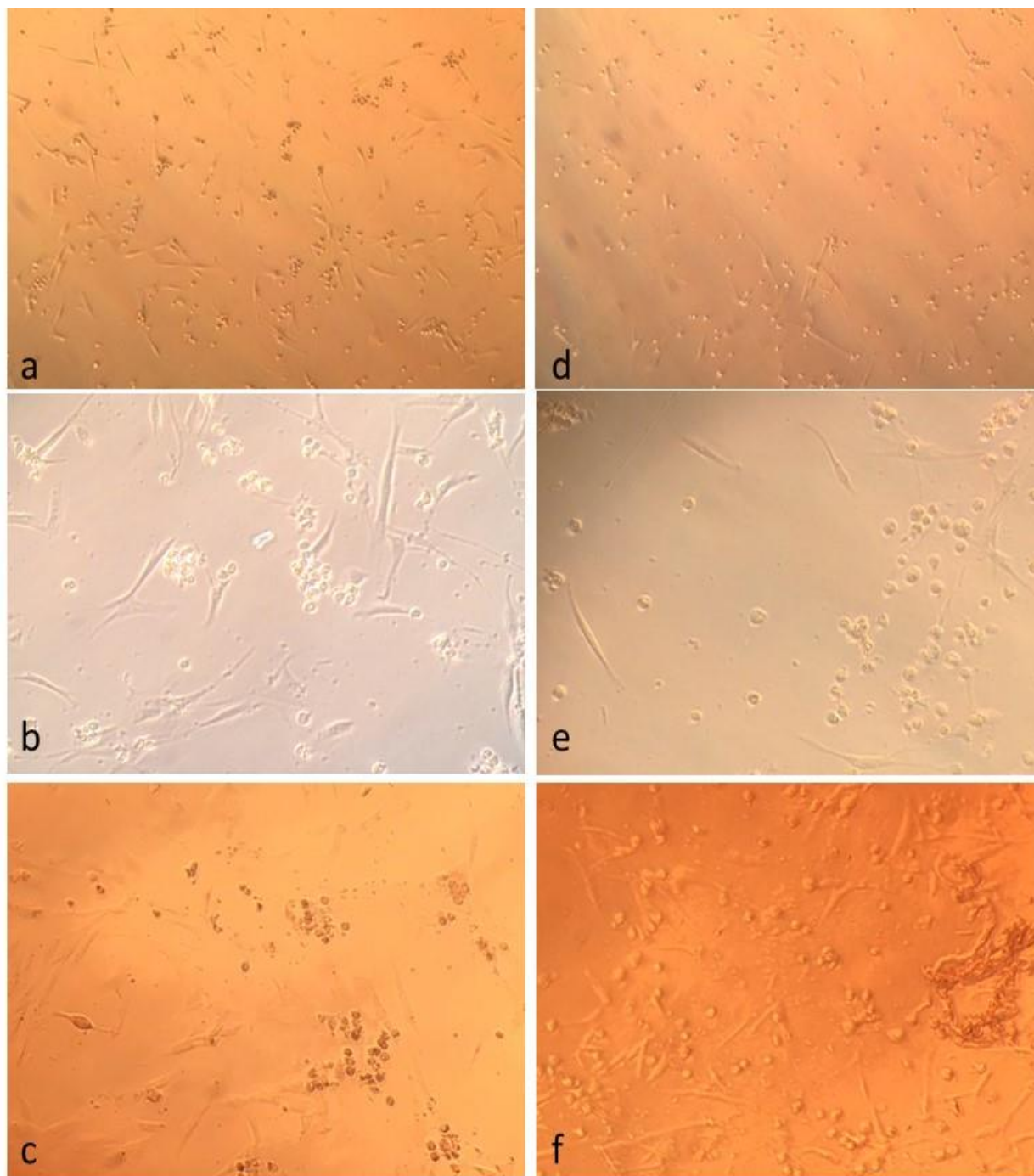
Após 7 dias de plaqueamento, observou-se que havia confluência e aderência em ambos os meios, ainda com uma quantidade maior em HDP do que em SFB. Porém notou-se que no sétimo dia começou a formar uma malha de fibrina no meio que continha HDP, as células que ali se encontravam começaram a aderir nessa malha de fibrina e também no plástico, mas a quantidade de aderência foi significativamente maior na malha de fibrina (figura 19).

Figura 19 – Aspecto da cultura da amostra 2 de CTM_h na presença de SFB (a,b e c) e HDP (d,e,f) em três diferentes momentos: 48h, 72h e 7 dias respectivamente



Legenda: a,b e c = cultura de CTM_h, amostra 2, na presença de SFB em 48h (a), 72 h(b) e 7 dias (c). Em d,e,f a mesma disposição para CTM_h na presença de HDP.

Figura 20 – Aspecto da cultura da amostra 3 de CTM_h na presença de SFB (a,b e c) e HDP (d,e,f) em três diferentes momentos: 48h, 72h e 7 dias respectivamente

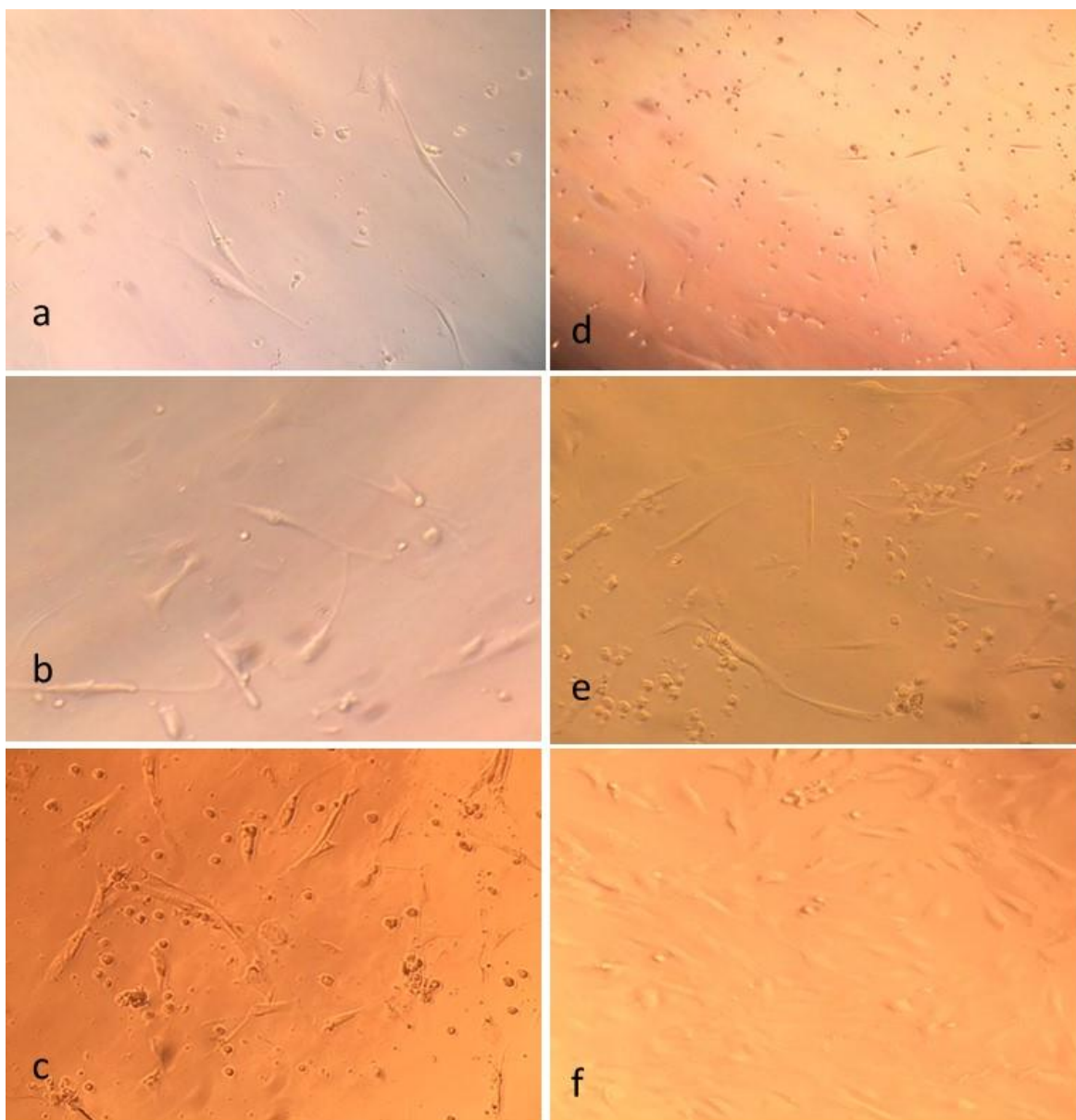


Legenda: a,b e c = cultura de CTM_h, amostra 3, na presença de SFB em 48h (a), 72 h(b) e 7 dias (c). Em d,e,f a mesma disposição para CTM_h na presença de HDP.

Na amostra 3, tanto com SFB e com HDP observou-se uma aderência e uma confluência semelhantes. As CTM_h tiveram um melhor desempenho nessa amostra do que nas amostras anteriores, pois em 48h não havia observado uma confluência significativa até então. Em 72 horas observou-se que as CTM_h estavam bem características. Nesta amostra a aderência em SFB era um pouco melhor que em HDP, porém observou-se também um ótimo desenvolvimento das células em meio com HDP. Com sete dias de cultura esta amostra, após o plaqueamento, mostrou uma excelente confluência e aderência tanto para o meio contendo SFB, quando para o meio contendo HDP. Foi observado que no meio de HDP obtinha mais células comparado com a mesma amostra em 72h, porém essas células se encontravam depositadas na malha de fibrina (figura 20).

A amostra 4 mostrou resultados semelhantes com a amostra 3, com confluência e aderência superponíveis nas primeiras 48h após o plaqueamento. A comparação entre os dois meios foi parecida, pois não foi observado diferença significativa na aderência celular. Já após 72 horas foi observado uma melhor confluência da amostra 4 no meio de HDP do que comparado com o meio com SFB, observou-se também que após 72h a malha de fibrina já começava a se formar nesse meio e as células começavam a aderir na malha. Sete dias após o plaqueamento a amostra 4 foi a que mostrou melhores condições em ambos os meios, no meio contendo SFB a confluência era de aproximadamente 70% e no meio com HDP a confluência era de aproximadamente 50%. Foi notada a mesma interferência da malha de fibrina no meio com HDP dificultando a sua aderência na placa. (figura 21).

Figura 21 – Aspecto da cultura da amostra 4 de CTM_h na presença de SFB (a,b e c) e HDP (d,e,f) em três diferentes momentos: 48h, 72h e 7 dias respectivamente

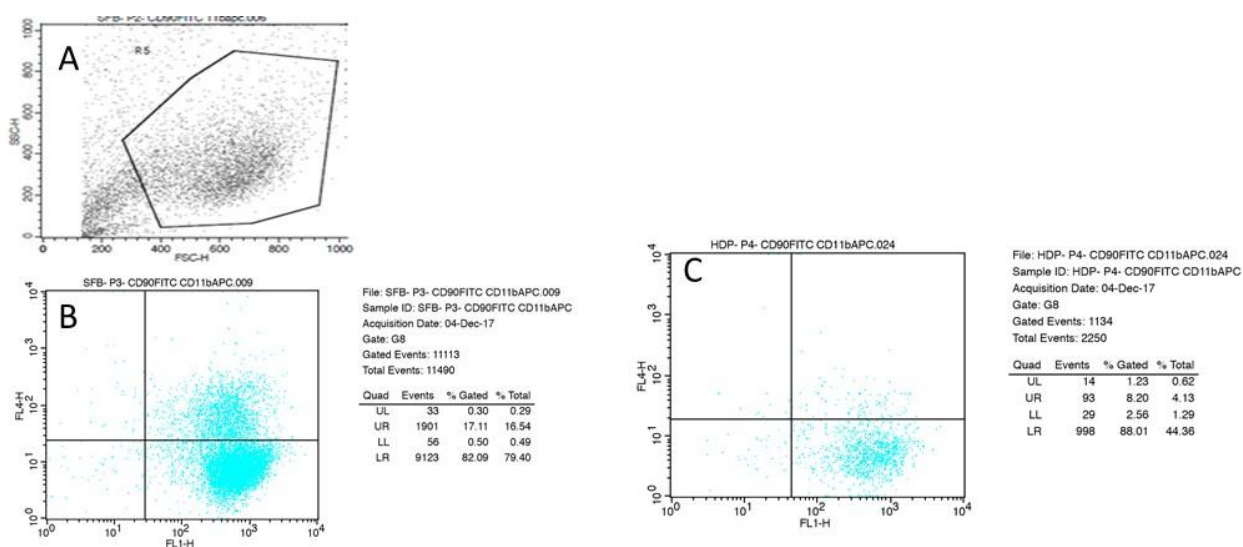


Legenda: a,b e c = cultura de CTM_h, amostra 4, na presença de SFB em 48h (a), 72 h(b) e 7 dias (c). Em d,e,f a mesma disposição para CTM_h na presença de HDP.

5.2- Resultado quanto à Citometria de Fluxo:

A citometria de fluxo é uma tecnologia que permite estudar várias características de uma célula de forma rápida e por vários parâmetros. Objetiva a caracterização imunofenotípica das células e a manutenção ou implementação dos marcadores específicos (CD90). Identificou-se maior dificuldade técnica para a quantificação fenotípica das células quando na presença de HDP pela formação de macroagregados, no entanto, nenhuma modificação do fenótipo esperado foi identificado.

Figura 22 – Aspecto representativo da citometria de fluxo



Legenda: A = gráfico de dispersão das CTM_h = *gating*; B= determinação do marcador CD90-APC com CTM_h cultivada em SFB e C = determinação do marcador CD90-APC com CTM_h cultivada em HDP.

O número médio de eventos nas amostras de CTM_h cultivadas com SFB foi de 12.000 a 15.000 eventos enquanto que para as CTM_h cultivadas em HDP foi de 2.000 a 3.000 pela existência dos macroagregados que não se dissolveram. Este fato aconteceu em função da alta concentração de cálcio no meio de cultura que é um quelante do CPD-A1, anticoagulante existente nas amostras de HDP. A

positividade para CD90 manteve-se em todas as amostras superior a 96% de acordo com o determinado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular^{10,11}.

5.3- Resultado quanto à Citocinas:

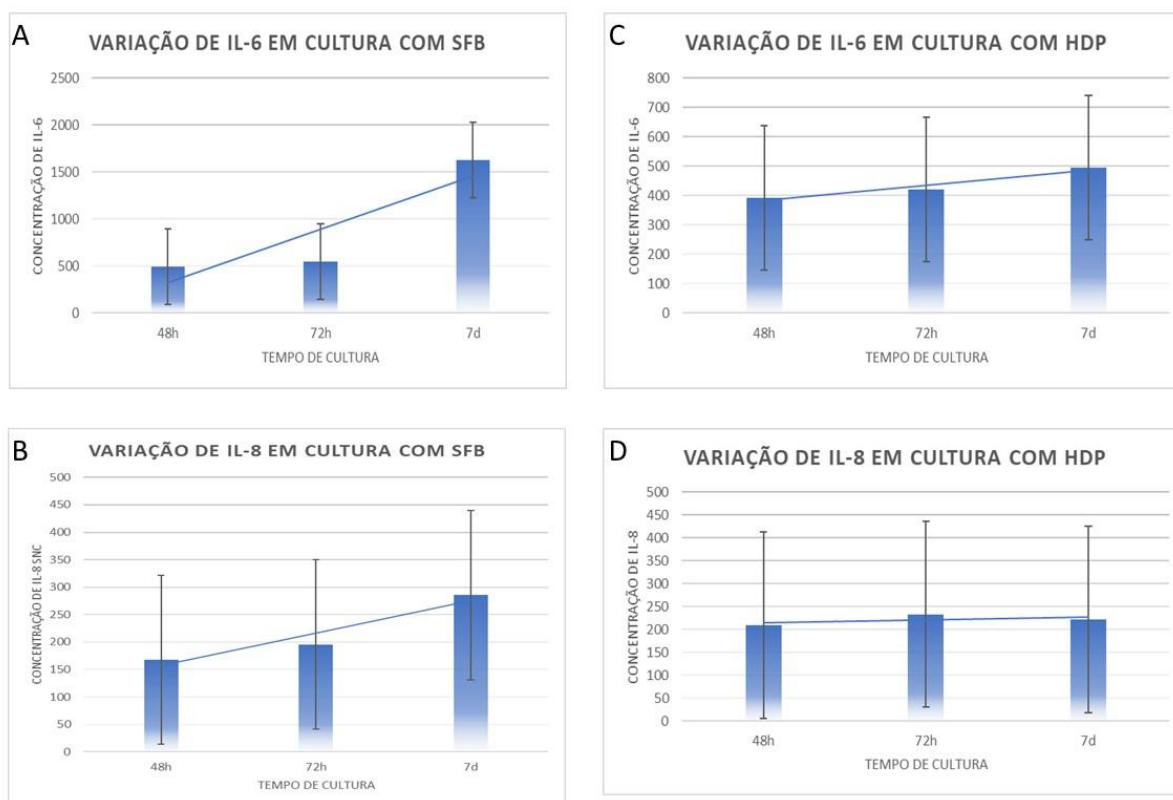
A dosagem das citocinas presentes no meio condicionado das CTMh em ambos os grupos estudados: SFB e HDP, mostraram desempenho diferente como pode ser observado na figura 22. Foi realizado *pool* da triplicata experimental realizada para o processamento das amostras. Das seis citocinas dosadas IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF, e IL-12p70, somente as IL-6 e IL-8 tiveram níveis significativos detectados. Podemos afirmar com segurança de que não se tratou de erro técnico tendo em vista que todas as curvas padrão com os devidos *standards* funcionaram adequadamente.

Pode ser identificado na figura 22 A, que as CTMh, na presença de SFB, secretam IL6 com uma tendência linear e crescente, enquanto que na presença de HDP estes valores são muito menores (observe-se a importante diferença de escala entre uma dosagem e outra em ng/ml). Em C podemos observar que as concentrações mantêm-se em média a 500ng/ml (3 vezes menos que as células cultivadas em SFB). Destacou-se, portanto, importante efeito inibitório do HDP sobre as CTMh quanto à secreção de IL-6. Este fato pode ter grande relevância no controle da ação da disfunção endotelial mediada pela IL-6^{28,29}.

Discutiu-se a importância das subpopulações de macrófagos quando na presença de elevados níveis de PAI-1, anteriormente. Sabe-se que a IL-6 tem um papel na regulação de linfócitos B e macrófagos. Considerada como um pirógeno endógeno, a IL-6 é o maior mediador da fase aguda da resposta inflamatória e altas concentrações inibe a secreção da albumina. Níveis elevados de IL-6 são encontrados em pacientes com queimaduras graves, psoríase generalizada e quadros de septicemia. É um importante mediador dos linfócitos B (LB), tanto na proliferação quanto na diferenciação dos LB⁷⁵. Na figura 23 pode-se observar a heterogeneidade dos fenótipos de macrófagos e a inscrição da ação da IL-6 no perfil pró-inflamatório ⁷⁶.

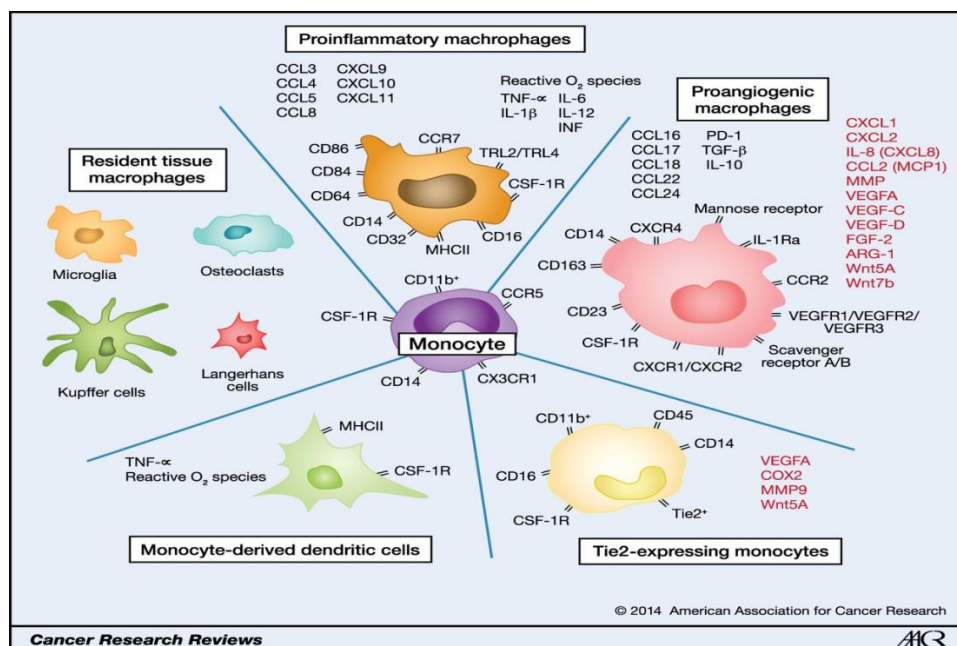
Já as concentrações de IL-8 não tiveram a variabilidade encontrada na IL-6. Não foram registradas alterações na concentração de IL-8 em D+48h e D+72h. As concentrações foram significativamente maiores em 7 dias apontando para efeito cumulativo da mesma no meio condicionado. Mas para IL-8, as concentrações aumentaram 2X em 7 dias, quando as CTM_h estão na presença de SFB e mantêm-se estáveis na presença do HDP (figura 22). Este fato chama a atenção com relação à ação da IL-8 sobre as subpopulações de macrófagos com efeito pró-angiogênico (figura 23)⁷⁶.

Figura 23 – Determinação das citocinas, por citometria de fluxo, em meio condicionado de CTM_h cultivadas na presença de SFB e HDP



Fonte: arquivo pessoal, 2018.

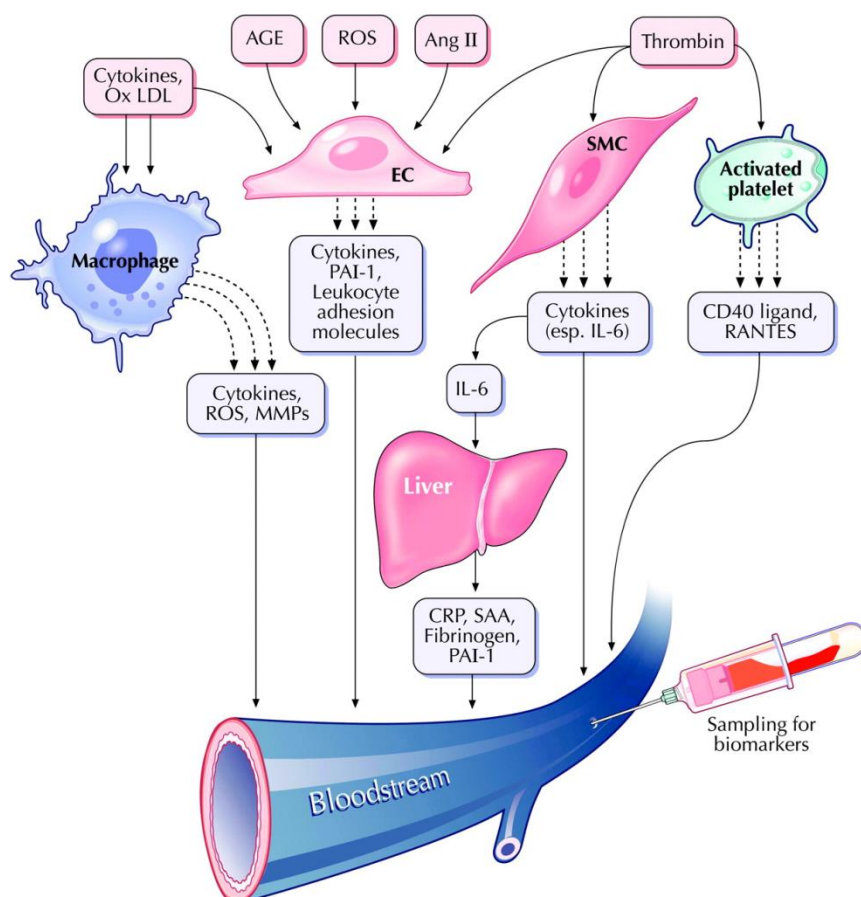
Figura 24 – Diversidade fenotípica da subpopulação de monócitos



Fonte: retirado de Monocyte Subpopulations in Angiogenesis. Heather J. Dalton, Guillermo N. Armaiz-Pena, Vianey Gonzalez-Villasana, Gabriel Lopez-Berestein, Menashe Bar-Eli and Anil K. Sood DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2825 Published March 2014

O complexo IL6 / sIL6R pode se ligar ao receptor gp130, que é expresso de forma ubiqüitária em células, incluindo células endoteliais e fibroblastos, para ativar os transdutores de sinal e os ativadores da via de sinalização de transcrição 3, (STAT3). A ativação das células endoteliais através da sinalização trans resulta em um aumento da molécula de adesão (ICAM-1), a liberação de quimiocinas (IL-8 e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1)) e a liberação de mais IL-6, contribui com a formação da placa aterosclerótica^{77,78}.

Figura 25 - Interação celular, imunidade, inflamação e alteração da parede arterial e secreção de marcadores inflamatórios na circulação.



Legenda: SMC= Ox = ; ILD = low-density lipoprotein cholesterol; AGE = advanced glycation end-products advanced glycation end-products= produtos finais da glicação avançada ; ROS = espécies reativas de oxigênio; Ang II = angiotensina 1-2; SMC= smooth muscle cells (células de músculo liso); MMPs = metaloproteinases; CRP= proteína C reativa; SAA= soro amilóide A. Retirado de René R. S. Packard, Peter Libby, 2007⁷⁸

Pesquisas recentes sobre a aterosclerose têm relacionado marcadores inflamatórios dosados nos pacientes portadores de feridas crônicas e relacionando-os com a fisiopatologia da doença aterosclerótica que deve ser a base de sustentação do não fechamento das feridas crônicas. As citocinas inflamatórias envolvidas na inflamação vascular estimulam a geração de moléculas de adesão endotelial, proteases e outros mediadores, que podem

entrar na circulação em forma solúvel. Essas citocinas possuem uma dinâmica de interação, entre elas, a IL- 6, que estimula o parênquima hepático a aumentar a produção de proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa. Além disso, plaquetas e tecido adiposo geram mediadores inflamatórios relevantes para a aterotrombose. O conceito de envolvimento da inflamação na aterosclerose estimulou a descoberta e adoção de biomarcadores inflamatórios para a predição de risco cardiovascular. A proteína C-reativa é atualmente um biomarcador inflamatório simples e validado⁷⁸.

Desta forma entendemos que a dosagem de fatores de crescimento nos pacientes portadores de feridas crônicas reforçam dados de publicações anteriores estabelecendo causa-efeito entre o processo inflamatório inquestionável e as prováveis microtromboses que devam existir na área lesionada. Tendo em vista que existem fatores de crescimento circulantes com níveis acima dos valores normalmente encontrados, mas estes, não estão atuando na área lesada, a presença de microtromboses e vasculopatia indica a não biodisponibilidade destes fatores no leito da ferida. Este fato pode ser a base da justificativa da atuação da cola de fibrina de uso externo (Biofibrin) e do Biogel (gel de plaquetas).

Foi possível obter citocinas inflamatórias no meio condicionado obtido tanto em células alimentadas com soro fetal bovino e um controle da secreção das mesmas na presença de HDP, mas não foi possível detectar as citocinas anti-inflamatórias. Este fato pode ser quantitativo, ou mesmo, de que as mesmas possam ser lábeis e se degradar rapidamente no meio de cultura. Estudos adicionais devem comprovar esta hipótese.

Nas condições atuais do experimento não se constatou que o acréscimo de IL6 e IL-8, que podem ser obtidas no meio condicionado da cultura de células tronco mesenquimais possa contribuir com o melhoramento dos biocurativos. Outros fatores de crescimento devem ser dosados em pesquisas a serem delineadas.

Conclusão

Houve a expansão das células tronco mesenquimais derivados de tecido adiposo para a obtenção de fatores de crescimento em meio condicionado customizado.

Os fatores de crescimento obtidos dos hormônios de derivados de plaquetas não obteve significância, pois o uso de HDP com a formação de “membrana” ou *scaffold* dificultou a obtenção das células tornando o experimento inviável e não tendo dado estatístico.

A comparação do SFB e HDP houve significância somente com relação a confluência nas amostras 3 e 4. Quanto a dosagem da citometria de fluxo a escolha do experimento em placas de 24 *wells* comprometeu esta análise pois o houve número insuficiente de eventos nas amostras 1 e 2 também comprometendo análise estatística.

A expansão das Células Tronco Mesenquimal humana (CTM_h) derivadas de tecido adiposo para a obtenção de fatores de crescimento e obtenção o meio condicionado em condições padrão (MC_p) e customizado com HDP (MC_{hdp}) mostrou aspectos peculiares. A presença do HDP forma um scaffold (membrana gelatinosa), mas não afeta os marcadores fenotípicos das CTM.

Com relação as citocinas foi possível obter quantidades significativas de IL-6 no meio condicionado das CTM_h na presença do soro fetal bovino. A adição de HDP regula negativamente a secreção da IL-6 de forma significativa e bloqueia a secreção de IL-8.

A quantificação dos fatores de crescimento sérico em grupo de pacientes portadores de feridas crônicas, abertas há mais de 3 anos, pelo método Luminex, mostrou que os dez biomarcadores: EGF, FGF1, FGF2, Angiopoietina-1, PDGF-AA, VEGF-AA, RANTES, Angiopoietina 2, PAI-1 e e Fator von Willebrand encontram-se elevados, com destaque para PAI-1 que é oito vezes maior que aquele de indivíduos saudáveis.

Referências Bibliográficas:

- 1- Bydlowski, SP, Debes AA, Maselli LMF. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, 2009
- 2- Yorukoglu AC, Kiter AE, Akkaya S, *et al.* A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells Int*, 2017
- 3- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999, 284(5411):143-7.
- 4- Muñoz MF, Argüelles S, Chozas M. Cell tracking, survival and differentiation capacity of adipose derived stem cells after engraftment in rat tissue. *J Cell Physiol*, 2018
- 5- Du HC, Jiang L, Geng WX, *et al.* Growth Factor-Reinforced ECM Fabricated from Chemically Hypoxic MSC Sheet with Improved In Vivo Wound Repair Activity. *Biomed Res Int*, 2017.
- 6- Xia X, Tao Q, Ma Q, Chen H, *et al.* Growth Hormone Releasing Hormone and Its Analogues: Significance for MSCs Mediated Angiogenesis. *Stem Cells Int*, 2016.
- 7- MORRISON, S.J. *et al.* Stemcells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life, p.598-611, 2008.

- 8- Modificado de:
<http://www.massgeneral.org/regenmed/stemcells/whatarestemcells.aspx> Acesso em 12/11/2017. Acessado em 12/12/2017.
- 9- <https://www.google.com.br/search?biw=1242&bih=588&tbm=isch&sa=1&ei=U6YwWuBng7bABJKZoOAI&q=self+renewal+stem+cells&oq=cells+self+renewal>. Acessado em 12/12/2017.
- 10- Dominic M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7
- 11- Tolar J, Le Blanc K, Keating A. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2010;28(8):1446-55.
- 12- You KN, Jae JB, Mijunglee WM. Wound healing potential of adipose tissue stem cell extract. *Biochemical and Biophysical Research*. 2017, 30-34.
- 13- Itali L, Orlando C. Paracrine effect mesenchymal stem cells derived human adipose tissue in bone regeneration. 2014, 9.
- 14- Ge Q, Zhang H, Hou J, Wan L, et al. VEGF secreted by mesenchymal stem cells mediates the differentiation of endothelial progenitor cells into endothelial cells via paracrine mechanism. 2018, (1) 1667-1675.

- 15- Hu L, Ruonan X, Zheng Z, *et al.* Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. 2011, 19-22.
- 16- Khoon SL. Stem Cells for Bone Regeneration: Role of Trophic Factors
- 17 Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *AnbrasDermatol, Rio de Janeiro. AnbrasDermatol, Rio de Janeiro. 2003, 78(4): 393-410.*
- 18- Blanes, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: [ttp://www.bapbaptista.com](http://www.bapbaptista.com).
- 19 - Reinke JM, Sorge H. Wound Repair and Regeneration. *EurSurg Res* 2012;49:35–43.
- 20 - Andrade AG, Lima CF, Albuquerque AKB. Effects of the therapeutic laser on the wound healing of burns: a bibliographic review. *Rev Bras Queimaduras.* 2010;9(1):21-30.
- 21 - Nicolosi JG, Moraes AM. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2005.
- 22 - Everts, PAM, Knape TAJ, Weibrich G, *et al.* Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra CorporTechn.*, 2006,38: 174-87

- 23- Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets, and Atherothrombosis. *Rev. EspCardiol.*, 2009, 62 (10): 1161-78.
- 24- Thon JN, Italiano JE. Platelets: production, morphology and ultrastructure. *HandbExpPharmacol.*, 2012, 210: 3-12.
- 25- Vani, ISR. Obtenção, Indicadores de Qualidade e Propriedades dos Hormônios Derivados de Plaquetas Humanas pela técnica de LisadoPlaquetário. Dissertação de mestrado – Universidade estadual Paulista, 2016.
- 26- <https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/50942.pdf>. Acessado em 15/11/2017.
- 27- Lubkowska A, Delegowska B, Banfi G. Grow factor content in PRP and their applicability in medicine. *J BiolRegul Homeostat Agents*, Abr-Jun 2012, 26:3-22.
- 28- Pagliosa GM, Alves GES. Isolation and use of platelet rich plasma and indiferenciates mesenchymal cells in bone grafts. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2007, 1202-1205.
- 29 - Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther* 9: 204.
- 30 - Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, et al. (2010) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20: 510-518.

31 – Abbas, AK. e Lichtman, AH. Imunologia Básica: funções e distúrbios do sistema imunológico, 3ª ed., Ed. Elsevier, 2009, Rio de Janeiro, RJ.

32 – Caio BO, Rioko KS, Adriana MI. Artigo de revisão: Citocinas e dor. Rev Brasileira de Anestesiologia Vol. 61. 2011, 255-265

33- PORTARIA Nº 158, DE 04 DE FEVEREIRO DE 2016 DOU de 05/02/2016 (nº 25, Seção 1, pág. 37)

34- <https://www.emdmillipore.com/US/en/life-science-research/protein-detection-quantification/milliplex-multiplex-assays-using-luminex/> Acessado em 15/12/2017

35- BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokines Kit Instruction

Manual disponível em http://www.bdbiosciences.com/documents/CBA_Human_Inf_Cytokine_manual.pdf Acessado em 10/11/2017.

36- Maroz A, Deffune E. Platelet-rich plasma and chronic wounds: remaining fibronectin may influence matrix remodeling and regeneration success. *Cytotherapy*. 2013 Nov;15(11):1436-9.

37- Maroz A, Felisbino SL, Deffune E. Platelet and plasma bioactive scaffolds for stem cell differentiation: what are we missing?. *Platelets*. 2014;25(7):556-7.

38- Tambella AM, Attili AR, Dupré G, *et al.* Platelet-rich plasma to treat experimentally-induced skin wounds in animals: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018 Jan 11;13(1).

39- Oliveira MG, Abbade LPF, Miot HA, *et al.* Pilot study of homologous platelet gel in venous ulcers. *An Bras Dermatol.* 2017 Jul-Aug;92(4):499-504.

40- Anitua E, Prado R, Orive G. Allogeneic Platelet Rich Plasma: At the Dawn of an Off the Shelf Therapy?. *Trends Biotechnol.* 2017 Feb;35(2):91-93.

41- Hermeto LC, DeRossi R, Oliveira RJ, *et al.* Effects of intra articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genet Mol Res.* 2016 Sep 2;15(3).

42- Aaron DN, Masatoshi S, Clive N. A High Concentration of Epidermal Growth Factor Increases the Growth and Survival of Neurogenic Radial Glial Cells Within Human Neurosphere Cultures. *Stem Cells.* 2008;26:348–355.

43- Gerber PA, Buhren BA, Schrumph H. Mechanisms of skin aging induced by EGFR inhibitors. *Support Care Cancer.* 2016;4241-8.

44- Epidermal growth factor and aging: A signaling molecule reveals a new eye opening function Christopher Rongo The Waksman Institute, Department of Genetics, Rutgers The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey, USA Key words: EGF, aging, ubiquitin, heat shock protein, C. Elegans Received: 9/14/11; Accepted: 9/14/11; Published: 9/15/11

45- Scholz A, Plate KH, Reiss Y. Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Jul;1347:45-51

46- Kim JH, Moon SO, Kwak HJ, Kim NG. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. 2000 Sep; 14;19(39):4549-52.

47-Gavin T, Christopher D. The Complex Role of Angiopoietin-2 in the Angiopoietin –Tie Signaling Pathway. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012.

48- Maddaluno L, Urwyler C, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. Development. 2017 Nov 15;144(22):4047-4060.doi: 10.1242/dev.152587

49- El Agha E, Kosanovic D, Schermuly RT, Bellusci S. Role of fibroblast growth factors in organ regeneration and repair. Semin Cell Dev Biol. 2016;53:76-84. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.009.

50- Maloof P, Wang Q, Wang H, Stein D, Denny TN. Overexpression of basic fibroblast growth factor (FGF-2) downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. 1999 Jul;56(2):153-67.

51- Mohammad RS, Mostafa K, Behzad K. High-level Expression and Purification of Active Human FGF-2 in *Escherichia coli* by Codon and Culture Condition Optimization. Iran Red Crescent Med J. 2016 Feb; 18(2): e21615. doi: 10.5812/ircmj.21615.

52- Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. Folia Histochem Cytobiol. 2005;43(4):203–8.

53- Sato N, Hattori Y, Wenlin D, Yamada T, Kamata T, Kakimoto T. Elevated level of plasma basic fibroblast growth factor in multiple myeloma correlates with increased disease activity. Jpn J Cancer Res. 2002 Apr;93(4):459-66.

54- Nickel, W. The mystery of nonclassical protein secretion. Eur. J. Biochem. 2003; 270, 2109-2119.

55- Nickel, W. *Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of Mammalian cells*. CrossRefPubMedWeb of ScienceGoogle Scholar. 2005; 607-614.

56- Prudovsky, I., Mandinova, A., Soldi, R., Bagala, C., *The non-classical export routes: FGF1 and IL-1{alpha} point the way. J. Cell Sci.* 2003;116, 4871-4881.

57- Walter N. Unconventional secretion: an extracellular trap for export of fibroblast growth factor 2. *J Cell Sci* 2007 120: 2295-2299; doi: 10.1242/jcs.011080

58- Larsson A, Sköldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis.* 2002;5(1-2):107-10.

59- Liu X¹, Zhang T², He S², Hong B², Chen Z², Peng D², Wu Y' et al. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2014 Aug 15;218(1-2):54-60. doi: 10.1016/j.psychres.2014.03.042.

60- Yuan Lin,¹ ·² Ye-cheng Xiao,³ Hong Zhu,⁴ Qing-yan Xu, et al. Serum Fibroblast Growth Factor 21 Levels Are Correlated with the Severity of Diabetic Retinopathy. *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 929756. doi: 10.1155/2014/929756

61- A. Aigner, J. Beyer, R. Jäger, D. Raulais, M. Vigny. et al. European Society for Medical Oncology Marked increase of the growth factors pleiotrophin and fibroblast growth factor-2 in serum of testicular cancer patients. *Annals of Oncology* 14: 1525–1529, 2003. DOI: 10.1093/annonc/mdg416.

62- Philip Bao, Arber Kodra, MarjanaTomic-Canic, Michael S. Golinko, et al. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. Published online 2008 May 12. doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023

63 - Grazul-Bilska AT, Johnson ML, Bilski JJ, et al. Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today (Barc)* 2003;39:787–800.

64 - Noiri E, Lee E, Testa J, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol.* 1998;274:C236–44.

65 Brkovic A, Sirois MG. Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: Role of endogenous PAF and NO synthesis. *J Cell Biochem.* 2006.

66 - Stojadinovic OKA, Golinko M, Tomic-Canic M, Brem H. A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. *Wound Repair and Regeneration.* 2007:A30.

67- Harding KG, Moore K, Phillips TJ. Wound chronicity and fibroblast senescence--implications for treatment. *Int Wound J.* 2005 Dec;2(4):364-8.

68- Mi-SK, Hye JS, Sang HL. *et all.* Comparative study of various growth factors and cytokines on type I collagen and hyaluronan production in human dermal fibroblasts. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 13, 44-51

69- Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J Cell Biochem.* 2018 Jan;119(1):17-27. doi: 10.1002/jcb.26146.

70- Christopher S. Coffey, Folkert W. Asselbergs² Patricia R. Hebert, Hans L. Hillege, Qing Li, Jason H. Moore. The Association of the Metabolic Syndrome with PAI-1 and t-PA Levels. *Cardiol Res Pract.* 2011; 2011: 541467.

71- Sema Bilgic Gazioglu, Gokce Akan, Fatma Atalar, Gaye Erten. PAI-1 and TNF- α profiles of adipose tissue in obese cardiovascular disease patients. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(12): 15919–15925.

72- Veronica R. Placencio, Yves A DeClerck. Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Cancer: Rationale and Insight for Future Therapeutic Testing. *Cancer Res.* 2015 Aug 1; 75(15): 2969–2974.. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0876

73- Hohensinner PJ, Baumgartner J, Kral-Pointner JB, Uhrin P. *et al.* PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) Expression Renders Alternatively Activated Human Macrophages Proteolytically Quiescent. *ArteriosclerThrombVasc Biol.* 2017 Oct;37(10):1913-1922. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309383.

74- Parkin JD, San Antonio JD, Persikov AV, Dagher H. *et al.* The collagen III fibril has a "flexi-rod" structure of flexible sequences interspersed with rigid bioactive domains including two with hemostatic roles. *PLoSOne.* 2017 Jul 13;12(7):e0175582. doi: 10.1371/journal.pone.0175582.

75- Theresa C. Barnes, Marina E. Anderson, Robert J. Moots. The Many Faces of Interleukin-6: The Role of IL-6 in Inflammation, Vasculopathy, and Fibrosis in Systemic Sclerosis. *International Journal of Rheumatology.* 2011.

76- Heather JD, Guillermo NAP, Vianey GV, *et al.* Monocyte Subpopulations in Angiogenesis. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2825 Published March 2014.

77- Jürgen S, Athena C, Dirk SA. The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Elsevier.* 2011; 878-888.

78- René RS, Peter L. Inflammation in Atherosclerosis: From Vascular Biology to Biomarker Discovery and Risk Prediction. *Clinical Chemistry.* 2007;DOI: 10.1373/clinchem.2007.097360.