

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2018.



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

TALITA ISAAC MARTINS

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

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

Orientadora: Profa Dra. Elenice Deffune

**Botucatu
2018**

Talita Isaac Martins

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

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

Orientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Botucatu

2018

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

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

Martins, Talita Isaac.

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

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

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 31301000

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

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

Talita Isaac Martins

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

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

Orientadora: Profa.Dra. Elenice Deffune

Comissão examinadora:

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

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

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

Botucatu, 26 de Fevereiro de 2018.

Dedicatória:

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

Agradecimentos:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Deuteronômio 31:6

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

Resumo

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

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

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

Abstract

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

Keywords: Healing. Cytokines. Cell Culture Technique

Lista de Figuras

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

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

Sumário

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

I – Introdução

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusão

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

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

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

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

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

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

Referências Bibliográficas:

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

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

15- Hu L, Ruonan X, Zheng Z, *et al.* Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. 2011, 19-22.

16- Khoon SL. Stem Cells for Bone Regeneration: Role of Trophic Factors

17 Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. *AnbrasDermatol, Rio de Janeiro. AnbrasDermatol, Rio de Janeiro. 2003, 78(4): 393-410.*

18- Blanes, L. Tratamento de feridas. Baptista-Silva JCC, editor. Cirurgia vascular: guia ilustrado. São Paulo: 2004. Disponível em: URL: [ttp://www.bapbaptista.com](http://www.bapbaptista.com).

19 - Reinke JM, Sorge H. Wound Repair and Regeneration. *EurSurg Res* 2012;49:35–43.

20 - Andrade AG, Lima CF, Albuquerque AKB. Effects of the therapeutic laser on the wound healing of burns: a bibliographic review. *Rev Bras Queimaduras.* 2010;9(1):21-30.

21 - Nicolosi JG, Moraes AM. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 2005.

22 - Everts, PAM, Knape TAJ, Weibrich G, *et al.* Platelet rich plasma and platelet gel. A review. *J Extra CorporTechn.*, 2006,38: 174-87

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

59- Liu X¹, Zhang T², He S², Hong B², Chen Z², Peng D², Wu Y¹ et al. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2014 Aug 15;218(1-2):54-60. doi: 10.1016/j.psychres.2014.03.042.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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