UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Patricia Rodrigues de Lima

Biopolímero de Fibrina como arcabouço biológico para células-tronco mesenquimais como potencial produtor osteogênico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor (a) em Doenças Tropicais.

\

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior

Botucatu (SP)
2019

Patricia Rodrigues de Lima

BIOPOLÍMERO DE FIBRINA COMO ARCABOUÇO BIOLÓGICO PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COMO POTENCIAL PRODUTOR OSTEOGÊNICO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor (a) em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior.

Botucatu (SP)
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lima, Patricia Rodrigues de.
Biopolímero de fibrina como arcabouço biológico para células-tronco mesenquimais como potencial produtor osteogênico / Patricia Rodrigues de Lima. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rui Seabra Ferreira Júnior
Capes: 40101096

1. Patrimônio genético. 2. Materiais biomédicos. 3. Biopolímeros. 4. Fibrina. 5. Células-tronco. 6. Osso e ossos.

Palavras-chave: Arcabouço; Biomaterial; Biopolímero de Fibrina; Células-tronco mesenquimais; Osso ectópico.

Dedicatória

“Torna-Te Quem Tu És” - Nietzsche

Dedico este trabalho A minha família Mãe, irmãos e sobrinhos;

Meu pai e minha avó (In memoriam).

Obrigada, por me incentivarem sempre a busca da minha verdadeira essência, amo vocês.

Agradecimentos

É neste momento que nos damos conta de quantas pessoas fazem parte da nossa trajetória...

Agradeço a minha família, meu pai Juarez (in memoriam), minha mãe Judith, meus irmãos Sonia, José Roberto e Eduardo, aos meus sobrinhos Danilo, Rafaela e Luna Mimi, a minha avó Aldevina (in memoriam) e a tia Maria. Obrigada pelas conversas, puxões de orelha, incentivo e todo amor, vocês são os bens mais importantes que essa vida me deu, amo vocês.

Ao meu orientador Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, por todos os ensinamentos e paciência. Agradeço por permitir meu desenvolvimento me dando liberdade e confiando no meu trabalho.

Ao professor Dr. Benedito Barraviera, pelos ensinamentos, e atenção.

À professora Dra. Lucilene Delazari, que me trouxe a experiência de vivências acadêmicas importantes fora das atividades rotineiras.

À toda equipe técnica do CEVAP, Elenize, Luciana, Alessandra e Cristiano, obrigada por toda disponibilidade, atenção e apoio no desenvolvimento das nossa atividades.

À Letícia secretária por toda disponibilidade e atenção em nos auxiliar.

À Luzia por toda atenção, cuidado e por trazer leveza ao ambiente sempre com um sorriso.

À amiga Claudia por toda conversa e problematizações do dia-a-dia, sempre acompanhada de boa comida e dicas de formatação.

À Francilene pelas risadas desabafo, dicas de trabalho e companhia na correria para pegar o ônibus.

Ao Fausto, pelas discussões, parceria nos experimentos e caronas.

À Laudicéia por toda conversa filosófica, boa comida e caronas precisas.

À Clara pelas aulas de espanhol e auxílio nos experimentos.

Ao Leo pela disposição em ajudar sempre que precisei.

À Camila por sempre se mostrar disposta a ajudar.

À todos outros colegas do CEVAP que fizeram parte da minha vida neste momento Priscila, Patricia Orsi, Aline, Andréia, Nayara, Letícia, Bárbara, Lidiane grata pela contribuição de cada um.

Agradeço a toda equipe de funcionários do CEVAP por toda ajuda e atenção. Agradeço à Selma, Juliana, Claudio, Marquinhos, Wendel, Granieri, Sérgio, Marília, Sandra, Sheila e Felipe.

Aos amigos de uma vida Diogo, Fabiana, Maísa, Kelly, Renata, Rodrigo Matheus, Marcele e Martha Passador que mesmo à distância encontram tempo para se fazerem presentes.

À amiga e psicóloga Glória que me ajudou a manter o foco e equilíbrio em momentos difíceis.

À Wanda grande apoiadora e incentivadora de tudo que eu fiz até hoje.

Ao Fernando aquela pessoa que conheci em um momento de distração e compartilha comigo bons momentos de conversa, conselhos e risadas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Harakava por ter me dado o empurrão inicial para a pesquisa.

A todo corpo docente e discente do Programa de pós- graduação em doenças tropicais da FMB-UNESP, Botucatu.

Ao departamento de Doenças Tropicais, em especial a Bruna por toda atenção, cuidado e esforço em nos ajudar.

A equipe técnica da Unidade experimental da FMB-UNESP, Botucatu (UNIPEX) Diego, Paulo César “PC”, Igor, Denise e Leandro, por toda ajuda e cuidados na parte experimental.

À Vickeline por compartilhar o seu conhecimento, por todo cuidado e atenção com os nossos experimentos e pela grande amizade.

Aos membros da banca de avaliação professor Dr. Rogério Leone Buchaim, da UNIMAR e FOB-USP, Prof. Dr. Rogério Amorim da FMVZ-UNESP, PhD. Juliana Floriano e PhD Andrea de Aro, muito obrigada pela disponibilidade e contribuições

Aos membros suplentes Prof. Dr. Alexandre Oliveira do Laboratório de Regeneração Nervosa da UNICAMP, PhD. Geraldo Marco Rosa e a Dra. Eleniza Jamas muito obrigada pelas contribuições

Agradecimentos Institucionais

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP UNESP Botucatu).
Ao Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB UNESP.
Ao Biotério do Laboratório de Medicina Experimental – FMB UNESP.
Ao Departamento de Reprodução Animal e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ UNESP Botucatu.
À Unidade de Pesquisa Experimental – UNIPEX UNESP Botucatu.
Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro do Hospital das Clínicas – UNESP Botucatu.
Ao Laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia – UNICAMP.
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“Apressa-te a viver bem e pensa que cada dia é, por si só, uma vida”.

Sêneca

Resumo

Desenvolvido em 1990 por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), no Estado de São Paulo, Brasil, o Biopolímero de Fibrina (BPF) possuía o principal objetivo de ser um adesivo à base de fibrina sem o uso de sangue humano, a fim de evitar a transmissão de doenças infecciosas por meio deste insumo. Após diversas pesquisas com o BPF, comprovou-se não somente sua capacidade adesiva, como também sua ação coagulante, sua ação como auxiliar no reparo ósseo e cartilaginoso e sua função como arcabouço para células-tronco mesenquimais (CTMs), devido ao fato de que o BPF possui uma estrutura tridimensional adequada. Em estudos recentes e ao exercer essa função, tal material não afetou o microambiente biológico das células, ou seja, permitiu a adesão, proliferação e diferenciação celular, e aderência e crescimento destas. Tais características, apresentadas pelo BPF, são desejáveis na maioria dos biopolímeros utilizáveis, o que ressalta a importância do aprofundamento das pesquisas com BPF e suas interações em experimentos *in vivo*. Assim, no capítulo 1 realizamos uma ampla revisão na literatura sobre biopolímeros de fibrina, células-tronco e reparação de tecido ósseo. No capítulo 2 é apresentado o artigo científico “Arcabouço de fibrina para células-tronco mesenquimais como potencial osteogênico”.

Palavras Chave: Biopolímero de Fibrina, Arcabouço, Células-tronco mesenquimais, Biomaterial

Abstract

Developed in 1990 by a group of researchers from the Center for the Study of Venomous and Poisonous Animals (CEVAP) in the State of São Paulo, Brazil, the Fibrin Biopolymer (GMP) had the main objective of being a fibrin-based adhesive without the use of human blood in order to avoid the transmission of infectious diseases by means of this input. After several investigations with BPF, it was verified not only its adhesive capacity, but also its coagulant action, its action as an aid in bone and cartilage repair and its function as a framework for mesenchymal stem cells (MSCs), due to the fact that the BPF has an adequate three-dimensional structure. In recent studies and in carrying out this function, such material did not affect the biological microenvironment of the cells, that is, it allowed cell adhesion, proliferation and differentiation, and adhesion and growth of these cells. These characteristics, presented by BPF, are desirable in most usable biopolymers, which underscores the importance of deepening GMP research and its interactions in in vivo experiments. Thus, in Chapter 1 we conducted a broad review in the literature on biopolymers of fibrin, stem cells and repair of bone tissue. In chapter 2 the scientific paper "Fibrin scaffold for mesenchymal stem cells as osteogenic potential" is presented.

Keywords: Fibrin Biopolymer, Scaffold, Mesenchymal Stem Cells, Biomaterial

Lista de Ilustrações

A- Capítulo I - Revião de Literatura

Figura 1. Morfologia das CTMs em garrafa de cultivo……2

Figura 2. Fotos de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde é posssível a observação da rede de fibrina tridimensional do BPF. (A) aumento 500X; (B) aumento de 2000X; (C) aumento 7000X onde é possível observar a presença de CTM no poro da malha do BPF. Fonte: Capuano, 2018……..6-7

B- Capítulo II- Artigo

Figura 1. (A) Tricotomia pré-incisão; (B) Incisão cirúrgica com acesso subcutâneo para a aplicação do BPF e associações; (C) Ossos retirados dos animais doadores; (D e E) Ossos particulados para atuação como indutores; (F) BPF; (G e H) BPF, associações e inserção nos animais receptores……21-22

Figura 2. (A) Fluorescência da cirurgia no dorso, indicando a mistura da associação das células marcadas com o nano cristal Qtracker, BPF e osso homólogo; (B) Raio x com sobreposição da imagem de florescência cirurgia no dorso; (C) Imagem de florescência cirurgia no dorso, sem background……24

Figura 3. Tomografia realizada 24h pós cirurgia para a confirmação da localização do enxerto……24

Figura 4. (A e B) Retirada do tecido formado; (C) amostras preparadas para descalcificação; (D) animais do grupo 3 com a completa absorção do material……..26

Figura 5. (A, B e C) Animal do grupo 3, avaliação do processo de rejeição do enxerto durante o processo de cicatrização pós cirúrgico ……27

Figura 6. Amostra Grupo 1; (A, B e C) colunas representando as 3 colorações utilizadas, HE, Picrossirius e Masson. Aumentos, (10x e 20x); As setas indicam os fragmentos do osso homólogo.....28

Figura 7. Amostra grupo 2; (A, B, C) colunas representando as 3 colorações utilizadas, HE, Picrossirius e Masson (Aumentos 2.5X, 5x); As setas indicam os fragmentos do osso homólogo.....29

Figura 8. (A,B, C e D); Grupo 1; (E, F, G e H) Grupo 2; (A) visualização completa do material,fragmentos ósseos envoltos por tecido conjuntivo, aumento de 2,5x; (B) tecido conjuntivo aumento 20x, (C) tecido sem vestígios de resposta inflamatória aumento 20x; (D)

vasos sanguíneos aumento 20x. (E) visualização completa do material,fragmentos ósseos envoltos por tecido conjuntivo, grande número de adipócitos e indicativos de reposta inflamatória, aumento 2,5 x; (F) fibroblastos e vasos sanguíneos aumento 20x (G) células de langerhans (H) adipócitos; (A,B,C,E,F e G) Coloração Masson; (D e H) Coloração HE……30-31

Figura 9. Células tronco mesenquimais de origem de medula óssea (CTM-MO) indiferenciadas……..37

Figura 10. CTM-MO diferenciadas em osteócitos. Coloração Alizarin Red indicando a deposição de cálcio realizada pelos osteócitos no meio extracellular……..37

Figura 11. CTM-MO diferenciadas em adipócitos. Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a presença de gotas de lipídeos no interior das células……38

Figura 12. (A) População de células analisadas; (B) Controle auto fluorescente só células; (C e D) Marcadores positivos ICAM1 e CD90; (E, F e G) Marcadores negativos CD11b, CD45 e CD34. As CTM-MO foram caracterizadas por citometria de fluxo. Para a citometria foram utilizados os marcadores da tabela 1. Na figura estão apresentados os gráficos com os valores representativos de expressão de cada marcador. O gráfico A representa a população de células avaliadas, B indica o controle auto fluorescente das células. Os marcadores positivos ICAM1 e CD 90 estão representados nos gráficos C e D tiveram gated de 95,49% e 87,79% respectivamente confirmando a expressão positivas dos marcadores de superfície. Os marcadores negativos CD11b, CD45 e CD34 estão representados nos gráficos E, F e G tiveram gated de 4,65%, 2,80% e 3,00% respectivamente, a baixa expressão confirma a expressão negativas dos marcadores……..39-40

Figura13. Extração de RNA total ribossomal (18s/28s) para análise de qRT-PCR das amostras dos grupos1 e 2……44

Lista de tabela

Anexo

Tabela 1. Marcadores celulares utilizados na Citometria de Fluxo.....39

Tabela 2. Grupo 1 peso inicial e final do material inserido.....41

Tabela 3. Grupo 2 peso inicial e final do material inserido.....41

Tabela 4. Primers para genes relacionados a formação óssea.....43

Tabela 5. Primers para ensaio TaqMan, para genes de citocinas.....43

Sumário

1. REVISÃO DE LITERATURA 1

1.1 . Tecido Ósseo 1

1.3. Células-tronco mesenquimais (CTMs), Engenharia de tecidos e Polímeros biodegradáveis. 2

1.4. O Biopolímero de fibrina (BPF) obtido a partir do veneno de serpente. 5

1.5. Biopolímeros e resposta inflamatória 7

2. JUSTIFICATIVA 8

3. OBJETIVOS 8

3.1. Objetivo geral 8

3.2. Objetivos específicos 9

4. Referências 10

Capítulo II- MANUSCRIPT SUBMITTED TO THE JOURNAL “MATERIALS RESEARCH: IBERO-AMERICAN JOURNAL OF MATERIALS” 16

Resumo 16

1. INTRODUÇÃO 17

2. MATERIAL E MÉTODOS 18

2.1. Biopolímero de Fibrina (BPF) 18

2.2. Obtenção das células tronco mesenquimais (CTMs) 18

2.3. Caracterização da linhagem celular 19

2.3.1. Linhagem osteogênica 19

2.3.2. Linhagem adipogênica 19

2.4. Caracterização das CTMs por Citometria de Fluxo 19

2.5 Procedimento experimental *in vivo* 20

2.5.1 Animais 20

2.5.2 Desenho experimental 20

2.5.3. Procedimento cirúrgico para a aplicação do BPF com as respectivas associações 22

2.6. Imageamento *In Vivo* e Tomografia Micro-computadorizada 22

2.6.1. Marcação celular 22
2.7. Avaliação histológica 23
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 23
7. Conclusão 32
8. Referências 33
ANEXO 1 36
ANEXO 2 37
I- Caracterização celular 37
II- Citometria de Fluxo 39
ANEXO 3 41
ANEXO 4 42
I- RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real) 42
II- Extração do RNA total 42
III - Primers 42
IV- Resultado Parcial (Genômica) 44

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Tecido Ósseo

O tecido ósseo desempenha o papel de sustentação e é o principal constituinte do esqueleto. Suas principais funções são suporte e proteção de órgãos vitais. Trata-se de um tipo de tecido conjuntivo especializado formado por matriz extracelular calcificada, chamada de matriz óssea, e células denominadas osteócitos, que estão localizados nas lacunas da matriz; oesteoblastos, que são produtores da parte orgânica da matriz, e os osteoclastos, que atuam nos processos de remodelação óssea[1].

O osso é um tecido complexo e funciona através de interações entre a combinação de células, forças biomecânicas e biofatores[2]. Devido as renovações constantes durante a vida do indivíduo o tecido ósseo é considerado muito ativo, este processo de renovação é chamado de remodelação óssea ou osteogênese que consiste na remoção do osso antigo (reabsorção) e substituição por um osso recém formado. Trata-se de um processo fisiológico que ocorre em conjuntos celulares, sendo caracterizado pala junção das funções dos osteoclastos e osteoblastos[2].

1.2. Osteogênese ectópica

A formação óssea ectópica ocorre espontaneamente e a partir do tecido conjuntivo que não esteja associado ao esqueleto[3]. Este processo de ossificação ectópica foi previamente descrito em vários locais como na pelve renal, paredes de artérias, olhos, músculos e tendões, o que indica o potencial de muitos tipos de tecido conjuntivo de possuir potencialidade e capacidade osteogênica latente, raramente manifestada[3].

Alguns estudos com osteogênese ectópica visam esclarecer o papel das células derivadas da medula óssea neste processo, visto que a osteogênese já existe localmente no modelo ortotópico. Portanto, ao estabelecer um modelo de osteogênese ectópica é possível investigar a dinâmica e localização de células derivadas da medula óssea ao longo do tempo[4]. Estas células podem ser recrutadas da medula óssea adjacente ao tecido próximo a lesão durante o processo de cicatrização. Por isso, tornou-se claro que células desta origem estão envolvidas na manutenção e reparação de vários órgãos *in vitro*[5].

Stiers et al., (2018), desenvolveram e validaram uma técnica de implante ectópico para regeneração óssea em camundongos a ser utilizada na engenharia de tecidos. Esta abordagem não interferiu nos processos biológicos de regeneração óssea que ocorrem nestes

implantes. Por meio da técnica de MicroCT, foi possível o rastreio de células individuais ao longo de vários dias *in vivo*[6].

Na região da cabeça e pescoço, o enxerto ósseo autógeno e os biomateriais artificiais estão sendo usados atualmente para tratar defeitos ósseos causados por traumas, tumores ou invasões cirúrgicas. No entanto, a disponibilidade de tecido ósseo para enxerto autógeno é limitada, além da existência do risco de infecção ou invasão de outros tecidos do doador. Assim, nos últimos anos, o tratamento de defeitos ósseos usando células-tronco mesenquimais (CTMs) indiferenciadas tem atraído a atenção[5].

1.3. Células-tronco mesenquimais (CTMs), Engenharia de tecidos e Polímeros biodegradáveis.

As CTMs derivadas de medula óssea (CTM-MO), são células estromais multipotentes com capacidade de diferenciação em diversos tipos de células, incluindo osteoblastos, condrócitos, miócitos e adipócitos[7]. A diferenciação de CTM-MO em células osteogênicas / osteoprogenitoras é um método terapêutico promissor capaz de promover nova formação óssea e cicatrizar fraturas. A aplicação direta de CTMs em cirurgia aberta tem sido relatada com resultados encorajadores em pacientes com cicatrização tardia da fratura óssea. A engenharia de tecido ósseo à base de CTMs com fatores osteoindutores efetivos é necessária para melhorar a neoformação óssea e a regeneração óssea[7].

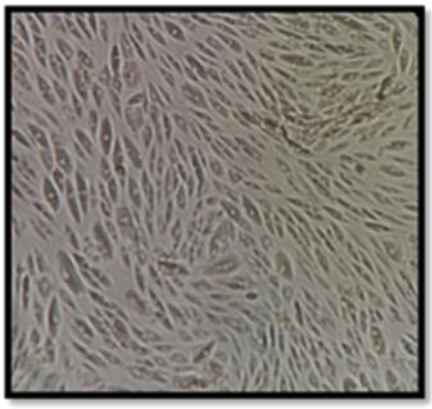


Figura 1. Morfologia das CTMs em garrafa de cultivo.

A engenharia de tecidos é um ramo promissor da medicina regenerativa, entretanto, sua aplicação clínica permanece limitada, pois o conhecimento detalhado acerca dos processos de reparo *in vivo* ainda possui limitações[8]. Trata-se de uma área científica interdisciplinar, que visa restaurar ou melhorar as funções biológicas de tecidos danificados, ou de tecidos que não são mais capazes de realizar a sua função[9].

Abrangendo conhecimentos de diferentes áreas da ciência e engenharia de materiais, biológica e médica, a técnica envolve a expansão *in vitro* de células viáveis do paciente doador sobre arcabouços de polímeros biodegradáveis[10].

Estes polímeros biodegradáveis ou biomateriais, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, dentre outros)[11]. São utilizados como suporte tridimensional que abrigam as células e moléculas biologicamente ativas. Estes arcabouços ajustam e orientam o crescimento celular, permitindo a regeneração do tecido sob esta estrutura tridimensional [10,11].

Um arcabouço ideal deve atender aos seguintes critérios: (a) não possuir um polímero e nem os produtos da sua degradação tóxicos, (b) possuir excelente biocompatibilidade (ISO 10993-1)[5,6] com células cultivadas, (c) apresentar boas propriedades mecânicas e de flexibilidade, (d) biodegradabilidade controlada, (e) ser facilmente formado como uma estrutura porosa, e (f) possuir propriedades termoplásticas apropriadas[12].

Os arcabouços utilizados pela engenharia de tecidos são divididos entre naturais e sintéticos. Os arcabouços naturais incluem os PHAs (família de poliésteres biodegradáveis sintetizados por bactérias como compostos de carbono e armazenamento de energia intracelulares), o colágeno, a quitosana e a fibrina, os quais são biocompatíveis e apresentam resultados promissores quando utilizados como arcabouços para engenharia de tecidos[13]. Os arcabouços sintéticos, tais como ácido poliglicólico e PLA (ácido polilláctico), têm sido amplamente utilizados em suturas, *stents* médicos e como auxiliares na liberação controlada de drogas[14].

As principais funções dos arcabouços são: (a) proporcionar integridade estrutural e definir o espaço potencial para a engenharia de tecidos, (b) orientar o processo de reestruturação, o qual envolve a proliferação de células do doador e o crescimento do tecido do hospedeiro, (c) manter uma distância apropriada entre as células do parênquima para a difusão de gases e nutrientes [15].

A engenharia de tecidos, juntamente com a tecnologia do uso de CTMs, tem mostrado bons resultados quando associados com arcabouços de selante de fibrina. Wittmann et al., (2013), utilizaram tais abordagens para o desenvolvimento de tecido adiposo, onde a combinação de células estaminais do próprio tecido adiposo e selante de fibrina se mostrou estável, um dado importante uma vez que o tecido adiposo é utilizado em processos de correção de deformidades[16].

O sucesso da combinação de CTMs da medula óssea e selante de fibrina mostrou-se positivo por fornecer novas maneiras de promover a cicatrização de feridas[17]. Kajbafzadeh et al., (2014), relataram resultados positivos da associação de células do prepúcio sobre um arcabouço de selante de fibrina para reconstrução da uretra em coelho. Esta associação se mostrou uma alternativa confiável para a reparação de defeitos uretrais segmentares[18].

O selante de fibrina como arcabouço associado ao fosfato de b-tricálcio (b-TCP), uma espécie de proteína osteoindutora, e células tronco, mostrou-se eficaz como arcabouço tridimensional para o crescimento ósseo[19]. Em um estudo sobre reparo de lesões craniofaciais obteve-se resultados satisfatórios, com uso do selante de fibrina associado com a proteína óssea morfogenética (BMP) secretoras derivadas de células estaminais musculares[20].

O selante de fibrina é um material com propriedade hemostática composto por fibrinogênio e trombina. Essa propriedade hemostática foi relata por Bergel (1909), e a partir deste muitos outros estudos corroboraram para tais conclusões. Yong e Medawar (1940), relataram o uso do fibrinogênio como adesivo para os nervos periféricos; Cronkite et al., (1944), associaram a trombina bovina com fibrinogênio em plasma para melhorar técnicas de enxerto de pele e Matras et al., (1972) trabalharam com uma forma concentrada de fibrinogênio que posterirormente contribuiria para a produção comercial do selante de fibrina[21,22,23,24].

O conceito de utilização de selantes de fibrina para aproximar as bordas da pele em feridas ou produzir aderência para outros tecidos é relativamente novo. Na essência, há três tipos básicos de selantes de fibrina: autólogos, homólogo (ambos obtidos a partir de crioprecipitado) e sintético / comercial[25].

Mesmo com os benefícios e facilidades no uso do selante, o seu uso clínico e aplicações futuras esbarraram, inicialmente, na utilização de sangue humano[26]. Spotnitz et al.(2010) relataram três casos de transmissão de parvovírus B19 associados com selantes de fibrina comerciais no Japão, este vírus é particularmente difícil de remover a partir do plasma[27].

O selante produzido de fibrinogênio a partir de plasma humano, trombina bovina, cloreto de cálcio e a aprotinina (um agente antifibrinolítico), teve a sua comercialização proibida inicialmente pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos, devido ao risco de transmissão de doenças virais como hepatite e HIV[28].

Adesivos autólogos, ou seja, utilizando fibrinogênio a partir de sangue do próprio paciente, é uma alternativa para evitar problemas, visto que minimiza o risco de transmissão de doenças infecciosas e reações alérgicas[29]; porém, sua utilização está limitada a procedimentos cirúrgicos eletivos e programados, impossibilitando sua utilização na cirurgia de emergência[28].

Nos últimos 20 anos não tem sido relatados na literatura mundial casos de transmissões de HIV e hepatite por meio da utilização do selante de fibrina convencional, devido evidentemente a métodos de prevenção virais como a triagem viral (sorologia e reação em cadeia da polimerase – PCR) e métodos de redução virais, incluindo filtração, tratamento pelo calor (aquecimento seco ou vapor, pasteurização), limpeza, precipitação, tratamento de pH e cromatografia[30].

Não só o fibrinogênio humano pode trazer riscos à saúde se não forem adotadas as especificações de segurança adequadas. A trombina bovina, utilizada inicialmente para reduzir os custos, pode levar a uma rejeição, pois alguns receptores podem desenvolver anticorpos contra a trombina bovina [31,32,33].

Tendo em vista estas desvantagens, um Biopolímero de Fibrina- BPF (chamado de Selante Heterólogo de Fibrina até 2016) foi desenvolvido em 1990 por um grupo de pesquisadores do Centro para o Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), no Estado de São Paulo), Brasil [34]. O objetivo principal era produzir um adesivo fibrina sem o uso de sangue humano, para evitar a transmissão de doenças infecciosas. Seus componentes eram uma serino protease (uma enzima semelhante à trombina) extraída do veneno das cobras *Crotalus durissus terrificus* e um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos *Bubalus bubalis*. Este novo bioproduto tem sido usado como coagulante, selante, adesivo e, recentemente, como suporte de células tronco mesenquimais e reparo ósseo e cartilaginoso[34],[35].

1.4. O Biopolímero de fibrina (BPF) obtido a partir do veneno de serpente.

A primeira avaliação da aplicação do BPF na estética da formação de cicatriz mostrou excelente resultado para a área de adesão; além disso, os pacientes não apresentaram efeitos tóxicos locais ou sistêmicos[36]. O BPF obtido a partir do veneno de serpente demonstrou, além de possuir menor custo de produção, ter fácil aplicação e ser viável para utilização em modelos animais[34]. O uso deste biopolímero traz inúmeras vantagens por se tratar de um polímero biológico biodegradável, não produzir reações adversas, não transmitir doenças infecciosas, não conter sangue humano, possuir boa capacidade adesiva e potencial de aplicação como uma opção adicional nos procedimentos de sutura convencional[34].

Barbosa et al., (2007/2008) realizaram estudos com o BPF, onde o bioplímero foi usado com sucesso para imobilizar enxertos gengivais livres, em comparação com uma série de enxertos suturados, indicando que este bioproduto pode representar uma alternativa às suturas convencionais em procedimentos de enxertos gengivais[37,38].

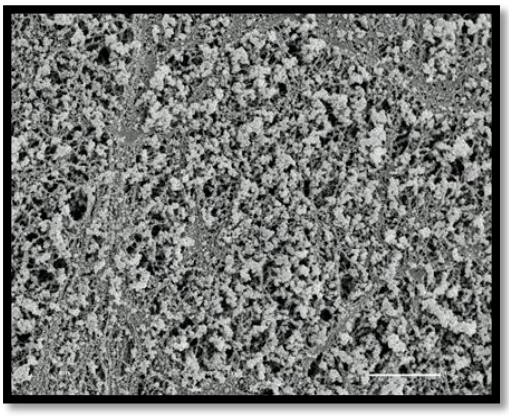
Vicente et al., (2007) compararam a eficácia da coaptação com o BPF derivado do veneno de serpente na reparação do nervo fibular. Dez ratos *Wistar* tiveram seu nervo esquerdo seccionado e reparado imediatamente com o selante de fibrina, enquanto o nervo direito foi utilizado como controle. Os nervos que foram reparados com o selante foram mielinizados e tiveram as fibras nervosas reparadas, com uma grande quantidade de tecido conjuntivo no espaço extracelular. Este processo mostrou uma interrupção da hemorragia e a recuperação funcional da estrutura do nervo[39].

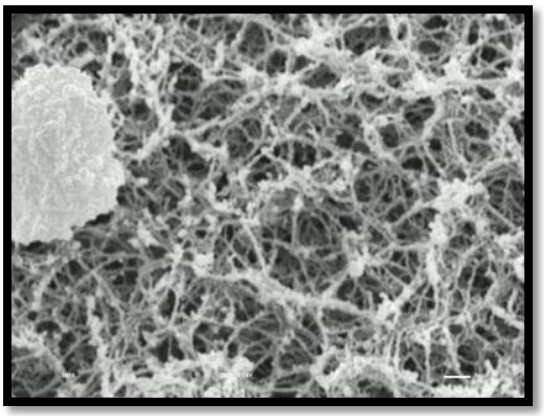
O BPF apresentou, também, resultados satisfatórios no tratamento de úlceras venosas. O resultado da aplicação do selante foi o preparo para o leito da ferida, diminuição da dor, além da facilidade de aplicação[40]. Aplicado em feridas de ratos *Wistar* diabéticos, o biopolímero apresentou resultados significativos em relação ao aumento na vascularidade na região da aplicação, o que pode acelerar o processo de cicatrização[41].

Estudos realizados por Barbizan et al. (2013) com fêmeas de ratos *Lewis* demostraram a eficiência do BPF na recuperação motora e na preservação sináptica de cirurgia reparadora de avulsão de raiz ventral, na interface do sistema nervoso central. Além de auxiliar na neuroproteção e preservação da rede sináptica, o biopolímero reduziu a reação astroglial aumentando os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para as neutrofinas e citocininas, substâncias estas que podem contribuir para a melhora da função motora[42].

Iatecola et al. (2013) constataram em seus estudos a capacidade osteocondutora deste novo selante na reparação de defeitos no crânio em ratos *Wistar* machos. Essa capacidade osteocondutora pode representar um interessante recurso, aplicado nas cirurgias de reconstrução óssea[43].

A estrutura tridimensional do BPF é importante pois pode ser utilizada como suporte para CTMs. Em estudos realizados por Gasparotto et al., (2014), o BPF não afetou o microambiente biológico das células, ou seja, não houve prejuízo na adesão celular, proliferação ou diferenciação e permitiu a aderência e o crescimento de CTMs. Estes resultados indicam o BPF como candidato a polímero biodegradável e adequado para células-tronco em diversas necessidades, principalmente em técnicas de engenharia de tecidos [35, 44]. Tal função de arcabouço também foi descrita com sucesso por Orsi et. al. (2017), ao utilizar o BPF como arcabouço para CTMs, na regeneração óssea de ratos com osteoporose[45].





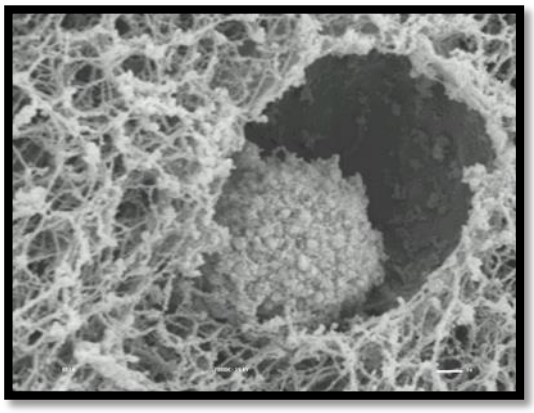


Figura 2. Fotos de Microscopia eletrônica de varredura (MEV) onde é posssível a observação da rede de fibrina tridimensional do BPF. **(A)** aumento 500X; **(B)** aumento de 2000X; **(C)** aumento 7000X onde é possível observar a presença de CTM no poro da malha do BPF. **Fonte:** Capuano, 2018.

1.5. Biopolímeros e resposta inflamatória

No que se refere a engenharia de tecidos, a atuação dos macrófagos é extremamente importante devido a sua associação a danos teciduais, embora também tenham um papel crítico na defesa do hospedeiro e no reparo tecidual[46]. Os macrófagos são divididos em duas classes. Os Macrófagos M1, que inicialmente são recrutados para locais de lesão, porém se seus efeitos forem prolongados, podem levar à inflamação crônica que impede o reparo normal dos tecidos. Estes macrófagos M1 são caracteristicamente descritos pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1β[46].

Alternativamente, os macrófagos ativados, também denominados M2, possuem funções anti-inflamatórias e expressam altos níveis de receptor de manose (CD206), arginase e Interleucina (IL-10). Os M2 podem ajudar a superar a inflamação e devido a sua alta capacidade de depuração endocítica mediam a cicatrização de feridas, a remodelação e o reparo tecidual[47].

Rammal et al. (2018) utilizaram uma combinação de fosfatos de cálcio e polissacarídeos e observaram uma resposta precoce modulada por macrófagos e monócitos em biomateriais semelhantes ao em osso. Os testes resultaram na secreção de fatores de crescimento pró-cicatrização de VEGF e TGF-β, TNF-α, MCP-1, mediadores pró- inflamatórios IL-6 e IL-8, mas também anti-IL-10[48].

Reeves et al. (2015) utilizaram biomateriais de seda para controlar a ativação crônica de qualquer tipo de macrófagos, o que tem sido implicado em várias doenças. Métodos para controlar localmente a polarização de macrófagos são de grande interesse para implantes biomédicos e engenharia de tecidos. Para esse fim, a proteína da seda foi usada para formar filmes biopoliméricos que liberam IFN-γ ou IL-4 para controlar a polarização de macrófagos[49].

Tal estudo, ao comparar o remodelamento tecidual e as respostas inflamatórias da cartilagem artificial construída com células-tronco mesenquimais da medula óssea, condrócitos ou ambos, e um estudo realizado com porcos Jinping et al. (2016), demonstraram que a cartilagem modificada com CTM-MO promoveu a polarização M2 de macrófagos com fenótipos antiinflamatórios, incluindo a regulação positiva de CD206, aumento da síntese de IL-10, diminuição da secreção de IL-1β e alterações na expressão gênica indicativa da transição M1 para M2. Foi sugerido que as construções semeadas com CTM-MO têm o potencial de melhorar a inflamação induzida por estrutura de suporte e melhorar a regeneração do tecido cartilaginoso através da polarização M2 de macrófagos[50].

Todas as estratégias aqui descritas visam oferecer abordagens para a utilização de biomateriais e para direcionar a polarização de macrófagos e melhorar as técnicas de engenharia tecidual.

2. JUSTIFICATIVA

Tradicionalmente, o enxerto ósseo autólogo é a primeira escolha para corrigir a falha óssea, pois estes enxertos são livres de problemas imunogênicos e absolutamente biocompatíveis, por serem oriundos do próprio paciente. As desvantagens são a fonte de doadores limitada, morbidades no sítio doador e a sobrevida variável do enxerto ósseo[49].

Desta maneira, este projeto foi motivado e desenvolvido pela necessidade de estudar uma nova alternativa minimamente invasiva para a regeneração de osso autógeno na correção e reconstrução de defeitos ósseos. O BPF derivado de veneno de serpente, apresentou excelentes resultados em diversas pesquisas com ossos, além de seu uso em variados tipos de tecidos. Objetivamos, portanto, estudar o quanto este biomaterial pode ser eficaz quando utilizado como arcabouço tridimensional de CTMs visando a neoformação óssea exógena.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do arcabouço derivado de veneno de serpente como arcabouço biológico tridimensional associado à CTMs e osso homólogo particulado como potencial produtor osteogênico, após aplicação da associação no espaço subcutâneo do dorso de ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a neoformação óssea por meio de análise histológica;
- Avaliar, por meio de qRT-PCR, o perfil de citocinas envolvidas nos processos de resposta imune do hospedeiro **(Anexo 4)**.

4. Referências

1. Junqueira L.C, Carneiro J. Histologia Básica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

2. Amadei, S.U, et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 5-12, Feb. 2006 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442006000100003&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Nov. 2018. http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442006000100003.

3. Kataoka, A. & Santana, A, E. Estudo da formação ectópica de tecidos ósse e hematopoiético induzida pelo implante de matriz óssea desmineralizada, em camundongos. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, SP, Vol. 22, nº1, 063-069, 2006. ISSN 0102-6380 1 Médica Veterinária.

4. Einhorn T.A. The cell and molecular biology of fracture healing. **Clin Orthop Relat Res**. 1998; 355: 7-21.

5. Takabatake, Kiyofumi et al. The Role of Bone Marrow-Derived Cells during Ectopic Bone Formation of Mouse Femoral Muscle in GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model. **International Journal of Medical Sciences**.Japan, 2018; 15(8): 748- 757. doi: 10.7150/ijms.24605

6. STIERS P.J, et al. An Ectopic Imaging Window for Intravital Imaging of Engineered Bone Tissue. **JBMR Plus**. 2018 Jan 31; 2(2):92-102. doi: 10.1002/jbm4.10028. E Collection 2018 Mar.

7. ALVES, Endrigo G.L. et al. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos.**Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 36, supl. 1, p. 21-32, June 2016. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2016001300021&lng=en&nrm=iso>. access on 12 Nov. 2018. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X201600130004.

8. FISHER, M.B., & MAUCK,R.l. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation.**Tissue Eng Part B Rev.** 2013 Feb; 19(1): 1–13.

Published online 2013 Jan 18. doi: [10.1089/ten.teb.2012.0723]

9. Puente P. DE LA, et al. Autologous fibrin scaffolds cultured dermalfibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2011; 99:648–654.

10. Barbantti S.H.et al. Polímeros bioreabisoríveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 2005; 15(1):13-21.

11. YANG S., et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. **Part I. Traditional factors. Tissue Eng**. 2001; 7:679–689.

12. Chang, H.M., et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) -based scaffolds for tissue engineering. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2014; 47(7): 533-539.

13. Jin, R. et al. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering**. Biomaterials**. 2009; 30: 2544-2551.

14. Jeong C.G. HOLLISTER S.J. A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes. **Biomaterials**. 2010; 31: 4304-4312.

15. Yamada S., et al. Potency of Fish Collagen as a Scaffold for Regenerative Medicine. **Biomed Research International**. 2014; 2014: 302932

16. Wittmann, K. et al. Development of volume-stable adipose tissue constructs using polycaprolactone-based polyurethane scaffolds and fibrin hydrogels. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. 2013; 30.

17. Yang Y. et al. Scalded Skin of Rat Treated by Using Fibrin Glue Combined with Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Ann Dermatol.** 2014; 26(3):289-205.

18. Kajbafzadeh A.M., et al. The application of tissue-engineered preputial matrix and fibrin sealant for urethral reconstruction in rabbit model. **International Urology and Nephrology**.2014.

19. Yamada Y., et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrina glue with a biodegradable scaffold. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**.2003; 31:27–33.

20. Usas A., et al. Bone regeneration mediated by BMP4-expressing muscle-derived stem cells is affected by delivery system. **Tissue Eng Part A**. 2009;15(2):285-93

21.Bergel S. Uber wirkungen des fibrins. **Dtsch Med Wochenschr**.1909; 35:633.

22. Young J.Z., MEDAWAR P.B. Fibrin suture of peripheral nerves. **Lancet** .1940; 275:126–132.

23. Cronkite, E. P., et al. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. **J Amer Med Assoc**.1944; 124:976-978.

24. Matras H., et al. Zur nachtlosen Interfaszikularen Nerventransplantation im Tierexperiment. **Wein Med** Wochenschr.1972; 122:517–523

25. Fathathi, T., et al. Clinical applications of fibrin sealants. **J Oral Maxillofac Surg**. 2004; 62:218-224.

26. Spotnitz W.D., “Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. **World Journal of Surgery**. 2010; 34(4) 632–634.

27. Hino, M., et al.Transmission of symptomatic parvovirus B19 infection by fibrin sealant used during surgery. **Br J Haematol**.2000; 108:194-195

28. Thomazini-Santos I.A., et al. Surgical adhesives. **J Venom Anim Toxins**. 2001;7(2):159-71.

29. Lerner, R., BINUR N. S. Current status of surgical adhesives. **J. Surg. Res**. 1990; 48:165–181.

30. Spotnitz W.D. “Fibrin Sealant: The Only Approved Hemostat, Sealant, and Adhesive—a Laboratory and Clinical Perspective. **International Scholarly Research Notices Surgery**.2014; 2014:28

31. Banninger, H., et al. AND FURLAN, M. Fibrin glue in surgery:Frequent development of inhibitors of bovine thrombin and human factor V. **Br. J. Haematol**. 1993. 85:528–532.

32. Israels, S. J., AND ISRAELS, E. D. Development of antibodies to bovine and human factor V in two children after exposure to topical bovine thrombin. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol**. 1994.16:249–254.

33. Rapaport, S. I., et al. Clinical significanceof antibodies to bovine and human thrombin and factor V after surgical use of bovine thrombin. **Am. J. Clin. Pathol.**1992; 97:84–91.

34.Barros L.C., et al. A new fibrin sealant from Crotalus durissus terrificus venom: Applications in Medicine. **J Toxicol Environmental Health, Part B**, 2009;12(8):553-71.

35. Ferreira R.S Jr, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside - an overview. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2017 Apr 4;23:21. doi: 10.1186/s40409-017-0109-8.

36.Stolf H. O. The use of fibrin adhesive derived from snake venom and the evaluation of skin graft from patients nasolabial fold. **J Venom Anim Toxins**. 1999;5(2):227.

37. Barbosa M.D., et al. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. **J Periodontol**. 2007;78(10):2026-31.

38. Barbosa M.D., et al. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery: histologicalanalysis. **Journal of Applied Oral Science**. [online]. 2008; 169(5): 310-315.

39. Vicente, E. J. D., et al. Regeneração do nervo periférico por meio de coaptação com cola de fibrina. **Rev. Méd. Hosp.Univ**.2007; 33:53–56.

40. Gatti M.A.N. Tratamento de úlceras venosas com adesivo cirúrgico derivado de veneno de serpente. Botucatu, São Paulo- UNESP; 2009.

41. Goulart M.C.V. Análise histológica e da aplicabilidade do adesivo cirúrgico derivado de veneno de veneno de cobra em feridas de animais diabéticos. Bauru, São Paulo-USP;2013.

42. Barbizan R., et al. Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. **PLoS One**. 2013 ;8(5): e63260.

43.Iatecola A., et al. Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair of skull defects in rats. **Brazilian Dental Journal**. 2013;24(5):456-61.

44. Gasparotto VPO, et al. RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, 2014, 5:78.

45 Orsi PR,et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. **Stem Cell Res Ther**. 2017 Sep 29;8(1):205. doi: 10.1186/s13287-017-0654-7.

46. Guiteras, R. et al. Exploring macrophage cell therapy on Diabetic KidneyDisease. **J Cell Mol Med**. 2018;1–11.

45. Dale, MA., et al. Elastin-derived peptides promote abdominal aortic aneurysm formation by modulating M1/M2 macrophage polarization. **J Immunol**. 2016 Jun 1; 196(11): 4536–4543. Published online 2016 May 4. doi: [10.4049/jimmunol.1502454]

46.Rammal, H. et al. Combining Calcium Phosphates with Polysaccharides: A Bone-Inspired Material Modulating Monocyte/Macrophage Early Inflammatory Response. **Int J Mol Sci**. 2018 Nov 3;19(11). pii: E3458. doi: 10.3390/ijms19113458.

47. Reeves, A.R.D., et al., Controlled Release of Cytokines Using Silk-biomaterials for Macrophage Polarization. **Biomaterials**. 2015 Dec; 73: 272–283.

21. doi: [10.1016/j.biomaterials.2015.09.027] PMCID: PMC4605898 NIHMSID: NIHMS725177 PMID: 26421484

48. Jinping, D., et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Based Engineered Cartilage Ameliorates Polyglycolic Acid/Polylactic Acid Scaffold-Induced Inflammation Through M2 Polarization of Macrophages in a Pig Model. **Stem Cells Transl Med.** 2016 Aug; 5(8): 1079–1089. Published online 2016 Jun 8. doi: [10.5966/sctm.2015-0263]

Capitulo II- MANUSCRIPT SUBMITTED TO THE JOURNAL "MATERIALS RESEARCH: IBERO-AMERICAN JOURNAL OF MATERIALS"

ARCABOUÇO DE FIBRINA PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COMO POTENCIAL OSTEOGÊNICO

Botucatu (SP)

2018

Capítulo II- MANUSCRIPT SUBMITTED TO THE JOURNAL "MATERIALS RESEARCH: IBERO-AMERICAN JOURNAL OF MATERIALS"

ARCABOUÇO DE FIBRINA PARA CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS COMO POTENCIAL OSTEOGÊNICO

Patricia Rodrigues de Lima[1,3], Claudia Vilalva Cassaro[1], Fausto Capuano Neto[1], Clara Reyes Ochoa[1], Marjorie de Assis Golim[2], Benedito Barraviera[1,3], Rui Seabra Ferreira Jr.[1,3*],

1- Center for the Study of Venoms and Venomous Animals –CEVAP UNESP, Botucatu, SP, Brazil.
2- Flow Citometry Laboratory – Blood Center of Botucatu Medical School – FMB UNESP, Botucatu, SP, Brazil.
3- Tropical Diseases Departament – Botucatu Medical School – FMB UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

*Corresponding author: rui.seabra@unesp.br

Resumo

O Biopolímero de Fibrina (BPF) possui uma estrutura tridimensional adequada para utilização em técnicas de engenharia de tecidos. Sua utilização tem-se mostrado promissora em diversos estudos. O uso do BPF traz inúmeras vantagens, pois trata-se de um polímero biológico biodegradável que não produz reações adversas, não transmite doenças e possui fácil aplicação. Com o objetivo de avaliar a capacidade do BPF como arcabouço para células-tronco mesenquimais (CTMs) na formação óssea ectópica, foram combinadas diferentes associações de BPF + CTMs e CTMs Modificadas (CTM-MO), divididas em 3 grupos de 8 animais cada: Grupo 1- BPF + Osso homólogo particulado; Grupo 2- BPF + CTM-MO + Osso homólogo particulado e Grupo 3- BPF + CTMS diferenciadas + Osso homólogo particulado. Estas associações foram aplicadas subcutaneamente no dorso de ratos *Wistar* de 3 meses de idade. Após 35 dias, o tecido formado foi coletado e submetido a análise histológica. Dos três grupos experimentais, apenas os grupos 1 e 2 apresentaram material para análise, já no grupo 3 o material não foi encontrado. As análises do grupo 2 mostraram a intensa resposta inflamatória, a qual certamente contribuiu para a falta do enxerto observada no grupo 3, em conjunto com o uso de CTMs diferenciadas em osso. Concluímos, portanto, que o BPF cumpriu de forma eficiente a função de arcabouço pois manteve-se estável tempo suficiente para que ocorresse a formação de um novo tecido.

Palavras Chave: Biopolímero de Fibrina, Arcabouço, Células-tronco mesenquimais, Osso ectópico

1. INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos é um ramo promissor da medicina regenerativa, entretanto, sua aplicação clínica necessita de conhecimento profundo dos processos de reparo *in vivo* ainda possui limitações[1]. É uma área científica interdisciplinar, que visa restaurar ou melhorar as funções biológicas de tecidos danificados ou que não são mais capazes de realizar a sua função[2]. Abrangendo conhecimentos de diferentes áreas da ciência e engenharia de materiais, biológica e médica, a técnica envolve a expansão *in vitro* de células viáveis do paciente doador sobre arcabouços de polímeros biodegradáveis[3].

Estes polímeros biodegradáveis, ou biomateriais, são conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, dentre outros)[11]. São utilizados como suporte tridimensional que abrigam as células e moléculas biologicamente ativas. Estes arcabouços ajustam e orientam o crescimento celular, permitindo a regeneração do tecido sob esta estrutura tridimensional [3,4]. Um arcabouço ideal deve atender aos seguintes critérios: (a) não pode ser um polímero ou gerar produtos da sua degradação tóxicos, (b) possuir excelente biocompatibilidade com células cultivadas, (c) apresentar boas propriedades mecânicas e de flexibilidade, (d) biodegradabilidade controlada, (e) ser facilmente formado como uma estrutura porosa, e (f) propriedades termoplásticas apropriadas[5].

Devido a uma demanda do mercado por um biopolímero que atendesse as necessidades e tivesse uma boa interação na aplicação *in vivo,* foi desenvolvido em 1990 por um grupo de pesquisadores do Centro para o Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), no Estado de São Paulo, Brasil o Biopolímero de Fibrina (BPF)[6,7]. O objetivo principal deste grupo era produzir um adesivo à base de fibrina sem o uso de sangue humano, para evitar a transmissão de doenças infecciosas[6,7]. Seus componentes eram uma serino protease (enzima semelhante à trombina) extraída do veneno das serpentes *Crotalus durissus terrificus,* e um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de búfalos da espécie *Bubalus bubalis*. Este novo bioproduto tem sido usado como coagulante, selante, adesivo e, recentemente, como suporte de células tronco mesenquimais no reparo ósseo, cartilaginoso e tendíneo[7].

Gasparotto et al. (2014) e Orsi et al. (2017) relataram que ao utilizar o BPF como arcabouço para CTMs, este não afetou o microambiente biológico das células, ou seja, não afetou sua adesão, proliferação ou diferenciação e permitiu o crescimento destas células, além de oferecer biocompatibilidade, biodegradabilidade e alta afinidade com superfícies biológicas. Estes resultados indicam o BPF como candidato a polímero biodegradável adequado para células-tronco em diversas necessidades, principalmente em técnicas de engenharia de tecidos [8,9].

Mediante a estes resultados, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atuação do BPF como arcabouço para CTMs e osso homólogo na formação de osso ectópico, bem como as respostas do sistema imune do hospedeiro a estas interações.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biopolímero de Fibrina (BPF)

O BPF derivado de veneno de serpente foi cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). Os componentes do BPF foram previamente descongelados e, no momento do uso, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente trabalho.

2.2. Obtenção das células tronco mesenquimais (CTMs)

Os procedimentos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, protocolo CEUA 1137-2015, (Anexo 1).

Foram utilizados 4 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem *Wistar* e com 21 dias de idade como doadores de medula óssea. Os animais utilizados nesta pesquisa foram provenientes do biotério do Laboratório de Medicina Experimental da UNESP, Campus de Botucatu - São Paulo.

As células extraídas da medula óssea (CTM-MO) foram obtidas a partir dos fêmures dos ratos doadores após a eutanásia com sobredose de Xilazina (Vetbrands®) e Ketamina (Ceva®). Os fêmures coletados foram depositados em tubos cônicos de 15mL e submetidos a centrifugação por 10min a 1500 rpm (340G) em temperatura ambiente. Após a centrifugação o precipitado celular foi ressuspendido em 1 mL de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium®) alta glicose, suplementado com soro fetal bovino 10% (Sigma-Aldrich Brasil Ltda®), anfotericina B 0,1% e estreptomicina 0,1%.

Após a completa diluição do precipitado, o conteúdo foi transferido para uma garrafa de cultivo celular de 25 cm contendo 4 mL de meio suplementado e armazenada em estufa de cultivo celular com CO_2 a 37 °C e 5% de umidade, onde permaneceu até a confluência celular e posterior passagem celular (repique), que acontece de forma exponencial dobrando-se a quantidade de células da passagem anterior. Este processo foi repetido até as células cultivadas atingirem a 5ª passagem, momento em que foram utilizadas no experimento.

2.3. Caracterização da linhagem celular

Parte das células obtidas a partir do cultivo primário (coletadas diretamente da medula óssea), foram submetidas a diferenciação celular de acordo como o seu potencial de diferenciação *in vitro*, em linhagens osteogênica e adipogênica.

Ao atingirem confluência de 80%, As células em cultivo primário foram transferidas para a 1ª passagem em uma placa de seis poços. Após a adesão celular o meio DMEM suplementado foi substituído pelo meio de diferenciação correspondente a linhagem a ser diferenciada, de acordo com o protocolo do fabricante, e mantido em estufa de cultivo celular com CO_2 a 37 °C e 5% umidade.

2.3.1. Linhagem osteogênica

Para a diferenciação em linhagem osteogênica foi utilizado o meio de cultivo contendo 90% de StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Chondrogenesis Supplement (Gibco™), 0,1% de estreptomicina e 0,1% de anfotericina B. Este meio foi trocado a cada três dias por 12 dias. Após este período, o meio foi descartado e as células foram fixadas com álcool 70%, lavadas com água destilada e coradas com 2 mL de Alizarin Red (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). Após adição do corante incubou-se as células por 30 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido este tempo, o corante foi lavado 4 vezes com água destilada e as células foram observadas no microscópio.

2.3.2. Linhagem adipogênica

Na diferenciação para linhagem adipogênica foi utilizado o meio diferenciação específico contendo 90% de StemPro Adipocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Adipogenesis Supplement (Gibco™), 0,1% de estreptomicina e 0,1% anfotericina B. Este meio foi trocado a cada três dias por 10 dias. Após este procedimento, as células foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e água destilada e, em seguida, foi adicionado 2mL de Oil Red-O Solution (Sigma-Aldrich Brasil Ltda). As células foram incubadas por 40 minutos em temperatura ambiente. Após este período foi removido o corante e lavou-se 3 vezes com água destilada. Em seguida adicionou-se 2 mL de solução de Hematoxilina durante 15 minutos para marcação do núcleo. Os poços foram lavados com água destilada para posterior observação no microscópio.

2.4. Caracterização das CTMs por Citometria de Fluxo

As CTMs provenientes do cultivo de quarta passagem foram caracterizadas por Citometria de Fluxo, utilizando citômetro de fluxo FACS Calibur (BD®), no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Para a realização da marcação, foi realizado um ajuste para que a suspensão celular fosse de 2 x 10^4 células para cada teste realizado. As células foram distribuídas em tubos Falcon BD®, específicos para Citometria de Fluxo.

Foram utilizados os marcadores positivos: CD90/Thy1, ICAM1 e marcadores negativos Cb11b, MHC-CLASS II CD34, CD45; também foi realizado um controle contendo somente células sem marcação.

Os anticorpos foram adicionados a uma diluição de 1:10 e, em seguida, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação, lavou-se as células com 1mL de PBS e centrifugou-se a 1500 rpm (340 G) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspendido com 1mL de PBS. Em seguida os tubos foram lidos em Citômetro de Fluxo.

2.5 Procedimento experimental *in vivo*

2.5.1 Animais

Para o estudo proposto foram utilizados 32 Ratos (*Rattus norvegicus*) machos, da linhagem *Wistar*, pesando aproximadamente 450g e provenientes do Biotério do Laboratório de Medicina Experimental, da UNESP, campus de Botucatu - São Paulo. Os animais foram aclimatados às condições do biotério, o qual constava de uma temperatura ambiente controlada de 21 ± 2 ºC e um ciclo de claro-escuro de 12/12 horas. Os ratos foram acondicionados em caixas apropriadas e separados por grupo, recebendo alimentação com ração de manutenção Labina-Purina® e água corrente *ad libitum*.

2.5.2 Desenho experimental

Os animais receberam, por via subcutânea, as seguintes associações de componentes:

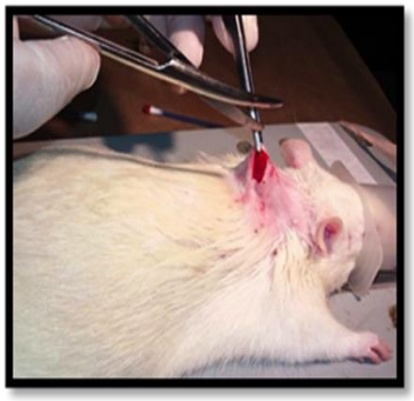
- Grupo 1: BPF + Osso homólogo particulado*;
- Grupo 2: BPF + CTM-MO + Osso homólogo particulado;
- Grupo 3: BPF + CTMs pré-diferenciadas + Osso homólogo particulado.

*O osso homólogo particulado foi retirado de 3 ratos da linhagem *Wistar*, com 3 meses de idade. Foram selecionados as tíbias e fêmures dos animais doadores, e os ossos foram triturados, pesados e inseridos nos animais de acordo com as respectivas associações **(Figura 1)**.

A



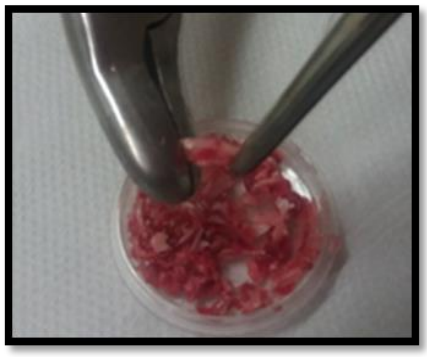
B



C



D



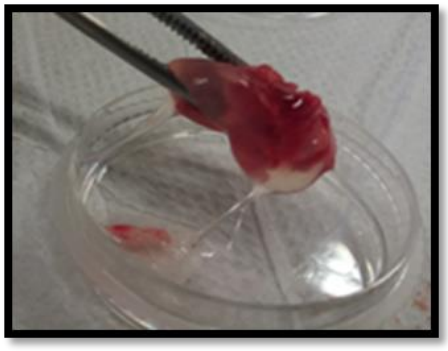
E



F



G



H

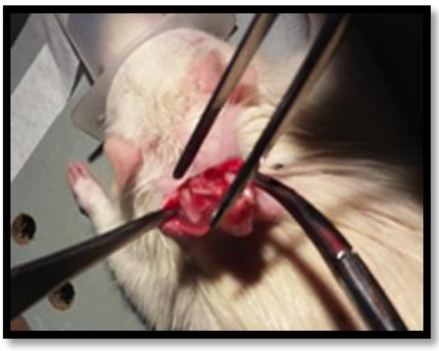


Figura 1. (A) Tricotomia pré-incisão; **(B)** Incisão cirúrgica com acesso subcutâneo para a aplicação do BPF e associações; **(C)** Ossos retirados dos animais doadores; **(D e E)** Ossos particulados para atuação como indutores; **(F)** BPF; **(G e H)** BPF, associações e inserção nos animais receptores.

2.5.3. Procedimento cirúrgico para a aplicação do BPF com as respectivas associações

Os animais foram pesados e anestesiados por anestesia geral e inalatória com Isoflurano (BioChimico®). Após indução anestésica, os animais foram posicionados em decúbito ventral e realizou-se a tricotomia da região de interesse. Após a tricotomia realizou-se um incisão de 1cm na pele na região do dorso do animal, abaixo do pescoço **(figura 1)**.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com o desenho experimental descrito no item 5.2, sendo 8 animais por grupo. As respectivas misturas\associações, foram fracionadas e misturadas em uma placa de cultivo celular estéril. Com o auxílio de uma pinça o material foi devidamente homogeneizado e inserido no espaço conjuntivo frouxo, entre o panículo carnoso e fáscia muscular.

O procedimento experimental/cirúrgico foi padronizado para todos os grupos. Os animais selecionados possuíam 3 meses de idade, pesavam aproximadamente 450g e tiveram aplicações no subcutâneo de 1g de BPF, 500 mg de osso particulado e, para o grupo com célula, $1x10^6$ células.

Após a cirurgia foi realizada a sutura e os animais retornaram ao biotério e receberam alimento e água *ad libitum* para sua completa recuperação. Receberam, analgesia pós-operatória com Flunixin-meglumine (Chemitec®) 2 mg/kg 2x ao dia, intramuscular durante dois dias.

2.6. Imageamento *In Vivo* e Tomografia computadorizada

Para confirmar a posição das associações aplicadas, foi realizado uma análise para localizar o enxerto logo a após a cirurgia, no equipamento de imageamento *in vivo* modelo MS FX PRO – Bruker do Laboratório de Regeneração Nervosa - Instituto de Biologia – UNICAMP. Vinte e quatro horas após a cirurgia, realizou-se uma tomografia micro-computadorizada no Departamento de Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina Veterinária –FMVZ-UNESP, Botucatu-SP.

2.6.1. Marcação celular

As células-tronco mesenquimais previamente cultivadas foram incubadas com nano marcadores cristais Qtracker 800 Cell Labeling Kit (Q25071MP – Life Technologies®). Para

isso, acrescentou-se 1 µL da solução A e 1 µL da solução B para cada 1 milhão de células a serem marcadas, após 5 min. Em temperatura ambiente, foi acrescido 200 µL de meio DMEM e então colocado 30 s no vórtex. Acrescentou-se essa solução ao precipitado celular, e incubou-se em estufa a 37ºC por uma noite.

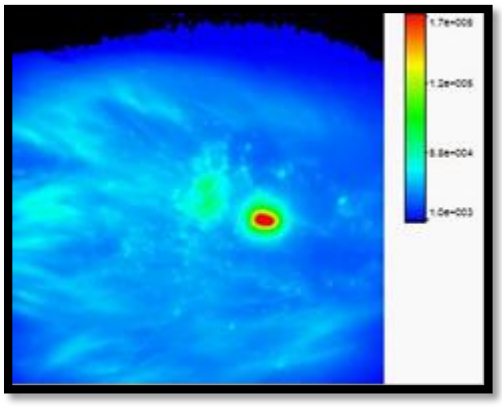
2.7. Avaliação histológica

O material coletado do subcutâneo dos animais, após 35 dias (período padronizado pós testes preliminares) foi pesado, descalcificado e fixados com formol 10% por 24h e descalcificadas em ácido fórmico por aproximadamente 30 dias. As amostras foram lavadas em água corrente durante a noite, desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados 5µm do tecido ósseo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE), Masson e Picrossirius.

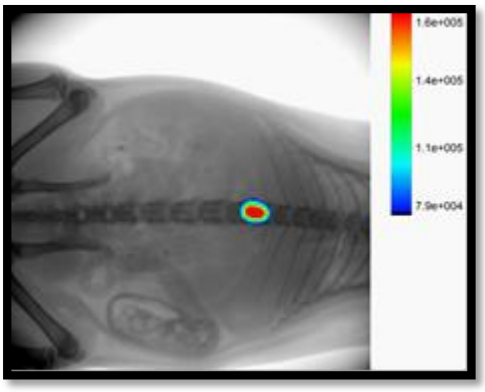
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O procedimento cirúrgico, estabelecido para todos os grupos, foi baseado no desenho experimental proposto por Yamada et al. (2003). Para a confirmação da posição do material inserido no dorso dos animais foram realizados os procedimentos de Imageamento *in vivo* com células previamente marcadas com o nano marcador Qtracker 800 Cell Labeling Kit (Q25071MP – Life technologies) e previamente caracterizadas (Anexo 2). A análise de imageamento foi realizada logo após a cirurgia. Devido à impossibilidade de acompanhar a evolução do processo cirúrgico pela análise fluorescência das células marcadas, realizou-se uma tomografia 24h pós cirurgia, como objetivo de confirmar a posição do enxerto.

A



B



C

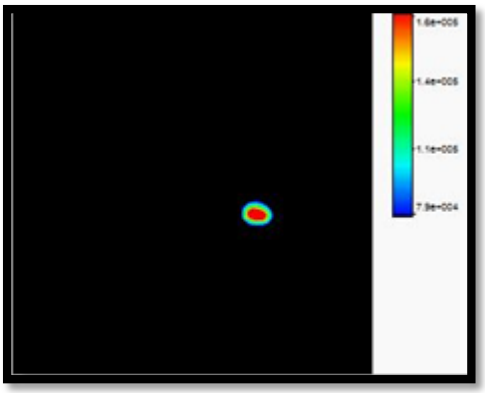


Figura 2. (A) Fluorescência da cirurgia no dorso, indicando a mistura da associação das células marcadas com o nano cristal Qtracker, BPF e osso homólogo; **(B)** Raio x com sobreposição da imagem de florescência cirurgia no dorso; **(C)** Imagem de florescência cirurgia no dorso, sem background.



Figura 3. Tomografia realizada 24h pós cirurgia para a confirmação da localização do enxerto.

Após o período de 35 dias os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico para a retirada do material formado. O material removido foi pesado e preparado para histologia. No grupo 1, o peso final do material inserido foi menor quando comparado a associação inicial com BPF, mas quando comparado ao peso de osso inicial (500 mg) foi maior, um indicativo da formação de novos tecidos **(tabela 2- anexo 3)**.

No grupo 2, os animais apresentaram resultados que diferiram do grupo 1: O peso final não foi maior quando comparado ao volume inicial de osso para todos os animais, 4 animais apresentaram peso final maior que o volume inicial de osso e 2 não **(tabela 3- anexo 3)**. Neste grupo, a adição de células contribuiu para uma maior resposta inflamatória e uma rejeição do enxerto, causado pela resposta imune do animal receptor. Este processo de rejeição também foi observado no grupo 3, o qual possuía células previamente diferenciadas em osteócitos onde, dentre os 8 animais utilizados, nenhum apresentou resultado a ser analisado; ou seja, o material inserido não foi encontrado.

Quando biomateriais são implantados *in vivo*, uma série de reações biológicas é desencadeada. No entanto, a resposta do primeiro hospedeiro aos implantes é uma resposta imune inata (reação de corpo estranho)[11]. Vários tipos de células imunes são recrutadas sequencialmente para o local do implante e desencadeiam reações imunes. Todavia, uma resposta imunológica aguda ou grave irá prejudicar o processo de osteogênese e resultar no encapsulamento do implante[12]. Em contraste, uma resposta imune antiinflamatória adequada induzida pelo implante é benéfica para reparo ósseo e angiogênese[3]. Assim, um biomaterial imunomodulador que pode regular células imunes para secretar citocinas osteogênicas e manter um microambiente imune ideal para o reparo ósseo deve ser promissor em aplicações clínicas[13].

Nos transplantes alogênicos em terapias com uso de CTMs, antígenos de histocompatibilidade maiores e menores de células podem ser reconhecidos como estranhos e levar à sua rejeição pelo sistema imune do hospedeiro[14]. Se uma resposta imune do hospedeiro for identificada na primeira semana após o transplante, terapias imunomoduladoras podem ser aplicadas para corrigir estas falhas, além de dar suporte ao enxerto[14]. Estas terapias consistem em avaliar as etapas dos processos de resposta do sistema imune do hospedeiro como: localizar e identificar respostas imunes inatas a transplantes de células-tronco, rastreamento de macrófagos ou detecção de mediadores de morte celular [15].

A regulação destes fatores em enxertos com o uso de CTMs mostraram resultados promissores. As CTMs possuem poderosa capacidade de imunossupressão. O fator de crescimento transformador-β (TGF-β) é uma citocina anti-inflamatória bem conhecida e desempenha um papel importante em vários processos inflamatórios[16]. Zhao et al., (2018), avaliaram o TGF-β, na inversão do efeito imunossupressor das células-tronco mesenquimais

em camundongos em modelos de enxerto de pele sendo que o estudo concluiu que O TGF-β inverteu parcialmente o efeito imunossupressor das CTMs *in vivo*. Esta característica imunorregulatória podem ter aplicações potenciais para o tratamento da rejeição de transplantes.

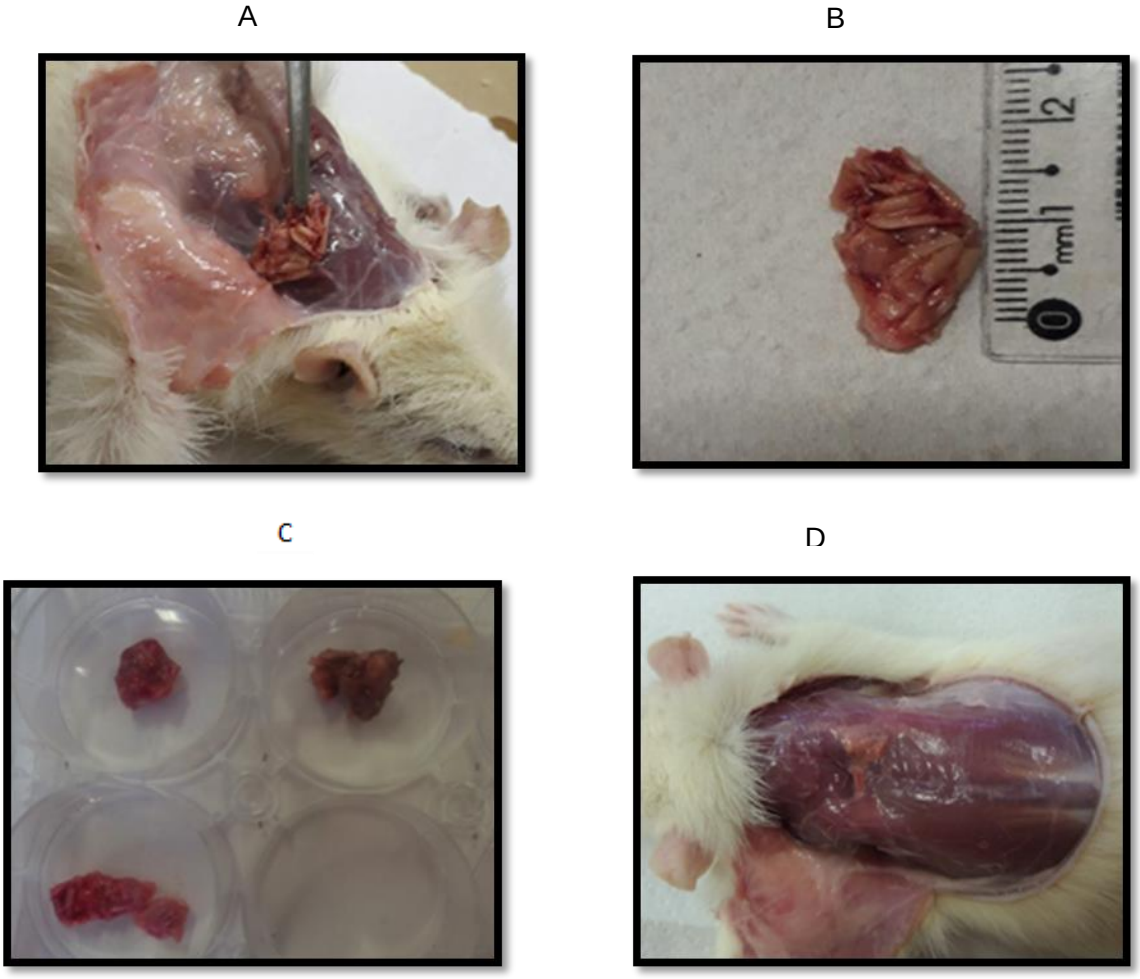


Figura 4. (A e B) Retirada do tecido formado; **(C)** amostras preparadas para descalcificação; **(D)** animais do grupo 3 onde o enxerto não foi encontrado.

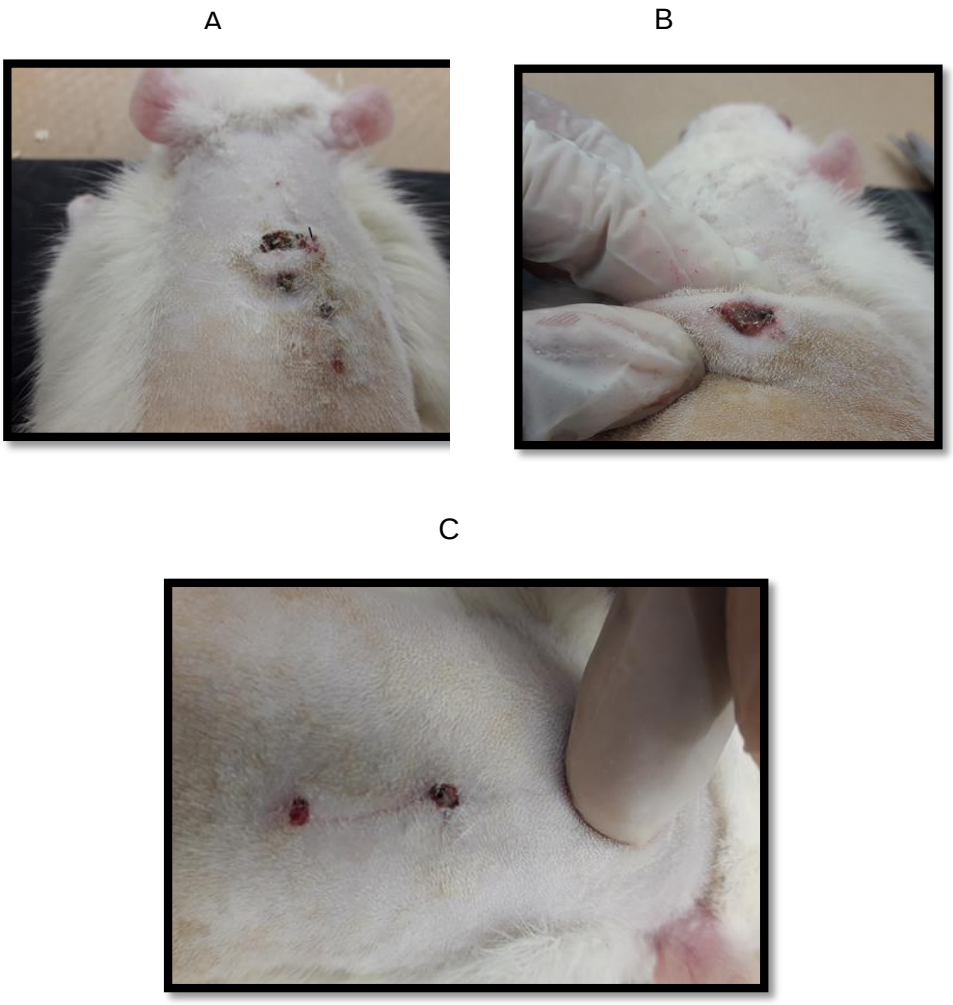


Figura 5. (A, B e C) Animal do grupo 3, avaliação do processo de rejeição do enxerto durante o processo de cicatrização pós cirúrgico

Os resultados obtidos através das análises histológicas forneceram dados descritivos das mudanças nos tecidos formados, facilitando a comparação entre os grupos 1 e 2. No grupo 1 pode-se observar uma baixa resposta inflamatória e a formação de um tecido conjuntivo predominantemente denso, com fibras colágenas abundantes, paralelas e bem alinhadas, circundante aos fragmentos de osso homólogo (Figura 6).

O tecido conjuntivo denso ou modelado tem como principais características ser um tecido pouco vascularizado e receber os nutrientes por difusão. Desenvolve um papel de grande importância visto que fornece resistência às forças de estiramento e tração; envolve órgãos, glândulas e outros tecidos, formando cápsulas e envoltórios; auxilia na sustentação e levando vasos e nervos, e é responsável pela cicatrização[17,18].

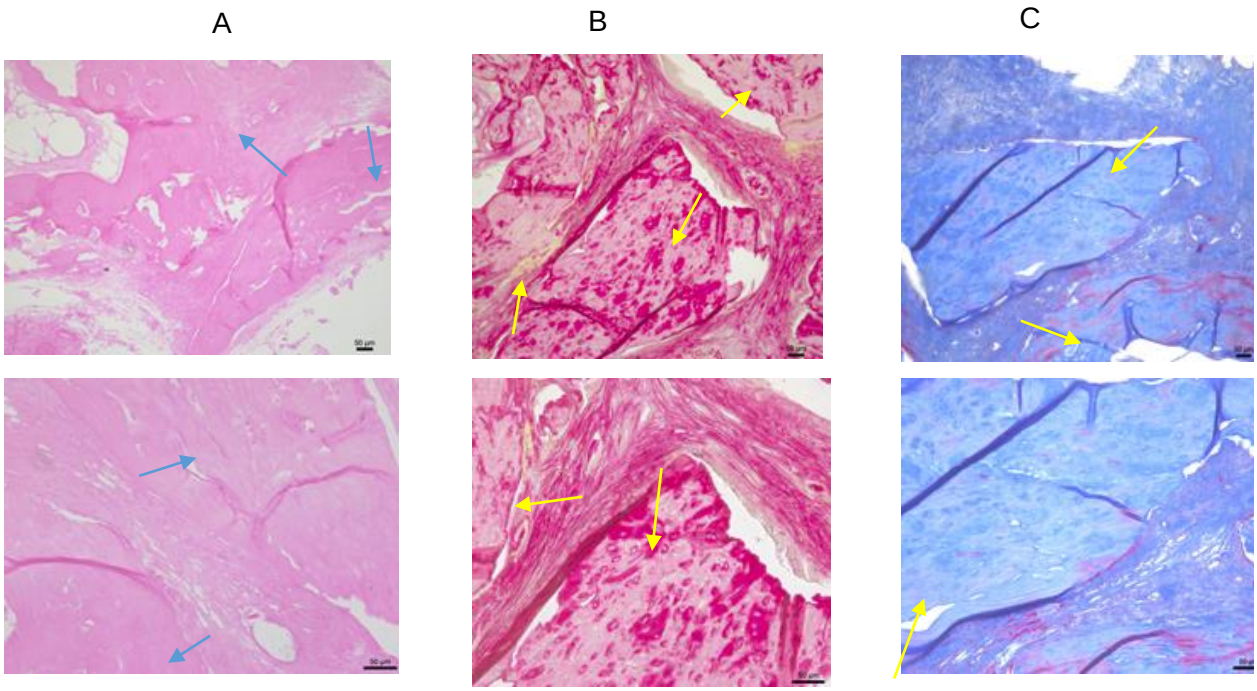


Figura 6. Amostra Grupo 1; **(A, B e C)** colunas representando as 3 colorações utilizadas, HE, Picrossirius e Masson (Aumentos, (10x e 20x); As setas indicam os fragmentos do osso homólogo.

O resultado do grupo 1 diferiu do grupo 2, que após o mesmo período de 35 dias apresentou intensa resposta inflamatória. Neste grupo, dos 8 animais submetidos a cirurgia, apenas 6 apresentaram resultados a serem analisados (Figura 7).

No grupo 2 além da resposta inflamatória intensa, foi possível identificar a presença de fibroblastos, alguns vasos sanguíneos, grandes quantidades de adipócitos e células de Langerhans, distribuídos em um tecido conjuntivo frouxo e com fibras mais desorganizadas[19].

O tecido conjuntivo frouxo é rico em diversidade celular tais como células mesenquimais, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, leucócitos e células adiposas, e possui rica matriz extracelular composta por fibras colágenas, elásticas e reticulares. Devido à disposição frouxa das fibras, o tecido apresenta-se flexível, sendo assim pouco resistente às trações[20].

A presença de fibroblastos e adipócitos são um ponto de destaque no tecido formado do grupo 2. Os fibroblastos possuem a função de sintetizar matriz extracelular com destaque para o colágeno, auxiliam no alinhamento das fibras colágenas no sentido do estresse tensional[19,20]. Em diferentes sistemas os fibroblastos suportam a homeostase do tecido e moldam as respostas imunes[20].

A significativa formação de tecido adiposo pode também estar relacionada com os fibroblastos e as citocinas inflamatórias que estes liberam durante o processo de formação do tecido[21].

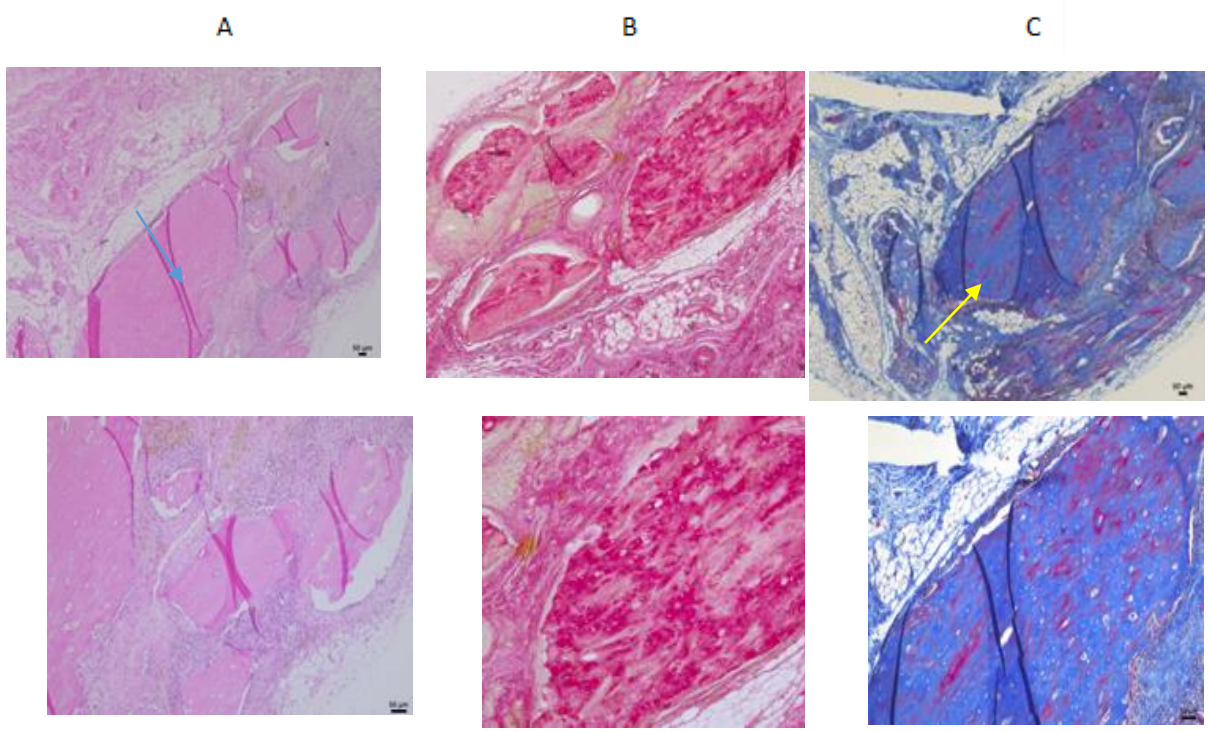


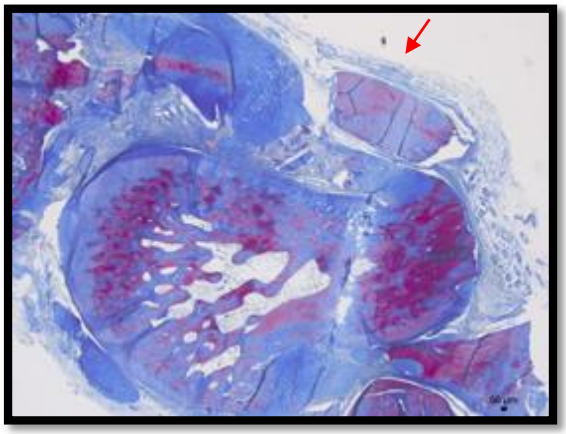
Figura 7. Amostra grupo 2 35 dias após implante; **(A, B, C)** colunas representando as 3 colorações utilizadas, HE, Picrossirius e Masson (Aumentos 2.5X, 5x); As setas indicam os fragmentos do osso homólogo.

A adipogenênese envolvida em processo inflamatório e relacionada com fibroblastos foi relatada por Xiong et al. (2018) em estudos oftalmológicos, e indicaram que fibroblastos orbitais, além de produzirem citocinas inflamatórias, também se diferenciam em adipócitos para produzir lipídios na órbita, o que pode agravar o quadro inflamatório[21].

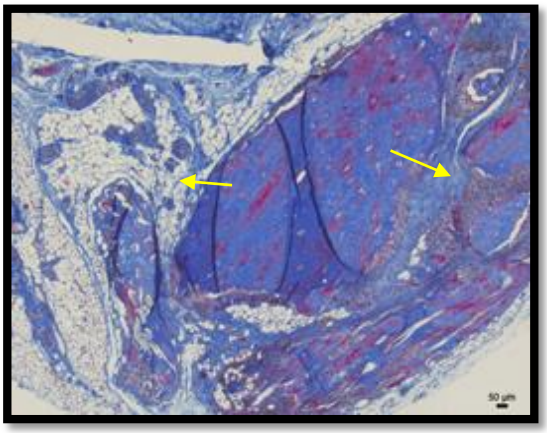
Os fibroblastos também podem alimentar um ciclo de inflamação, produzindo quimiocinas que recrutam leucócitos para o tecido lesionado, onde esses estimulam continuamente um ao outro para manter a inflamação crônica[22].

A inflamação é uma parte normal da cicatrização e regeneração de feridas e tecidos e é importante na remoção de microrganismos. A remoção incompleta de bactérias e endotoxinas pode levar a infecções na superfície da pele lesada, prolongando a fase inflamatória; tal prolongamento da fase inflamatória contribui para uma falha na cicatrização. Tal processo também pode levar a níveis aumentados de metaloproteinases de matriz, que podem degradar a matriz extracelular[23].

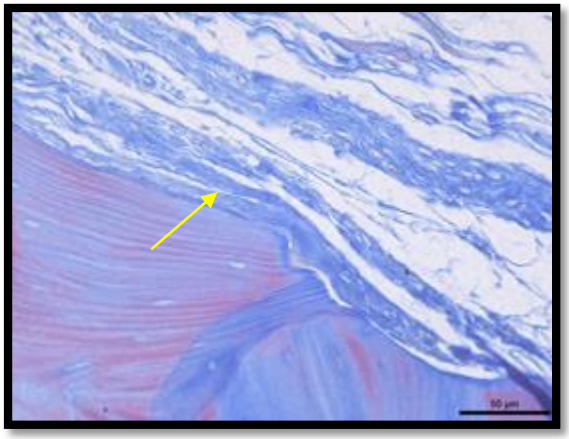
A



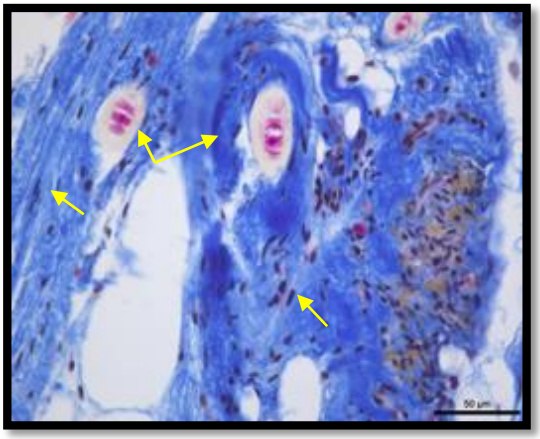
E



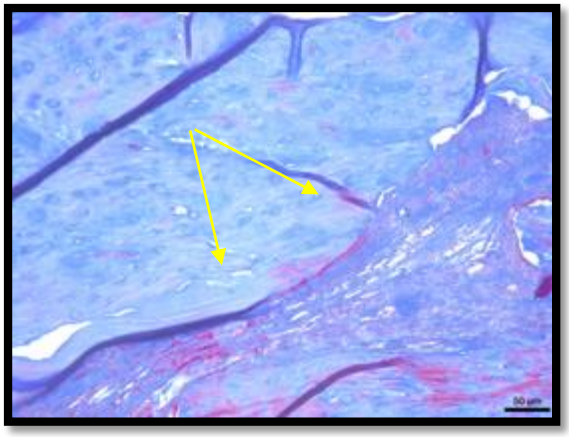
B



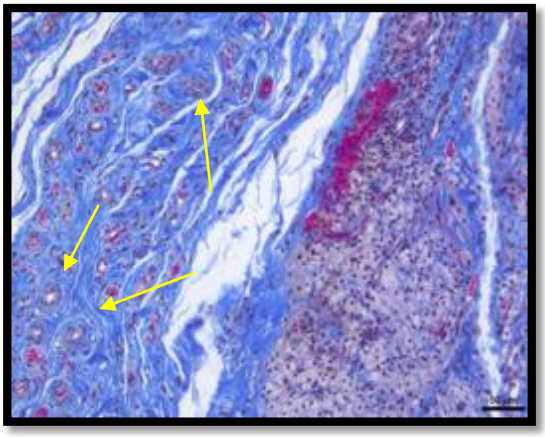
F



C



G



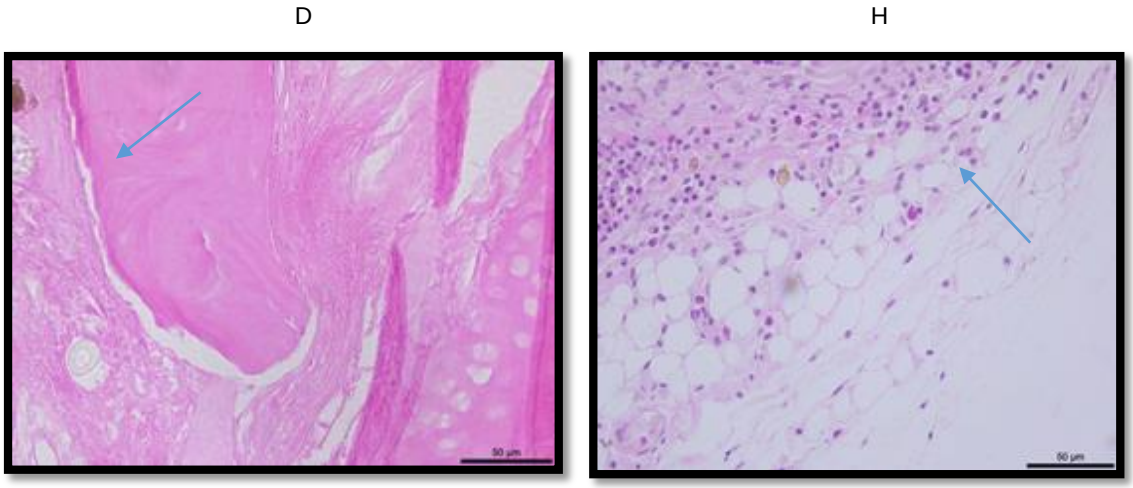


Figura 8. (A,B, C e D); Grupo 1; **(E, F, G e H)** Grupo 2; **(A)** visualização completa do material,fragmentos ósseos envoltos por tecido conjuntivo, aumento de 2,5x; **(B)** tecido conjuntivo aumento 20x, **(C)** tecido sem vestígios de resposta inflamatória aumento 20x; **(D)** vasos sanguíneos aumento 20x. **(E)** visualização completa do material,fragmentos ósseos envoltos por tecido conjuntivo, grande número de adipócitos e indicativos de reposta inflamatória, aumento 2,5 x; **(F)** fibroblastos e vasos sanguíneos aumento 20x **(G)** células de langerhans **(H)** adipócitos; **(A,B,C,E,F e G)** Coloração Masson; **(D e H)** Coloração HE.

Cooper et al. (2018) apontara, outro fator importante: a capacidade sinalizadora de algumas células tronco, como por exemplo as originadas do tecido adiposo, de recrutar fibroblastos dérmicos humanos *in vitro.* Estas células liberam exossomos e vesículas que escapam da resposta imune do hospedeiro na terapia celular, e mostraram boa capacidade de cicatrização ao atraírem os fibroblastos *in vitro* [24].

Ao que se refere a migração celular, o Grupo 2 também apresentou células de Langherans. As células de Langerhans (CL) são um tipo de células dendríticas encontradas em tecidos linfóides e não linfóides. Nos tecidos não linfoides são especializados na defesa e processamento de antígenos estranhos. Nesse contexto, apresentam uma importante função imunológica e estímulo da resposta imune, participando da ativação dos linfócitos T, além de serem responsáveis por secretarem citocinas e expressarem receptores de superfície, sendo as principais células apresentadoras de antígeno do sistema imune[25].

As células de Langerhans são a causa da histiocitose, um distúrbio do sistema retículo endotelial, que leva a uma proliferação desordenada de células dendríticas e envolve tegumento, ossos e vísceras. Mesmo com a característica de multiplicação desordenada de células, a histiocitose não tem sido considerada doença neoplásica, mas uma proliferação celular ou disfunção imune[26].

O perfil de citocina é algo importante a ser considerado nesta avaliação entre os grupos, principalmente quando observamos as diferenças de resposta inflamatórias. Park et al., (2018) relataram a capacidade das citocinas liberadas por macrófagos de recrutarem células

tronco mesenquimais para a superfície de titânio de implantes ósseos e assim afetarem a cicatrização biológica. O estudo das citocinas presentes no sítio do material inserido pode auxiliar na modulação deste ambiente, proporcionando uma melhora no processo de formação do novo tecido[27].

As citocinas também estão envolvidas no processo de formação óssea. Recentemente, as vesículas extracelulares têm atraído maior atenção devido à sua função na reparação óssea, o que se tornou uma vantagem sobre a terapia celular tradicional. Além disso, as vesículas extracelulares derivadas das CTMs provavelmente atingirão a meta osteogênica por meio da modulação das células e citocinas envolvidas no metabolismo ósseo[28].

Os avanços dos últimos anos na imunologia e a compreensão aprofundada da remodelação óssea levaram ao surgimento de uma nova palavra, “osteoimunologia” [29], indicando a estreita relação entre o sistema imunológico e o sistema esquelético. As células imunes no osso podem influenciar a remodelação e a reabsorção óssea devido ao conjunto de moléculas sinalizadoras, citocinas e receptores que compartilham com o sistema esquelético um perfil imunológico favorável para alcançar uma osteointegração satisfatória[28].

As citocinas liberadas pelas células imunes são consideradas fatores importantes para induzir a regeneração do tecido ósseo. No entanto, o caminho para a atuação dessas citocinas macrofágicas com direcionamento ósseo, induzidas pelo contato com biomaterial e sob o microambiente tecidual é raramente relatada[23].

7. Conclusão

O BPF serviu de arcabouço tanto para o osso homólogo quanto para as células tronco mesenquimais. Ao associar este bioproduto com osso homólogo, o mesmo mostrou-se capaz de manter suas propriedades estáveis por tempo suficiente para que a formação tecidual no entorno do osso doador se iniciasse.

Com a associação entre BPF e as células foi obtido resultado semelhante. A resposta infamatória intensa no local do enxerto indica que as CTMs permaneceram no local durante o processo, inclusive ativando os mecanismos de resposta imune do hospedeiro.

No que diz respeito a utilização de células, os resultados da aplicação direta nos enxertos não trouxe benefícios para este estudo; pelo contrário, prolongou o período inflamatório, o qual, de acordo com descritos na discussão, pode ser prejudicial para recuperação e formação de novo tecido.

Porém, sem estudos aprofundados dos mecanismos envolvidos nestes processos, não podemos concluir que a utilização de células para esta aplicação não é recomendada.

8. Referências

1. FISHER, M.B., & MAUCK,R.l. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Recent Innovations and the Transition to Translation.**Tissue Eng Part B Rev.** 2013 Feb; 19(1): 1–13. Published online 2013 Jan 18. doi: [10.1089/ten.teb.2012.0723]

2. Puente P. DE LA, et al. Autologous fibrin scaffolds cultured dermalfibroblasts and enriched with encapsulated bFGF for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 2011; 99:648–654.

3. Barbantil S.H.et al. Polímeros bioreabisoríveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 2005;15(1):13-21.

4. Yang S., et al. The design of scaffolds for use in tissue engineering. **Part I. Traditional factors. Tissue Eng**. 2001; 7:679–689.

5. Chang, H.M., et al. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) -based scaffolds for tissue engineering. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2014; 47(7): 533-539.

6. Barros L.C., et al. A new fibrin sealant from Crotalus durissus terrificus venom: Applications in Medicine. **J Toxicol Environmental Health, Part B**, 2009;12(8):553-71.

7. Ferreira R.S Jr, et al. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside - an overview. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2017 Apr 4;23:21. doi: 10.1186/s40409-017-0109-8.

8. Gasparotto VPO, et al. RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy, 2014, 5:78.

9. Orsi PR,et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. Stem Cell Res Ther. 2017 Sep 29;8(1):205. doi: 10.1186/s13287-017-0654-7.

10. Yamada Y., et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrina glue with a biodegradable scaffold. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**.2003; 31:27–33.

11. Kohli N., et. al. Bone remodelling in vitro: Where are we headed? -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials *in vitro*. **Bone** 2018; 110, 38

12. Wistlich L., Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Adv. Funct. Mater**. 2017, 27, 1702903;

13. Sadtler K., et. al. Regulation of the Stem Cell-Host Immune System Interplay Using Hydrogel Coencapsulation System with an Anti-Inflammatory Drug. **Nat. Rev. Mater.** 2016, 1, 16040;

14. NEJADNIK H., et. al. Magnetic resonance imaging of stem cell-macrophage interactions with ferumoxytol and ferumoxytol-derived nanoparticles. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**. 2019; 7-1552. doi: 10.1002/wnan.1552. [Epub ahead of print]

15. Zhao J., et. al., Transforming Growth Factor-β Partially Reversed the Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stem Cells in Mice. **Transplant Proc.** 2018; 50(10):3851-3857. doi: 10.1016/j.transproceed.2018.08.054. Epub 2018 Sep 7.

16. Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

17. Deus, G.C., et al. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. **Einstein**. 2012;10(3):296-301

18. Lowe, J. S.; et al. **Human Histology**. 4.ed. Philadelphia: Elsevier, Mosby, 2015. pp. 49, 363.

19. Ham, A. W.; CORMACK, D. H. **Histologia.** 8.ed. Rio de Janeiro

20. Sorrell J.,M., Caplan A.,I Fibroblast diversity and significance of interactions with other cell types, especially in the skin. **Int Rev Cell Mol Biol**. 2009; 276:161–214.

21. Xiong,H., et al. Chitosan inhibits inflammation and adipogenesis of orbital fibroblasts in Graves ophthalmopathy. **Molecular Vision** 2018; 24:509-517.

22. Kamil S., et.al. Functional genomics of stromal cells in chronic inflammatory diseases. **Curr Opin Rheumatol**. 2018; 30(1): 65–71.

23. GUITERAS, R. et al. Exploring macrophage cell therapy on Diabetic Kidney Disease. **J Cell Mol Med**. 2018;1–11.

24. COOPER, D.R., et al. Human Adipose-Derived Stem Cell Conditioned Media and Exosomes Containing MALAT1 Promote Human Dermal Fibroblast Migration and Ischemic Wound Healing. **Advances in wound**. 2018, Volume 7, Number 9.

25. Tripode, M.A.B.; et al. Histiocitose de células de Langerhans em lactente - Relato de caso e revisão da literatura. **Residência Pediátrica** 2015;5(2):82-85.

26. Ximenes F. et al. Células de Langerhans no epitélio da prega vocal humana: estudo imunoistoquímico. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** São Paulo, v.70, n. 5, p. 584-588, Oct. 2004 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00372992004000500002&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Nov. 2018. http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992004000500002.

27. Park, J., et al. Effects of Surface Nanotopography and Calcium Chemistry of Titanium Bone Implants on Early Blood Platelet and Macrophage Cell Function. **Hindawi BioMed Research International** Volume 2018, Article ID 1362958.

28. 57. Liu, W., et al. Zinc-Modified Sulfonated Polyetheretherketone Surface with Immunomodulatory Function for Guiding Cell Fate and Bone Regeneration. **Adv. Sci**. 2018, 5, 1800749

29. Spiller K., L. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. **Biomaterials**. 2015 Jan;37:194-207. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.10.017.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

unesp

FMB

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1137/2015-CEUA

Projeto de Pesquisa **(Protocolo CEUA 1137-2015) Selante de fibrina como arcabouço biológico para células tronco mesenquimais como potencial produtor osteogênico**, a ser conduzido por Patrícia Rodrigues de Lima, orientado pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

Vigência do projeto	01/03/2019
Espécie/Linhagem	Ratos Wistar
Nº de animais	50
Peso/Idade	200 a 300 gramas – 10 dias a 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério do Campus de Botucatu - UNESP

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 28/05/2015

Profª. Adjunta Noeme Sousa Rocha
Vice-Presidente da CEUA

Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: kleber@fmb.unesp.br

ANEXO 2

I- Caracterização celular

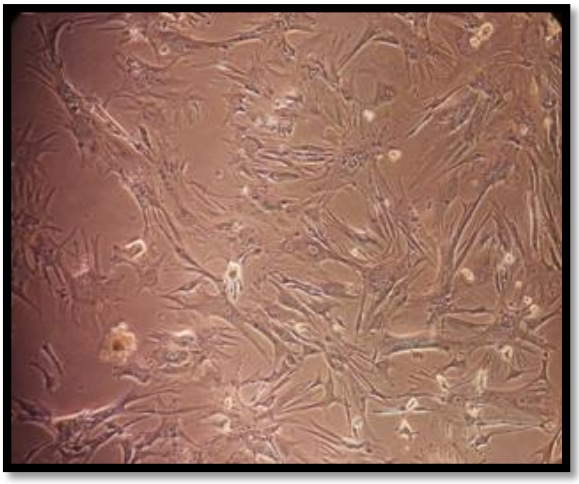


Figura 9. Células tronco mesenquimais de origem de medula óssea (CTM-MO) indiferenciadas.

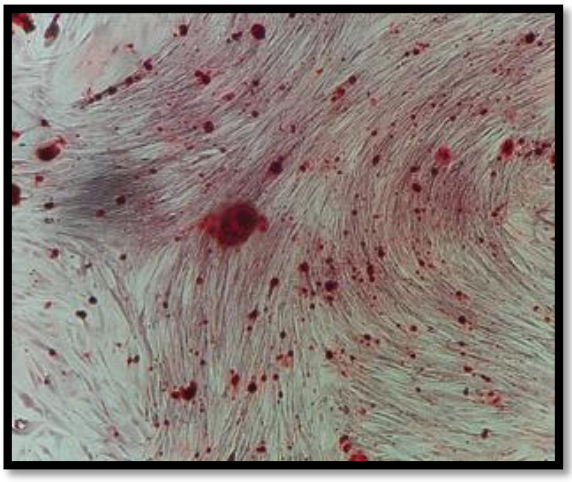


Figura 10. CTM-MO diferenciadas em osteócitos. Coloração Alizarin Red indicando a deposição de cálcio realizada pelos osteócitos no meio extracelular

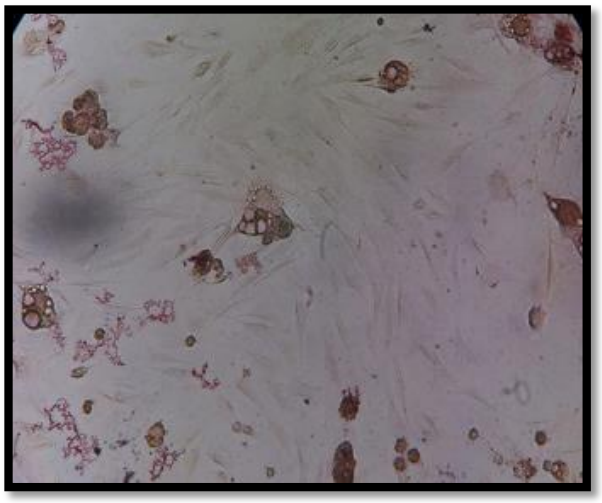


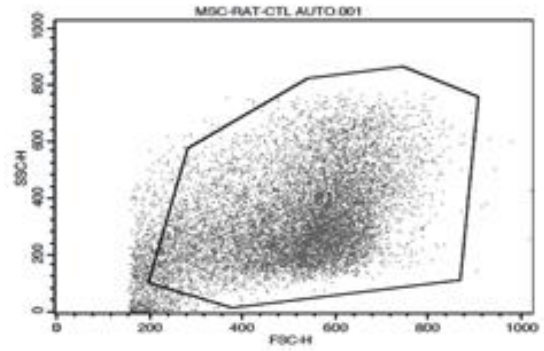
Figura 11. CTM-MO diferenciadas em adipócitos. Coloração das células com Oil Red-O Solution indicando a presença de gotas de lipídeos no interior das células.

II- Citometria de Fluxo

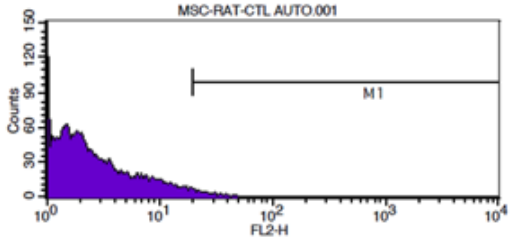
Tabela 1. Marcadores celulares utilizados na Citometria de Fluxo

Controles	Marcadores positivos	Marcadores Negativos
Só célula	CD 90	CD 11b
	ICAM1	CD 45
		CD 34

A



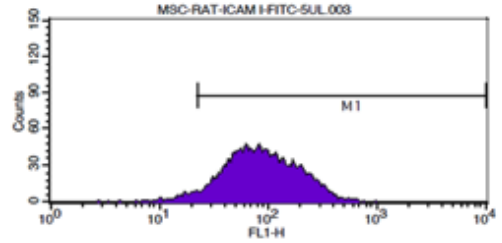
B



Sample ID: MSC-RAT-CTL AUTO
Acquisition Date: 24-Apr-18
Gate: G1
Gated Events: 10536
Total Events: 11475

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
All	10538	100.00	91.83	1.96
M1	206	1.95	1.80	24.69

C

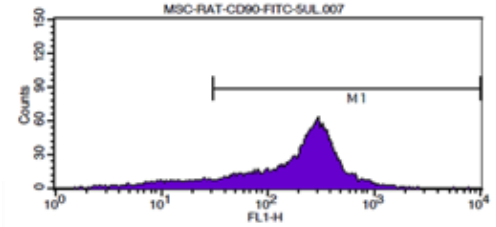


Sample ID: MSC-RAT-ICAM I-FITC-5UL
Acquisition Date: 24-Apr-18
Gate: G1
Gated Events: 9243
Total Events: 10000

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
All	9267	100.00	92.67	81.31
M1	8848	95.48	88.48	85.05

UTILIZAR 5uL

D



Sample ID: MSC-RAT-CD90-FITC-5UL
Acquisition Date: 24-Apr-18
Gate: G1
Gated Events: 9233
Total Events: 10000

Marker	Events	% Gated	% Total	Median
All	9261	100.00	92.61	218.70
M1	8130	87.79	81.30	243.62

UTILIZAR 5uL

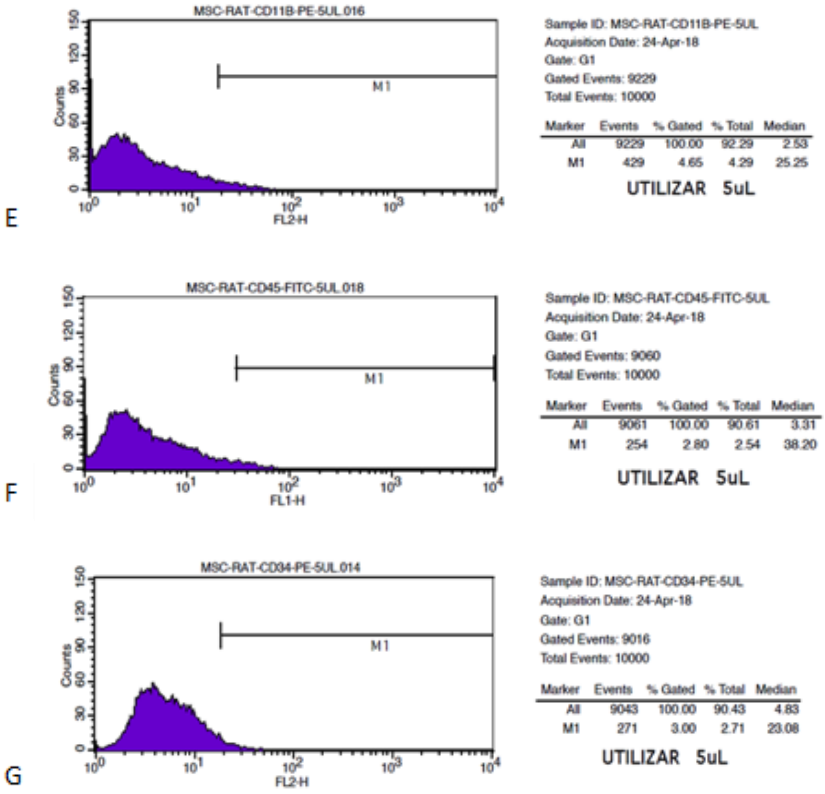


Figura 12. **(A)** População de células analisadas; **(B)** Controle auto fluorescente só células; **(C e D)** Marcadores positivos ICAM1 e CD90; **(E, F e G)** Marcadores negativos CD11b, CD45 e CD34. As CTM-MO foram caracterizadas por citometria de fluxo. Para a citometria foram utilizados os marcadores da **tabela 1**. Na figura estão apresentados os gráficos com os valores representativos de expressão de cada marcador. O gráfico A representa a população de células avaliadas, B indica o controle auto fluorescente das células. Os marcadores positivos ICAM1 e CD 90 estão representados nos gráficos C e D tiveram gated de 95,49% e 87,79% respectivamente confirmando a expressão positivas dos marcadores de superfície. Os marcadores negativos CD11b, CD45 e CD34 estão representados nos gráficos E, F e G tiveram gated de 4,65%, 2,80% e 3,00% respectivamente, a baixa expressão confirma a expressão negativas dos marcadores.

ANEXO 3

Tabela 2. Grupo 1 peso inicial (BPF + Osso homólogo particulado) e peso final do material inserido.

Grupos	Peso inicial	Peso final
Grupo 1	1168,6 g	0,751 mg
	1157,2 g	0,676 mg
	1154,8 g	0,798 mg
	1165,3 g	0,503 mg
	1166,1 g	0,689 mg
	1148,0 g	0,735 mg
	1157,6 g	0,630 mg
	1168,3 g	-

Tabela 3. Grupo 2 peso inicial (BPF + CTM-MO + Osso homólogo particulado) e peso final do material inserido.

Grupos	Peso inicial	Peso final
Grupo 2	1205,5 g	0,826 mg
	1198,6 g	0,536 mg
	1202,3 g	0,411 mg
	1208,1 g	0,539 mg
	1197,7 g	0,685 mg
	1205,3 g	0,389 mg
	1199,4 g	-
	1200,3 g	-

ANEXO 4

I- RT-qPCR (PCR quantitativo em tempo real)

Este experimento está aguardando a chegada do material para a sua realização.

II- Extração do RNA total

Para obtenção de dados sobre a formação de novos tecidos e da influência do processo inflamatório envolvido neste processo, será realizado o qRT-PCR. Os animais serão anestesiados da mesma forma como descrito no item 5.3, Em seguida, o material formado será retirado. Para a extração do RNA total, o material obtido será congelado com nitrogênio líquido, lisado e será adicionado o trizol (Qiazol). O tecido lisado, será completamente homogeneizado.

A solução resultante será incubada por 5min, à temperatura ambiente para dissolução de complexos protéicos. Será adicionado 200µL de clorofórmio, seguida de vigorosa agitação. Uma nova incubação será realizada por 5min, à temperatura ambiente e posterior centrifugação (12.000 rpm, 15min, 4° C) para a remoção do sobrenadante que contém o RNA. Este sobrenadante será purificado com o kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen - cat nº 74804) que consiste em sucessivas centrifugações em colunas e tratamentos com tampões específicos. Ao final do processo o RNA será eluído em 20µL de água RNase free e mantido no biofreezer (- 80 °C) até o momento do uso.

III - Primers

Para as análises de qRT-PCR, serão utilizados dois grupos de primers, os primers para identificação de genes relacionados a formação óssea (**Tabela 4**) e primers que avaliam os genes de citocinas envolvidas no processo inflamatório (**Tabela 5**).

Tabela 4. Primers para genes relacionados a formação óssea

Primer	Sequências
GAPDH	GGCATGGACTGTGGTCATGAG- Forward
GAPDH	TGCACCACCAACTGTTAGC- Reverse
ALP	ACCATTCCCACGTCTTCACATTT- Forward
ALP	AGACATTCTCTCGTTCACCGCC-Reverse
BMP2	GTATCGCAGGCACTCAGGTC- Forward
BMP2	CACTTCCACCACGAATCCAT- Reverse
Col1	CACTGGTGATGCTGGTCCTG-Forward
Col1	CGAGGTCACGGTCACGAAC- Reverse
OCN	CCTCACACTCCTCGCCCTATT-Forward
OCN	CCCTCCTGCTTGGACACAAA- Reverse
OPN	GTACCCTGATGCTACAGACG- Forward
OPN	TTCATAACTGTCCTTCCCAC- Reverse
Osterix	CCAGGCAACACTCCTACTCC-Forward
Osterix	GCCTTGCCATACACCTTGC- Reverse
Runx2	ACTTCCTGTGCTCGGTGCT-Forward
Runx2	GACGGTTATGGTCAAGGTGAA-Reverse

Tabela 5. Primers para ensaio TaqMan, para genes de citocinas.

Primer	Código
TNF-α	Rn01525859_g1
IL-6	Rn01410330_m1
IL-1β	Rn00580432_m1
IL-10	Rn00563409_m1
IL-4	Rn01456866_m1
IL-13	Rn00587615_m1
TGF-β	Rn00572010_m1

IV- Resultado Parcial (Genômica)

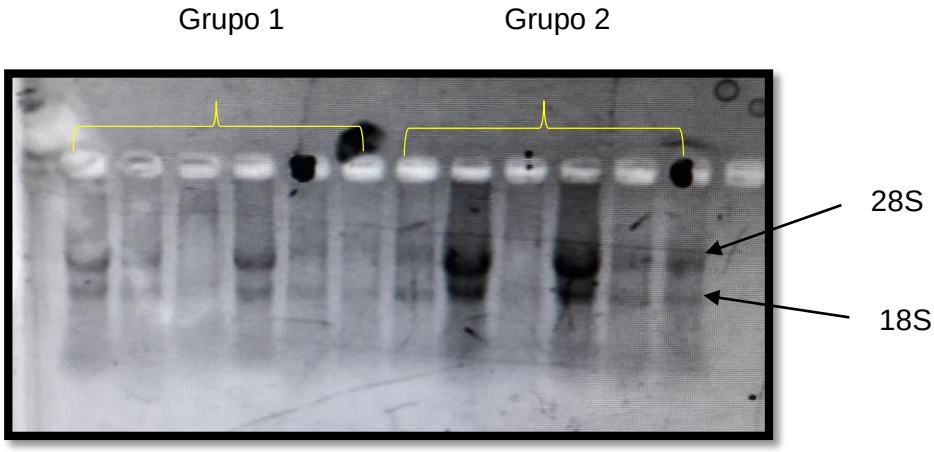


Figura13. Extração de RNA total ribossomal (18s/28s) para análise de qRT-PCR das amostras dos grupos1 e 2.