



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Idiberto José Zotarelli Filho

Investigação do potencial de utilização em terapia celular de células tronco mesenquimais cultivadas em matrizes de quitosana-colágeno-genipina, em petakas e após criopreservação

São José do Rio Preto
2018

Idiberto José Zotarelli Filho

Investigação do potencial de utilização em terapia celular de células tronco mesenquimais cultivadas em matrizes de quitosana-colágeno-genipina, em petakas e após criopreservação

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular (Área de Pesquisa em Novos Materiais, Biomateriais e Aplicações Tecnológicas), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140871/2015-2

Orientador: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio

Co-orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto
2018

Zotarelli Filho, Idiberto José.

Investigação do potencial de utilização em terapia celular de células tronco mesenquimais cultivadas em matrizes de quitosana-colágeno-genipina, em petakas e após criopreservação / Idiberto José Zotarelli Filho. – São José do Rio Preto, 2018

129 f.: il.

Orientador: Marinônio Lopes Cornélio

Coorientador: Agnes Cristina Fett Conte

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Células-tronco. 4. Engenharia tecidual. I. Título.

CDU – 577.3

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Idiberto José Zotarelli Filho

Investigação do potencial de utilização em terapia celular de células tronco mesenquimais cultivadas em matrizes de quitosana-colágeno-genipina, em petakas e após criopreservação

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular (Área de Pesquisa em Novos Materiais, Biomateriais e Aplicações Tecnológicas), do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq – Proc. 140871/2015-2

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Elias Naim Kassis
Unorp/Unipós – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Andreia Borges Scriboni
Unorp/Unipós – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
07 de Dezembro de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico a presente Tese de Doutorado a Deus por toda Graça cedida e por toda Benção alcançada.

Também dedico aos meus pais Idiberto José Zotarelli e Célia Garcia Pícolo Zotarelli, à minha esposa Miriam Cristina da Silva Zotarelli, aos meus filhos Miguel José Silva Zotarelli e Luiz Felipe Silva, bem como à minha irmã Bárbara Camila Zotarelli, ao meu cunhado Vinícius Barbosa Cruz e minha sobrinha Giovanna Zotarelli Cruz por todo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus por sua imensurável e incondicional ajuda em todos os meus passos e em todas as minhas conquistas, pois Ele me capacitou para a realização do presente trabalho.

Agradeço imensamente à minha esposa Miriam Cristina da Silva Zotarelli por toda atenção e carinho que tem prestado ao longo de todo o meu trabalho, por todo seu apoio e dedicação por mim.

Agradeço aos meus filhos Miguel José Silva Zotarelli e Luiz Felipe Silva por todo amor, carinho e inspiração.

Agradeço aos meus pais por todo investimento e dedicação incondicional por mim, por todo trabalho e confiança que depositaram em mim e nos meus esforços, pois esse trabalho foi realizado em conjunto.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio pelo enorme apoio, incentivo e dedicação ao meu trabalho desde o início do programa.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte pelo forte apoio em pesquisas em genética, pelo meu treinamento de 2 anos em análises cromossômicas e por toda disposição em me ensinar.

Agradeço ao Prof. Dr. Elias Naim Kassis pelo imenso apoio em pesquisas com células tronco, em especial, pelo fomento de pesquisa com células tronco no Laboratório Mitosis, no Hospital Beneficência Portuguesa, São José do Rio Preto/SP.

Agradeço as profas Dras. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, Patrícia Simone Leite Vilamaior e Andreia Borges Scriboni por toda ajuda e participação na minha banca de defesa de doutorado, fizeram uma brilhante análise da minha tese.

Não que sejamos capazes, por nós, de pensar alguma coisa, como de nós mesmos; mas a nossa capacidade vem de Deus.

(II Coríntios 3:5)

RESUMO

Introdução: A terapia de tecidos e órgãos artificiais tem resultado no aumento da expectativa de vida de milhares de pessoas, sendo que uma a cada cinco com mais de 65 anos já foi beneficiada com tecidos e órgãos gerados *in vitro*. Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias de desenvolvimento e otimização de biomatrizes e de células tronco, para atender a demanda, que sejam capazes de promover regeneração de tecidos e órgãos, amortização dos custos e uso seguro em nível celular. Neste contexto, as células tronco mesenquimais adiposas (CTMA) tem despertado grande interesse científico. **Objetivo:** Foi analisado a biocompatibilidade em nível celular e cromossômica/cromatídica da biomatriz de quitosana-colágeno-genipina com CTMA humanas. **Métodos:** Foram testadas diferentes concentrações de genipina para estabelecimento da matriz, por análise de intumescimento, degradação e grau de reticulação, por espectrofotometria. As CTMA foram obtidas por processamento enzimático do lipoaspirado humano e cultivadas em Petakas (controle) e na biomatriz selecionada após caracterização físico-química, com e sem criopreservação. As CTMA foram caracterizadas quanto a adesão e proliferação por microscopia óptica convencional, contraste de fase e eletrônica de varredura, imunofenotipagem, viabilidade celular com teste de azul de Trypan, estabilidade cromossômica, por técnicas citogenéticas convencionais, potencial neoplásico por teste de Papanicolau e quanto a capacidade de diferenciação celular em três tipos de tecidos, com abordagem estatística. **Resultados:** A biomatriz intercruzada com 0,75% v/v de genipina foi a melhor para os estudos celulares. Os testes de adesão, proliferação e capacidade de diferenciação mostraram que as CTMA em contato com a biomatriz mantiveram suas características naturais. Os testes citogenéticos, e do papanicolau das CTMA após diferentes condições de cultivo na biomatriz não revelaram frequências estatisticamente diferentes das células controles (cultivadas sem a biomatriz). **Conclusão:** Os resultados sugerem que a biomatriz de quitosana-colágeno-genipina com 0,75% v/v de genipina é biocompatível em nível celular e cromossômico, com células tronco mesenquimais adiposas. **Palavras chave:** Células tronco mesenquimais adiposas. Biomatrizes poliméricas. Engenharia de Tecidos. Estabilidade cromossômica. Estabilidade cromatídica.

ABSTRACT

Introduction: Therapy of artificial tissues and organs has resulted in an increase in the life expectancy of thousands of people, and one in five over 65 years has already benefited from tissues and organs generated *in vitro*. Thus, it is imperative to develop new strategies for the development and optimization of biomatrices and stem cells to meet demand, which is capable of promoting tissue and organ regeneration, cost amortization and safe use at the cellular level. In this context, adipose mesenchymal stem cells (AMSC) have aroused great scientific interest. **Objective:** The biocompatibility at the cellular and chromosomal/chromatidic level of chitosan-collagen-genipin biomatrix with human AMSC was analyzed. **Methods:** Different concentrations of genipin for matrix establishment were tested by the analysis of the number of cells, the degradation, and degree of crosslinking by spectrophotometry. AMSC were obtained by enzymatic processing of human lipoaspirate and cultured in Petakas (control) and in the selected biomatrix after physicochemical characterization, with and without cryopreservation. The AMSC were characterized for adhesion and proliferation by conventional optical microscopy, phase contrast and scanning electron microscopy, immunophenotyping, cell viability with Trypan blue test, chromosomal stability, by conventional cytogenetic techniques, neoplastic potential by Papanicolaou test and for the capacity of cell differentiation in three types of tissues, with a statistical approach. **Results:** The crosslinked biomatrix with 0.75% v/v genipin was the best for the cell studies. The tests of adhesion, proliferation and differentiation capacity showed that the AMSC in contact with the biomatrix maintained their natural characteristics. The cytogenetic and Papanicolaou tests after different culture conditions in the biomatrix did not reveal statistically different frequencies of the control cells (cultured without the biomatrix). **Conclusion:** The results suggest that the chitosan-collagen-genipin biomatrices with 0.75% v/v genipin are biocompatible at the cellular and chromatidic/chromosomal level, with adipose mesenchymal stem cells.

Key words: Adipose mesenchymal stem cells. Polymeric biomatrices. Tissue Engineering. Chromosomal stability. Chromatidic stability.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das matrizes A (quitosana) e B (quitosana-colágeno) e células tronco mesenquimais adiposas, C e D .	28
Figura 2 - Ilustração da distribuição física das Petakas e suas principais funções como diminuição da desidratação do meio de cultivo celular, controle da entrada e saída de O ₂ e CO ₂ e o controle de pH.	32
Figura 3 - Imagem do lipoaspirado humano que foi utilizado no presente estudo.	41
Figura 4 - Imagens da extração da fração estromal vascular do lipoaspirado.	42
Figura 5 - A, câmara de Neubauer; B, aspecto da área de contagem de células ao microscópio; C, “quadrado” que representa o “n” a ser usado na fórmula.	44
Figura 6 - Resultados de viabilidade celular na terceira passagem.	61
Figura 7 - Histogramas da análise da expressão de CD31, CD90, CD34, CD117, CD54, CD73, CD44, CD133, CD45, CD105 e CD166 em células da região de maior tamanho e granulosidade. Resultado representativo de imunofenotipagem das CTMA após Cultivo nas biomatrizes com 0.75% v/v de genipina.	64
Figura 8 - Gráfico Curva analítica com L-arginina.	68
Figura 9 - Teste da normalidade em relação a cada grupo de biomatrizes. Foi adotado $p > 0.10$ como resultado de normalidade.	69
Figura 10 - Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e declínio da curva do grau de reticulação com o aumento da concentração de genipina.	71
Figura 11 - Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio grau de reticulação.	72
Figura 12 - Gráficos mostrando os resultados da análise residual para o ensaio de reticulação.	73
Figura 13 - Teste da normalidade em relação a cada grupo de biomatrizes. Foi adotado $p > 0.10$ como resultado de normalidade.	75
Figura 14 - Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e diminuição da degradação das biomatrizes com o aumento da concentração de genipina.	76
Figura 15 - Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio grau de degradação.	77
Figura 16 - Gráficos mostrando os resultados da análise residual para o ensaio de degradação.	78

Figura 17 - Teste da normalidade para o ensaio intumescimento, com $p > 0.10$ como significativo.	80
Figura 18 - Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e declínio da curva de intumescimento com o aumento da concentração de genipina.	81
Figura 19 - Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio intumescimento.	82
Figura 20 - Gráficos representativos dos três ensaios do presente estudo, mostrando de maneira genérica os resultados da análise residual.	83
Figura 21 - Imagens de microscopia óptica mostrando nas Figuras A e B as CTMA aderidas nas Petakas e nas Figuras C e D as CTMA em fuso mitótico.	85
Figura 22 - Resultados de microscopia eletrônica de varredura mostrando imagens das biomatrizes de quitosana, colágeno, quitosana/colágeno, quitosana/colágeno com genipina a 0.75 % v/v, CTMA em fuso mitótico aderidas na biomatriz de quitosana/colágeno com genipina a 0.75 % v/v e biomatriz com CTMA aderidas e proliferadas.	86
Figura 23 - Curva de cinética de crescimento das CTMA.	88
Figura 24 - Imagens que mostram a diferenciação de CTMA em três linhagens celulares diferentes, adipócitos, osteócitos e condrócitos.	91
Figura 25 - Imagem representando a amostra total do presente estudo, mostrando cromossomos metafásicos de CTMA com o seu cariótipo representativo.	94
Figura 26 - Imagens mostrando a quantificação e morfologia nucleares da amostra controle e teste das CTMA.	96
Tabela 1 - Principais propriedades físico-químicas e biológicas das biomatrizes.	20
Tabela 2 - Resultados de viabilidade celular (citotoxicidade) na terceira passagem.	60
Tabela 3 - Resultado representativo de imunofenotipagem das CTMA após Cultivo nas Biomatrizes.	63
Tabela 4 - Valores em porcentagem da diminuição do grau de reticulação com o aumento da concentração de genipina.	70
Tabela 5 - Análise cromatídica e cromossômica de quebras/falhas e/ou alterações numéricas das CTMA na presença ou não das biomatrizes e antes e após a criopreservação.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTMA	Células tronco mesenquimais adiposas
PDT	Population doubling time
ISCT	<i>Sociedade Internacional de Terapia Celular</i>
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
GD	Grau de Desacetilação
RGD	Domínio de ligação arginina-glicina-aspartato
NO	Óxido de nitrogênio
OONO ⁻	Peroxinitrito
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH ⁻	Ânion hidroxila
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase do endotélio vascular
nNOS	Enzima óxido nítrico sintase de neurônios
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase estimuladas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas
Ch	Quitosana (<i>Chitosan</i>)
Ch-Co-Ge	Quitosana-colágeno-genipina (<i>chitosan-collagen-genipin</i>)
CD	<i>Cluster Differentiation</i> (diferenciação de grupos)
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
MIP - 1 α / CCL3	Proteína inflamatória de macrófagos

MHC classe 2	<i>Major Histocompatibility Complex Class II</i>
IL – 1 e 2	Interleucina 1 e 2 (citocinas)
ROS	Intermediário reativo de oxigênio
RNS	Intermediário reativo de nitrogênio
FSC	<i>Forward Light Scatter</i> (Dispersão frontal de luz em citometria de fluxo – mede o tamanho celular)
SSC	<i>Side Scatter</i> (dispersão lateral de luz em citometria de fluxo – mede a granulosidade celular)
UV-visível	Faixa ultra-violeta e visível do espectro eletromagnético
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
HSIL, ASC-H lesion	Atypical squamous cells - cannot exclude high grade intraepithelial
LSIL	Low grade squamos intraepithelial lesion

LISTA DE SÍMBOLOS

ΔS	Varição de entropia
kcal mol ⁻¹	kilocalorias por mol
nm	nanômetro (10 ⁻⁹)
β (1→4)	Ligação glicosídica entre os carbonos 1 e 4 de monossacarídeos.

SUMÁRIO

1	Introdução	17
1.1	Engenharia de tecidos.....	17
1.2	Células Tronco Mesenquimais (CTM) – significância.....	20
1.3	Estabilidade Cromossômica.....	23
1.3.1	Estabilidade Cromossômica – análises estruturais e numéricas.....	25
1.4	Teste do papanicolaou.....	26
1.5	Caracterização Molecular das CTMA.....	27
1.6	Biomatrizes poliméricas – Quitosana, Colágeno e Genipina.....	28
1.7	Inovação Tecnológica para cultivo celular – Petakas.....	31
1.8	Criopreservação e preservação celular.....	35
1.9	Relevância e Justificativa.....	36
2	Objetivo	37
2.1	Objetivo geral.....	37
2.2	Objetivo específico.....	37
3	Aprovação Ética	38
4	Infraestrutura e execução do projeto	38
5	Representação esquemática do estudo	39
6	Materiais e métodos	40
6.1	Obtenção e seleção de células tronco mesenquimais adiposas (CTMA).....	41
6.2	Extração da fração estromal vascular do tecido adiposo.....	42
6.3	Viabilidade das CTMA por azul de trypan.....	43
6.4	Cultivo das CTMA nas Petakas.....	45
6.5	Criopreservação.....	45
6.6	Descongelamento celular.....	46
6.7	Cinética de crescimento das CTMA antes e após criopreservação.....	46
6.8	Cultivo das CTMA na biomatriz de quitosana-colágeno-genipina.....	47
6.9	Preparo da biomatriz quitosana-colágeno-genipina.....	47
6.10	Determinação do grau de intumescimento (GI) das biomatrizes.....	48
6.11	Estudo da degradação “in vitro” das biomatrizes com amostra sanguínea em meio de cultivo alfa-MEM.....	48
6.12	Microscopia de luz de contraste de fase das CTMA.....	49
6.13	Microscopia eletrônica de varredura da biomatriz isolada e na presença das CTMA.....	49
6.14	Grau de reticulação com genipina – espectrofotometria de absorção.....	50
6.15	Análise citogenética das CTMA.....	50
6.15.1	Protocolo de obtenção dos cromossomos metafásicos por coloração usual.....	51
6.16	Teste do Papanicolaou.....	52

6.17	Ensaio de Imunofenotipagem.....	53
6.18	Análise de diferenciação das CTMA (Trileneage).....	54
6.18.1	Diferenciação osteogênica.....	54
6.18.2	Diferenciação condrogênica.....	55
6.18.3	Diferenciação adipogênica.....	56
7	Análise Estatística.....	58
8	Resultados.....	59
8.1	Contagem e Viabilidade Celular.....	59
8.2	Imunofenotipagem	62
8.3	Estudo da Normalidade (Anderson-Darling).....	66
8.4	Grau de reticulação com genipina.....	66
8.5	Ensaio de Degradação da biomatriz em amostra sanguínea em meio de cultivo.....	74
8.6	Ensaio de Intumescimento.....	79
8.7	Microscopia de luz e eletrônica de varredura.....	84
8.8	Estudo da cinética de crescimento das CTMA antes e após criopreservação.....	88
8.9	Diferenciação celular.....	89
8.10	Análise citogenética – estabilidade cromossômica.....	92
8.11	Teste do papanicolaou.....	94
9	Discussão.....	97
9.1	Importância das Células Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTMA).....	97
9.2	Algoritmo de caracterização das CTMA – Monitoramento.....	100
9.2.1	Diferenciação das CTMA.....	100
9.2.2	Estudos Citogenéticos e Potencial Tumorígeno (Papanicolaou).....	101
9.2.2.1	Teste do Papanicolaou.....	101
9.2.2.1.1	Limitações do estudo.....	102
9.2.2.2	Estudo citogenético.....	103
9.2.2.3	Estudo de imunofenotipagem.....	105
9.3	Estudos físico-químicos das Biomatrizes.....	105
9.3.1	Estudo da Degradação.....	105
9.3.2	Forças intermoleculares entre quitosana-colágeno-genipina.....	106
10	Conclusão.....	108
	Referências Bibliográficas.....	108
	Anexos.....	118

1 Introdução

1.1 Engenharia de tecidos

Mais de 60 milhões de pessoas nos EUA tiveram aumento em sua expectativa de vida em virtude da terapia de tecidos e órgãos artificiais, sendo que a cada cinco pessoas, com mais de 65 anos, uma foi beneficiada com tecidos e órgãos gerados “in vitro” (BALDWIN; KIICK, 2010; MUZZARELLI et al., 2016). A principal causa de internação e morte hospitalar no Brasil é devido às lesões causadas por acidentes em geral. De 2004 até dias atuais, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou mais de 900 milhões de reais com órteses e próteses (DATASUS, 2018). Além disso, a American Heart Association estima que aproximadamente 5,7 milhões de americanos sofrem de insuficiência cardíaca congestiva (BRAILE-STERNIERI et al., 2018). No Brasil, um terço das mortes são causados por doenças cardiovasculares, e cerca de 350.000 pacientes sofrem infarto agudo do miocárdio por ano (SABINO et al., 2018). Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novas estratégias para atender a demanda com o desenvolvimento de biomatrizes, tendo como finalidade principal a regeneração de tecidos e órgãos e a amortização dos custos (JAYAKUMAR; MENON; MANZOOR; NAIR; TAMURA, 2010; MUZZARELLI et al., 2016).

A engenharia de tecidos contempla inúmeras vantagens que atendem às necessidades do tecido lesado ou órgão para o processo de regeneração (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999). Para isso, é necessário o entendimento de processos químicos, físicos e biológicos tanto material biológico, quanto do nicho biológico do hospedeiro (KO; SFEIR; KUMTA, 2010).

Nesse sentido, os microambientes biológicos possibilitam o reconhecimento celular e as cascatas de sinalizações para neovascularizações (BOCCAFOSCHI et al., 2005). Outra vantagem é a intervenção cirúrgica minimamente invasiva, que possibilita o emprego de técnicas cirúrgicas mais rápidas e que causam menos riscos ao paciente (LANGER; VACANTI, 1999).

Assim, a engenharia de tecidos é uma ferramenta que possibilita por meio da criação de um nicho biológico adequado a construção e regeneração de quaisquer tecidos e órgãos (BONFIELD, 2006; BREYNER; HELL; CARVALHO, 2010). Para isso, são utilizadas vias de enxertos autógenos ou alógenos, com e sem a utilização de células. Por exemplo, biomatrizes como quitosana, colágeno e poliidroxibutirato, que são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos, podem atuar na liberação controlada de drogas, transfecção gênica e regeneração de tecidos.

Segundo a Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982, os biomatrizes são compostos orgânicos benéficos, ou a combinação deles, que possam ser usadas por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano (STRAUER; MUHAMMAD; SCHANNWELL, 2010). O grande desafio é entender que a ciência dos biomatrizes é multidisciplinar e a sua aplicação necessita de adequações de processamento, esterilização e modificações estruturais que favoreçam a interação com o tecido de interesse. Há diversos modelos de fabricação de biomatrizes.

Estes modelos seguem representações geométricas que devem estar em concordância com o tipo de tecido ou órgão de interesse. Para satisfazer a diversidade de tecidos e órgãos, as biomatrizes podem ser fabricados na forma de matrizes porosas, finas camadas sobrepostas, esferas e na forma de fios alongados (CHAN; SO; 2005).

O tipo da biomatriz também direciona o tipo de linhagem celular que ele pode armazenar e estimular a proliferação ou a diferenciação a partir de células tronco (CHAN; KING, 2009). Dessa forma, a bioengenharia e a terapia celular atuam de maneira conjunta para a medicina regenerativa, favorecendo e melhorando as condições biológicas para acelerar o reparo e a regeneração tecidual e, assim, manter naturalmente a homeostase tecidual. Essa condição é mantida porque são fornecidos os elementos celulares requeridos, os fatores de proliferação e diferenciação celular e estruturas supramoleculares que garantem a organização estereoquímica funcional dos tecidos gerados e a sua integração sistêmica (CHEN et al., 2006).

As principais propriedades físico-químicas e biológicas são elencadas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 01. Principais propriedades físico-químicas e biológicas das biomatrizes.

<u>Requisitos Biológicos</u>	<u>Requisitos Mecânicos</u>
- Biocompatibilidade. Materiais ou biomatrizes que permitam adesão, proliferação e diferenciação;	- Resistência e durabilidade suficientes para suportar o estresse mecânico dentro do tecido do paciente.
- Biodegradabilidade. Materiais ou biomatrizes devem degradar e formar bioprodutos (metabólitos) não tóxicos. Também devem apresentar taxa de degradação controlada para acompanhar a regeneração tecidual.	- Facilidade na esterilização. Suportar altas temperaturas ou imersão em agentes de esterilização, mantendo-se íntegro em qualquer procedimento.
- Porosidade, interconectividade e microestruturas adequadas para permitir o influxo celular, adesão e formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese).	- Superfície e padrões adequados para suportar e garantir a ligação mecânica entre a biomatriz e o tecido do paciente.

1.2 Células Tronco Mesenquimais (CTM) – significância

As células-tronco adultas apontam como uma alternativa para a terapia celular, uma vez que se constatou que as mesmas apresentam certo grau de plasticidade, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em progenitoras especializadas (BAKSH; SONG; TUAN, 2004; CHIONO et al., 2008). As células-tronco mais estudadas na atualidade são as derivadas da medula óssea (MO), que se dividem em dois tipos celulares principais: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) (do inglês, HSC – hematopoietic stem cells), que originam as células sanguíneas, e as células-tronco

mesenquimais (CTM) (do inglês, MSC – mesenchymal stem cells), que estão no estroma medular envolvendo as células hematopoiéticas e têm potencial de diferenciação em múltiplos tecidos (NARDI; MEIRELLES, 2006; ASTORI, 2007).

CTM são células mesodérmicas primordiais presentes em todos os tecidos e são capazes de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em diferentes tipos celulares. Seu potencial terapêutico é principalmente explicado pela produção de moléculas bioativas, que fornecem um microambiente regenerativo em tecidos lesionados (MARX et al., 2014).

Além disso, as CTM têm potencial para a diferenciação *in vivo* e *in vitro* em cardiomiócitos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos (*in vitro*) (PLANAT BERNARD et al., 2003; DOMINICI, et al., 2007). Porém, apresentam-se em baixa frequência na MO humana mas têm características positivas para o cultivo celular como rápida aderência à placa de cultura e intensa proliferação *in vitro* (PLANAT BERNARD et al., 2004).

As CTM também têm as vantagens de autorenovação, caráter imunomodulatório, multipotencialidade, facilidade de isolamento, purificação e criopreservação (PLANAT BERNARD et al., 2004). Segundo as recomendações da *Sociedade Internacional de Terapia Celular*, para que as mesmas possam ser utilizadas em estudos, devem apresentar as características mínimas como células aderentes e proliferativas, diferenciarem-se em pelo menos três linhagens celulares (adipócitos, condrócitos e osteócitos) e apresentar o painel mesenquimal com os marcadores de superfície celular típicos, além de apresentar estabilidade citogenética. Alguns estudos mostram também que há uma associação importante entre as CTM e a rede vascular (NARDI; MEIRELLES, 2006). Estas células representam uma população heterogênea de células

como as endoteliais microvasculares, os pericitos e os fibroblastos (BAKSH; SONG; TUAN, 2004).

Em condições de cultura, as células tronco adiposas crescem facilmente em monocamadas, mantêm a multipotencialidade normalmente até a 10a passagem e apresentam morfologia fibroblastóide (alongada) (ORMEROD, 2000). A imunofenotipagem da CTM mostra marcação positiva para os anticorpos CD 9, CD 10, CD 13, CD 29, CD 44, CD 49, CD 54, CD 55, CD 59, CD 73, CD 90, CD 105, CD 106, CD 144, CD 146, CD 166 e HLA-1 e negativa para CD 11b, CD 14, CD 19, CD 31, CD 34, CD 45, CD 79 alfa, CD 80, CD 117, CD 133, CD 144, HLA-DR e Stro-1 (CAPLAN; BUDER, 2001; ALICE, 2002; NARDI; MEIRELLES, 2006).

As CTM secretam uma cascata de citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas, autócrinas e endócrinas, tais como fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α / CCL3). (ZUK; ZHU; ASHJIAN, 2002). Estes fatores quando conjugados podem produzir uma série de respostas do sistema imune local, estimulando a angiogênese e induzindo a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais no tecido desejado. Além disso, as CTM induz a expressão das proteínas de junção e aumentam a integridade microvascular e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (ZUK; ZHU; ASHJIAN, 2002).

Também secretam uma série de citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas e autócrinas, tais como Il-6, Il-7, Il-8, Il-11, Il-12, Il-14, Il-15, fator estimulador de colônias macrofágicas (M-CSF), ligante de Flt-3 e Fator de Células Tronco (SCF),

fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) e fator estimulador de colônias granulocítica-macrofágicas (GM-CSF) (MARX et al., 2014).

Na medicina regenerativa, as CTM derivadas do tecido adiposo são uma área de pesquisa de crescimento constante e rápido. O isolamento das células do tecido adiposo implica no corte do tecido em pequenos fragmentos, que são submetidos à digestão enzimática, seguido de centrifugação. O pellet formado frequentemente denominado fração estromal vascular (FEV), é uma mistura heterogênea de células, incluindo fibroblastos, pericitos, células endoteliais, células sanguíneas e células tronco derivadas do tecido adiposo (MARX et al., 2014).

Além disso, a população de CTM isoladas do tecido adiposo tem recebido atenção especial, devido à facilidade de coleta, abundância e potencial regenerativo. Os critérios mínimos para definir estas células, tanto a fração vascular estromal fresca, quanto as CTs de tecido adiposo cultivadas, foram propostos pela Federação Internacional de Terapia Adipogênica e pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (MARX et al., 2014).

1.3 Estabilidade cromossômica

Para o emprego de células tronco mesenquimais (CTM) em terapia celular é necessário conhecer a segurança no nível gênico e cromossômico, com o cultivo *in vitro* extenso, que aumenta a probabilidade de transformação celular e instabilidade genética (BOCHKOV, 2007; NIKITINA et al., 2011; ROSS et al., 2011). A estabilidade cromossômica em linhagens celulares consiste na manutenção do cariótipo normal após sucessivas passagens (KERMANI; FATHI; MOWLA, 2008). A identificação de

anormalidades cromossômicas em células-tronco com potencial emprego terapêutico é importante, uma vez que, *in vivo*, mudanças cromossômicas numéricas ou estruturais podem resultar em carcinogênese (BITTMANN et al., 2001; MEZA-ZEPEDA et al., 2008; ROSS et al., 2011).

Portanto, os métodos de cultivo e propagação das células devem ser avaliados, entre outros, por meio de técnicas citogenéticas para que sejam otimizados para cada linhagem, de modo a eliminar a possibilidade de utilização de células com alterações cromossômicas (BOCHKOV et al., 2008; BUYANOVSKAYA et al., 2009). O controle da estabilidade genética de culturas de células expandidas antes do transplante é determinante na terapia celular, para se evitar o aparecimento de tumores causados por possíveis rearranjos genéticos. Um estudo desenvolvido por Ugarte (2003) apresentou citogeneticamente culturas de CTM derivadas da MO após a expansão *in vitro* por três e 25 passagens, e mostrou que as células continuavam com cariótipo diploide normal.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de se estabelecer métodos que possibilitem mensurar a segurança do uso de CTM em terapias, mesmo que estas células não sejam submetidas à expansão *in vitro*. Assim, vários testes empregados originariamente a outros tipos celulares ou finalidades específicas podem ser aplicados, como o teste de Papanicolau, a avaliação citogenética (convencional com análise do cariótipo e molecular), a caracterização imunofenotípica, de diferenciação e do potencial tumorigênico *in vivo*.

1.3.1 Citogenética

As alterações cromossômicas específicas resultam em dezenas de síndromes identificáveis na análise do cariótipo. Elas também são responsáveis por uma grande proporção de perdas reprodutivas, malformações congênitas e e deficiência intelectual, desempenham um importante papel na patogênese de doenças neoplásicas, como nas hematológicas malignas, e, nestes casos, os estudos dos distúrbios cromossômicos são importantes para auxiliar no diagnóstico, prognóstico, conduta terapêutica e monitoração de tratamento (IRIODA et al. 2011).

O funcionamento normal do material genético depende da sua estabilidade (SUMNER et al., 2003). O cariótipo pode sofrer modificações espontâneas ou causadas por agentes ambientais. Tais alterações podem ser numéricas ou estruturais. As alterações no número de cromossomos podem ser do tipo euploidia ou aneuploidia. Na primeira forma, ocorre um aumento ou uma diminuição do conjunto haplóide em uma célula, que em situação normal é diplóide. Já no segundo tipo, ocorre um aumento ou uma diminuição de um ou mais cromossomos dos pares, resultando, por exemplo, em monossomias ou trissomias (IRIODA et al. 2011).

As alterações estruturais modificam a morfologia normal de um ou mais cromossomos. Tais anomalias podem afetar cromossomos inteiros ou segmentos. Assim, ocorre uma desorganização que pode ser observada ao microscópio óptico, que pode ser caracterizada como deleção ou deficiência duplicação translocação, inserção e inversão (SUMNER et al., 2003; ISCN, 2016).

1.4 Teste do Papanicolaou

Descrito por George Papanicolaou na década de 1920, o teste batizado com seu nome consiste de um método de coloração desenvolvido originalmente para a avaliação de células obtidas da cérvix uterina. Por este teste é possível a identificação de alterações citoplasmáticas e/ou nucleares típicas de células neoplásicas (SMITH et al., 2003; MUNTEAN, 2009).

Neste teste a análise das células é realizada a partir do preparo de um esfregaço, no qual as células são dispostas em uma fina camada sobre uma lâmina de vidro e então fixadas. Após a fixação, é realizada sua coloração, pela combinação de um corante nuclear, a hematoxilina, e uma mistura de dois corantes citoplasmáticos, *orange G* e *EA-51* (NAIB, 1990; MUNTEAN, 2009).

Esta combinação de corantes possibilita revelar aspectos celulares fundamentais para a identificação de células neoplásicas. Estes aspectos incluem características nucleares como pigmentação, posição, volume e morfologia; características de membrana nuclear, como regularidade e integridade, além da organização da cromatina. Quanto ao citoplasma, avalia-se a presença, proporção e volume de vacúolos e grânulos, a formação de sincício, além da ocorrência de queratinização. Alterações nos padrões destes parâmetros sugerem a existência de anormalidades (NANDA et al., 2000; APGAR et al., 2003).

A aplicação deste teste em cultivos de células tronco mesenquimais adiposas (CTMA) foi proposta recentemente por Irioda et al. (2011), que documentaram a identificação de alterações morfológicas em cultivos de CTMA humanas, similares às aquelas identificadas em células tumorais e pré-tumorais de exames da cérvix uterina.

1.5 Caracterização molecular das CTMA

Devido à ausência atual de marcadores para o isolamento e caracterização das CTMA, sua caracterização se baseia nas propriedades físicas, fenotípicas e funcionais (FRIEDENSTEIN, 1976; NARDI; MEIRELLES, 2006). Entretanto, a variabilidade de protocolos empregados para estabelecer culturas de CTMA, assim como a diversidade das fontes iniciais, como a medula óssea (MO), tecido adiposo, segmento de cordão umbilical e sangue periférico, demandam o desenvolvimento de estudos mais aprofundados de caracterização molecular das preparações celulares. A análise da expressão gênica e proteica das CTMA permite a caracterização molecular das preparações celulares (CAPLAN; BUDER, 2001).

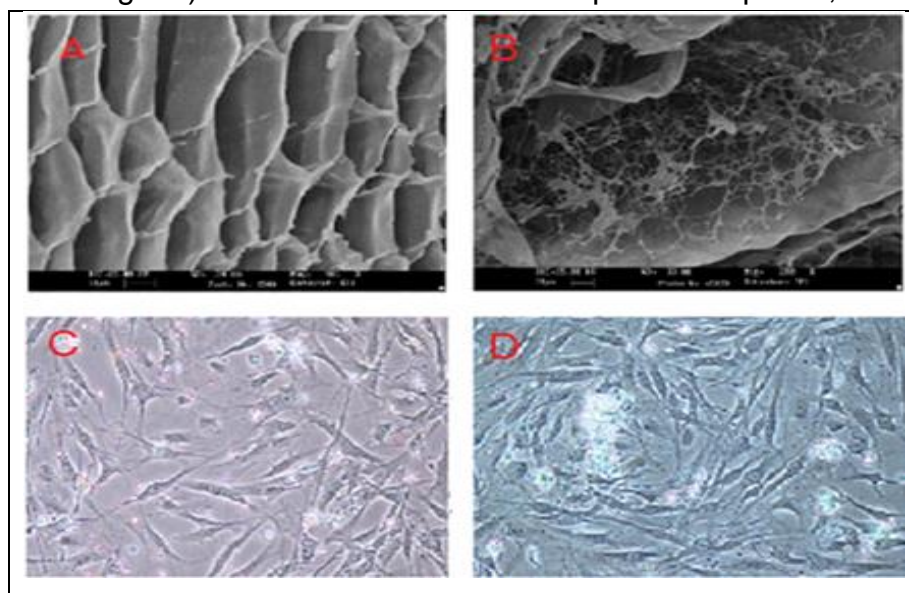
Na tentativa de definir o perfil de expressão gênica das CTMA, diversos estudos de análise em larga escala têm focado na sua diferenciação *in vitro*, na comparação direta entre diferentes preparações de CTMA, na expressão de RNAm e na comparação entre CTMA isoladas de diferentes fontes (PLANAT BERNARD et al., 2004; NARDI; MEIRELLES, 2006).

As propriedades biológicas únicas codificadas no genoma das CTMA podem ser analisadas em nível de transcriptoma. O fenótipo e função celular são determinados pelas proteínas e enzimas traduzidas. Assim, a análise proteômica tem permitido a identificação de proteínas essenciais para o papel das CTMA no microambiente hematopoético da MO e na modulação das respostas imunes.

1.6 Biomatrizes poliméricos – quitosana, colágeno e genipina

A quitosana como apresentado na imagem de microscopia eletrônica de varredura (Figura 1A) é um copolímero de cadeia linear obtido da quitina constituído por unidades de 2-amino- 2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, em que o grau médio de desacetilação, que representa a percentagem de grupos NH_2 livres, é maior que 60,0 % (ALSARRA et al., 2009). Ao contrário da quitina, a quitosana após agitação prolongada torna-se solúvel em ácidos orgânicos diluídos, tais como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, assim como em ácidos inorgânicos como ácido clorídrico. No entanto, sua solubilidade está relacionada com a quantidade de grupos protonados (NH_3^+) na cadeia polimérica. A quitosana é uma base fraca com valor de pKa do resíduo de D-glicosamina de cerca de 6,2 – 6,5, tornando-se insolúvel em pH neutro e alcalino (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; BERGER et al., 2004).

Figura 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura das matrizes **A** (quitosana) e **B** (quitosana-colágeno) e de células tronco mesenquimais adiposas, **C** e **D**.



(ZOTARELLI FILHO et al., 2013).

Além disso, quitosanas de baixa massa molar com graus de desacetilação maiores que 0,4 são facilmente solúveis em solventes ácidos (ALSARRA et al., 2009). O comportamento físico-químico da quitosana em soluções aquosas é altamente dependente do pH e do grau de desacetilação e tem sido alvo de um grande número de estudos (ALSARRA et al., 2009).

Assim, o grau de desacetilação (GD) é um critério importante na atividade da quitosana no processo de regeneração tecidual. Isso foi analisado com o crescimento *in vitro* de culturas de fibroblastos e queratinócitos humanos tratadas com soluções de quitosana com diferentes graus de desacetilação (CHAN; KING, 2009). Resultado similar foi obtido por Alsarra et al. (2009) empregando géis contendo quitosana com diferentes massas moleculares e graus de desacetilação em modelos experimentais de queimaduras em ratos.

Assim, por causa de suas propriedades físico-químicas e biológicas, o colágeno pode ser processado em diferentes formas geométricas sem perder as suas propriedades intrínsecas (PANOPOULOS; YANES; RUIZ, 2012). Pode sofrer alterações químicas por reticulação e hidrólise para utilização como matrizes tanto na sua forma pura, como em géis de colágeno, ou ainda na forma de blendas com quitosana e outros biopolímeros. Além disso, o colágeno tem destaque como um biopolímero importante na engenharia de tecidos e está presente em diversos produtos comerciais usados na área de dermatologia e estética (BET; GOISSIS; PLEPIS, 1997).

A mistura dos dois biopolímeros (Figura 1,B) concilia a biocompatibilidade do colágeno com as forças de adesão da quitosana (DOMARD; TARAVEL, 1995). O colágeno é bioaderente pelos sítios específicos arginina-glicina-aspartato (RGD) (ZOTARELLI et al., 2013).

O grupo RGD promove adesão celular por meio da ligação aos receptores de integrina, promovendo, assim, o crescimento e diferenciação celular (GOISSIS et.al. 2009). Entretanto, o colágeno apresenta rápida biodegradação e baixa resistência mecânica *in vitro* e *in vivo*, fazendo necessidade de fazer *cross-linking* (intercruzamento) e adicionar outros biopolímeros como a quitosana às matrizes de colágeno, a fim do ganho de resiliência, resistência e forças mecânicas (HORN; MARTINS, 2009; ZOTARELLI et al., 2013).

O colágeno tipo I tem destaque em sua utilização na medicina regenerativa por sustentar a maioria dos tecidos e também por ancorar proteínas e células na sua matriz extracelular. Estudos reportam que a unidade física do colágeno tipo I designada como “período D” está envolvido com o controle de atividades biológicas que mantém o nicho biológico nos tecidos. A sequência de resíduos de aminoácidos Arg-Gly-Asp no colágeno tipo I é das mais importantes para a adesão celular e a ancoragem de moléculas funcionais presentes na matriz extracelular, além de possuir outras sequências de aminoácidos que também são responsáveis pela adesão celular (GOISSIS et.al., 2009).

A genipina é um composto orgânico hidrofílico que teve a sua estrutura descoberta em 1960 e é extraída do geniposídio (fruta do gênero *Gardênia*) (JIN; SONG; HOURSTON, 2004). O gênero *Gardênia* contém 250 espécies de plantas da família do café, Rubiaceae, nativa das regiões tropicais e subtropicais da África, sul da Ásia,

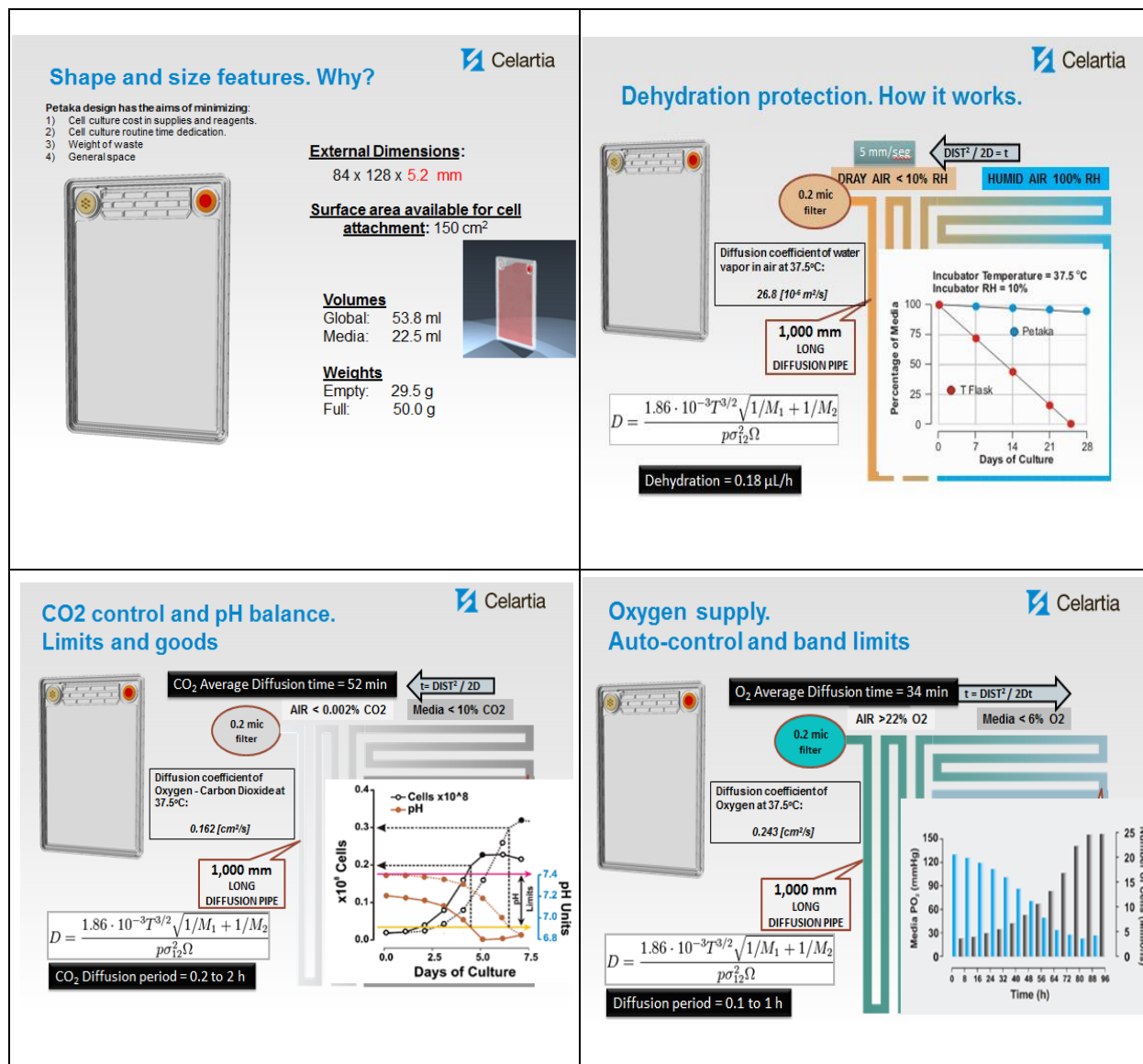
Austrália e Oceania (JIN; SONG; HOURSTON, 2004). A fruta *Gardenia jasminoides Ellis* apresenta tradições medicinais na cultura chinesa e funciona para tratar irritabilidade, doenças febris, icterícia, conjuntivites agudas, hematemese e úlceras da pele (CHIONO et al., 2008).

Apesar de não ter a sua biocompatibilidade testada em seres humanos, demonstrou-se que a genipina não é citotóxica “in vitro” e que é biocompatível em ratos. Sung et al. (1999) verificaram que a genipina era 10.000 vezes menos citotóxica que o glutaraldeído, o que justifica seu uso como agente inter cruzante em biomatrizes sem causar problemas inflamatórios crônicos.

1.7 Inovação Tecnológica para cultivo celular - Petakas

Com a evolução da cultura de células, surgiram empresas, com o objetivo de desenvolver instrumentos de melhor qualidade para o crescimento celular *in vitro*. Por exemplo, a Celartia® (Columbus, OH, EUA) desenvolveu as Petakas com garantia de segurança, manejo facilitado, custos mais baixos e minimização do impacto ambiental das culturas de células (Figura 2). A Petaka é um dispositivo destinado para o cultivo de células aderentes e não aderentes (CELARTIA®, 2018. Acesso Disponível em: <https://www.celartia.com/petaka-documents>).

Figura 2 – Ilustração da distribuição física das Petakas e suas principais funções como diminuição da desidratação do meio de cultivo celular, controle da entrada e saída de O₂ e CO₂ e o controle de pH.



(fonte: Celartia®, 2018)

A Petaka foi concebida para eliminar todo o ar no interior da câmara de cultura, o que permite a ligação e crescimento de células aderentes em todas as superfícies do interior do dispositivo. Foi especialmente projetada para cultivar células em um ambiente isolado, altamente protegido de condições ambientais externas, permitindo a proteção de incubação de células com ou sem CO₂ e independente da umidade relativa do ambiente. Um projeto estrutural estabelece uma taxa de troca gasosa no interior das Petakas, o que proporciona um ambiente de crescimento adequado para a maioria das células incubadas em atmosfera normal (0,2 % CO₂).

Além disso, esta estrutura reduz a taxa de desidratação do meio de cultivo, permitindo que esses dispositivos possam ficar armazenados por semanas. A câmara de cultura de células nas Petakas tem 150,0 cm² de área de superfície disponível para o crescimento interno das células, com capacidade de 20,0 mL (\pm 1,0 %) por unidade. A razão de área média/superfície otimizada (0,133 mL cm⁻²) facilita o crescimento de células sem substituição do material, dependendo do metabolismo celular e características de tempo de duplicação (CELARTIA®, 2018. Acesso Disponível em: <https://www.celartia.com/petaka-documents>).

Isso permite a otimização dos recursos e aditivos especiais, como fatores de crescimento. Além disso, a Petaka fornece característica única de células aderentes em crescimento nas paredes verticais e na superfície do teto, o que permite uma separação contínua do crescimento das células e detritos insolúveis (Figura 2).

O crescimento de células não aderentes convencional também é adequado para este dispositivo. A estrutura da Petaka também é projetada para minimizar a taxa de desidratação. Isto permite a eliminação do recipiente de água da incubadora, o que pode

ser fixo de HR = 5 % - 30 % (meio normal), sem colocar em perigo a cultura de células. Ela também reduz o risco de contaminação cruzada na incubadora e pode ser armazenada à temperatura ambiente ou sob refrigeração (4,0 °C) sem desidratação perigosa por vários meses. Este recurso também possibilita a introdução de instrumentos e aparelhos eletrônicos e ópticos em incubadoras.

A ventilação especial permite a injeção e retirada de meio de cultura, sem compressão e descompressão de forças fortes dentro da câmara de cultura de células. A ventilação é um acesso de ar para dentro e para fora com um fluxo de ar de cerca de 1,0 segundo por 1,0 mL à pressão de injeção. Isso facilita as operações de manuseio de semeadura de células, a recuperação das células e a troca de meio. O ar é estéril, uma vez que está protegida com um filtro de tamanho de poro de 0,22 micrômetros. Isto evita a contaminação da cultura de células, tanto o ar de entrada e a pressão de ar de saída (CELARTIA®, 2018. Acesso Disponível em: <https://www.celartia.com/petaka-documents>).

O meio é inserido e removido da Petaka através de uma porta (abertura) de um *hall* de entrada. O átrio é ligado a um canal de 120,0 mL de tampão (meios de canal) que termina na câmara de cultura. Este canal, com apenas 1,0 mm² de difusão com a câmara principal, permite aditivos incorporados à demora na entrega do meio que é gradualmente misturado na câmara de cultura. A Petaka, então, tem integrada na sua estrutura um sistema de captação que se interpõe entre a câmara de cultura de células de microfluidos e o filtro de ar.

Este sistema de captação evita derrames em qualquer posição ou movimento pelos usuários (tremendo, batendo e transportando), favorecendo o transporte fácil, confortável e seguro (CELARTIA®, 2018. Acesso Disponível em: <https://www.celartia.com/petaka-documents>).

1.8 Criopreservação e preservação celular

Em determinadas situações, como no transplante alogênico, as células tronco mesenquimais (CTM) podem ser infundidas frescas (ABBOTT, 2012). No transplante autólogo a criopreservação dessas células é necessária para posterior utilização. O conhecimento dos mecanismos físico-químicos que ocorrem durante o congelamento é de suma importância para manter a estrutura e a integridade funcional das células e tecidos congelados. O processo de criopreservação é conhecido há várias décadas e tem como objetivo cessar reversivelmente as funções biológicas dos tecidos vivos em temperatura abaixo de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. É importante que não se formem cristais de gelo intracelular. A contração das células durante o congelamento lento é resultante da saída de água intracelular, evitando lesões celulares (ABBOTT, 2012).

A presença de dimetilssulfóxido e de glicerol é eficaz contra as lesões celulares causadas pelo congelamento, reduzindo a formação de cristais de gelo intracelular e reduzindo a osmolaridade das membranas celulares (PANOPOULOS; YANES; RUIZ, 2012). Por meio da criopreservação das células tronco, pode-se atingir um tratamento fino dessas células para a terapia celular, uma vez que se pode armazenar essas células por tempo indeterminado. No entanto, é preciso investigar ao longo do tempo se o processo de congelamento causa instabilidade genética e se provoca perda da

capacidade de diferenciação celular. Poucos estudos tem sido realizados para caracterizar o efeito do procedimento de congelamento das células no desenvolvimento subsequente de células adultas (MAC ISAAC et al., 2012).

Fatores como o crioprotetor e a velocidade de congelação são os de maior impacto sobre as células após a descongelação. O tempo que as CTM podem ser estocadas, sem prejuízos para a viabilidade celular é desconhecido. Porém, estudos demonstram que a estocagem em nitrogênio líquido propicia um maior tempo de estocagem sem afetar a qualidade das CTM, sendo importante após congelamento fazer viabilidade celular, imunofenotipagem e ensaios de estabilidade genética (MAC ISAAC et al., 2012).

1.9 Relevância e Justificativa

Com base no crescente aumento de doenças que são refratárias às terapias tradicionais, como terapia farmacológica para insuficiência cardíaca congestiva, retinose pigmentar, doença pulmonar obstrutiva crônica e esclerose múltipla, bem como de necessidade de reposição tecidual após diversos procedimentos cirúrgicos, a como mastectomias, faz-se necessário o avanço em pesquisa na área de terapia celular com células tronco e engenharia de tecidos com biomatrizes com características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade. Como estratégia na medicina regenerativa, tem-se a utilização de matrizes biocompatíveis enriquecidas com células tronco mesenquimais para o abrigo, transporte e bioestímulo tecidual, a fim de atender às necessidades das atividades celulares em um microambiente específico, com controle da proliferação e diferenciação celular.

Com base nestas considerações, o presente estudo reflete uma estratégia laboratorial inédita para obtenção de células tronco mesenquimais do tecido adiposo cultivadas e conservadas em matriz que confira biocompatibilidade, ou seja, que sua aplicação clínica não cause reações adversas, tóxicas ou carcinogênicas ao paciente. A matriz testada, sob vários parâmetros biológicos, inclusive cromossômicos, foi a de quitosana-colágeno-genipina.

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi analisar a biocompatibilidade de células tronco mesenquimais adiposas humanas, oriundas de duas pacientes, com a biomatriz de quitosana-colágeno-genipina.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1** Investigar as propriedades físico-químicas da biomatriz de quitosana-colágeno-genipina em termos de biodegradabilidade, capacidade de intumescimento e grau de reticulação, em diferentes concentrações de genipina;
- 2.2.2** Analisar a viabilidade celular das CTMA cultivadas com e sem biomatriz de quitosana-colágeno-genipina, em diferentes concentrações de genipina;
- 2.2.3** A partir dos resultados dos objetivos anteriores, estabelecer a matriz de quitosana-colágeno-genipina mais adequada para os demais ensaios de biocompatibilidade;
- 2.2.4** Analisar a frequência de quebras e falhas cromatídicas e cromossômicas, e/ou de alterações cromossômicas numéricas em CTMA nas amostras biológicas das duas pacientes sob diferentes condições de cultivo (após 3ª passagem e após

criopreservação por 12 meses), na presença e na ausência de biomatriz de quitosana-colágeno-genipina;

2.2.5 Investigar a capacidade de diferenciação das CTMA em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, após serem cultivadas na biomatriz de quitosana-colágeno-genipina.

2.2.6 Analisar a presença de multinucleação e de polimorfismos nucleares das CTMA após o contato com a biomatriz.

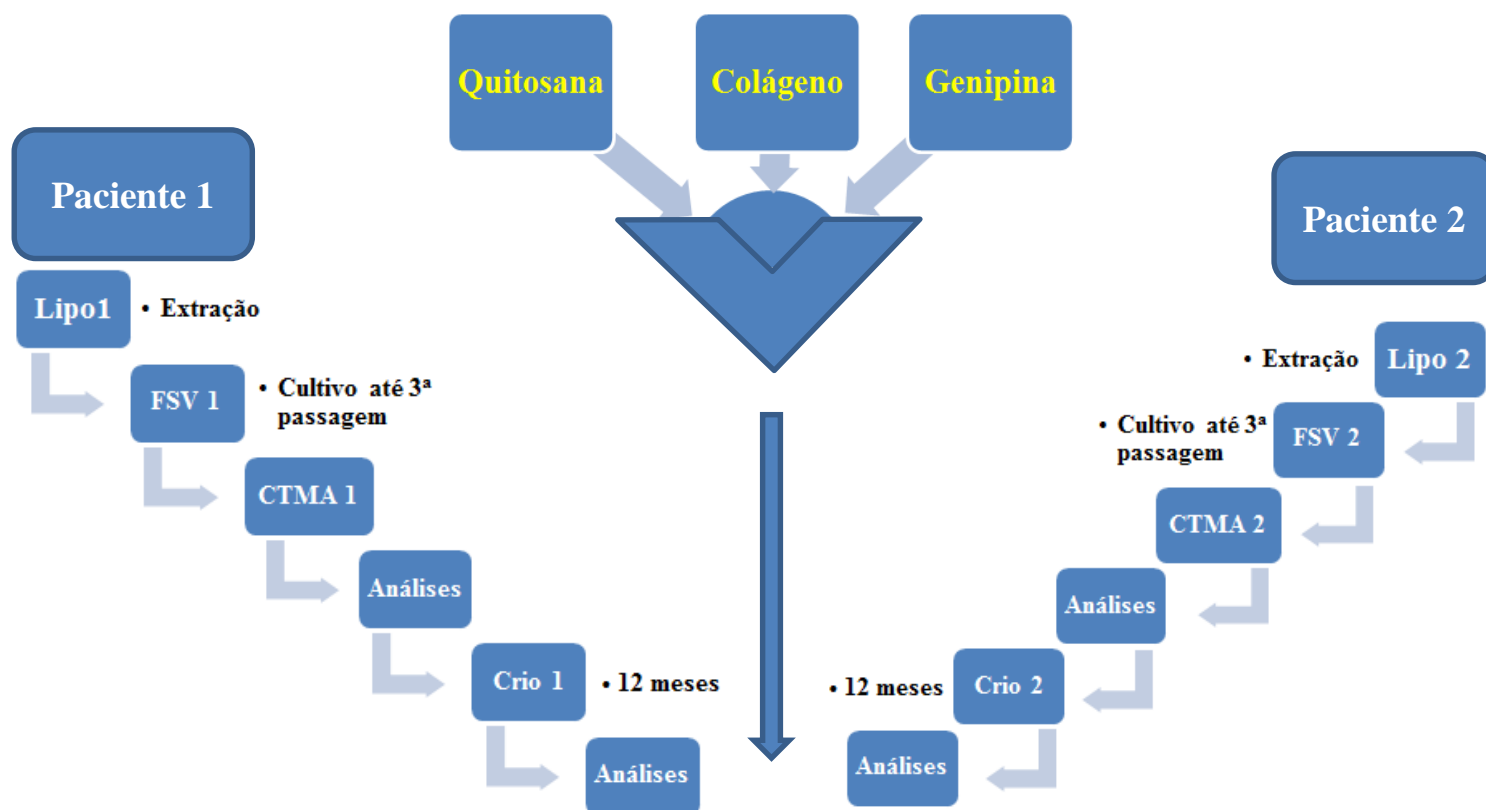
3 Aprovação em Comitê de Ética

O presente projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto/SP, sob número do processo de aprovação 030427/2015 (Anexo A).

4 Infraestrutura e execução do projeto

O projeto foi realizado por meio da utilização da infraestrutura do IBILCE, Unesp, campus de São José do Rio Preto, do Departamento de Física, no qual foram efetuados ensaios para a fabricação da matriz de quitosana-colágeno-genipina, bem como a análise em microscopia eletrônica de varredura. A preparação e cultivo das células tronco mesenquimais foram realizados no Centro de Terapia Celular – Mitosis, localizado no Hospital Beneficência Portuguesa de São José do Rio Preto/SP. Os estudos citogenéticos foram realizados no Laboratório de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto/SP, sob a direção da Profa. Dra Agnes Cristina Fett Conte.

5 Representação esquemática do estudo



- Análise de intumescimento das biomatrizes;
- Análise de degradação das biomatrizes;
- Análise do grau de reticulação com genipina;
- Cultivo, proliferação e aderência em Petakas;
- Cultivo, proliferação e aderência nas Biomatrizes;
- Análise citogenética (quebras e falhas cromossômicas ecromatídicas) - Ensaio do papanicolau;
- Imunofenotipagem;
- Microscopia eletrônica e óptica;
- Viabilidade celular;
- Cinética de crescimento;
- Diferenciação celular;
- Análise estatística.

*FSV = fração estromal vascular. * CTMA = células tronco mesenquimais adiposas.

6 Materiais e métodos

Foram utilizados quitosana, colágeno bovino tipo I, genipina, ácido acético e outros reagentes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para cultivo celular foram utilizadas as Petakas (Celartia® - (1555 Picardae Court Powell, OH, 43065, Ohio State, USA), meio de cultivo Alpha MEM, soro fetal bovino (SFB), antibióticos, colcemid, Giemsa e Kit de diferenciação celular da Gibco Life Technologies (Van Allen Way, Carlsbad, CA, 92008, USA). O Espectrofotômetro de Microplacas utilizado foi da BioTek® Instruments, USA.

6.1 Obtenção e seleção de células tronco mesenquimais adiposas (CTMA)

Foram estudadas células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTMA) de duas mulheres jovens, com 29 e com 30 anos de idade, que foram nominadas, respectivamente, paciente 1 e paciente 2. Ambas eram não tabagistas, sem história de doenças crônicas de qualquer natureza, incluindo metabólicas, hematológicas, autoimunes, cardíacas ou psiquiátricas, negaram dependência química e tratamentos quimio e radioterápico prévios. O material biológico de ambas, após consentimento, foi obtido de parte do material retirado por lipoaspiração eletiva, procedimento previamente agendado e sob responsabilidade do cirurgião plástico Luiz Fernando Frascino de São José do Rio Preto. As amostras de tecido adiposo das duas pacientes (três amostras de 2,0 mL por paciente) foram obtidas da região do abdômen.

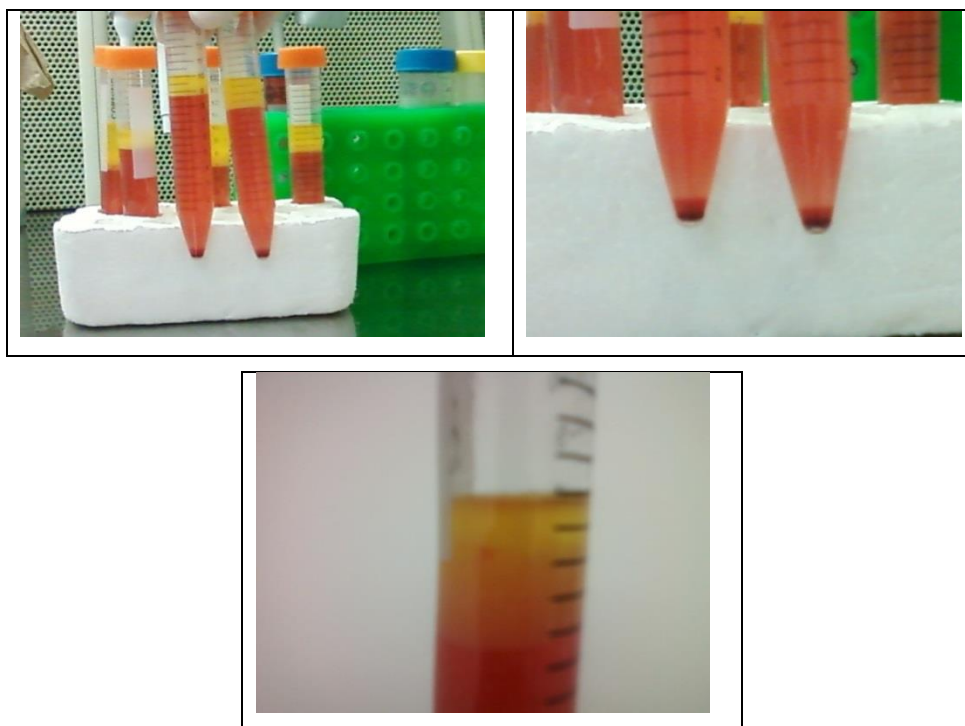
A técnica para extração de tecido adiposo (Figura 3) utilizou lipoaspiração manual com cânula de 2,5mm. De acordo com o protocolo de Zuk et al. (2002), o tecido adiposo foi tratado com collagenase tipo IV de *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich), durante duas horas, para extração da fração estromal vascular (Figura 4). Em seguida, a suspensão foi levada ao sistema Sepax para a obtenção e lavagem do precipitado celular (*pellet*) que depois foi ressuspenso em meio de cultura até concentração em torno de $2,5 \times 10^5$ células mL⁻¹, para cultivo em matrizes de quitosana-colágeno-genipina, em Petakas, e posterior criopreservação por um ano.

Figura 3. Imagem do lipoaspirado humano que foi utilizado no presente estudo.



(Fonte: autor, 2017)

Figura 04. Imagens da extração da fração estromal vascular do lipoaspirado.



(Fonte: autor, 2017)

6.2 Extração da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo

De acordo com Coleman et al. (2006), as amostras de tecido adiposo foram extraídas pelo método de lipoaspiração manual (com Cânula de 2,5 mm de diâmetro) e levadas ao laboratório para procedimentos de extração de CTMA. As amostras de tecido gorduroso foram homogeneizadas e um volume inicial de 20,0 mL será dividido em amostras de 2,0 mL. Subsequentemente, a esses volumes foram adicionados 6,0 mL de colagenase tipo IV (*Clostridium histolyticum* – Sigma Aldrich), numa proporção de 1:3 (gordura: colagenase), e a mistura foi levada para uma incubadora a 37,0 °C, a 5,0 % de CO₂, por 1 hora e meia. Após este tempo, a mistura foi centrifugada a 800 xg durante 10

minutos a 23,0 °C e, então, o sedimento foi ressuspensão em 10,0 mL de meio de cultura, e 1,0 mL foi utilizado para os ensaios (ZOTARELLI FILHO et al., 2013).

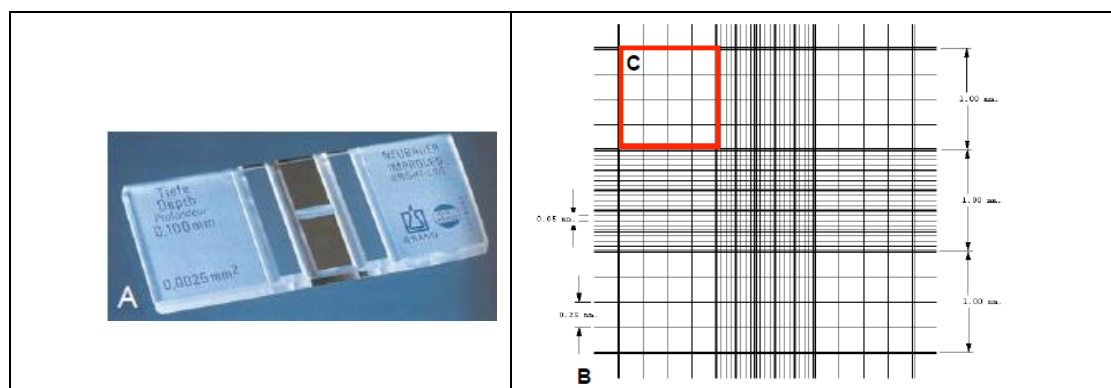
6.3 Viabilidade das CTMA por azul de trypan

De acordo com Nardi e Meirelles (2006), 10,0 uL de solução celular foram colocadas na câmara de Neubauer para quantificação de células vivas e mortas, com réplicas de $n = 3,0$. A câmara de Neubauer (Figura 05) tem sua faixa central em posição milimetricamente determinada abaixo das laterais, de modo que a colocação de uma lamínula, bem aderida às bordas da depressão, origina uma câmara com volume bem determinado. Após colocar uma amostra da suspensão de células nessa câmara, de modo que ela seja toda preenchida, mas sem que haja extravasamento, as células viáveis (não coradas) são contadas ao microscópio. A câmara possui quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4) com área de $0,1\text{mm}^2$ cada. Ao integrar uma lamínula de vidro à Câmara de Neubauer, obtém-se altura de $0,1\text{mm}$. A capacidade de volume é então, de $0,1\text{mm} \times 0,1\text{mm}^2 = 0,1\text{mm}^3$.

Após determinar o n (total de células nos quatro quadrados), as equações 1 e 2 abaixo indicam a **concentração** de células na suspensão (número de células por mL):

* para uma mistura de células:azul tripan de 1:1, o fator de diluição (FD) será = 2, para uma mistura 1:2, o fator de diluição será = 3, etc.

Figura 05 - A, câmara de Neubauer; B, aspecto da área de contagem de células ao microscópio; C, “quadrado” que representa o “n” a ser usado na fórmula.



$$\text{Número de células / mL} = \frac{\sum Q_1 Q_2 Q_3 Q_4}{4} * FD * 1 \times 10^4 / \text{mL}$$

(Equação 01)

(Fonte: SOUZA, 2013)

- cálculo da viabilidade celular:

VC (%) = número de células vivas / número de células totais (vivas + mortas)

(Equação 02)

6.4 Cultivo das CTMA nas Petakas

De acordo com metodologia da Celartia® (2018) modificada, as CTMA foram cultivadas em Petakas na quantidade aproximada de $2,5 \times 10^5$ células por mL, que foram submetidas até a décima passagem, em meio alfa-MEM com 10,0 % de soro fetal bovino e antibióticos. As células foram infundidas nas Petakas por meio de uma membrana impermeável e estéril. Após a infusão, o conjunto (células e Petaka) foi mantido na horizontal de um lado por 1,0 hora e, logo depois, foi virado do outro lado e mantido por no mínimo 12 horas. Após esse tempo, o conjunto foi colocado na vertical para o cultivo celular.

6.5 Criopreservação

De acordo com Nardi e Meirelles (2006), as células foram congeladas em meio de cultura RPMI 1640 contendo 10,0 % de SFB (Gibco) e 10,0 % de DMSO (Grupo Vida). As células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio RPMI e transferidas para um tubo falcon ($\pm 5,0$ mL), foram centrifugadas a 900 xg por 5,0 minutos, o sobrenadante foi removido e o “pellet” ressuspensas com a solução de congelamento escolhida. A quantidade depende do “pellet” ou número de células (concentração aproximada 10^6 a 10^7 células mL⁻¹). Colocou-se 1,0 mL da solução preparada em um tubo de congelamento com tampa rosqueável, que permaneceu por cerca de uma hora no freezer a -20,0 °C, cerca de 24h no freezer -80,0 °C e foi transferida para tanque com nitrogênio líquido ($\pm -196,0$ °C), onde permaneceu por um ano. E depois disso, fez-se os procedimentos de passagens nas Petakas, crescimento das células nas matrizes e ensaios de estabilidade genética.

6.6 Descongelamento celular

Os criotubos com as células criopreservadas foram retirados do reservatório de nitrogênio líquido, onde estavam armazenados, e descongelados em banho termostático a 37,0 °C. Após, as células foram suspensas em meio Alfa-MEM suplementado com 10,0 % de SFB, e centrifugadas a 400 xg por 10,0 min. O processo de descongelamento teve a duração média de 3 minutos.

6.7 Cinética de crescimento das CTMA antes e após criopreservação

Para obter o controle celular e curva padrão, no 15^o dia, plaqueou-se 5 placas de 48 poços, em triplicata, com densidades de 1×10^3 , $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , $7,5 \times 10^3$, 10×10^3 . As variadas concentrações celulares foram suplementadas com meio alfa MEM a 1,0 % P/S e 10,0 % de SFB, levadas a incubadora a 37,0 °C por 24hr.

O estudo da cinética de crescimento celular analisou o tempo de duplicação da população (PDT) (equação 03) das CTMA, semelhante aos estudos relatados por Nardi; Meirelles (2006) e Rodriguez et al. (2012). Para estudar a cinética do crescimento celular, bem como o tempo de duplicação da população (PDT), as culturas de células em petakas começaram a partir da concentração inicial de $2,5 \times 10^3$. A quantificação de células vivas por meio de azul de tripan foi realizada nos dias 2 a 20 para cada passo de expansão celular.

$$PDT = \frac{1}{3.32 (\log N_h - \log N_i) / (t_2 - t_1)}$$

(Equação 03)

6.8 Cultivo das CTMA na biomatriz de quitosana-colágeno-genipina

Para a cultura de CTM, de acordo com Nardi e Meirelles (2006), estas células foram expandidas em meio de cultura alfa MEM, suplementado com 10,0 % de soro fetal bovino em v/v, contendo 1,0 % v/v de ampicilina e estreptomicina. Depois de atingir cerca de 85,0 % de confluência, as células foram revolvidas da superfície da placa com tripsina-EDTA e, em seguida, as células foram contadas na câmara de Neubauer, a fim de conhecer o número de células vivas a serem semeadas sobre as biomatrizes. Após a semeadura, as biomatrizes foram transferidas para uma incubadora a 37,0 °C com 5,0 % de dióxido de carbono, nos tempos de 24,0 h e 72,0 h para posterior análises. As matrizes foram esterilizadas em solução de 70,0 % de etanol (durante a noite), na presença de luz ultravioleta (15,0 min). Depois de lavar as matrizes seis vezes com água estéril, cerca de $1,0 \times 10^5$ CTMA foram semeadas nas matrizes.

6.9 Preparo da biomatriz quitosana-colágeno-genipina

Com base no método descrito por Baldwin e Kiick (2010), 0,25 mg de quitosana previamente caracterizada ($M_w = 115,00$ kDa e grau de desacetilação de 85,25 %) foi dissolvida em 10,00 mL de solução de ácido acético a 2,50 % v/v durante 24 horas a temperatura ambiente. De igual maneira dissolveu-se o colágeno tipo I. A biomatriz de quitosana-colágeno foi preparada misturando as duas soluções sob agitação durante 96 h. As soluções foram transferidas para uma placa de 96 poços, com volume de 170,0 μ L, na proporção de 1:1 v/v. Por fim, a biomatriz foi inter cruzada a 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 e 1,00 % v/v de genipina. Seguidamente, a mistura foi congelada em azoto líquido (-196,0 °C) e depois liofilizada.

6.10 Determinação do grau de intumescimento (GI) das biomatrizes

As biomatrizes foram pesadas quando secas e intumescidas com meio de cultura celular DMEM (pH = 7,4) para determinação do grau de intumescimento, com n = 60 e os dados medidos foram estudados e analisados no programa estatístico Minitab 18. A quantidade de amostra sanguínea enriquecida com meio alfa MEM absorvida foi calculada pela equação 04:

$$\text{Absorção de ALFA MEM (\%)} = (\mu - m_s) / \mu \times 100$$

sendo : μ = massa úmida

m_s = massa seca

(Equação 04)

6.11 Estudo da degradação “in vitro” das biomatrizes com amostra sanguínea em meio de cultivo ALFA MEM

Este estudo foi realizado visando uma comparação qualitativa da degradabilidade das matrizes em função do grau de intercrossamento. Para a determinação do índice de degradação (ID) as amostras em triplicatas foram secas em estufa a $(40 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$ e pesadas após a estabilização do peso (M_{sl}). Após a pesagem as amostras foram colocadas em recipientes com a solução de solução sanguínea em meio ALFA MEM, obedecendo à relação entre a área superficial e volume de solução = $0,1 \text{ cm}^{-1}$ [39, 40]. As amostras foram mantidas a $(37 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C})$ em banho-maria. Em seguida, foram retiradas do recipiente e secas em estufa a $(40 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$, após atingir a estabilização do peso este foi registrado.

O ID foi obtido conforme a equação 05, onde M_{SI} é a massa seca inicial e M_{Sf} a massa da amostra após a secagem final.

$$ID = \frac{M_{SI} - M_{Sf}}{M_{SI}} \times 100$$

(Equação 05)

A avaliação foi realizada para os tempos de: 0, 10, 30, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos, com n=10.

6.12 Microscopia de luz de contraste de fase das CTMA

As CTMA foram fotografadas na terceira passagem com 85,0 % de confluência e também após o tempo de 48h na terceira passagem onde se pode encontrar o maior número de células em fase mitótica.

6.13 Microscopia eletrônica de varredura da biomatriz isolada e na presença das CTMA

As matrizes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) no Laboratório de Microscopia e Microanálise (Ibilce – Unesp, São José do Rio Preto/SP), a fim de se obter um panorama da adesão celular na matriz, por meio do revestimento de ouro das matrizes e reprodução de imagens no computador para obter imagens com ampliações diferentes, utilizando uma série de ampliações: 300, 200, 100, 30, 20 e 10 vezes. Este procedimento permitiu analisar a adesão e proliferação das células tronco mesenquimais nas matrizes de quitosana-colágeno-genipina.

6.14 Grau de reticulação com genipina – espectrofotometria de absorção

O grau de reticulação (ligação cruzada) com genipina entre quitosana e colágeno tipo I foi determinada pelo ensaio com ninidrina, e foi definida como a razão entre os grupos amino consumidos nas biomatrizes de quitosana (Ch), colágeno (Col), quitosana-colágeno (Ch/Col) e quitosana-colágeno genipina (Ch/Col/Gen) com concentrações crescentes de genipina de 0,1 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 % v/v pela ligação cruzada e os grupos aminos livres nas biomatrizes. Utilizou-se como padrão o aminoácido L-arginina em diferentes concentrações (1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg mL⁻¹) para construção da curva analítica (equação analítica).

Foram realizadas 10 medições para cada grupo de biomatriz (n=10). A quantidade de grupos aminos livres nas biomatrizes foi determinada pela absorbância óptica da solução a 570 nm, com subtração do “branco” em um espectrofotômetro de Microplacas (BioTek® Instruments, USA).

6.15 Análise citogenética das CTMA

Após a expansão celular na 3ª passagem, após 48 h de cultivo nas Petakas (controle) e biomatrizes de quitosana-colágeno-genipina, as células foram submetidas à coloração usual com Giemsa, conforme protocolo rotineiramente utilizado no Laboratório de Genética do Hospital de Base de São José do Rio Preto/SP. O estudo da estabilidade cromossômica foi realizado com base na presença de quebras e falhas, cromatídicas e cromossômicas, e de alterações cromossômicas numéricas. Os achados foram interpretados e descritos de acordo com informações e padronização contida no *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016). A análise

citogenética foi realizada em 480 células no total (240 de cada paciente), considerando-se 60 células metafásicas de quatro amostras de cada participante. A cada paciente, foram consideradas duas amostras com células metafásicas (60 células controle e 60 células na biomatriz). Assim, para cada amostra, de cada paciente, foram avaliadas 60 metáfases de células cultivadas na biomatriz e 60 de células cultivadas nas Petakas. Após 12 meses de criopreservação, também foram avaliadas 60 metáfases cultivadas nas biomatrizes e 60 cultivadas nas Petakas de cada paciente.

6.15.1 Protocolo de obtenção dos cromossomos metafásicos por coloração usual

As células tronco mesenquimais adiposas em divisão celular foram bloqueadas na metáfase por colcemide a $0,1\mu\text{g mL}^{-1}$ (Gibco), destacadas da superfície de crescimento com tripsina a 0,25% (Gibco) e subsequentemente hipotonizadas pela exposição a solução de KCl a 0,057M (Merck). As células foram fixadas em solução 3:1 de metanol e ácido acético. A análise citogenética dos cromossomos metafásicos foi realizada por coloração usual (SANCHEZ et al., 1973) e as imagens foram capturadas no microscópio BX60 (Olympus), com o programa ImagePro Plus.

Os achados foram conferidos por uma citogeneticista e os resultados foram caracterizados de acordo com as normas *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016).

6.16 Teste do Papanicolaou

Após os cultivos atingirem confluência de $\cong 85,0\%$, o meio de cultivo foi removido das Petakas e descartado, e os poços foram lavados com PBS a $37,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (3x). Após, as células nas Petakas foram coradas com hematoxilina de Harris, Orange G6 e EA36, constantes do kit para citologia esfoliativa Conjunto Papanicolaou® (Newprov). Os procedimentos foram repetidos para cada petaka, em temperatura ambiente.

Esta coloração foi realizada por meio da remoção e descarte do PBS; incubação com etanol a $80,0\%$, $70,0\%$, $50,0\%$ e água destilada, por 2,0 min cada. Após remoção e descarte da água, adicionou-se 1,0 mL do corante hematoxilina de Harris, incubando-se por 2,0 min. As Petakas foram lavadas várias vezes (10x) com água destilada. O excedente de água foi removido e procedeu-se à incubação com etanol a $50,0\%$, $70,0\%$, $80,0\%$ e $96,0\%$, por 2,0 min cada.

Após o descarte do etanol a $96,0\%$, adicionou-se 1,0 mL do corante Orange G6, incubando-se por 2,0 min. Este corante foi descartado e adicionou-se 1,0 mL de etanol a $96,0\%$, incubando-se por 2,0 min (2x). Após, adicionou-se 1,0 mL do corante EA36, incubando-se por 2,0 min. As Petakas foram então incubadas três vezes com etanol a $96,0\%$, por 2,0 min cada.

Após isso, as Petakas foram submetidas à análise por microscopia, realizada inicialmente em microscópio invertido, com posterior captura de imagens realizada em microscópio Olympus BX51, acoplado à câmera digital DP70 e *software* DP70-BSW. Para cada amostra (cada paciente) foram capturadas imagens de, ao menos, dez campos visuais com aumento de 200x, analisando-se 100 células após 72h de cultivo nas Petakas, 100 células nas biomatrizes, 100 células após 12 meses de

criopreservação das mesmas células nas Petakas e 100 células nas biomatrizes, com o total de 800 células para as duas participantes do presente estudo.

6.17 Ensaio de Imunofenotipagem

Após remoção das células das frascos de cultivo, realizada com o auxílio da solução de tripsina, essas foram suspensas em 1,0 mL de PBS suplementado com 3,0 % de albumina humana (Albumina Humana Grifols® 20,0 %, PBS/A). A suspensão resultante foi submetida à determinação do número e proporção de células não viáveis pelo método de coloração com azul de Trypan, como descrito na seção 6.3, seguida do ajuste da densidade de células viáveis para 10^6 células mL⁻¹.

A avaliação imunofenotípica destas células foi realizada por meio da técnica imunofenotipagem por citometria de fluxo em citômetro FACSCanto II® (BD Biosciences), utilizando os anticorpos monoclonais conjugado com fluorocromos, e seus respectivos controles isotípicos.

CTMA da última passagem de todos os cultivos, homogeneizadas em PBS/A, foram separadas em alíquotas de 100,0 µL e dispensadas em tubos de 5,0 mL para citometria de fluxo. Após, foram adicionados 5,0 µL de cada anticorpo aos tubos e homogeneizados por agitação em agitador tipo vórtex. As suspensões foram então incubadas por 15,0 min à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida foram adicionados 400,0 µL de PBS/A em cada tubo, seguida de homogeneização por agitação e centrifugação a 400xg por 10,0 min.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* homogeneizado em 500,0 μL de PBS/A. Ao tubo 3 de cada amostra foram adicionados 5,0 μL de 7-AAD momentos antes da aquisição em citômetro. As CTMA foram então adquiridas em citômetro acoplado ao *software* de análise BD FACSDiva II® (BD Biosciences) e posteriormente analisadas por meio do *software* Infinicyt® (Cytognos) para a ligação/marcação de cada anticorpo (expressão do marcador) e 7-AAD (células não viáveis).

6.18 Análise de diferenciação das CTMA (Trileneage)

6.18.1 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi induzida em cultivos de CTMA em seis (6) Petakas e exibindo $\cong 85,0$ % de confluência. Nestas, três Petakas tiveram o meio alfa-MEM/SFB suplementado com dexametasona 10 nM, β -glicerolfosfato 10 mM e ascorbato-2-fosfato 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sigma-Aldrich). O meio de diferenciação osteogênica (alfa MEM/DIFO) foi preparado por meio da mistura de: 5,0 mL de solução ascorbato-2-fosfato/ β -glicerolfosfato em meio alfa-MEM/SFB (0,05 % de ascorbato-2-fosfato e 2,16 % de β -glicerolfosfato em meio alfa-MEM, m/v); 98,0 μL de solução de dexametasona (0,1% em etanol, m/v, diluído em alfa-MEM, 1:49, v/v); 44,02 mL de meio alfa-MEM/SFB; Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana com microporos de 0,22 μm .

As CTMA foram incubadas com meio alfa MEM a 37,0 °C e 5,0 % CO_2 por 14 dias, com substituição do meio a cada 72 h. O mesmo procedimento foi realizado paralelamente, com as Petakas de controle negativo, com meio de cultivo alfa-MEM/SFB.

Após o período de diferenciação, as células foram submetidas à coloração para evidenciar a secreção de matriz extracelular mineralizada (diferenciação em osteócitos), conforme os seguintes procedimentos: remoção do meio de cultivo de todos os poços (diferenciação e controle); enxágue do poço com PBS (2x); fixação das células com solução aquosa de glutaraldeído a 2,5 % (m/v) por 1 h 30 min; enxágue com água destilada (2x); desidratação com isopropanol 60,0 % (v/v) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte do isopropanol e adição da solução corante de alizarina (1,37 % em água ultrapura, m/v, pH 4,1-4,3, Sigma-Aldrich) e incubação à temperatura ambiente por 45 min; descarte da solução corante e enxágue com PBS (3x); fotodocumentação e análise em microscópio invertido.

6.18.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi induzida por meio do meio comercial StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco®). Para isto foi realizado um cultivo de micromassa onde as células foram ressuspensas em uma concentração de $1,6 \times 10^7$ de células viáveis por mL, deste total de células foi aliqotado 1,0 mL de suspensão celular que foi transferido para outra Petaka, onde permaneceu por 2 horas em estufa com 5,0 % de CO₂ a 37,0 °C. Após período de incubação, adicionou-se 500,0 µL de meio diferenciação (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit – Gibco®), e nas células controle meio de cultivo padrão. Os meios foram substituídos duas vezes por semana. Após 14 dias o meio foi removido e as células foram fixadas com as células foram fixadas

com 2,5 % de glutaraldeído (Merck/Millipore, USA) em temperatura ambiente por 90 minutos.

Seguida da fixação foi adicionado o corante Alcian Blue (Sigma®, USA), (1,0 % preparado em 0,1N HCL (F.Maia ® / Brasil)) por 30 minutos, posteriormente as células foram lavadas em solução 0,1 N de HCL por 3 vezes, e analisada a coloração em microscópio óptico invertido, sendo que a coloração observada indica a síntese de proteoglicanas produzida pelos condrócitos.

6.18.3 Diferenciação adipogênica

Para a indução da diferenciação adipogênica foram utilizados cultivos de CTMA em Petakas. Ao atingirem $\cong 85,0$ % de confluência, três poços tiveram o meio alfa MEM/SFB suplementado com isobutilmetilxantina 0,5 mM (3-isobutil-1- metilxantina), indometacina 50,0 μ M e dexametasona 0,5 μ M (Sigma-Aldrich). O meio de diferenciação adipogênica (alfa MEM/DIFA) foi preparado por meio da mistura de 3,0 mL de solução de IBMX (0,18 % em água); 90 μ L de solução de indometacina 1,0 % em etanol; 490 μ L de solução de dexametasona (0,1% em etanol; diluído em alfa MEM, 1:49, v/v); e 46,42 mL de meio alfa MEM/SFB. Após homogeneização, a solução foi filtrada em membrana com microporos de 0,22 μ m (membrana de fluoreto de polivinilideno).

As CTMA foram incubadas com meio alfa-MEM/DIFA a 37 °C e 5,0 % CO₂ por 14 dias, com substituição do meio a cada 72 h. O mesmo procedimento foi realizado paralelamente, com Petakas de controle negativo, com meio de cultivo alfa MEM/SFB. Após o período de diferenciação, as placas foram submetidas à coloração para evidenciação do acúmulo citoplasmático de gotículas lipídicas (diferenciação em adipócitos), conforme os seguintes procedimentos: remoção do meio de cultivo de todos os poços (diferenciação e controle); enxágue do poço com PBS (2x); fixação das células com solução aquosa de glutaraldeído a 2,5 % (m/v, Sigma-Aldrich) por 1 h 30 min; enxágue do poço com água destilada (2x); desidratação com isopropanol 60,0 % (v/v) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte do isopropanol e adição da solução de Oil Red O® (Sigma-Aldrich) (0,3 % em isopropanol 99,0 %, m/v, diluídos em água na proporção de 3:2 v/v) e incubação à temperatura ambiente por 5 min; descarte da solução corante e enxágue com água destilada (2x); fotodocumentação e análise em microscópio invertido.

7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada e interpretada pelo próprio autor do presente estudo. Para análise dos dados foi construído um banco de dados na planilha eletrônica Microsoft Excel a qual foi exportada para o programa estatístico Minitab 18. Fez-se análise estatística descritiva comum e teste da normalidade de Anderson-Darling para todas as variáveis e controles, com referência $p > 0,10$ como “normal”. Como houve a presença dos preditores contínuos e categóricos (biomatrizes de quitosana/colágeno reticulados com concentrações crescentes de genipina de 0,10 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 % v/v) e os preditores resposta (biomatrizes de quitosana, colágeno e quitosana/colágeno), aplicou-se a regressão linear e análise residual de Durbin-Watson (Anexo G). Para todos os testes de regressão linear foi adotado nível alfa menor que 0,05 como significativo. Para análise de resíduos de Durbin-Watson, o nível de significância referencial foi de 0,05, adotando como intervalo aceitável de independência $0,95 < d_w < 1,54$ (de acordo com a tabela padrão de Durbin-Watson, $d_U < d_w < 4 - d_U$), com duas variáveis explicativas para tamanho amostral de $n=10$. Já para os ensaios de viabilidade celular, adotou-se para a análise residual de Durbin-Watson, o nível de significância referencial foi de 0,05, adotando como intervalo aceitável de independência $1,75 < d_w < 2,60$.

8 Resultados

8.1 Contagem e Viabilidade Celular

O azul tripan é um corante vital, isto é, atravessa a membrana de células mortas, mas não de células vivas. Assim, ressuspensando as células em uma solução de azul tripan é possível avaliar a viabilidade da suspensão. A contagem do número de células em uma suspensão, com emprego da câmara de Neubauer, é baseada na contagem do número de células em uma amostra de volume definido, que é depois convertido em número de células por mL ou número total de células na amostra, com as fórmulas adequadas.

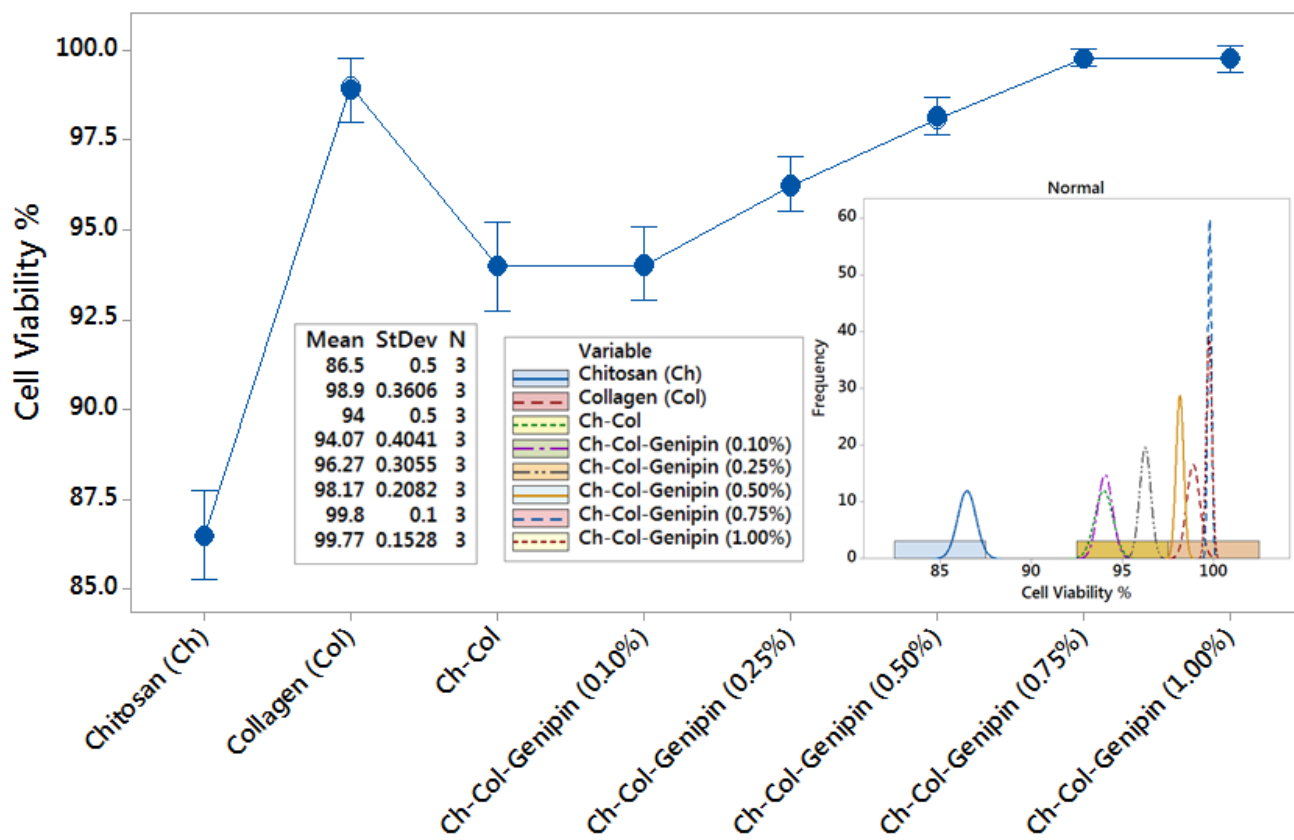
De acordo com a Tabela 2 e Figura 6, os testes em triplicata de viabilidade celular com azul de trypan mostraram maior viabilidade celular nas biomatrizes com menores porcentagens de grupamentos aminos livres. Como exemplo, a biomatriz de quitosana (Ch) apresentou a menor viabilidade celular (86.5 %) e a biomatriz de quitosana-colágeno (com 0.75 % e 1.00 % v/v de genipina) apresentou a maior viabilidade celular (99.8 %) em relação à referência de 99.5 % como valor mínimo preconizado pela Sociedade Internacional para a Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT).

Não houve significância estatística entre a amostra de quitosana-colágeno com 0.75 % e 1.00 % v/v de genipina com os grupos controles de quitosana, colágeno e quitosana-colágeno, com $p > 0.05$. E a análise residual de Durbin-Watson confirmou que não houve similaridade entre essas amostras, ficando o resultado de d_w entre $1.75 < d_w < 2.60$.

Tabela 2. Viabilidade celular (citotoxicidade) na terceira passagem, demonstrando que com o aumento do grau de *cross-linking* (reticulação) da biomatriz com genipina, ocorreu o aumento da viabilidade celular.

Biomatrizes	Viabilidade celular (VC) %
Quitosana	86,5
Colágeno	99,2
Quitosana / Colágeno	94,0
Quitosana / Colágeno / Genipina (0.10 % v/v)	94,5
Quitosana / Colágeno / Genipina (0.25 % v/v)	96,6
Quitosana / Colágeno / Genipina (0.50 % v/v)	98,4
Quitosana / Colágeno / Genipina (0.75 % v/v)	99,8
Quitosana / Colágeno / Genipina (1.00 % v/v)	99,8

Figura 06. Distribuição dos dados de viabilidade celular na terceira passagem.



8.2 Imunofenotipagem

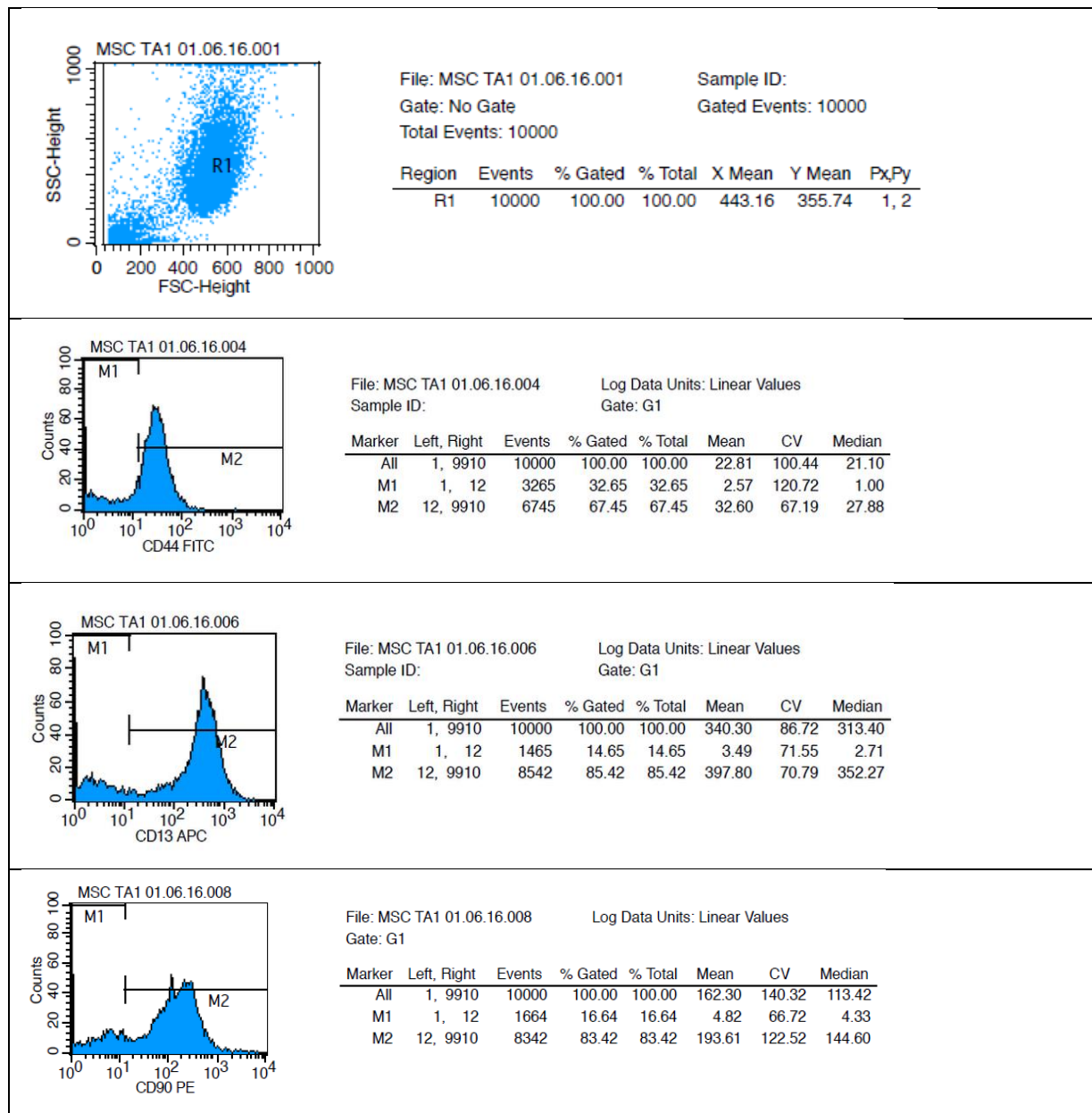
A cultura de CTM derivadas do tecido adiposo humano se mostrou uma população heterogênea fenotipicamente. Essas células estavam localizadas na região direita superior do dot-plot para FSC x SSC, correspondendo às células de maior tamanho e granulosidade. Portanto, as células desta região, que contém menos de 2,0 % dos eventos positivos, foram analisadas. A análise da região descrita revelou uma alta frequência (maior do que 90,0 %) de expressão de antígenos característicos de CTM (CD166, CD105, CD90, CD73 e CD54) na terceira passagem (Tabela 03).

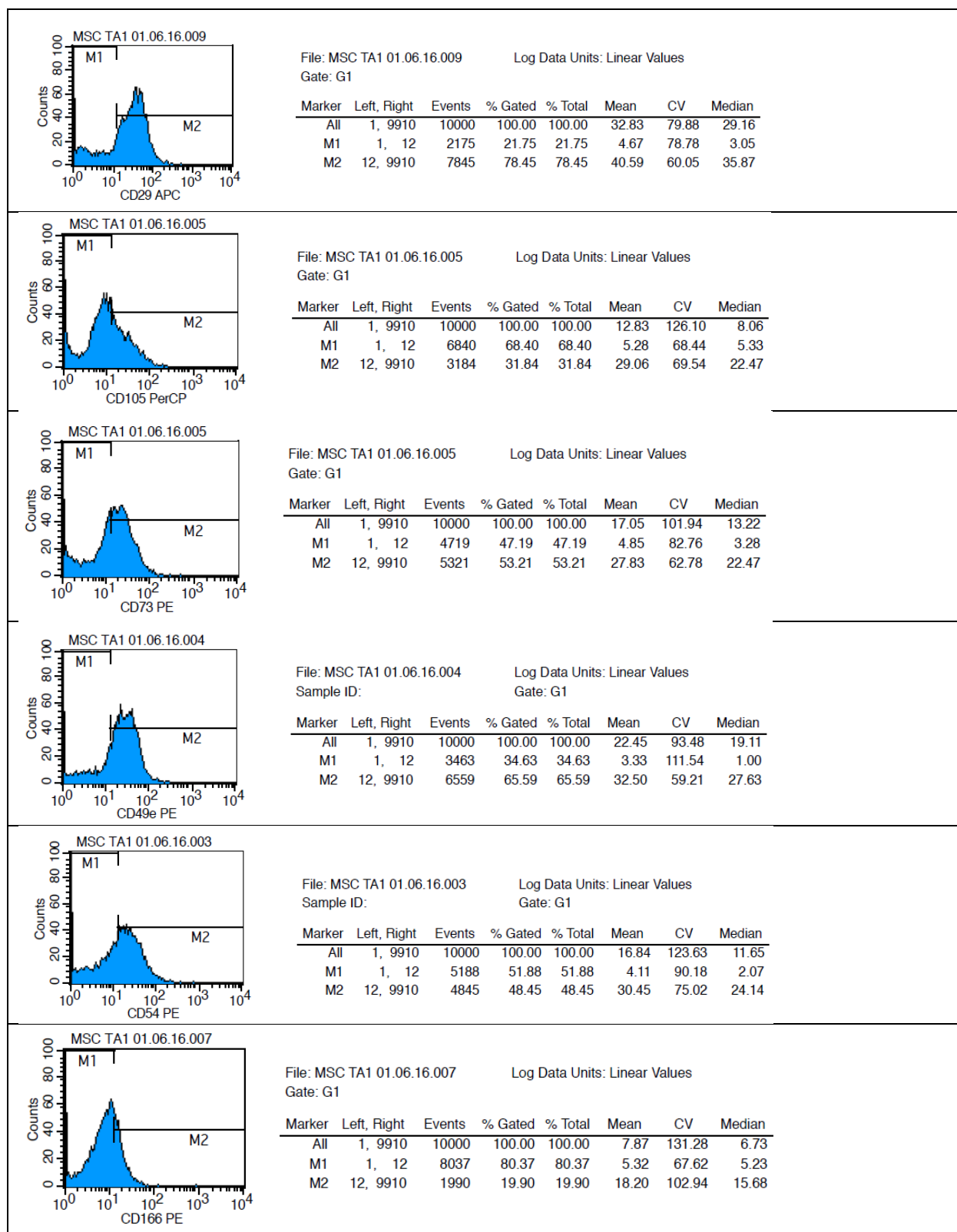
A região R1 contém as células de maior tamanho e granulosidade. Em **M₂** foram apresentados a porcentagem de células positivas para CD105, CD166, CD34, CD133, CD45, CD31, CD73, CD44, CD90, CD117 e CD54 na população total e na região de células de maior tamanho e granulosidade. Os histogramas da análise da expressão de CD31, CD90, CD34, CD117, CD54, CD73, CD44, CD133, CD45, CD105 e CD166 em células da região de maior tamanho e granulosidade (Figura 07).

Tabela 03. Imunofenotipagem das CTMA após Cultivo nas biomatrizes.

CDs / Resultados (%)	FSV	3 ^a Passagem (Petakas)	3 ^a Passagem Biomatriz	Após Criopreservação (Petakas)	Após Criopreservação (Biomatriz)
CD 45	-	1.13	1.1	1.02	0.99
CD 14	-	0.14	0.13	0.12	0.14
CD 51,61	-	1.85	1.90	1.87	1.74
CD 54	-	47.28	48.2	45.6	46.7
CD 44	-	66.93	68.5	66.3	66.8
CD 49e	-	64.42	67.4	65.5	67.3
CD 34	-	0.71	0.51	0.43	0.32
CD 13	-	84.92	85.3	83.1	84.2
CD 31	-	0.21	0.23	0.19	0.18
CD 166	-	18.73	17.4	16.6	17.2
HLA-DR	-	0.45	0.43	0.41	0.44
HLA-ABC	-	19.14	20.1	18.4	20.2
CD 29	-	77.95	78.2	76.5	78.3
CD 146	-	0.49	0.32	0.29	0.30
CD 90	-	82.25	81.2	80.02	82.1
CD 105	-	31.06	32	30.3	31.3
CD 106	-	0.68	0.89	0.69	0.58
CD 73	-	52.04	54.41	49.4	53.4

Figura 07. Histogramas da análise da expressão de CD31, CD90, CD34, CD117, CD54, CD73, CD44, CD133, CD45, CD105 e CD166 em células da região de maior tamanho e granulosidade. Resultado representativo de imunofenotipagem das CTMA após Cultivo nas biomatrizes com 0,75 % v/v de genipina.





8.3 Estudo da Normalidade (Anderson-Darling)

Em todas as análises do presente estudo, conforme Figuras 9, 13 e 17, observou-se que todas as amostras apresentaram distribuição normal, com $p > 0,10$, seguindo assim análise estatística paramétrica.

8.4 Grau de reticulação com genipina

Antes das medições do grau de reticulação com genipina, fez-se a curva padrão (equação analítica) com o aminoácido L-arginina com gradiente de concentração de 1.0 a 8.0 mg mL⁻¹, conforme apresentado na Figura 08.

A Figura 10 mostra o grau de reticulação na quitosana, colágeno, quitosana/colágeno e quitosana/colágeno reticulados com concentrações crescentes de genipina de 0,10 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 %. O grau de reticulação variou de 80,0 % a 6,3 %, de acordo com o número de grupamentos amino livres e com a concentração de genipina, conforme apresentado na Tabela 04.

A análise de regressão estatística entre os preditores contínuos e categóricos (biomatrizes de quitosana/colágeno reticulados com concentrações crescentes de genipina de 0,10 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 % v/v) e os preditores resposta (biomatrizes de quitosana, colágeno e quitosana/colágeno) mostrou que não houve significância estatística entre os preditores contínuos e categóricos em relação aos preditores resposta biomatrizes quitosana e colágeno, evidenciando que não houve diferença no grau de intumescimento, com $p > 0.05$, porém, já em relação ao preditor resposta biomatriz de quitosana/colágeno houve significância estatística, com $p < 0.05$, conforme apresentado na Figura 11.

Na análise residual de Durbin-Watson, todos os resultados de correlação entre o grau de intumescimento das biomatrizes ficaram no intervalo aceitável de independência $0.95 < d_w < 1.54$ (de acordo com a tabela padrão de Durbin-Watson, $d_U < d_w < 4 - d_U$), com duas variáveis explicativas e com tamanho amostral de $n=10$. Portanto, não houve relação de dependência (significância) entre os dados analisados. Dessa forma, os resultados são confirmados pela Figura 12, em que os resíduos parecem seguir uma linha reta. Não há evidência de pontos discrepantes ou de variáveis não identificadas; os resíduos parecem ser dispersos aleatoriamente em torno de zero. Não existem evidências de variância não constante, termos ausentes, pontos discrepantes ou pontos influentes; o histograma não segue uma curva normal; os resíduos parecem estar dispersos aleatoriamente em torno de zero. Não há evidência de que os termos de erro estejam correlacionados entre si.

Esses resultados demonstraram que a genipina é favorável reagente de reticulação para colágeno e quitosana, como pode eficientemente reticular os grupos amino, mesmo com baixa concentração. Além disso, à medida que a concentração de genipina aumentou, mais grupos amino foram reticulados.

A região destacada em azul na tabela 04 mostra a biomatriz com 0.75 % v/v de genipina que foi a que melhor apresentou as características físico-químicas realizadas no presente estudo selecionada e, portanto, foi a biomatriz selecionada para os estudos biológicos.

Equação Analítica com L-arginina

Figura 08 - Gráfico Curva analítica com L-arginina.

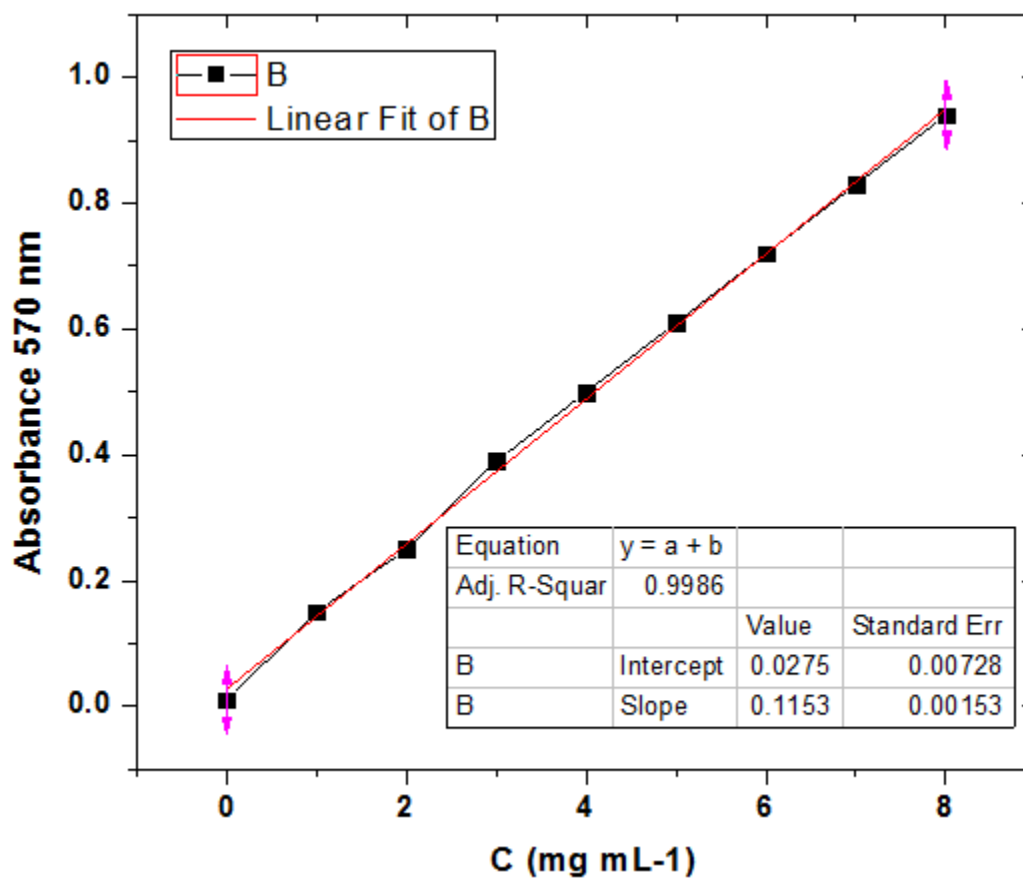


Figura 09. Teste da normalidade em relação a cada grupo de biomatrizes. Foi adotado $p > 0.10$ como resultado de normalidade.

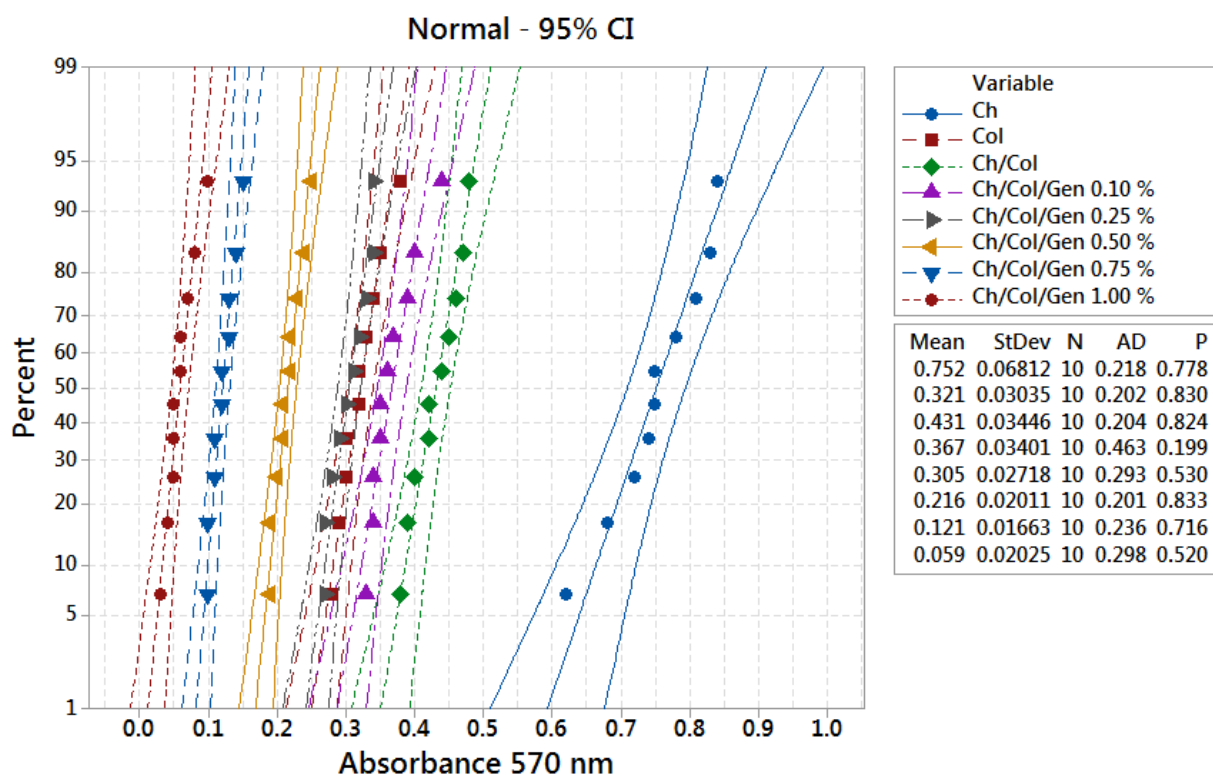


Tabela 04. Valores em porcentagem da diminuição do grau de reticulação com o aumento da concentração de genipina.

Biomatrizes	Grau de reticulação %
L-arginina (padrão)	±100,0
Quitosana	80,0
Colágeno	34,1
Quitosana / Colágeno	45,9
Quitosana / Colágeno / Genipina (0,10 % v/v)	39,0
Quitosana / Colágeno / Genipina (0,25 % v/v)	32,4
Quitosana / Colágeno / Genipina (0,50 % v/v)	23,0
Quitosana / Colágeno / Genipina (0,75 % v/v)	12,9
Quitosana / Colágeno / Genipina (1,00 % v/v)	6,3

Figura 10. Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e declínio da curva do grau de reticulação com o aumento da concentração de genipina.

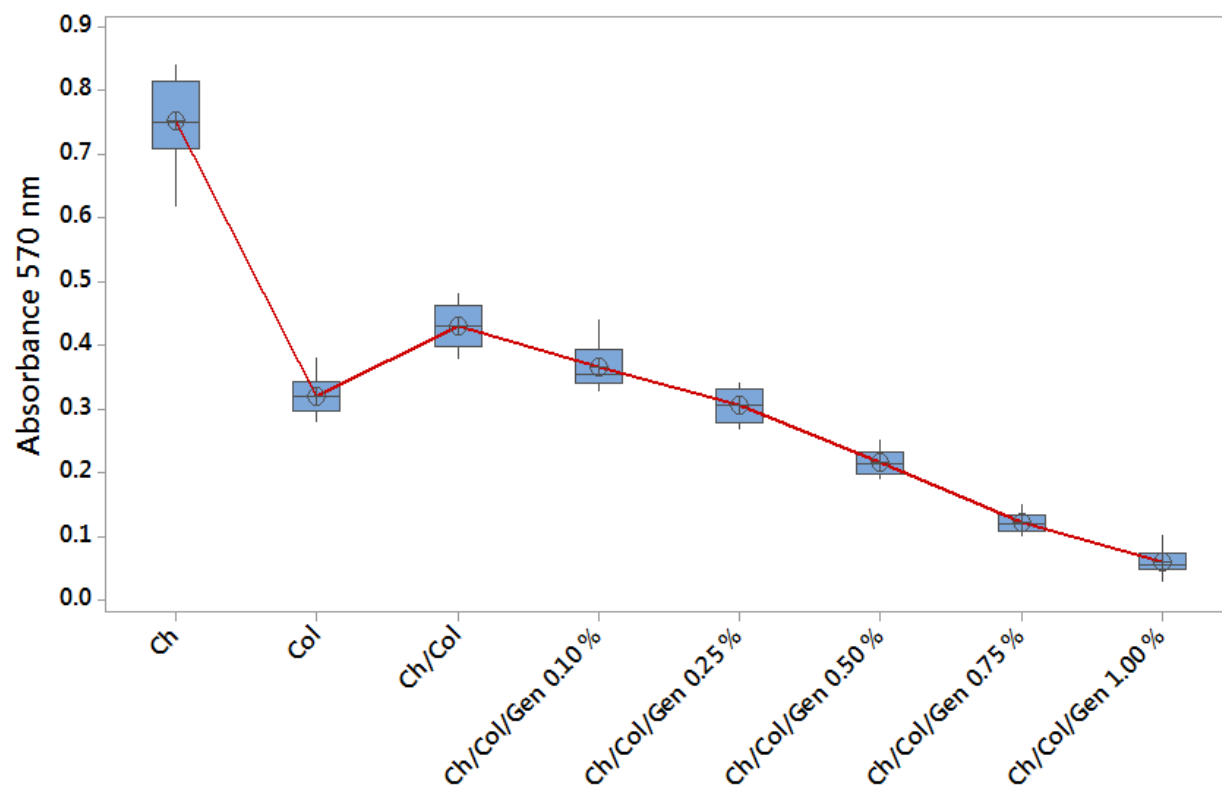


Figura 11. Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio grau de reticulação.

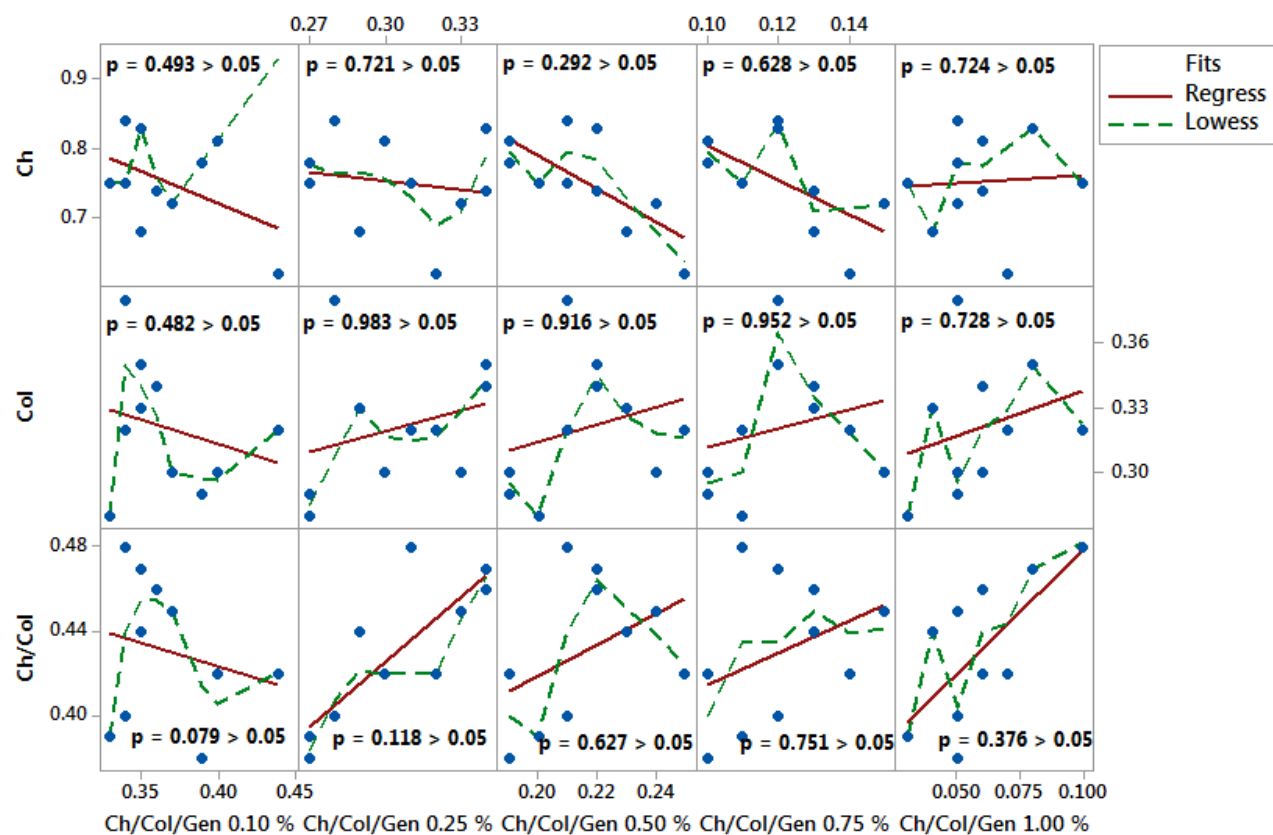
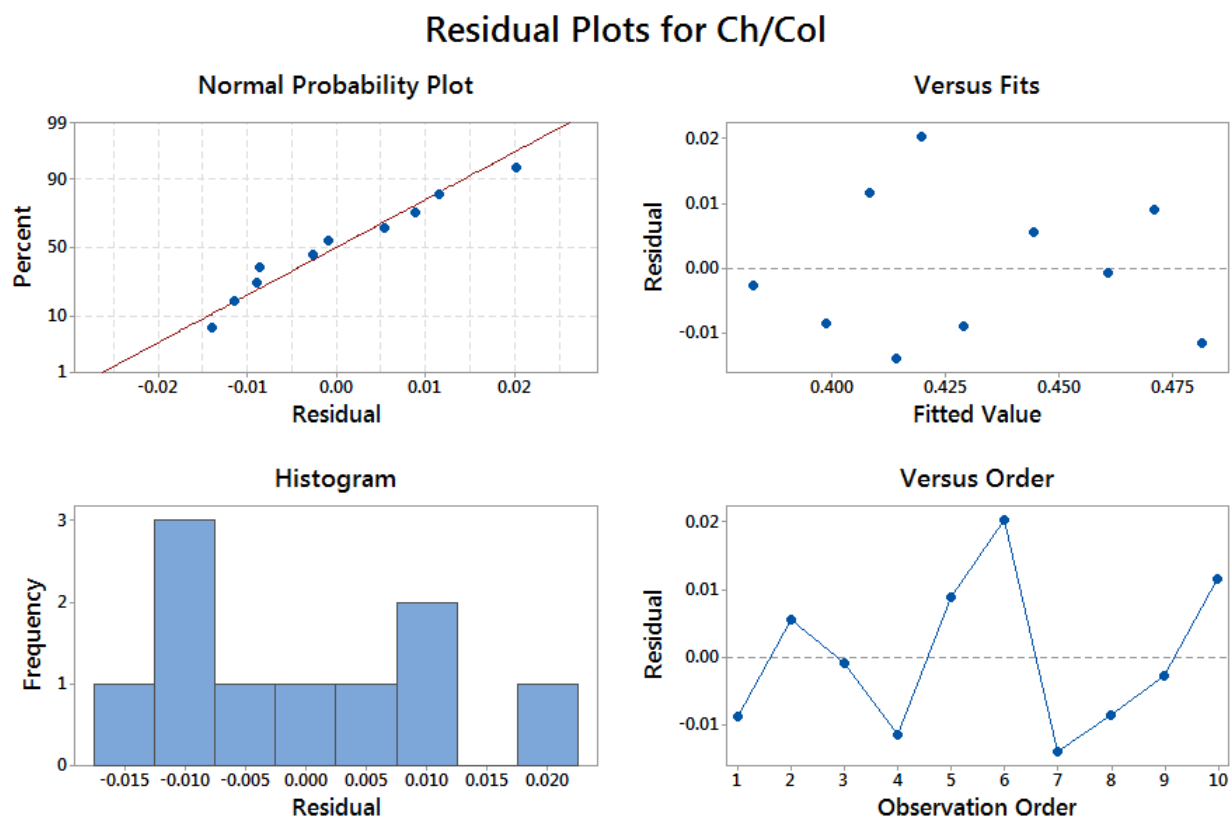


Figura 12. Gráficos mostrando os resultados da análise residual para o ensaio de reticulação.



8.5 Ensaio de degradação da biomatriz em amostra sanguínea com meio de cultivo

De acordo com a Figura 13, as biomatrizes apresentaram valores com comportamento paramétrico apenas com as concentrações de genipina de 0,75 % e 1,00 % v/v. A Figura 14 mostra a taxa de perda de massa das matrizes durante a imersão numa solução de sangue humano em meio de cultivo celular. As biomatrizes com gradiente crescente de conteúdo de genipina de 0,10 % a 1,00 % presentes nesta sequência, apresentaram redução na taxa de degradação.

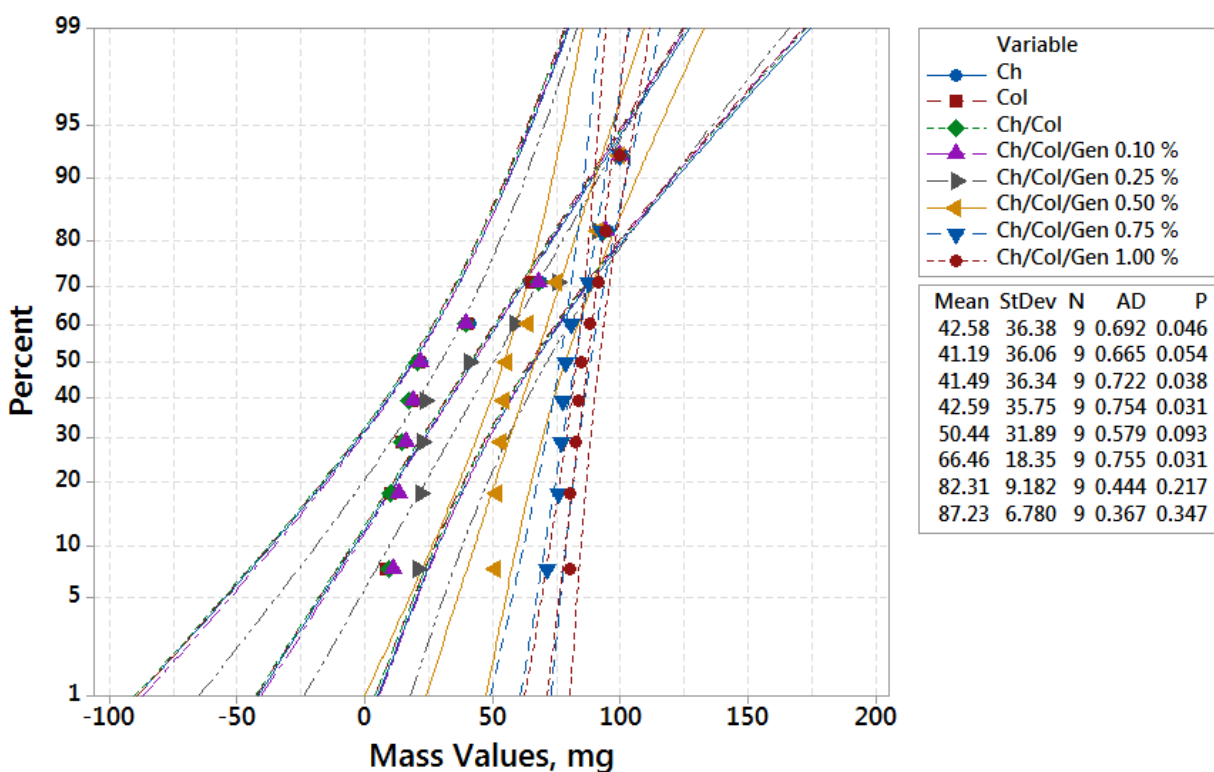
A análise de regressão estatística entre os preditores contínuos e categóricos (biomatrixies de quitosana/colágeno reticulados com concentrações crescentes de genipina de 0,10 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 % v/v) e os preditores resposta (biomatrizes de quitosana, colágeno e quitosana/colágeno) mostrou que não houve significância estatística entre os preditores contínuos e categóricos em relação aos preditores resposta biomatrizes quitosana e colágeno até a concentração de 0.25 % v/v de genipina, evidenciando que não houve diferença no grau de degradação, com $p < 0.05$, porém, já a partir de 0.50 % v/v de genipina, houve diferença estatística, com $p > 0.05$, conforme apresentado na Figura 15.

Na análise residual de Durbin-Watson, todos os resultados de correlação entre o grau de intumescimento das biomatrizes ficaram no intervalo aceitável de independência $0.95 < d_w < 1.54$ (de acordo com a tabela padrão de Durbin-Watson, $dU < d_w < 4-dU$), com duas variáveis explicativas e com tamanho amostral de $n=10$. Portanto, não houve relação de dependência (significância) entre os dados analisados. Dessa forma, os resíduos parecem seguir uma linha reta. Não há evidência de pontos discrepantes ou de

variáveis não identificadas; os resíduos parecem ser dispersos aleatoriamente em torno de zero.

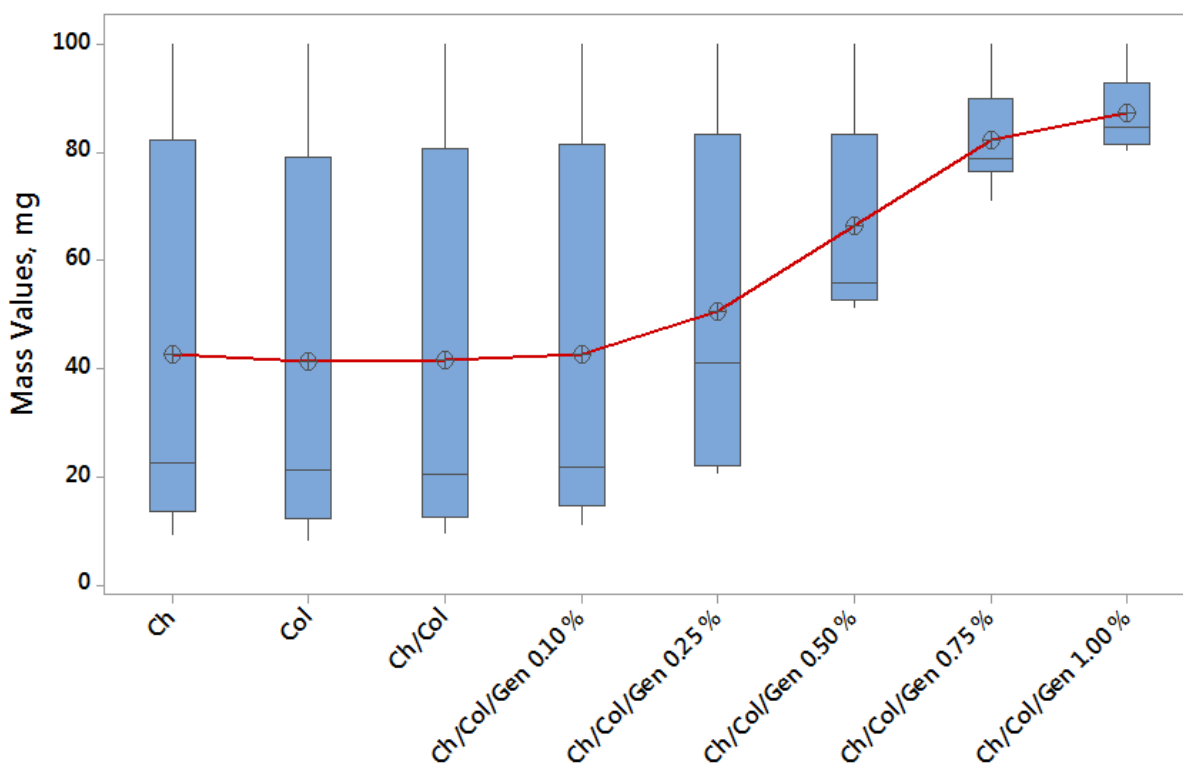
Não existem evidências de variância não constante, termos ausentes, pontos discrepantes ou pontos influentes; o histograma não segue uma curva normal; os resíduos parecem estar dispersos aleatoriamente em torno de zero. Não há evidência de que os termos de erro estejam correlacionados entre si (Figura 16).

Figura 13. Teste da normalidade em relação a cada grupo de biomatrizes. Foi adotado $p > 0.10$ como resultado de normalidade.



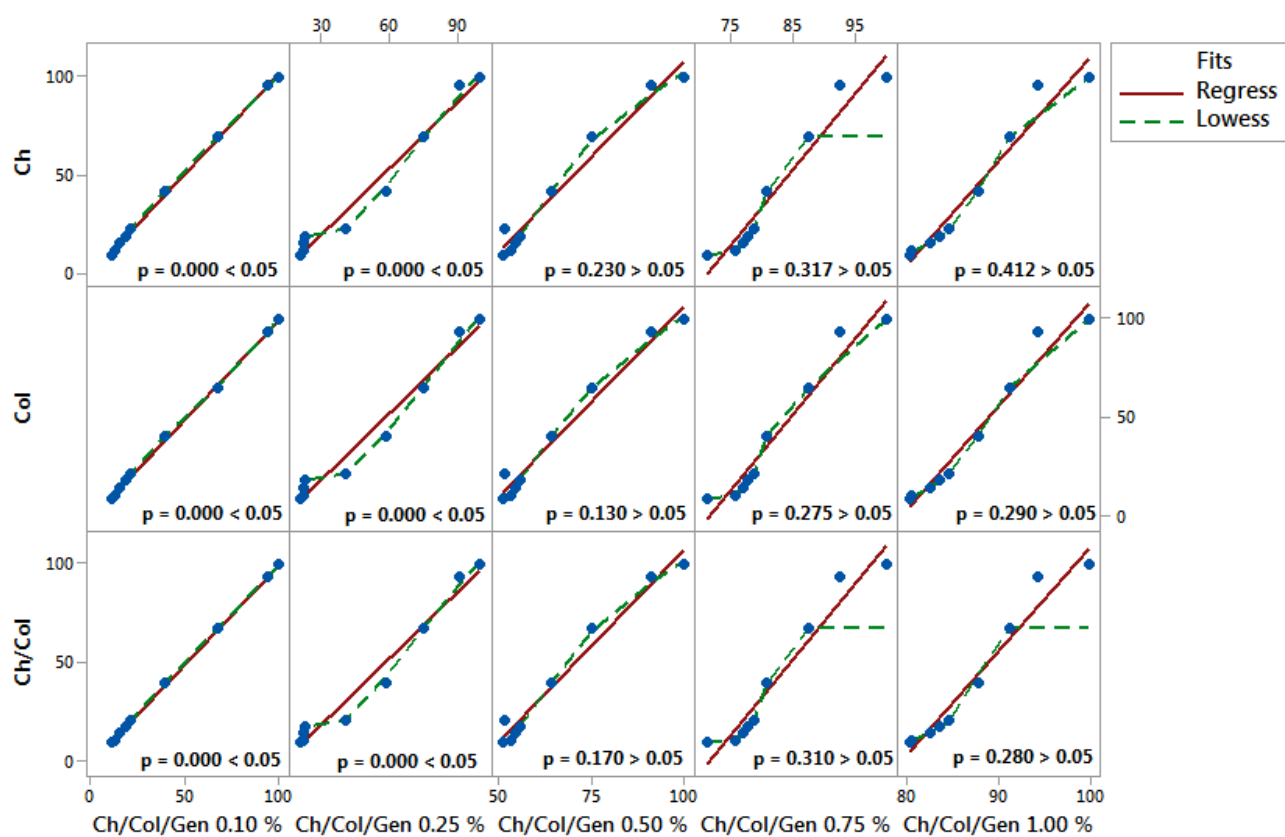
(Fonte: Autor, 2017).

Figura 14. Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e diminuição da degradação das biomatrizes com o aumento da concentração de genipina.



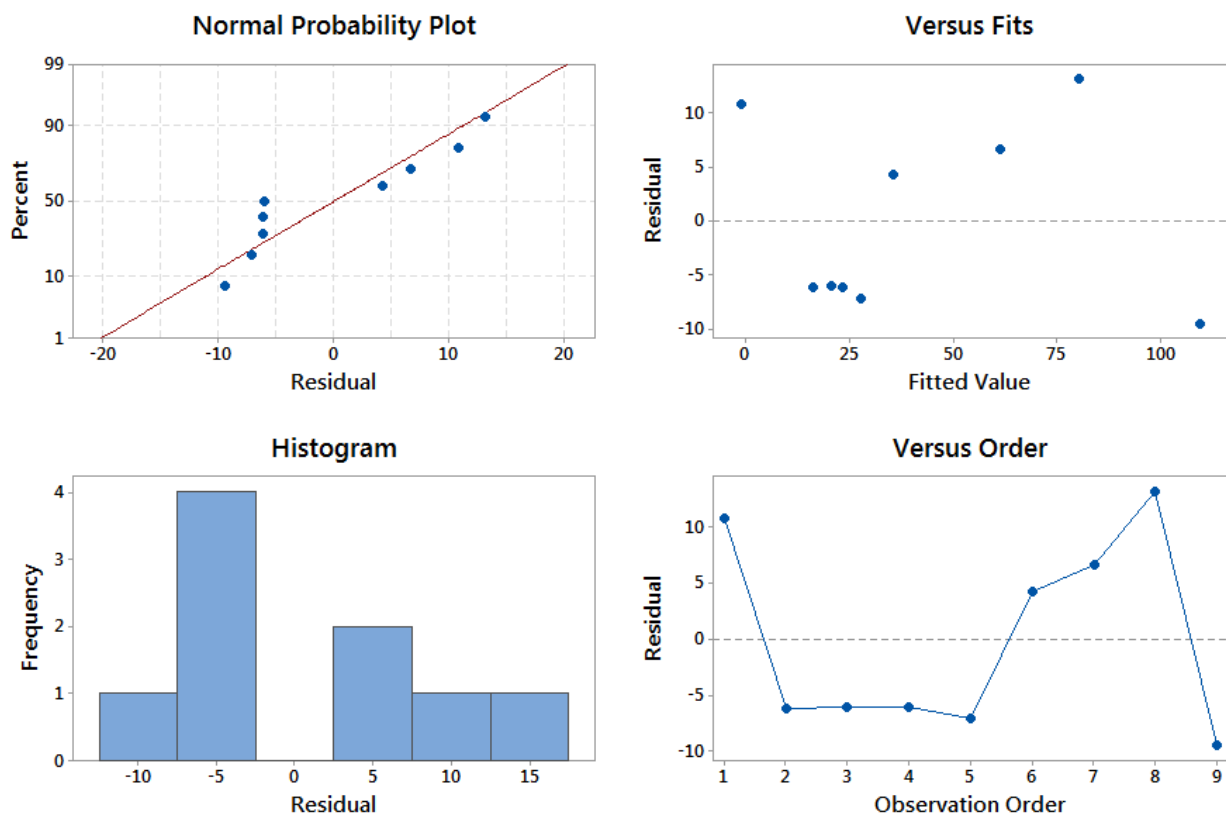
(Fonte: Autor, 2017)

Figura 15. Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio grau de degradação.



(Fonte: Autor, 2017)

Figura 16. Gráficos mostrando os resultados da análise residual para o ensaio de degradação.



(Fonte: Autor, 2017)

8.6 Ensaio de Intumescimento

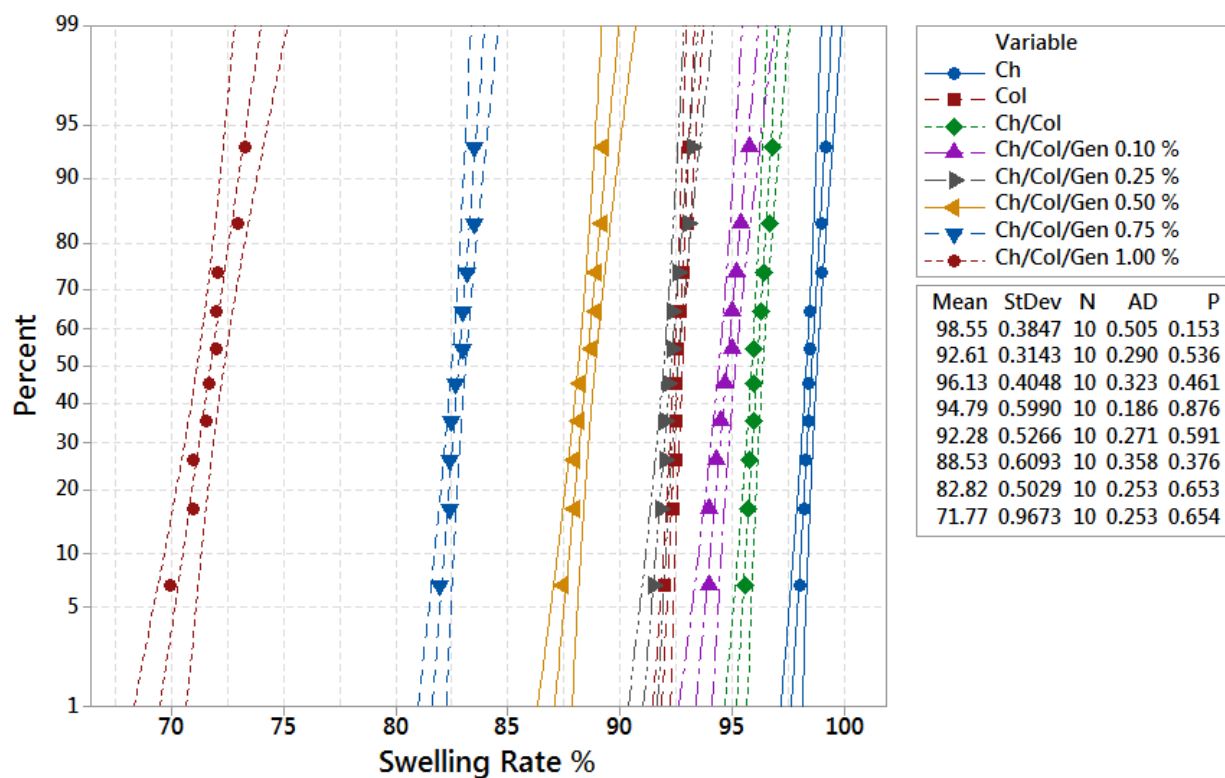
De acordo com a Figura 17, todos tipos de biomatrizes apresentaram comportamento paramétrico. A Figura 18 mostra que a biomatriz de quitosana, devido ao maior número de grupos hidrofílicos, apresentou maior grau de intumescimento em relação às biomatrizes de colágeno, quitosana-colágeno e quitosana-colágeno inter cruzada com gradiente de 0,10% a 1,00%. Em virtude do aumento da rigidez dos biomatrizes reticulados com genipina, a biomatriz com 0.75 % v/v de genipina apresentou rigidez moderada e com grau de intumescimento em torno de 80.0 %, apontando ser escolhida para outros estudos.

A análise de regressão estatística entre os preditores contínuos e categóricos (biomatrizes de quitosana/colágeno reticulados com concentrações crescentes de genipina de 0,10 %, 0,25 %, 0,50 %, 0,75 % e 1,00 % v/v) e os preditores resposta (biomatrizes de quitosana, colágeno e quitosana/colágeno) mostrou que não houve significância estatística entre os preditores contínuos e categóricos em relação aos preditores resposta biomatrizes quitosana e colágeno, evidenciando que não houve diferença no grau de intumescimento, com $p > 0.05$, porém, já em relação ao preditor resposta biomatriz de quitosana/colágeno houve significância estatística, com $p < 0.05$, conforme apresentado na Figura 19.

Na análise residual de Durbin-Watson, todos os resultados de correlação entre o grau de intumescimento das biomatrizes ficaram no intervalo aceitável de independência $0.95 < d_w < 1.54$ (de acordo com a tabela padrão de Durbin-Watson, $dU < d_w < 4 - dU$), com duas variáveis explicativas e com tamanho amostral de $n=10$. Portanto, não houve relação de dependência (significância) entre os dados analisados.

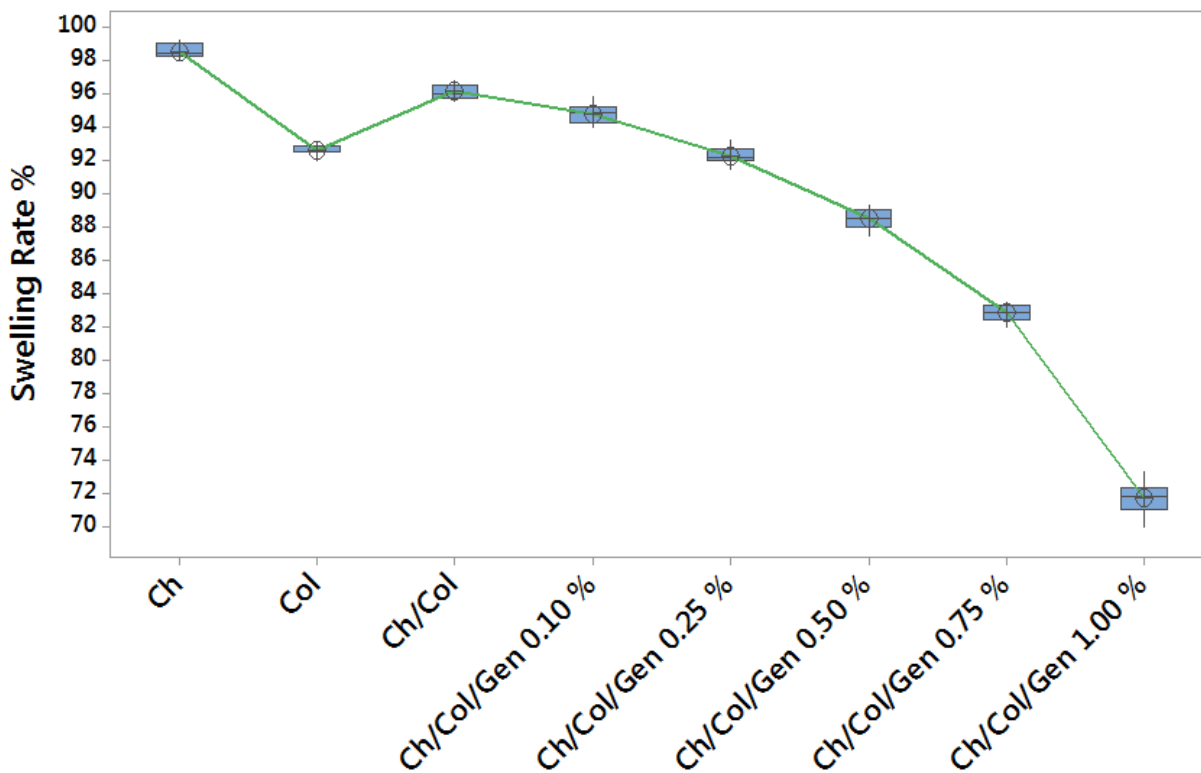
Dessa forma, os resultados são confirmados pela Figura 20, em que os resíduos parecem seguir uma linha reta. Não há evidência de pontos discrepantes ou de variáveis não identificadas; os resíduos parecem ser dispersos aleatoriamente em torno de zero. Não existem evidências de variância não constante, termos ausentes, pontos discrepantes ou pontos influentes; o histograma não segue uma curva normal; os resíduos parecem estar dispersos aleatoriamente em torno de zero. Não há evidência de que os termos de erro estejam correlacionados entre si.

Figura 17. Teste da normalidade para o ensaio intumescimento, com $p > 0.10$ como significativo.



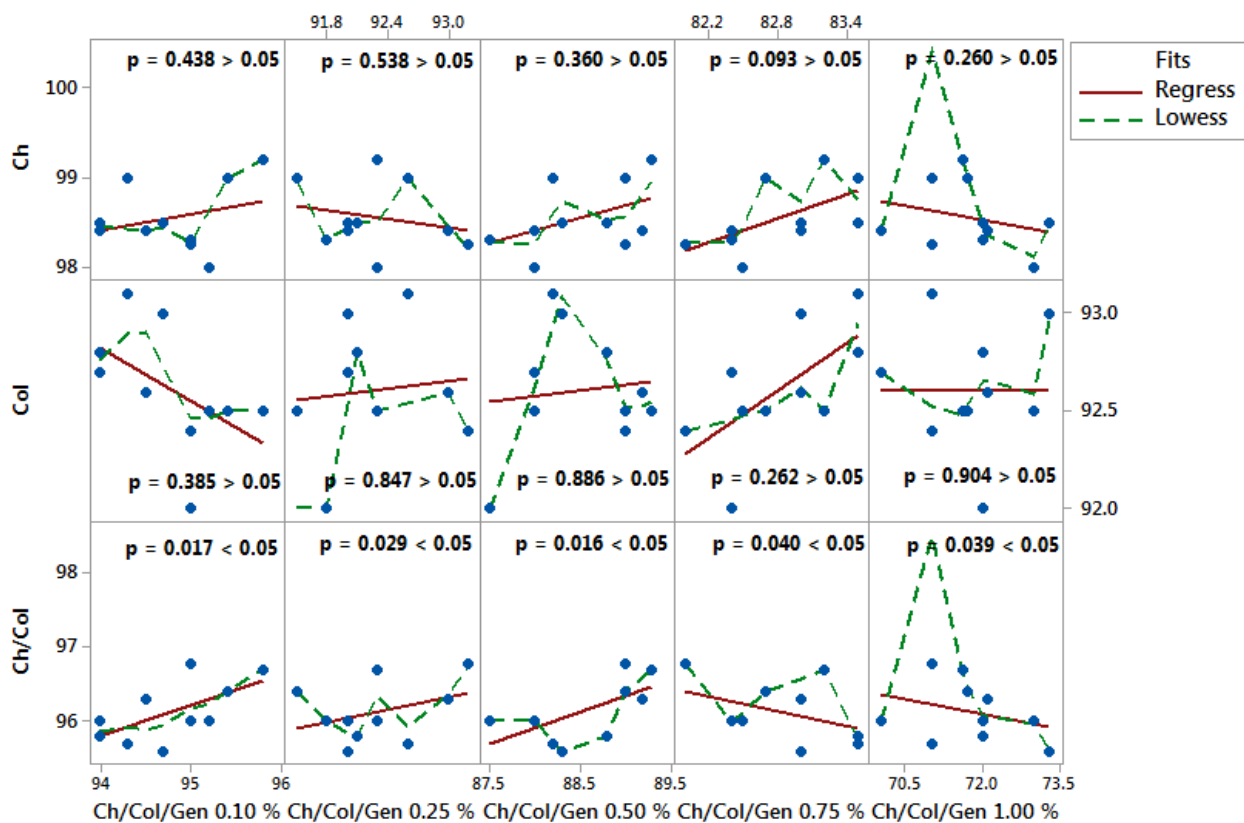
(Fonte: Autor, 2017)

Figura 18. Gráfico modelo Box-Plot mostrando valores estatísticos de média, desvio-padrão e declínio da curva de intumescimento com o aumento da concentração de genipina.



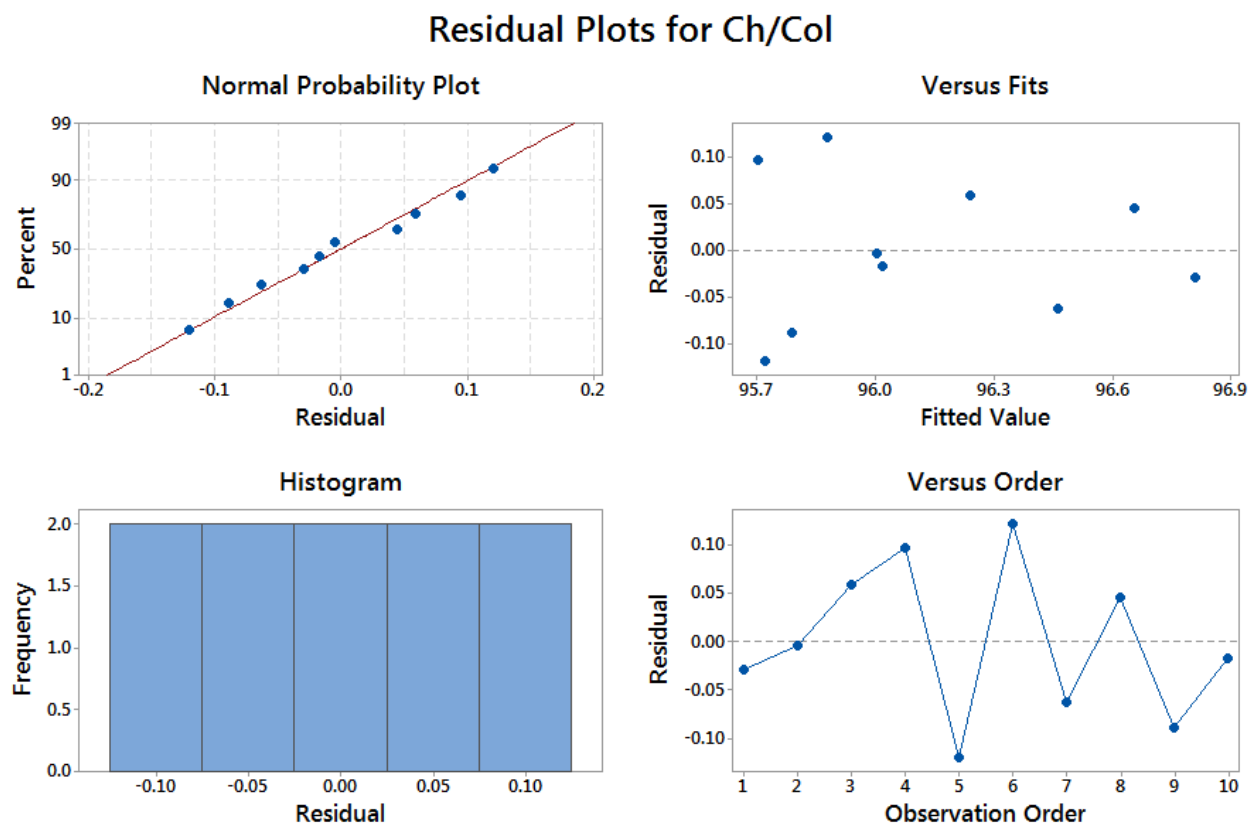
(Fonte: Autor, 2017)

Figura 19. Gráfico modelo Matrix-Plot mostrando os resultados da análise de regressão entre os preditores contínuos/categóricos e resposta no ensaio intumescimento.



(Fonte: Autor, 2017)

Figura 20. Gráficos representativos dos três ensaios do presente estudo, mostrando de maneira genérica os resultados da análise residual.



(Fonte: Autor, 2017)

8.7 Microscopia de luz de contraste de fase e eletrônica de varredura

Por meio das imagens A e B, pode-se observar as CTMA aderidas e proliferadas nas Petakas, e nas imagens C e D, pode-se analisar as mesmas células em processo mitótico, de acordo com a Figura 21.

Já nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), observou-se as imagens dos biopolímeros de quitosana, colágeno e genipina individualmente, bem como em sua forma combinada quitosana-colágeno com genipina a 0,75 % (biomatriz). Também foi analisado a aderência e proliferação das CTMA na biomatriz, mostrando imagens com as CTMA em fase mitótica e também imagens em fase proliferativa e com projeções citoplasmáticas, conforme Figura 22.

Além disso, pode-se observar na superfície das CTMA que não houve o aparecimento de exossomos, mostrando que mesmo na presença da biomatriz, as células não apresentaram intensa atividade, mantendo o estado de quiescência. Os exossomos aparecem morfologicamente em análises de MEV como “bolinhas” na superfície das CTMA.

Figura 21. Imagens de microscopia de contraste de fase mostrando nas Figuras **A** e **B** as CTMA aderidas nas Petakas e nas Figuras **C** (final de anáfase) e **D** (telófase) as CTMA em divisão celular.

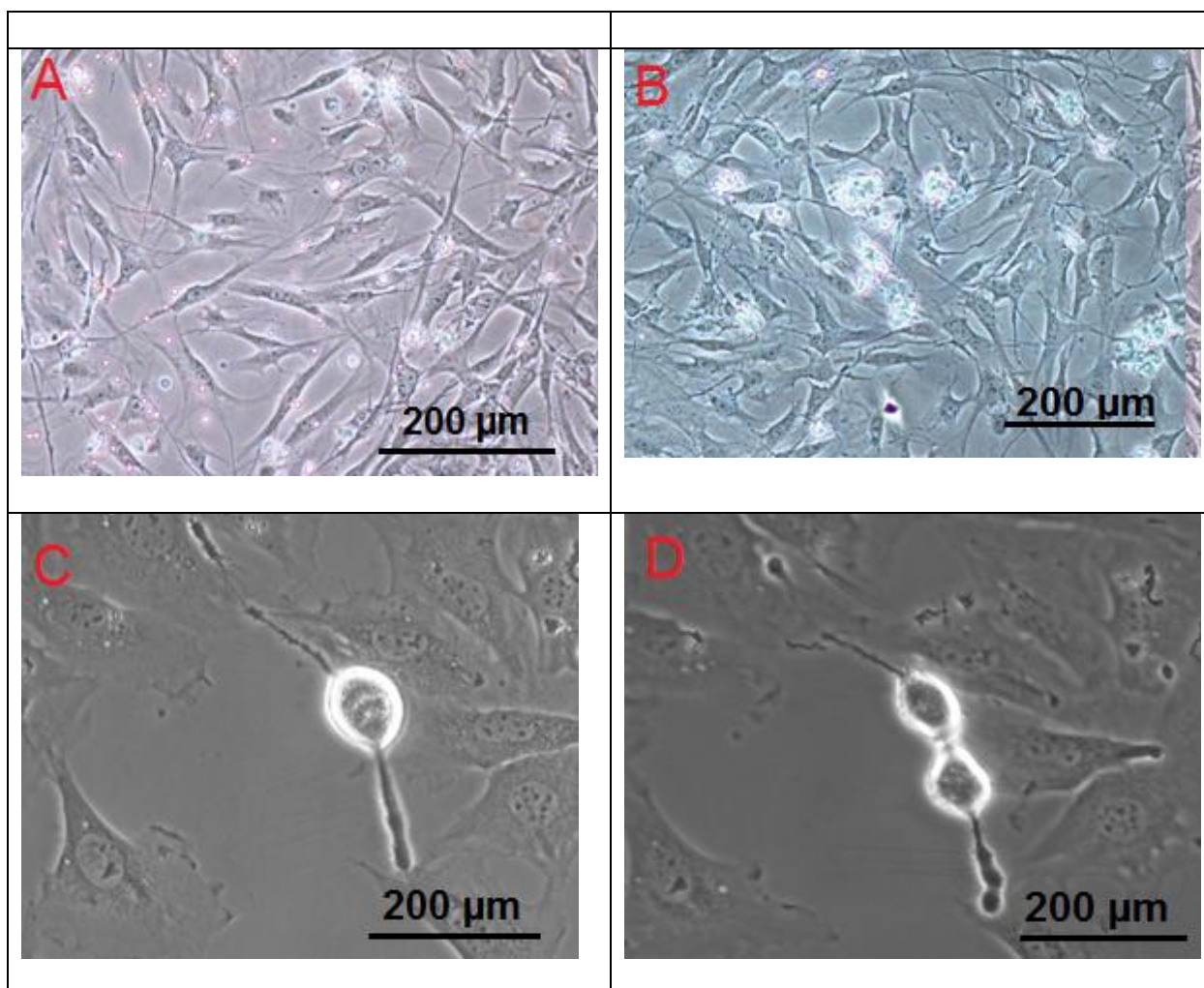
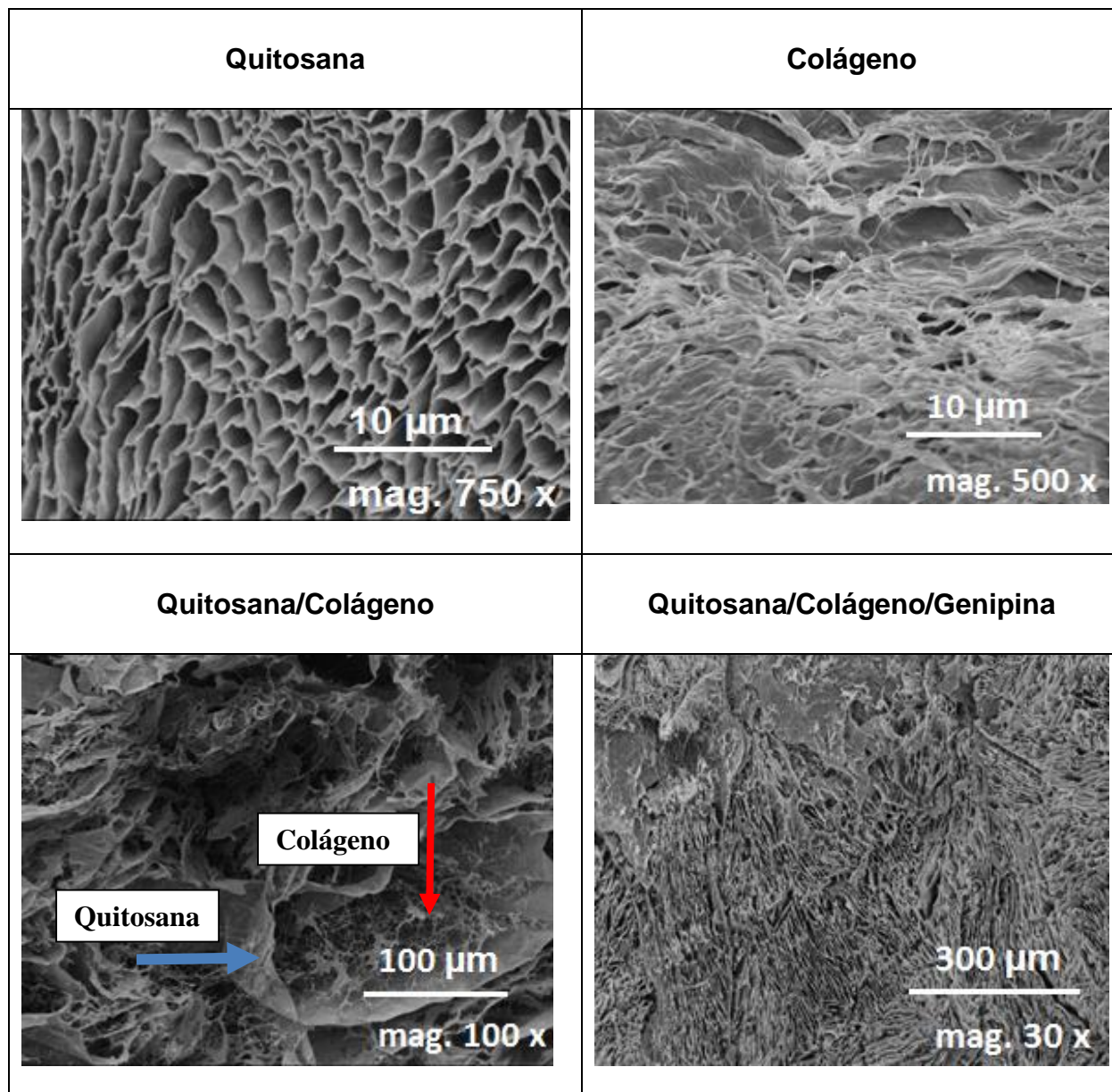
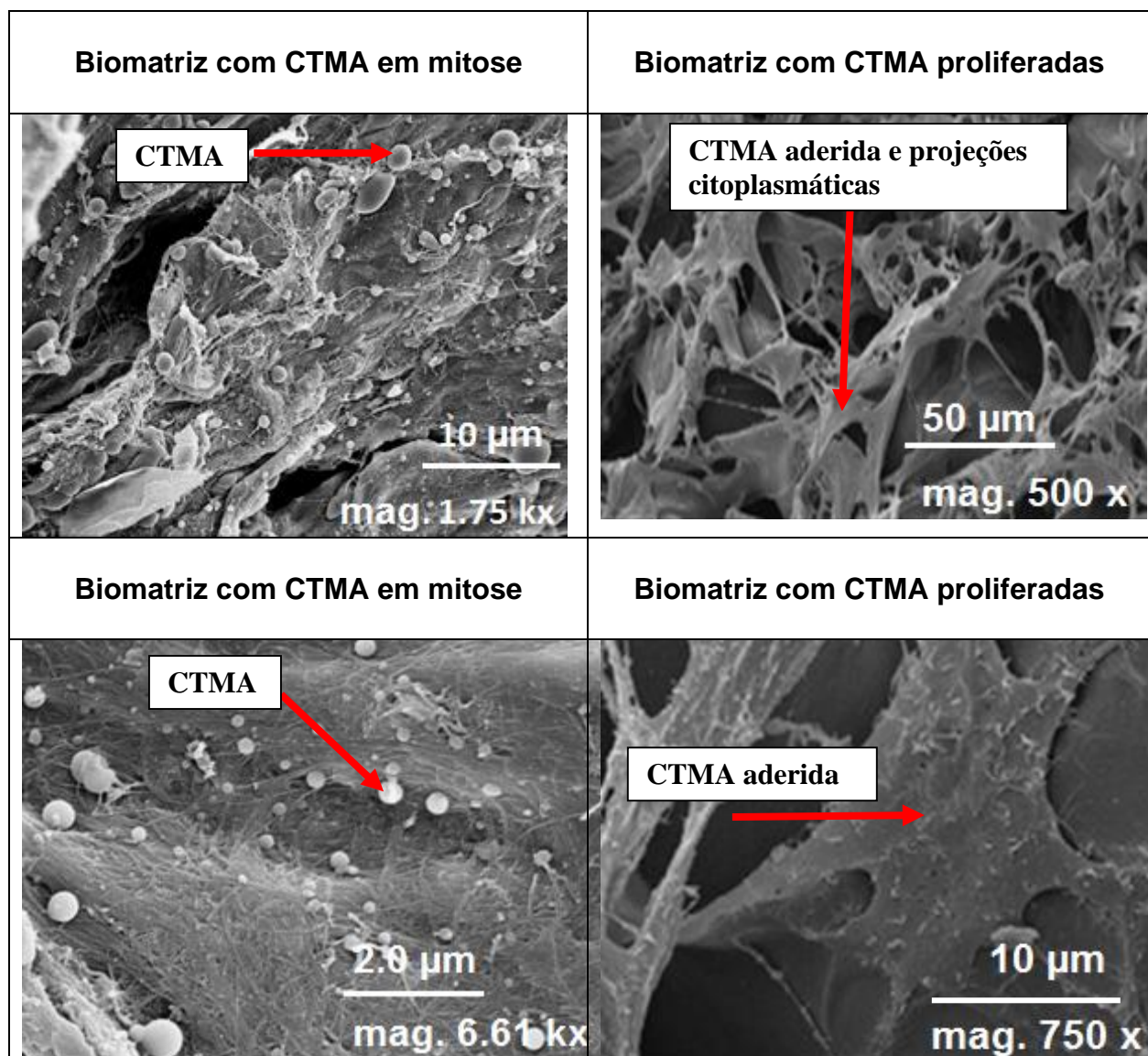


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura mostrando imagens das biomatrizes de quitosana, colágeno, quitosana/colágeno, quitosana/colágeno com genipina a 0,75 % v/v, CTMA em fuso mitótico aderidas na biomatriz de quitosana/colágeno com genipina a 0,75 % v/v e biomatriz com CTMA aderidas e proliferadas.

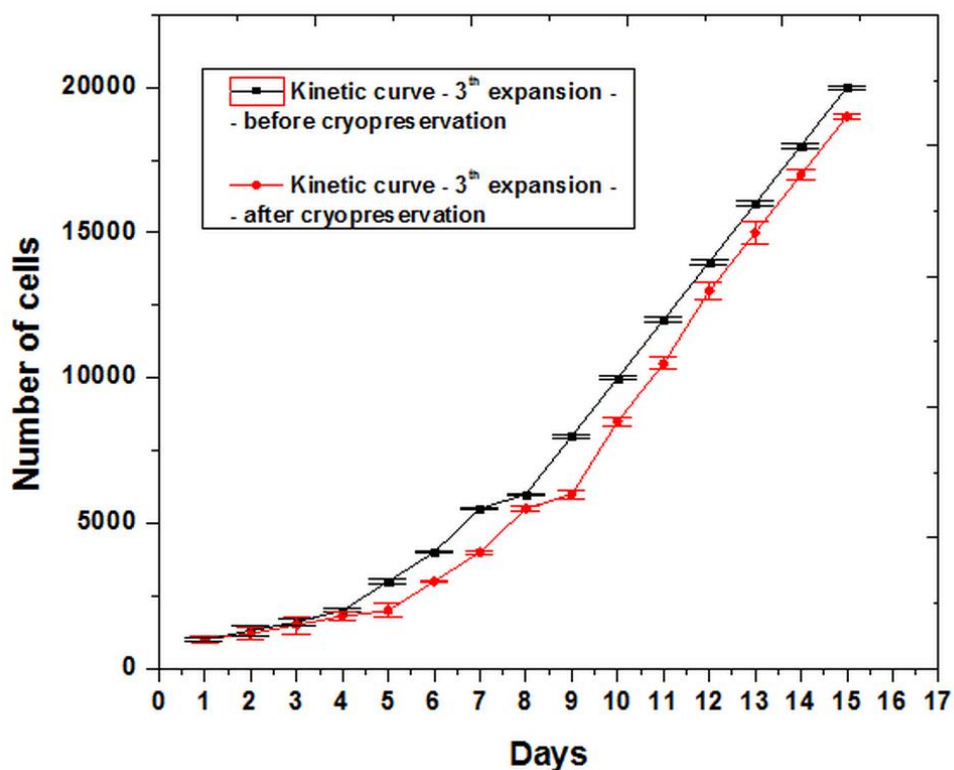




8.8 Estudo da cinética de crescimento das CTMA antes e após criopreservação

O estudo da cinética de crescimento celular analisou o tempo de duplicação da população (PDT) das CTMA, envolvendo um aumento considerável da taxa de crescimento celular, à medida que o número de células foram aumentando e sendo estimuladas por efeito autócrino até o tempo médio de 15 dias. A primeira duplicação considerável do número de células ocorreu após a segunda troca de meio, do oitavo (8) ao nono (9) dia, conforme apresentado na Figura 23.

Figura 23. Curva de cinética de crescimento das CTMA.



8.9 Diferenciação celular

Para comprovar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais, padronizamos um protocolo eficiente para diferenciação nas linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas. Após a expansão celular e a caracterização por citometria de fluxo, iniciou-se a diferenciação nas três linhagens descritas.

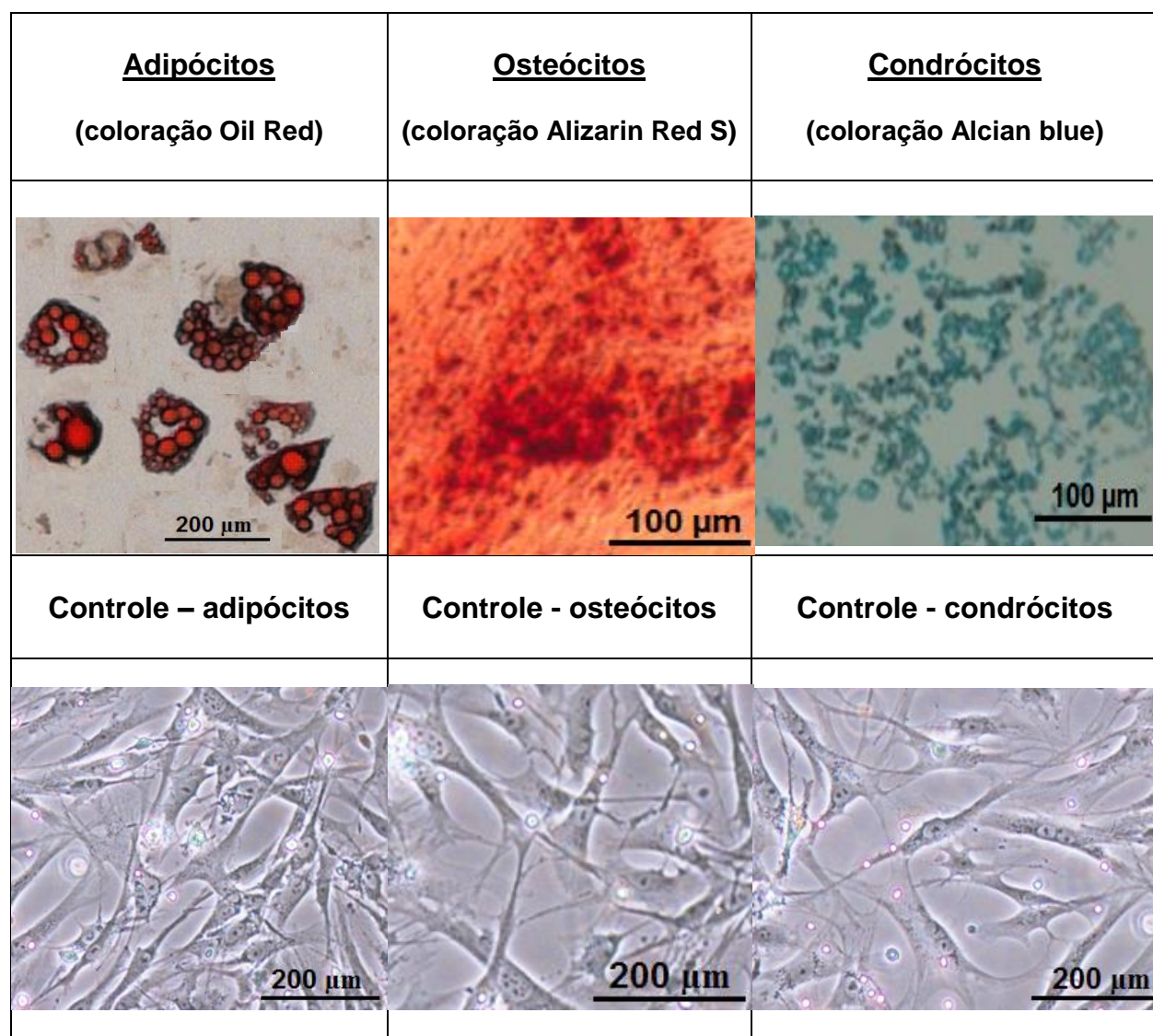
Após a diferenciação adipogênica, as células-tronco mesenquimais apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com Oil Red. A propriedade desse corante de interagir com lipídeos e triglicerídeos neutros mostra uma coloração vermelha que evidencia o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas. Como pode-se observar na Figura 24, as células-tronco mesenquimais perderam sua morfologia fibroblástica e adquiriram uma morfologia esférica e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos.

O processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais para a linhagem osteogênica foi evidenciado com a coloração Alizarin Red S que cora de vermelho os depósitos de cálcio e outros minerais. Como pode-se observar na Figura 24, em volta das células diferenciadas encontram-se regiões avermelhadas, as quais supõem-se que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Outra característica marcante é a mudança de morfologia, pois as células fibroblásticas alteram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrando toda placa de cultura e em alguns lugares, formando aglomerados celulares.

Após três semanas as células-tronco mesenquimais induzidas para diferenciação condrogênica, foram coradas com Alcian blue. As células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento no citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada devido à interação do corante com as glicosaminoglicanas produzidas ou secretadas durante a diferenciação.

A Figura 24 mostra as CTMA na terceira passagem apresentando morfologia fibroblástica. Células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem adipogênica coradas com Oil Red, mostrando acúmulo de vesículas de lipídios nas células. D células-tronco mesenquimais diferenciadas na linhagem osteogênica coradas com Alizarin Red S mostrando acúmulo de cálcio formado, e células-tronco mesenquimais em microscopia óptica durante a cultura de diferenciação, mostrando formação de colônias e alinhamento das células com sua estrutura alongada (Figura 24). Células-tronco mesenquimais diferenciadas em linhagem condrogênica coradas com Alcian blue, observa-se a mudança da morfologia das células (arredondadas) e a produção de matriz com proteoglicanas coradas em azul (n=6).

Figura 24. Imagens que mostram a diferenciação de CTMA em três linhagens celulares diferentes, adipócitos, osteócitos e condrócitos.



8.10 Análise citogenética – estabilidade cromossômica e cromatídica

O estudo da estabilidade do material genético em nível cromossômico foi realizado com base na presença de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas, além de alterações numéricas. As células foram submetidas à coloração usual com Giemsa, conforme protocolos rotineiramente utilizados no Laboratório de Genética do Hospital de Base (Hemocentro/São José do Rio Preto/SP). Os achados foram interpretados e descritos de acordo com informações e padronização contida no *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016).

Os ensaios de citogenética foram realizados após a expansão celular na 3ª passagem, após 48 h de cultivo nas Petakas (controle) e biomatriz de quitosana-colágeno com genipina a 0,75 % v/v. O mesmo se repetiu após 12 meses de criopreservação. Foram analisadas 480 células no total (amostras das duas participantes), conforme descrito anteriormente.

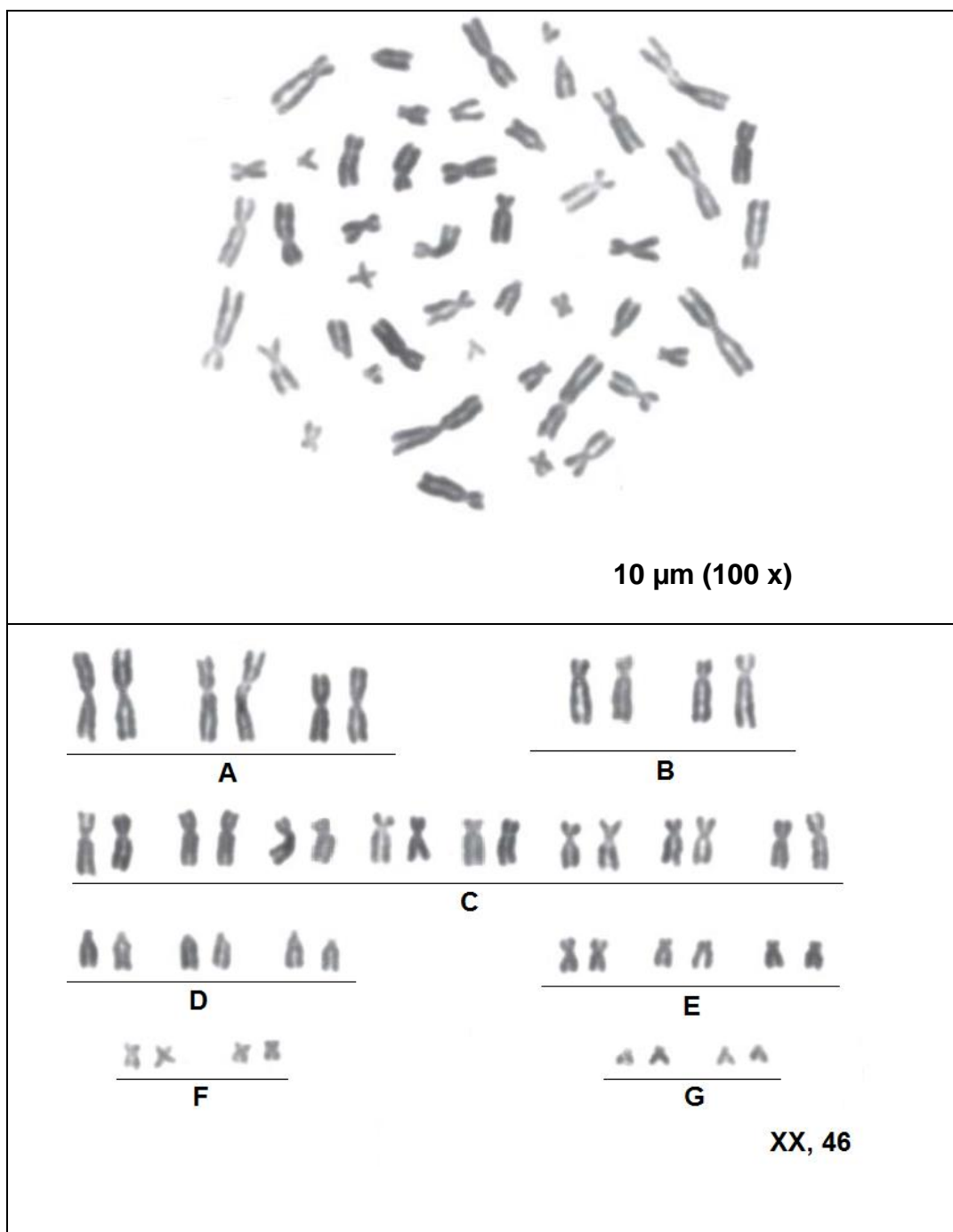
Para melhor conhecer o tempo em dias mais preciso para obtenção de um número maior de CTMA em metáfase, para a interrupção e estabilização dos cromossomos, antes e após criopreservação, fez-se análise de cinética de crescimento celular, conforme apresentado no item 8.8, Figura 23. Por meio desse estudo, pode-se entender que o melhor tempo para aplicação do colcemide foi após 24h (um dia) da segunda troca de meio de cultivo. De acordo com a Figura 23, esse melhor tempo foi do oitavo (8) ao nono (9) dia. A análise cromossômica das amostras não revelou diferença estatística significativa entre as frequências de alterações numéricas e/ou quebras ou falhas cromatídicas e/ou cromossômicas, conforme apresentado na Figura 25, tanto nos cromossomos metafásicos obtidos após 48 h de cultivo nas Petakas (controle), quanto

nos obtidos de células cultivadas na biomatriz de quitosana-colágeno com genipina a 0,75 % v/v, antes e após os 12 meses de criopreservação.

Tabela 5. Análise cromossômica e cromatídica de quebras/falhas e/ou alterações numéricas das CTMA na presença ou não das biomatrizes e antes e após a criopreservação.

N total = 480 metáfases	Petakas_Antes (controle) Quebras/Falhas /Alterações numéricas	Biomatriz_Antes Quebras/Falhas /Alterações numéricas	Petakas_Após (controle) Quebras/Falhas /Alterações numéricas	Biomatriz_Após Quebras/Falhas /Alterações numéricas	p-value ($\alpha < 0,05$)
Paciente 1					
Amostra 1	01/00/01	03/01/02	03/02/00	03/01/02	p=4,23
Amostra 2	01/00/00	03/00/00	00/02/03	03/01/02	p=3,45
Paciente 2					
Amostra 1	01/01/00	02/00/00	03/02/00	02/01/02	p=2,23
Amostra 2	02/01/01	01/01/00	03/02/02	03/01/02	p=1,45

Figura 25. Imagem de microscopia óptica representando a amostra total do presente estudo, mostrando cromossomos metafásicos de CTMA com o seu cariótipo representativo, com coloração usual por Giemsa (sem tripsina). Imagem obtida antes da criopreservação.

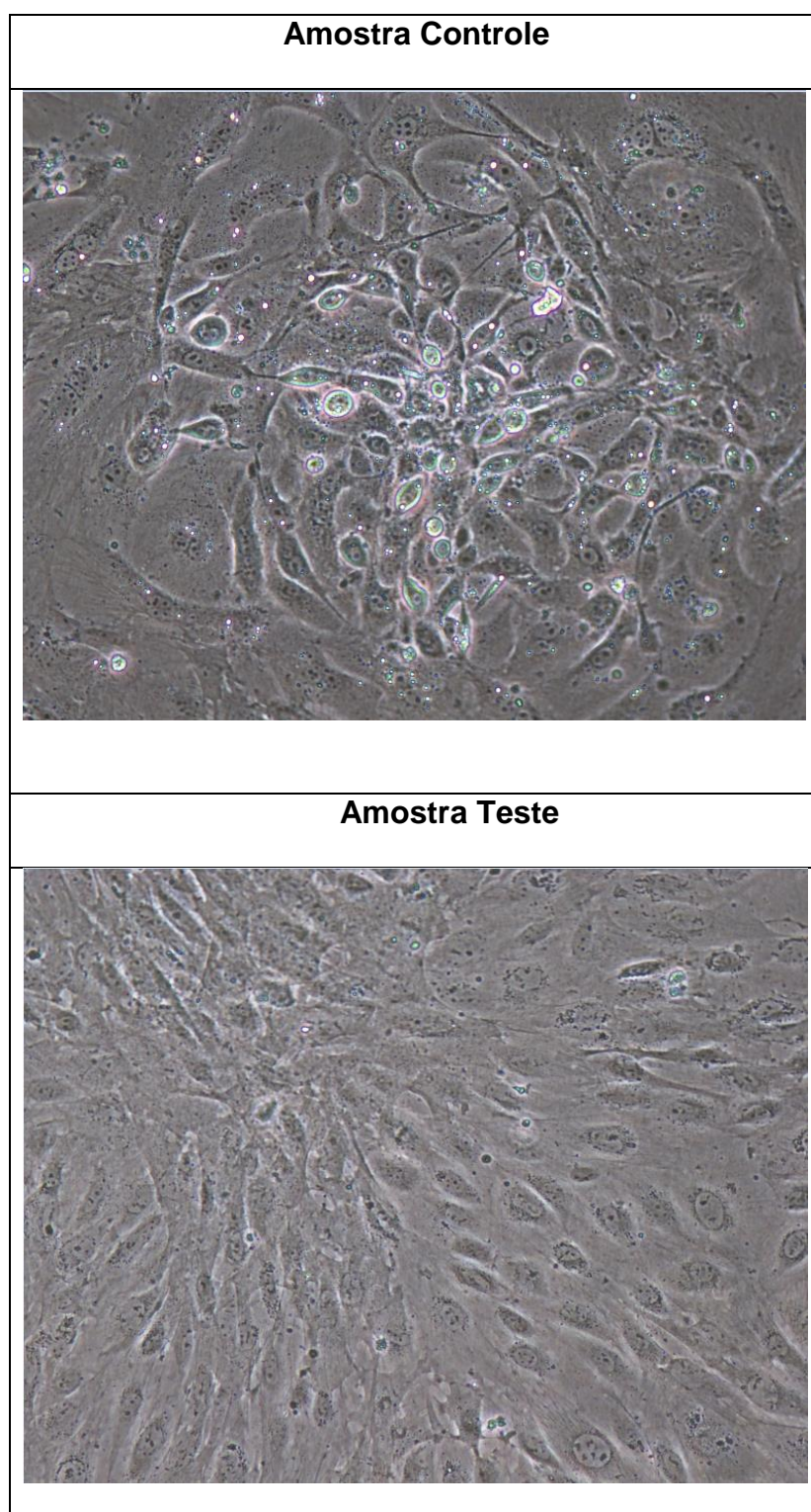


8.11 Teste do Papanicolaou

Foram avaliadas todas as amostras celulares do controle e biomatriz. Para cada amostra e passagem, tendo sido estabelecido o número de 400 células por amostra e passagem, totalizando 800 células analisadas com as duas pacientes, não foram identificadas células com número alterado de núcleos e/ou morfologia nuclear atípica (Figura 26).

Com base no sistema Bethesda de classificação (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; APGAR *et al.*, 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013), as possíveis alterações morfológicas dos núcleos que poderiam ser identificadas correspondem às células escamosas atípicas de significado indeterminado (*atypical squamous cells of undetermined significance*, ASC-US) e às células escamosas atípicas não excludentes de lesões intra-epiteliais de alto grau (*atypical squamous cells - cannot exclude high grade intraepithelial lesion - HSIL*, ASC-H). Já a multinucleação é característico de células de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (*low grade squamos intraepithelial lesion*, LSIL). Entretanto, não foram encontrados esses eventos nas amostras de CTMA do presente estudo.

Figura 26. Imagens mostrando a quantificação e morfologia nucleares da amostra controle e teste das CTMA.



9 Discussão

9.1 Importância das Células Tronco Mesenquimais do Tecido Adiposo (CTMA)

As CTMA têm as vantagens de autorrenovação, caráter imunomodulatório, multipotencialidade, facilidade de isolamento, purificação, proliferação "in vitro", bem como a criopreservação (ZUK *et al.*, 2002; ACHILLEOS; TRAINOR, 2012; ABBOTT, 2013). As CTMA devem apresentar as características mínimas como células aderentes e proliferativas, diferenciarem-se em pelo menos três linhagens celulares (adipócitos, condrócitos e osteócitos) e apresentar o painel mesenquimal com os marcadores de superfície celular típicos para que as mesmas possam ser utilizadas em estudos, segundo as recomendações da *Sociedade Internacional de Terapia Celular* (ISCT) (ZHU *et al.*, 2010; AKIYAMA *et al.*, 2012). Essa diferenciação traduz a importância dessas células de serem utilizadas com biomatrizes como indutoras de diferenciação (CAPLAN; BUDER, 2001; PLANAT BERNARD *et al.*, 2004).

Estas células representam uma população heterogênea de células endoteliais microvasculares, constituem uma fonte conveniente de células multipotentes e não são restritivas (NARDI; MEIRELLES, 2006; PARK *et al.*, 2011). Em condições de cultura, as células tronco adiposas crescem facilmente em monocamadas, mantêm a multipotencialidade normalmente até a décima passagem e apresentam morfologia fibroblastóide (alongada).

Para a imunofenotipagem da CTMA são necessários os marcadores (anticorpos) positivos CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49, CD54, CD55, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD144, CD146, CD166 e HLA-1 e negativa para CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 alfa, CD80, CD117, CD133, CD144, HLA-DR e Stro-1, sendo

que a sigla CD significa do inglês *Cluster Differentiation*, isto é, grupos de diferenciação (NARDI; MEIRELLES, 2006; PANOPOULOS *et al.*, 2012).

As CTMA secretam uma cascata de citocinas e fatores de crescimento com atividades parácrinas, autócrinas e endócrinas, tais como fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 α / CCL3), como demonstrado por Sibille e Reynolds 1990 (PLANAT BERNARD *et al.*, 2004; ROITT *et al.*, 2010; PATTERSON *et al.*, 2012). Estes fatores quando conjugados podem produzir uma série de respostas do sistema imune local, estimulando a angiogênese e induzindo a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais no tecido desejado (TOMA *et al.*, 2002; SMITS *et al.*, 2005; UCELLI *et al.*, 2008; RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Além disso, as CTMA induz a expressão das proteínas de junção e aumentam a integridade microvascular e a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos (IKEGAMI *et al.*, 2010; YOSHIMURA *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2012).

Por meio da utilização do equipamento a vácuo, a quantidade de CTMA obtidas com as 12 amostras foi significativa quando comparada com resultados disponíveis na literatura, tais como os de Karaaltin (2012) e Caplan; Buder (2001). A utilização da cânula de 3.0 mm no processo de lipoaspiração permitiu aumentar a área superficial da gordura extraída, facilitando a atividade das enzimas colagenase IV para extrair a fração estromal vascular (FSV). Somado a isso, por meio dessa técnica, obteve-se em maior quantidade a extração do tecido adiposo com vasos sanguíneos onde essas células também estão presentes ao seu redor, com trabalho semelhante apresentado por Zuk *et al.* (2002), Nardi; Meirelles (2006) e Li *et al.* (2012).

Além da quantificação celular, também foi demonstrado a comparação entre o tempo de duplicação da população celular (PDT, *population doubling time*) da 1^a à 9^a expansão (repique). Isso ocorreu provavelmente por causa do aumento progressivo da pureza celular e também pelo aumento da atividade metabólica e expressão das CTMA pelo efeito autócrino (interação célula-célula), semelhante aos estudos relatados por Nardi; Meirelles (2006) e Rodriguez et al. (2012).

O estudo de adesão e proliferação de CTMA nas Petakas provou ser relevante com resultados notórios frente as publicações de cultivo celular em frascos tradicionais como demonstrado por Nardi; Meirelles, 2006, pois foi possível obter um maior número de células em menos tempo, dispensou o uso de CO₂ gasoso, diminuiu o processo de desidratação do meio de cultura celular e permitiu trocas gasosas mais controlada, garantindo por maior tempo a estabilidade do pH do meio de cultura celular. Isso possibilitou também na redução do consumo do meio de cultura.

Embora os resultados da imunofenotipagem de CTMA tenham sido representativos e de acordo com a literatura, principalmente por causa dos anticorpos CD13 +, CD 29 +, CD 44 +, CD 54 +, CD 90 +, CD 166 +, CD 146 +, CD 49e, CD73 + e CD 105 +, o fenótipo destas células não é conclusivo, pois a maioria desses anticorpos não são expressos apenas nas CTMA, aparecendo também em fibroblastos, conforme estudos de Zuk et al. (2002). Por isso, os ensaios de atividade enzimática da fosfatase alcalina foram conclusivos para a identificação das CTMA, conforme relatado por Planat Bernard et al. (2004).

9.2 Algoritmo de caracterização das CTMA – Monitoramento

Irioda et al. (2011) propuseram um algoritmo para a padronização da triagem dos cultivos de CTM, visando avaliar a segurança do uso destes em transplantes. Neste algoritmo foram combinadas as técnicas de diferenciação, Papanicolaou, imunofenotipagem por citometria de fluxo e cariotipagem.

9.2.1 Diferenciação das CTMA

A manutenção do potencial de diferenciação das CTMA sob cultivo é condição *sine qua non* para a obtenção do efeito terapêutico desejado (HWANG et al., 2008; STRIOGA et al., 2012). Assim, mesmo não compondo o fluxograma proposto para a triagem dos cultivos dessas células, é apenas por meio da indução da diferenciação que sua pluripotencialidade pode ser atestada.

A Sociedade Internacional para a Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT), após empreender esforços na uniformização da denominação para as CTM (HORWITZ et al., 2005), indicou entre os critérios mínimos para a demonstração da pluripotencialidade das CTM, a indução da sua diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos (DOMINICI et al., 2006).

O registro literário sobre CTM no entanto, contém grande diversidade de relatos de diferenciação (OSWALD et al., 2004; SHIM et al., 2004; DEZAWA et al., 2005; SATO et al., 2005; KUO, TUAN, 2008; KRAMPERA et al., 2007; PĂUNESCU et al., 2007). Nestes relatos, mesmo quando restrito às CTMA, incluem tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários (JEON et al., 2006; TIMPER et al., 2006; ANGHILERI et al., 2008; AURICH et al., 2009; BLANDE et al., 2009).

No presente estudo, todas as amostras que mantiveram padrão fibroblastóide de crescimento até P15, bem como a amostra A2 em P13, foram induzidas à diferenciação celular *in vitro* para as linhagens adipogênica e osteogênica. A coloração diferencial permitiu a detecção dos depósitos lipídicos citoplasmáticos típicos da diferenciação adipogênica, bem como dos depósitos extracelulares de cristais de cálcio, típicos da diferenciação osteogênica, em todas as amostras submetidas à diferenciação.

9.2.2 Potencial tumorígeno (Papanicolaou) e Estabilidade cromossômica

9.2.2.1 Teste do Papanicolaou

Irioda et al. (2011) foram os primeiros a relatar este tipo de aplicação da técnica, incluindo-a como a primeira no algoritmo proposto. Na mesma publicação, os autores também relataram a detecção de alterações em CTMA humanas.

A técnica de Papanicolaou é uma ferramenta com ótima relação custo-benefício utilizada na prevenção e diagnóstico do câncer de colo de útero tendo, por isso, sido incluída na triagem rotineira da população feminina adulta em diferentes países (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2011; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2014). Sua eficiência e especificidade são alvos frequentes de avaliação por meio de diferentes metodologias.

Avaliações baseadas na repetição do teste, como o de Soost et al. (1991) por exemplo, estimaram a sensibilidade e especificidade global dessa técnica em $\cong 80,0\%$ e $\cong 99,4\%$, respectivamente. Estudos utilizando limiares de detecção, como o de Nanda et al. (2003), apesar de identificarem maior variação nos resultados, também obtiveram

estimativa elevada tanto para sensibilidade ($\cong 70,0 - 80,0 \%$) quanto para a especificidade ($\cong 95,0 \%$).

Na triagem populacional para prevenção do câncer de colo uterino, estudos mais recentes têm revelado maior eficiência de outras técnicas diagnósticas em relação ao teste de Papanicolaou (KARIMI-ZARCHI et al., 2013; WILLIS, HYDE, 2014), contudo, corroborando o proposto por Irioda et al. (2011), consideramos que esta técnica pode contribuir significativamente na avaliação de CTM e outras células aderentes em cultivos para terapias, tanto em razão da sua sensibilidade/especificidade quanto pela facilidade de execução (APGAR et al., 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013).

No presente estudo não foram identificadas células com número alterado de núcleos e/ou morfologia nuclear atípica em todas as amostras e passagens avaliadas, com o total de 800 células para as duas participantes do presente estudo.

9.2.2.1.1 Limitações do estudo

A técnica de Papanicolaou, quando utilizada na análise de células descamadas da cérvix uterina, possibilita também a detecção de outras alterações, cujo arranjo pode caracterizar tipos distintos de lesões (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1989; APGAR et al., 2003; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013). No presente estudo decidiu-se pela inclusão apenas das alterações do número e de morfologia dos núcleos. Esta decisão decorreu do fato de ainda não haver padronização do uso dessa técnica para cultivos de CTM.

Desta forma, evitou-se incorrer em erros de julgamento, resultantes de eventuais falhas no preparo das amostras ou mesmo devido à não capacitação do avaliador no uso da técnica, haja vista que, mesmo para o uso padronizado da técnica, divergências de

juízo não são incomuns (NANDA et al., 2000; TAVARES et al., 2008; UTAGAWA et al., 2010).

9.2.2.2 Estabilidade cromossômica

No presente estudo, foram analisadas 480 células no total das duas participantes. Para melhor conhecer o tempo em dias mais preciso da fase de metáfase das CTMA para a interrupção e estabilização dos cromossomos, antes e após criopreservação, fez-se análise de cinética de crescimento celular,

De acordo com a Figura 23, esse melhor tempo foi do oitavo (8) ao nono (9) dia, após a segunda troca de meio de cultivo. Assim, sugere-se com essa análise uma diretriz otimizada para melhor aproveitar o tempo ideal de interrupção metafásica.

Após análise, não foram evidenciadas alterações numéricas e/ou quebras ou falhas cromossômicas ou cromatídicas, tanto nos cromossomos metafásicos após 48 h de cultivo nas Petakas (controle) e biomatrizes de quitosana-colágeno com genipina a 0,75 % v/v, quanto após 12 meses nos cromossomos metafásicos que foram extraídos das CTMA criopreservadas.

As anomalias cromossômicas específicas são responsáveis por centenas de síndromes identificáveis na análise e estudo do cariótipo. Elas são responsáveis por uma grande proporção de perdas reprodutivas, malformações congênitas e retardo mental, desempenhando um importante papel na patogênese de doenças hematológicas malignas, quando adquiridas durante a vida, associadas a neoplasias e, nestes casos, os estudos dos distúrbios cromossômicos são importantes para auxiliar o diagnóstico, prognóstico, conduta terapêutica e monitoração de tratamento dos pacientes que apresentam tais alterações (IRIODA et al. 2011).

O funcionamento normal do sistema genético depende da estabilidade do material genético contido nos cromossomos (SUMNER et al., 2003). O cariótipo pode modificar-se levando a alterações genéticas, tais alterações podem ser no número de cromossomos quanto na sua estrutura. As alterações no número de cromossomos pode levar a euploidia ou aneuploidia. Na primeira forma, ocorre um aumento ou uma diminuição do número de genomas em uma célula, temos uma euploidia. Já no segundo tipo de mutação, ocorre um aumento ou uma diminuição de um ou mais cromossomos no genoma, alterando o cariótipo daqueles que a apresentam (IRIODA et al. 2011).

As alterações estruturais modificam a morfologia normal de um ou mais cromossomos. Tais anomalias cromossômicas podem afetar cromossomos inteiros ou segmentos cromossômicos. Assim, ocorre uma desorganização na estrutura cromossômica que pode ser observada ao microscópio das seguintes maneiras: - Deleção ou deficiência: envolve a perda de material cromossômico; - Duplicação: um segmento do cromossomo é representado duas ou mais vezes, se o fragmento duplicado incluir o centrômero ele pode ser incorporado ao cariótipo como um cromossomo extra; Inversão: envolve a inversão de 180° de um segmento cromossômico (SUMNER et al., 2003).

Portanto, no presente trabalho não alterações ou anomalias cromatídicas e/ou cromossômicas significativas, sugerindo que as biomatrizes apresentam biocompatibilidade e são fortemente indicadas para seu uso em terapias translacionais.

9.2.2.3 Estudo de Imunofenotipagem

A caracterização imunofenotípica da CTMA inclui habitualmente a expressão dos marcadores CD73, CD90 e CD105; e a ausência da expressão dos marcadores CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e complexo maior de histocompatibilidade classe II, principalmente HLA-DR (DOMINICI et al., 2006; BARKHOLT et al., 2013).

9.3 Estudos Físico-Químicos das Biomatrizes

9.3.1 Estudo da Degradação

A Degradação das matrizes de quitosana-colágeno-genipina na presença de sangue humano em meio de cultivo diminuiu à medida que aumentou o grau de intercruzamento da biomatriz com genipina. Isto provavelmente ocorre devido à maior energia necessária para a despolimerização da ligação cruzada de cadeias de polímero (covalente de ligação cruzada) do que a que apresentou baixo nível de agente de reticulação. Os resultados encontrados mostram a reticulação preferida por meio de NH₂ (quitosana) em vez de hidroxila (colágeno), portanto, é esperado uma cinética equilibrada de degradação da mistura, uma vez que o colágeno que é fisicamente reticulado sofre uma solvatação rápida e o quitosana/colágeno é covalentemente reticulado e a via de despolimerização fica mais lento durante a degradação.

Em comparação com os estudos de Chiono et al. (2008), a solubilidade das matrizes foi aumentando à medida que o grau de intercruzamento com genipina também foi aumentando, devido ao aumento da vulnerabilidade para dissolver as matrizes pelo aumento do grau de dissociação da quitosana e do colágeno com protonação dos grupos aminos. Isso revelou que a melhor concentração de genipina para a fabricação das

biomatrizes foi de 0,75 % v/v, semelhante aos resultados relatados por Baldwin; Kiick (2010). Assim, quando o grau de intercruzamento com genipina foi inferior a 0,50 % v/v a biomatriz ficou muito frágil, com baixa resistência, e quando a concentração de genipina foi maior que 1,00 % v/v, a biomatriz rompeu e saíram pedaços de “flocos”.

9.3.2 Forças intermoleculares entre quitosana-colágeno-genipina

A quitosana reage facilmente por ataque nucleofílico dos seus grupamentos aminos com compostos carbonilados, formando ligação covalente com alguns grupamentos do colágeno e da genipina (AROF et al., 2010; ANTONOV; MOLDENAERS, 2012). A miscibilidade da quitosana é devido às interações eletrostáticas na forma de íon-íon, íon-dipolo, e dipolo-dipolo, interações de Van der Waals, π -elétrons e os complexos de transferência de carga, formando ligações iônicas, de hidrogênio e covalentes entre os componentes poliméricos, produzindo uma energia livre de Gibbs ($\Delta G < 0$) negativa na mistura, apesar da elevada massa molecular dos polímeros (DRAGO, 1977; DOMARD; TARAVEL, 1995; BALDWIN; KIICK, 2010; ISRAELACHVILI, 2011).

Além disso, a quitosana, sendo um polieletrólito, estimulou a expressão “in vitro” das atividades das CTMA por fatores parácrinos e autócrinos. Já o colágeno tipo I por meio do *site-specific arginineglycine - aspartato* (RGD) promoveu a adesão dessas células pela ligação a receptores de integrina, promovendo assim o crescimento celular, ancoragem de proteínas e células pela matriz extracelular matriz. Estudos relatados por Goissis et al. (2012) relataram que a unidade física do colágeno tipo I designado como "período D" está envolvida com o controle das atividades biológicas que mantém o microambiente biológico nos tecidos.

A miscibilidade da quitosana com o colágeno foi devida às interações eletrostáticas na forma de íon-íon, íon-dipolo e dipolo-dipolo, interações de Van der Waals, π -elétrons e complexos de transferência de cargas, formando ligações iônicas, de hidrogênio e covalentes entre os componentes poliméricos, bem como energia livre de Gibbs negativa ($\Delta G < 0$), conforme a literatura de Domard; Taravel (1995) e Israelachvili (2011) na mistura entre outros polímeros, apesar desses serem de elevada massa molecular.

Os grupos de hidroxiprolina (OH-) do colágeno podem formar ligações de hidrogênio entre as cadeias e com outros grupos laterais para a formação das fibrilas. Esses grupos laterais também podem formar ligações de hidrogênio com os grupos -OH e -NH₂ da quitosana. Os grupos terminais -COOH e -NH₂ do colágeno também podem formar ligações de hidrogênio com -OH e -NH₂ da quitosana. Nesse sentido, as duas cadeias poliméricas de quitosana-colágeno podem entrelaçarem-se, formando um complexo com maior viscosidade (HILL, 1960).

Essa mistura de policátions (quitosana) e poliânions (colágeno) pode ter levado à agregação espontânea e liberação dos contra-íons, aumentando a entropia ($\Delta S > 0$) (ISRAELACHVILI, 2011). Assim, a presença dos contra-íons, bem como a presença dos cátions e ânions das cadeias poliméricas individuais estimulou as atividades celulares das CTMA do presente estudo, sem causar estresse celular (ausência de exossomos na superfície celular) e perda da quiescência dessas células.

10 Conclusão

A biomatriz de quitosana-colágeno-genipina, na concentração testada de 0,75 % mostrou biocompatibilidade em nível celular e cromossômico, uma vez que permitiu adesão, proliferação e bioestímulos para a expressão das funções celulares normais, e não causou danos às células tronco mesenquimais adiposas.

Referências Bibliográficas

- BRAILE-STERNIERI, M.C.V.B., MUSTAFA, E.M., FERREIRA, V.R.R., BRAILE SABINO,S., BRAILE STERNIERI, G., BUFFULIN DE FARIA, L.A., SBARDELLINI, B.C., VIANNA QUEIROZ, C.O., BRAILE, D.M., ZOTARELLI FILHO, I.J. Main Considerations of Cardiogenic Shock and Its Predictors: Systematic Review. **Cardiol Res.** Apr;9(2):75-82,2018.
- SABINO SB, STERNIERI GB, BRAILE-STERNIERI MCVB, MUSTAFA EM, FERREIRA VRR, FARIA LAB, SBARDELLINI BC, QUEIROZ COV, BRAILE DM, RAMIREZ AVG, FILHO IJZ, CORNÉLIO ML. Metalloproteinases and Spontaneous Coronary Artery Dissection Relationships: A Systematic Review. **Med One.** Jun 30; 3: e180005, 2018.
- ABBOTT, A. Cell rewind wins medicine Nobel. **Nature**; 490:151-152, 2012.
- ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A.; CIFELLI, P.; GALIÉ, M.; SBARBATI, A.; KRAMPERA, M.; BELLUZZI, O.; BONETTI, B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 5, p. 909-916, 2008.
- ALICE, L. G. **Flow Cytometry: First Principles**; 2nd Edition. Wiley, 2002.
- ALSARRA, I.A. Chitosan topical gel formulation in the management of burn wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford; 5 :16-21, 2009.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT JR., T. C. The 2001 Bethesda system terminology. **American Family Physician**, v. 68, p. 1992-1998, 2003.
- ASTORI, G. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells, **J. Transl. Med.**, 5: 55, 2007.

- AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWASSER, P.; VETTER, M.; WEISE, A.; LIEHR, T.; BRULPORT, M.; HENGSTLER, J. G.; DOLLINGER, M. M.; FLEIG, W. E.; CHRIST, B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue *in vitro* promotes hepatic integration *in vivo*. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570-581, 2009.
- ATHERTON, N.M. **Principles of electron spin resonance**, Ellis Horwood Limited, Chichester, 1993.
- BAKSH, D., SONG, L., TUAN, R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **J. Cell. Mol. Med.**, 8, 3: 301-316, 2004.
- BALDWIN, A.D.; KIICK, K.L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomatrizes. **Biopolymers**; 94:128–140, 2010.
- BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECH, J.L. **The AGT Cytogenetics Laboratory Manual**. Third Edition. Philadelphia, 1997.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E.; SANTANA, C. C. Synthesis and Characterization of Porous Structures of Dense and Chitosan. **Polymers: Science and Technology**; 9(4):163-169, 1999.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**; 57:19-34, 2004.
- BET, M.R.; GOISSIS, G.; PLEPIS, A.M.G. Compósitos Colágeno Aniômico: Fosfato de Cálcio. Preparação e Caracterização, **Química Nova**; 20: 475-477, 1997.
- BITTMANN, I.; DOSE, T.; BARETTON, G.B.; ULLER, C.N.; CHWAIBLMAR; LOHRS, I. Cellular chimerism of the lung after transplantation. An interphase cytogenetic study. **Am. J. clin Pathol**, 115: 525-533, 2001.
- BOCCAFOSCHI, F.; HABERMEHL, J.; VESENTINI, S.; MANTOVANI, D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. **Biomatrizes**; 26 (35) : 7410-7417, 2005.
- BOCHKOV, N.P. Chromosome variability of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Bull. Exp. Biol. Med.**, 143, 1: 122-126, 2007.
- BOCHKOV, N.P.; NIKITINA, V.A.; BUYANOVSKAYA, O.A.; VORONINA, E.S.; GOLDSTEIN, D.V.; KULESHOV, N.P. Aneuploidy of stem cells isolated from human adipose tissue. **Bull Exp Biol Med.**;146:344–347, 2008.

- BONFIELD, W. Designing porous scaffold for tissue engineering. **Phil Trans R Soc A**; 364 : 227-232, 2006.
- BREYNER, N.M.; HELL, R.C.; CARVALHO, L.R. Effect of three dimensional chitosan porous scaffold on the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. **CTO**; 191: 119-28, 2010.
- BUTLER, M. F.; PUDNEY, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. **Journal of polymer science part a-polymer chemistry**; 41(24):3941-3953, 2003.
- BUYANOVSKAYA, O.A.; KULESHOV, N.P.; NIKITINA, V.A.; VORONINA, E.S.; KATOSOVA, L.D.; BOCHKOV, N.P. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. **Bull Exp Biol Med**;148:109–112, 2009.
- BLANDE, I. S.; BASSANEZE, V.; LAVINI-RAMOS, C.; FAE, K. C.; KALIL, J.; MIYAKAWA, A. A.; SCHETTER, I. T.; KRIEGER, J. E. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. **Transfusion**, v. 49, n. 12, p. 2680-2685, 2009.
- CAPLAN, A.I.; BUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends Mol Med**; 7: 259-64, 2001.
- CELARTIA. Protocolos 2018. Disponível em: <https://www.celartia.com/petaka-documents>.
- CHAN, B. P.; SO, K. F. Photochemical crosslink improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. **Journal Biomedical Materials Research**. Part A; 75 (3): 689-701, 2005.
- CHAN, Y. L.; KING, N. M. Use of focused ion beam milling for investigating the mechanical properties of biological tissues: A study of human primary molars. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, 2 (4): 375-383, 2009.
- CHEN, H.; OUYANG, W.; JONES, M.; MARTONI, C.; HAQUE, T.; COHEN, R.; PRAKASH, S. Genipin cross-linked alginate-chitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of crosslinking reaction. **Biomacromolecules**, 7: 2091-2098, 2006.
- CHIONO, V., PULIERI, E., VOZZI, G., CIARDELLI, G., AHLUWALIA, A., GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **J Mater Sci Mater Med**;19: 889–898, 2008.

- COLEMAN, S.R. Structural fat grafting: more than a permanent filler. **Plast Reconstr Surg**. Sep;118(3 Suppl):108S-120S, 2006.
- DATASUS. **Banco de Dados do Sistema Único de Saúde**. Disponível em: <<http://www.datasus.br>> Acesso em: julho, 2018.
- DEZAWA, M.; ISHIKAWA, H.; ITOKAZU, Y.; YOSHIHARA, T.; HOSHINO, M.; TAKEDA, S.; IDE, C.; NABESHIMA, Y. Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration. **Science**, v. 309, n. 5732, p. 314-317, 2005.
- DOMARD, A., TARAVEL, M.N. Collagen and its interaction with chitosan: II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen. **Biomatrizes**;16(11):865–71, 1995.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKO, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- DRAGO, R.S. **Physical methods in chemistry**. Saunders and Co., London, 1977.
- FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol.** ;47:327-59, 1976.
- GRECO OT, FILHO IJZ, BELLINI MF, BILAQUI A, SOUZA AS JUNIOR, et al. Cardiomyopathy and Cell Therapy: Ejection Fraction Improvement and Cardiac Muscle Mass Increasing, after a Year of Bone Marrow Stem Cells Transplantation by Magnetic Resonance Image. **J Stem Cell Res Ther**. S6: 008, 2013.
- HORN, M.M.V.C. A.; MARTINS, A.M.G.P. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carboh. Polym**; 77:239–243, 2009.
- HORWITZ, E. M.; LE BLANCA, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.
- HWANG, N. S.; VARGHESE, S.; ELISSEEFF, J. Controlled differentiation of stem cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 2, p. 199-214, 2008.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/Titulos/Nomenclatura_colo_do_uterio.pdf>. Acesso em: 015/06/2017.

IRIODA, A. C.; ZOCHE, L.; SOUZA, C. M. C. O.; FERREIRA, R. J.; ALIPRANDINI, E.; CUNHA, R. C.; FRANCISCO, J. C.; GUARITA-SOUZA, L. C.; MALVEZZI, M.; BELTRAME, M. P.; MESQUITA, L. A. F.; KUCZERA, D.; CHACHQUES, J. C.; CARVALHO, K. A. T. Pap test as the first step in screening genetic stability in cell-based therapy. **Journal of Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 3, p. 1000106, 2011.

IRIODA, A. C. *et al.* Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Cryopreservation and Thawing Decrease α 4-Integrin Expression. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature Reprint of: **Cytogenetic and Genome Research**. Vol. 149, No. 1-2, 2016.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J.R.Soc Interface**; 3: 589-601, 2006.

JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S.V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan nanomaterials — a short review. **Carbohydr Polym**; 82: 227–32, 2010.

JACOB JLB, ZOTARELLI FILHO IJ, GRECO OT, KASSIS EN, ALBUQUERQUE MC, SINIBALDI FT AND CORNÉLIO ML. Significant Improvement in Ejection Fraction and Functional Class after Two Years of Cells Transplantation. **Cell Biol: Res Ther**, 4:2, 2015.

JEON, E. S.; MOON, H. J.; LEE, M. J.; SONG, H. Y.; KIM, Y. M.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S.; KIM, J. H. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. **Journal of Cell Science, Part 23**, v. 119, p. 4994-5005, 2006.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D. J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**; 5 : 162-168, 2004.

JUI-YANG L. Biocompatibility of Genipin and Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Materials in the Anterior Chamber of the Eye. **Int. J. Mol. Sci.**, 13, 2012.

KARIMI-ZARCHI, M.; PEIGHMBARI, F.; KARIMI, N.; ROHI, M.; CHITI, Z. A Comparison of 3 ways of conventional pap smear, liquid-based cytology and colposcopy vs cervical biopsy for early diagnosis of premalignant lesions or cervical cancer in women with abnormal conventional Pap test. **International Journal of Biomedical Science**, v. 9, n. 4, p. 205-210, 2013.

- KASSIS EN, ZOTARELLI FILHO IJ, CORNÉLIO ML, CICARELLI AJ, FRASCINO LF AND ARAÚJO TSB. Potential use of mesenchymal stem cells and bio-oss® in surgery skull-maxillofacial: a review. **International Journal of Development Research**, Vol. 05, Issue, 03, pp. 3821-3827, 2015.
- KERMANI, A.J.; FATHI, F.; MOWLA, S.J. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. **Rejuvenation Res.**, 11, 2: 379-386, 2008.
- KHAN F., TARE R. S., OREFFO R. O. C., BRADLEY M. Versatile Biocompatible Polymer Hydrogels: Scaffolds for Cell Growth, **Angew. Chem. Int.**; 48: 978 – 982, 2009.
- KHAN, F.;TTARE, R. S.; OREFFO, R. O. C.; BRADLEY, M. Versatile Biocompatible Polymer Hydrogels:Scaffolds for Cell Growth, **Angew. Chem. Int.**; 48: 978 –982, 2009.
- KLEINSASSER, N.H.; SCHMID, K.; SASSEN, A.W.; HARRÉUS, U.A.; STAUDENMAIER, R.; FOLWACZNY, M. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. **Biomatrizzs**. 2006;27:1762–1770.
- KO, H.F.; SFEIR C.; KUMTA, P. N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomatrizzs as potential scaffolds for tissue engineering. **Phil. Trans. R. Soc. A.**; 368 : 1981-1997, 2010.
- KRAMPERA, M.; SARTORIS, S.; LIOTTA, F.; PASINI, A.; ANGELI, R.; COSMI, L.; ANDREINI, A.; MOSNA, F.; BONETTI, B.; REBELLATO, E.; TESTI, M. G.; FROSALI, F.; PIZZOLO, G.; TRIDENTE, F.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Immune regulation by mesenchymal stem cells derived from adult spleen and thymus. **Stem Cells and Development**, v. 16, n. 5, p. 797-810, 2007.
- KUO, C. K.; TUAN, R. S. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering, Part A**, v. 14, n. 10, p. 1615-1627, 2008.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering: The design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **Lancet**, 354: 32–34, 1999.
- MAC ISAAC, Z.M.; SHANG, H.; AGRAWAL, H.; YANG, N.; PARKER, A.; KATZ, A.J. Long-term in-vivo tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells. **Exp Cell Res.**; 318:416–423, 2012.

- MEZA-ZEPEDA, L.A.; NOER, A.; DAHL, J.A.; MICCI, F.; MYKLEBOST, O.; COLLAS P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. **J Cell Mol Med.**;12:553–563, 2008.
- MUNTEAN, M. Cytological identification of the (pre)cancerous cervical lesions within a clinically asymptomatic female population. **Current Health Science Journal**, v. 35, n. 3, p. 176-179, 2009.
- MUZZARELLI RA, EL MEHTEDI M, BOTTEGONI C, GIGANTE A. Physical properties imparted by genipin to chitosan for tissue regeneration with human stem cells: A review. **Int J Biol Macromol.** Dec;93(Pt B):1366-1381, 2016.
- NAOUM FA, ESPÓSITO BP, ZOTARELLI FILHO IJ. Impact of labile plasma iron and iron chelation on the viability of cultured mononuclear cells from patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. **Blood Res.** 2017, Jun;52(2):135-136.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Bethesda System Website Atlas** [Internet]. Disponível em <<http://nih.techriver.net/index.php>>. Acesso em 06/05/2017.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Cervical Cancer Sreening (PDQ®)** [Internet]. Disponível em <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/screening/cervical/HealthProfessional/page2#Section_54>. Acesso em 10/07/2017.
- NANDA, K.; McCRORY, D. C.; MYERS, R. R.; BASTIAN, L. A.; HASSELBLAD, V.; HICKEY, J. D.; MATCHAR, D. B. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 10, p. 810-819, 2000.
- NARDI, N.B.; MEIRELLES S.L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **HEP**; 174 : 249-82, 2006.
- NIKITINA, V.A.; OSIPOVA, E.Y.; KATOSOVA, L.D.; RUMYANTSEV, S.A.; SKOROBOGATOVA, E.V.; SHAMANSKAYA, T.V. Study of genetic stability of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. **Bull Exp Biol Med.**;150:627–631, 2011.
- ORMEROD, M.G. Oxford University Press. **Flow Cytometry: A Practical Approach**; 3rd Edition. Practical Approach Series, 2000.

- OSWALD, J.; BOXBERGER, S.; JØRGENSEN, B.; FELDMANN, S.; EHNINGER, G.; BORNHÄUSER, M.; WERNER, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, v. 22, n. 3, p. 377-384, 2004.
- PANOPOULOS, A.D.; YANES, O.; RUIZ, S. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. **Cell Res**; 22:168-177, 2012.
- PLANAT BERNARD, V.; SILVESTRE, J.S.; COUSIN, B. Plasticity of human adipose lineage cells towards endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**; 109: 656 -63, 2004.
- PLANAT BERNARD, V.; SILVESTRE, J.S.; COUSIN, B. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circ. Res**; 94: 223-9, 2003.
- PĂUNESCU, V.; DEAK, E.; HERMAN, D.; SISKA, I. R.; TĂNASIE, G.; BUNU, C.; ANGHEL, S.; TATU, C. A.; OPREA, T. I.; HENSCHLER, R.; RÜSTER, B.; BISTRIAN, R.; SEIFRIED, E. *In vitro* differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 502-508, 2007.
- ROSS, A.L.; LEDER, D.E.; WEISS, J.; IZAKOVIC, J.; GRICHNIK, J.M. Genomic instability in cultured stem cells: associated risks and underlying mechanisms. **Regen Med.**;6:653–662, 2011.
- SHIM, W. S.; JIANG, S.; WONG, P.; TAN, J.; CHUA, Y. L.; TAN, Y. S.; SIN, Y. K.; LIM, C. H.; CHUA, T.; TEH, M.; LIU, T. C.; SIM, E. *Ex vivo* differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 2, p.481-488, 2004.
- STRAUER, B; YOUSEF, M.; SCHANNWELL, C.M. The acute and long-term effects of intracoronary Stem cell Transplantation in 191 patients with chronic heart failure: the STAR-heart study. **European journal of Heart Failure**; 12 : 721-729, 2010.
- STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 14, p. 2724-2752, 2012.
- SOOST, H. J.; LANGE, H. J.; LEHMACHER, W.; RUFFING-KULLMANN, B. The validation of cervical cytology. Sensitivity, specificity and predictive values. **Acta Cytologica**, v. 35, n. 1, p. 8-14, 1991.
- SUMNER, A.T. (2003). Chromosomes – Organization and Function. **Blackwell Publishing: United Kingdom-UK**. 287p.

- SUNG HW, HUANG RN, HUANG LL, TSAI CC. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. **Biomater Sci Polym Ed.**; 10:63–78, 1999.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen.** 2000;35:206–221.
- TIMPER, K.; SEBOEK, D.; EBERHARDT, M.; LINSCHIED, P.; CHRIST-CRAIN, M.; KELLER, U.; MÜLLER, B.; ZULEWSKI, H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p. 1135-1140, 2006.
- UCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature**; 8 : 726-37, 2008.
- UGARTE, D.A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissues Organs**, 2003, 174 : 101-109.
- VARONI EM, VIJAYAKUMAR S, CANCIANI E, COCHIS A, DE NARDO L, LODI G, RIMONDINI L, CERRUTI M. Chitosan-Based Trilayer Scaffold for Multitissue Periodontal Regeneration. **J Dent Res.** Oct 1:22034517736255, 2017.
- ZAZAKOWNY K, LEWANDOWSKA-ŁAŃCUCKA J, MASTALSKA-POPŁAWSKA J, KAMIŃSKI K, KUSIOR A, RADECKA M, NOWAKOWSKA M. Biopolymeric hydrogels - nanostructured TiO₂ hybrid materials as potential injectable scaffolds for bone regeneration. **Colloids Surf B Biointerfaces.** Dec 1;148:607-614, 2016.
- ZOTARELLI FILHO IJ, BILAQUI A, KASSIS EN, CORNÉLIO ML, FRASCINO LF. Chronic Obstructive Lung Disease, Stem Cells and Telocytes: Review of Therapeutic. **Cell Biol: Res Ther**, 3:1 4:1, 2015.
- ZOTARELLI FILHO IJ, FRASCINO LF, GRECO OT, ARAUJO JDD, BILAQUI A, KASSIS EN, ARDITO RV AND BONILLA-RODRIGUEZ GO. Chitosan-collagen scaffolds can regulate the biological activities of adipose mesenchymal stem cells for tissue engineering. **J Regen Med Tissue Eng.**; 2:12, 2013.
- ZOTARELLI FILHO IJ, GRECO OT, BILAQUI A, KASSIS EN, ARAÚJO JD, JACOB JLB, BORRALHO CMT et al. Measurement and feasibility of hematopoietic stem cell was greater for equipment in closed system. **International Journal of Development Research**, Vol. 3, Issue, 12, pp.033-039, 2013.

WILLIS, B. H.; HYDE, C. J. Estimating a test's accuracy using tailored meta-analysis-How settingspecific data may aid study selection. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 67, n. 5, p. 538-546, 2014.

YANG JP, ANDERSON AE, MCCARTNEY A, ORY X, GARRET MA, PAPPALARDO E, BADER J AND ELISSEEFF JH. Metabolically. Active Three-Dimensional Brown Adipose Tissue Engineered from White Adipose-Derived Stem Cells. **TISSUE ENGINEERING: Part A** Volume 00, Number 00, Mary Ann Liebert, Inc. 2017.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**; 13: 4279–4295, 2002.

Anexos

A- Aprovação Comitê de Ética

15/01/2018

Plataforma Brasil

Saúde



principal



sair

IDIBERTO JOSÉ ZOTARELLI FILHO - Pesquisador | V3.2

Cadastros

Sua sessão expira em: 39min 05

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL DE UTILIZAÇÃO EM TERAPIA CELULAR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS CULTIVADAS EM MATRIZES DE QUITOSANA-COLÁGENO-GENIFINA EM PETAKAS E APÓS CRIOPRESERVAÇÃO

Pesquisador Responsável: IDIBERTO JOSÉ ZOTARELLI FILHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43985114.1.0000.5629


Submetido em: 15/04/2015

Instituição Proponente: UNIPOS - POS GRADUACAO E EDUCACAO CONTINUADA RIO PRETO LTDA

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_351691

B – Artigos Publicados

B.1 - Blood Research

NCBI Resources How To

PMC
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PMC

Advanced Journal list

Journal List > Blood Res > v.52(2); 2017 Jun > PMC5503892



[Blood Res.](#) 2017 Jun; 52(2): 135–136.

PMCID: PMC5503892

Published online 2017 Jun 22. doi: [10.5045/br.2017.52.2.135](https://doi.org/10.5045/br.2017.52.2.135)

Impact of labile plasma iron and iron chelation on the viability of cultured mononuclear cells from patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation

Flávio Augusto Naoum,¹ Breno Pannia Espósito,² and Idiberto José Zotarelli Filho³

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

B.2 – Wulfenia Journal – **Qualis A2** na área interdisciplinar do programa de Biofísica Molecular

Biomatrix of Chitosan-Collagen-Genipin Demonstrated Preserving the Intrinsic Characteristics of Adipose Mesenchymal Stem Cells Before and After Cryopreservation for Future Translational Therapy

Idiberto José Zotarelli Filho^{1,2}, Elias Naim Kassis², Durval Ribas Filho³, Ana Valéria Garcia Ramirez³, Marinônio Lopes Cornélio¹

¹São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto/SP, Brazil.

²Post Graduate and Continuing Education (Unipos), Department of scientific production, Street Ipiranga, 3460, São José do Rio Preto SP, Brazil.

³Associação Brasileira de Nutrologia (ABRAN)/Brazilian Association of Nutrology, Catanduva/SP, Rua Belo Horizonte, 909 - Centro, Catanduva - SP, 15801-150.

Corresponding author: Prof. Dr. Marinônio Lopes Cornélio; State University of São Paulo - IBILCE-UNESP Tel: +55(17) 99112-2780; e-mail address: mariol.cornelio@gmail.com

B.3 – International Journal of Development Research – Qualis A2 na área interdisciplinar do programa de Biofísica Molecular



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 08, Issue, 05, pp.20215-20224, May, 2018



ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

STATISTICAL APPROACH OF THE PHYSICALCHEMICAL INVESTIGATION OF CHITOSAN/COLLAGEN BIOMATRIX CROSSLINKED WITH GRADIENT OF GENIPIN FOR TISSUE ENGINEERING

^{1,2,3}Idiberto José Zotarelli Filho, ¹Maria Christiane Valéria Braga Braile-Sternieri, ²Durval Ribas Filho, ²Victor Rodrigues Ribeiro Ferreira, ²Eliana Migliorini Mustafa, ¹Sofia Braile Sabino, ²Giovanni Braile Sternieri, ¹Cibele Olegário Vianna Queiroz, ¹Bethina Canaroli Sbardellini, ¹Lúcia Angélica Buffulin de Faria, ¹Domingo Marcolino Braile and ³Marinônio Lopes Cornélio

¹ Domingo Braile Institute of Sao Jose do Rio Preto (SP), Rua Luíz Vaz de Camões, 3111 - Vila Redentora, São José do Rio Preto SP Brazil 15015-750

² Associação Brasileira de Nutrologia (ABRAN) / Brazilian Association of Nutrology, Catanduva/SP, Rua Belo Horizonte, 909 - Centro, Catanduva SP Brazil 15801-150

³ State University of São Paulo - IBILCE-UNESP, Department of Physics (Molecular Biophysics), Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP Brazil 15054-000

B.4 – International Journal of Development Research – Qualis A2 na área interdisciplinar do programa de Biofísica Molecular



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 5, Issue, 03, pp. 3821-3827 March, 2015

International Journal of
DEVELOPMENT RESEARCH

Full Length Research Article

POTENTIAL USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND BIO-OSS® IN SURGERY SKULL-MAXILLO-FACIAL: A REVIEW

^{1,2}Elias Naim Kassis, ^{1,2,4}Idiberto José Zotarelli Filho, ⁴Marinônio Lopes Cornélio, ²Álvaro José Cicarelli, ³Luiz Fernando Frascino and ^{1,2}Taylane Soffener Berlanga de Araújo

¹Unorp, University Center North Paulista, São José do Rio Preto, SP, Brazil

²Unipos, Post Graduate and Continuing Education, Street Ipiranga, 3460, São José do Rio Preto SP, Brazil

³Frascino Plastic Surgery, Street Antonio de Godoy, 3945, Redentora, São José do Rio Preto SP Brazil

⁴State University of São Paulo - IBILCE-UNESP, Rua Cristovão Colombo 2265, São José do Rio Preto SP Brazil
15054-000

B.5 - Cell Biology: Research & Therapy

Jacob et al., Cell Biol: Res Ther 2015, 4:2
<http://dx.doi.org/10.4172/2324-9293.1000120>



**Cell Biology:
Research & Therapy**

Research Article

A SCITECHNOL JOURNAL

Significant Improvement in Ejection Fraction and Functional Class after Two Years of Cells Transplantation

José Luiz Balthazar Jacob², Idiberto José Zotarelli Filho^{3,4,5}, Oswaldo Tadeu Greco^{1,3}, Elias Naim Kassis^{3,4}, Manoel Cavalcanti de Albuquerque³, Flávia Tajara Sinibaldi³ and Marinônio Lopes Comélio⁵

Abstract

To mitigate the Idiopathic dilated cardiomyopathy in the world, about 16,000 transplants of autologous stem cell allogeneic and 29 000 are performed. In Brazil, the transplantation of autologous bone marrow stems cells increased by about the 1000 per year. The aim of this study was to identify short-term results by intracoronary infusion of autologous mononuclear layer cells from bone marrow by SEPAX in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy to examine improvement in Functional Class and Ventricular Ejection Fraction. In the methodology of the 15 patients with a

5.7 million people suffer from congestive heart failure, according to American Heart Association [1,2]. In addition, patients with IDC in functional class IV have high mortality. To mitigate this problem in the world, are held about 16,000 transplants of autologous stem cells and 29,000 allogeneic [1,3]. In Brazil, the transplantation of autologous stem cells from bone marrow increases about 1000 cases per year [4].

Hospitalization costs worldwide exceed \$ 1 billion annually, quality of life is poor, and thousands of lives are lost each year [5]. In Brazil, it is estimated that 2.0% of the population are affected by dilated cardiomyopathy and cardiovascular mortality rate in 2004 was 286 people per 100,000 inhabitants, and the forecast for 2020 of 400 people per 100,000 populations [4].

Dilated cardiomyopathy is a disease with few therapeutic options, and very often the organ transplantation [5,6,13], and most patients on the waiting list die before receiving a new heart. Therefore, a therapy it is necessary to be able to improve heart function and more accessible to the population is of great interest. Thus, cell therapy with bone marrow stem cells have shown promising results in the literature as improvement of life of patients with IDC [1,8,12]. Thus, studies in ischemic heart disease demonstrated that stem cells obtained from

B.6 - Cell Biology: Research & Therapy

José Zotarelli I et al., Cell Biol: Res Ther 2014, 3:1 2015, 4:1
<http://dx.doi.org/10.4172/2324-9293.1000114>



Cell Biology: Research & Therapy

Research Article

A SCITECHNOL JOURNAL

Chronic Obstructive Lung Disease, Stem Cells and Telocytes: Review of Therapeutic

Idiberto José Zotarelli Filho^{1-3*}, Aldemir Bilaqui¹, Elias Naim Kassis², Marinônio Lopes Cornélio³ and Luiz Fernando Frascino¹

¹Portuguese Beneficent Hospital, São Jose do Rio Preto SP, Brazil

²Unipos - Post graduate and continuing education, Street Ipiranga, 3460, São José do Rio Preto SP, Brazil 15020-040

³State University of Sao Paulo-IBILCE-UNESP, Rua Cristovao Colombo 2265, Sao Jose do Rio Preto SP, Brazil

*Corresponding author: Dr. Idiberto Jose Zotarelli Filho, University of Sao Paulo-IBILCE-UNESP, Rua Cristovao Colombo 2265, Sao Jose do Rio Preto SP, Brazil, Tel: 11- 5627-0233; E-mail: m.zotarelli@gmail.com

Rec date: Jul 21, 2014 Acc Date: Mar 13, 2015 Pub Date: Mar 20, 2015

Abstract

Chronic Obstructive Lung Disease (COLD) is responsible for leading causes of mortality and morbidity worldwide, and a major public health problem worldwide. In addition, COLD is associated with high costs. In the EU, the total direct costs of

disease" (Burden of Disease) measured in QALYs (Quality Adjusted Life Years - metric involving the quantity and quality of years lived), it is estimated that COLD will be the 13th pathology Ranking world in 2004 to 5th in 2030, possibly due to population aging and the industrialization of low-income countries [7-9].

In addition, COLD is associated with high costs. In the EU, the total direct costs of respiratory diseases are estimated at 6% of total health care costs, and that COLD accounts for 56% of these expenditures (38.6 billion euros). In the United States, the direct costs of COLD are 29.5 billion and indirect costs of the order of 20.4 billion dollars [10]. In Brazil, it is estimated that 5 million Brazilians have COLD, according to the Brazilian Thoracic Society (BTS) and second DATASUS, COLD generated in 2010, the National Public Health System, 141,994 hospitalizations that led the 778,428 days of hospitalization [11]. The total cost of these hospitalizations was R \$ 92,434,415.51 and 7,937 deaths directly related to COLD. According to BTA, the prevalence of COLD in Brazil is 15.8% in adults older than 40 years [12].

The main issue related to COLD is cigarette smoking, which are associated with 95% of cases. Other causative factors include air pollution, occupational exposure to pollutants and also in alpha-1-antitrypsin [13-16] disability. In the epidemiological study called Projecto Latinoamericano de Investigacion en pulmonary obstruction (PLATINUM: Latin American Project for the Investigation of

C - Artigo Aceito

C.1 - Wulfenia Journal – **Qualis A2** na área interdisciplinar do programa de Biofísica Molecular

15/01/2018

Gmail - Result of the paper review



Idiberto Zotarelli <m.zotarelli@gmail.com>

Result of the paper review

2 messages

Wulfenia Journal <office@multidisciplinarywulfenia.org>

Fri, Dec 1, 2017 at 4:00 PM

Reply-To: "office@multidisciplinarywulfenia.org" <office@multidisciplinarywulfenia.org>

To: m.zotarelli@gmail.com

Cc: office@multidisciplinarywulfenia.org

Dear Author(s)

Idiberto José Zotarelli Filho, Maria Christiane Valéria Braga Braile-Sternieri, Victor Rodrigues Ribeiro Ferreira, Eliana Migliorini Mustafa, Sofia Braile Sabino, Giovanni Braile Sternieri, Cibele Olegário Vianna Queiroz, Bethina Canaroli Sbardellini, Lúci,

The journal editorial board has made final decision about your submitted paper entitled ' **Controlling the pores sizes and Biodegradability of glutaraldehyde crosslinked Chitosan/Collagen Scaffolds for Tissue Engineering** '(invoice number: DTMjods).

Based on the reviewers' comments, Your paper could be considered for publication in Wulfenia Journal.

At this point, to include your paper for publication in Wulfenia, you are required to pay the publication and printing cost of your paper in 7 days from now.

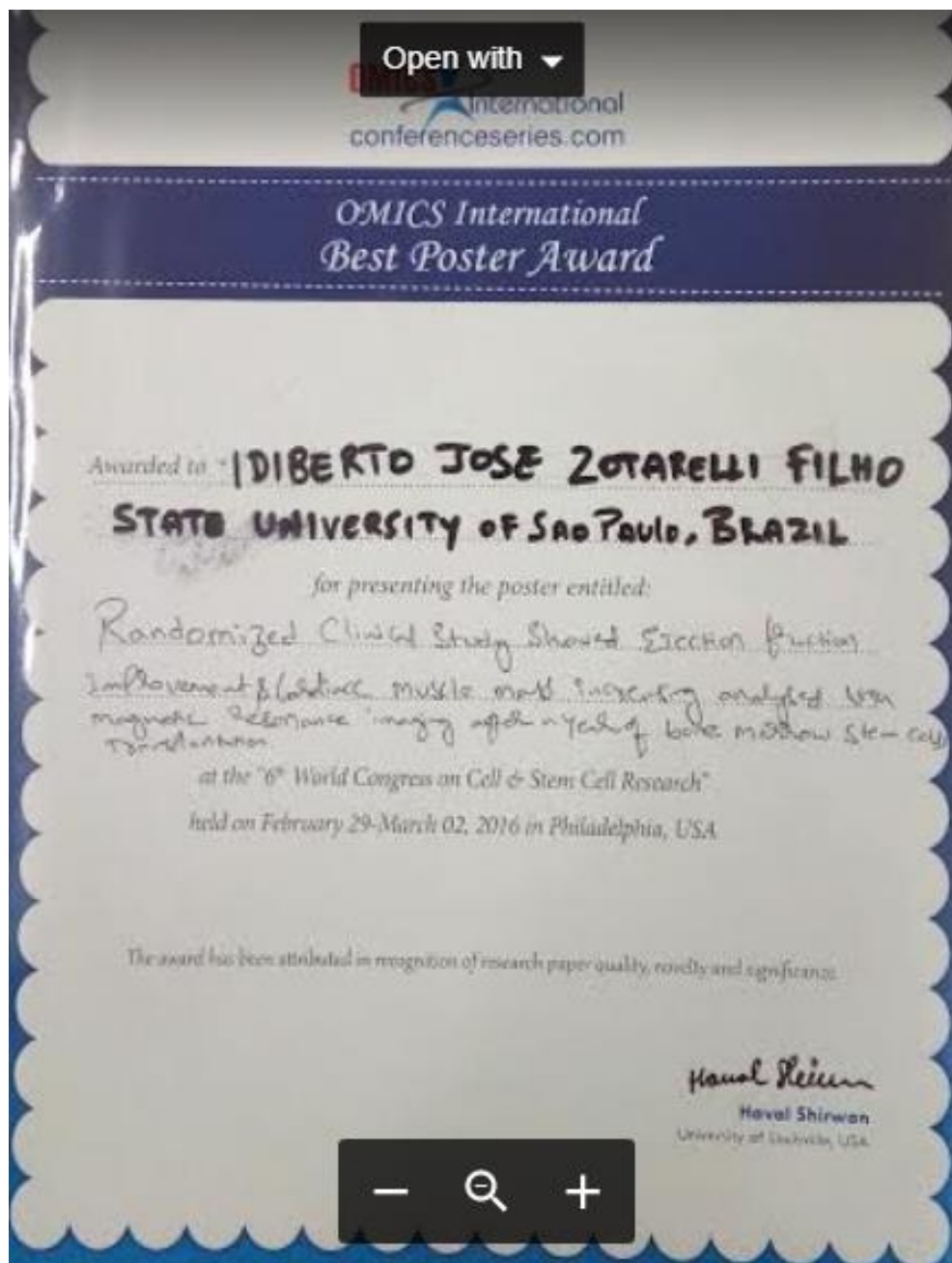
Meanwhile please note that the accepted papers are all considered for publication in the journal coming issue. So, if you do not send the required cost before the deadline, your paper could not be included.

After you made the payment please visit (<http://multidisciplinarywulfenia.org/form/>)to send us the payment receipt (jpeg format) and the final version (pdf only) of your paper.

The required user name and password to enter the URL above are:

Username:	Password:
AhL8zxRallxX	SPTZHOLwPm0Z

D- Premiação Internacional no 6th World Congress on Cell & Stem Cell Research, 2016 – Philadelphia – EUA



E- Premiação no **5th World Congresso n Cell & Stem Cell Research**, Chicago, Illinois, USA, 2015.



F- Certificação Internacional de manejo de Células Tronco

Sepax Training Certificate

Is hereby granted to

Dr. Idiberto Jose Zotarelli Filho

who has attended a training seminar on the following topics

Sepax Application Training

- Working with the Sepax main processing unit: the applications (software protocols)
- Specific aspects of the application used: DGBS
- Specific aspects of the single-use kits used: CS-900.2
- Practical demonstration and hands-on
- Troubleshooting and purge mode

Sao Jose do Rio Preto, Brazil, 24th May 2016



Hugo Bravo Rosin

Field Service Engineer
Biosafe Latin America

Dr. Idiberto Jose Zotarelli Filho

Banco de Tecidos Mitosis

training program
.....

 **biosafe** 
innovation in cell processing

G- Regras e tabela Durbin-Watson

$$dw = \frac{\sum_{i=2}^n (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2},$$

em que $0 \leq dw \leq 4$. A distribuição de dw depende da matriz X . Entretanto, podemos tomar a decisão comparando o valor de dw com os valores críticos d_L e d_U da Tabela de Durbin-Watson (Tabela 3.3.2.1). Assim,

se $0 \leq dw < d_L$ então rejeitamos H_0 (dependência);

se $d_L \leq dw \leq d_U$ então o teste é inconclusivo;

se $d_U < dw < 4 - d_U$ então não rejeitamos H_0 (independência);

se $4 - d_U \leq dw \leq 4 - d_L$ então o teste é inconclusivo;

se $4 - d_L < dw \leq 4$ então rejeitamos H_0 (dependência).

Quando $0 \leq dw < d_L$ temos evidência de uma correlação positiva. Já quando $4 - d_U < dw < 4$ a correlação é negativa. No caso em que não rejeitamos H_0 , temos que não existe autocorrelação, ou seja, os resíduos são independentes. Podemos também tomar a decisão pelo p-valor.

Os valores críticos tabelados apresentados na Tabela 3.3.2.1 são geralmente utilizados para testar $\rho = 0$ versus $\rho > 0$. Desta forma, se para um determinado α utilizarmos os valores da Tabela 3.3.2.1 para testar $\rho = 0$ versus $\rho \neq 0$, o erro tipo I do teste em questão será 2α .

	Nível de significância	Número de variáveis explicativas									
		1		2		3		4		5	
n		d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U	d_L	d_U
	0,01	0,81	1,07	0,7	1,25	0,59	1,46	0,49	1,7	0,39	1,96
15	0,025	0,95	1,23	0,83	1,4	0,71	1,61	0,59	1,84	0,48	2,09