

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

UNESP

**Helga Caputo Nunes**

**ESTUDO COMPARATIVO DE TRÊS DIFERENTES SCAFFOLDS PARA  
CRESCIMENTO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL,  
FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS**

Botucatu 2014

**Helga Caputo Nunes**

**ESTUDO COMPARATIVO DE TRÊS DIFERENTES SCAFFOLDS  
PARA CRESCIMENTO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL,  
FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu, da Universidade  
Estadual Paulista, *Campus* de Botucatu, para  
obtenção do Título de Mestre em Pesquisa e  
Desenvolvimento - Biotecnologia Médica.

**Orientadora : Profa. Dra. Rosana Rossi Ferreira**

Botucatu - SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Nunes, Helga Caputo.

Estudo comparativos de três diferentes scaffolds para crescimento de célula-tronco mesenquimal, fibroblastos e queratinócitos / Helga Caputo Nunes. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Rosana Rossi Ferreira

Capes: 31301002

1. Células-Tronco. 2. Curativos biológicos. 3. Engenharia de tecidos. 4. Materiais biomédicos. 5. Fibroblasto.

Palavras-chave: Biologia celular; Células tronco; Curativos bioativos; Engenharia de tecidos; Scaffolds.

*Dedicatória*

*Aos meus pais, família e amigos*

*Aos pacientes*

*Epígrafe*

*"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal, e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".*

*Albert Einstein*

*Agradecimientos*

*Agradeço aos meus pais pela criação e educação recebidas, pelo esforço, zelo e amor inquestionáveis, meu muito obrigada.*

*Ao Prof. Dr. Hugo Medeiros Garrido de Paula (in memorian) meu primeiro orientador, meu primeiro exemplo de dedicação à ciência, determinação e prodígio .*

*Ao Prof. Dr. Katsumasa Hoshino pela personificação da sabedoria, calma, respeito, honestidade e vasta diversidade de conhecimento adquiridos durante a vida, meu muito obrigada pela paciência, atenção e dedicação dispensadas à mim.*

*Ao Laboratório de Engenharia Celular:*

*À Profa. Dra. Rosana Rossi Ferreira, minha professora, minha orientadora, minha oportunidade. Obrigada por prontamente acreditar em mim, abrindo as portas ao Campus de Botucatu, seu laboratório e proporcionando-me todas as condições de aprendizado, vivência e infraestrutura, e por ter me proporcionado conhecer os grandes amigos que aqui fiz.*

*À Profa. Dra. Elenice Deffune, nossa estrela guia. Capacidade intelectual, agregadora, firme administradora, empreendedora, multifuncional, cientista, médica, mãe, irreverente, imprevisível, detalhista, fantástica, enfim, Singular. Meu muito obrigada por me receber e confiar em mim.*

*À Michele Janegitz Acorci Valério quem me acolheu, me ensinou, orientou e aconselhou durante a minha chegada à Botucatu. Exemplo de honestidade, competência, amor ao trabalho e doçura no trato com as pessoas. Amiga incondicional, sempre se mostrando justa e fiel aos seus princípios mesmo nos momentos tempestuosos. Obrigada por compartilhar sua vida comigo.*

*À Regina Avelina de Moraes da Silva "amor à primeira vista"! Primeira amizade, grande empatia, explosão de personalidade, emoção e afeto! Exemplo de determinação e perseverança. Muito habilidosa com a comunicação. Desejo à você todo sucesso e alegria na sua escolha. Você cativa à todos por onde passa.*

*À Priscila Murador minha treinadora, meu exemplo de seriedade, minuciosidade, cuidado e esmero no trabalho. Devo à você maioria dos meus conhecimentos adquiridos na bancada. A paciência e propriedade em ensinar passo a passo, cada detalhe, o porquê de se estar fazendo algo, enfim; se hoje o presente trabalho foi realizado, é graças à você a meticulosidade e persistência para que obtivéssemos tal qualidade.*

*À Thaiane Cristine Evaristo por tornar nosso cotidiano leve, feliz e descontraído. Você ilumina os lugares que passa trazendo alegria. Esses anos não teriam sido os mesmos sem a sua presença. A figura de menina é apenas uma doce ilusão quando confrontada com a garra, astúcia e bagagem que você possui. Delicadeza, cautela e zelo pelo seu trabalho são os pontos que me inspiram em você. Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos, conversas, caronas, enfim toda ajuda e carinho dispensados à mim. Você é uma grande pessoa e amiga. O meu muito obrigada e a sensação de amizade eterna.*

*Josy Campanha Vicentini de Oliveira sinônimo de calma, doação e paciência. Você é totalmente responsável pelo desenrolar mecânico, técnico, cada material, processo, método, burocracia ou problema logístico, você foi quem suportou e soube administrar sabiamente. Sua experiência no lidar com pessoas e problemas é admirável e impressionante. Sua preocupação e cuidado com as pessoas ao seu redor vai além do comum. Meu muito obrigada por cada detalhe e meus Parabéns pela formidável capacidade!*

*Ao Henrique de Souza Vieira primeiro amigo que eu acompanhei na bancada. Amigo fiel, paciente, muito paciente por estar rodeado de meninas e ser querido por todas elas. Constantemente é o contraponto de equilíbrio no dia-a-dia. Descobri uma amizade simples e verdadeira estando ao seu lado. O meu muito obrigada por fazer parte da minha vida.*

*À Mariele de Oliveira Gobo, que em tão pouco tempo de convivência, nutro grande admiração e a vejo como molde para ter iniciado o presente trabalho. O ângulo alternativo do seu olhar sobre o grande tema que abrange nossos trabalhos me abriu caminhos e perspectivas que nunca havia vislumbrado antes. O meu muito obrigada por ser uma das várias pessoas que se debruçaram sobre a temática das feridas crônicas, engenharia de tecidos e hemoterapia contribuindo de forma relevante para o avanço dessas áreas.*

*À Ana Carolina Picolo Pasian minha companheira e amiga. Dividi com você muitas dúvidas e problemas durante o presente trabalho e na maioria das vezes você apresentava estratégias, saídas lógicas e coerentes. Sua capacidade comunicativa e de absorver informação rapidamente certamente te levarão ao sucesso! O meu muito obrigada pela parceria, pela competência e pelos prêmios que obtivemos grande parte graças à você.*

*À Juliana Ravelli Baldassarre Martins sinônimo de bondade e altruísmo. Não havia me deparado antes com alguém tão meiga, singela e boa, que todas essas qualidades juntas à tornam tão simples e serena. Sua habilidade em cativar e ajudar as pessoas é preciosa. Desejo que consigas tudo o que almejas, pois merece imensamente!*

*À Heloísa Vicente Garcia, minha colega de faculdade, minha "bixete" que nesses dois anos tornou-se melhor amiga! Inseparáveis, viramos até motivo de chacota entre o pessoal, mas, realmente, nesses dois anos morando juntas, você me ensinou muito. Mas não ensinou somente em matéria de conteúdo didático, de conhecimentos científicos ou técnicas e "POP'S", me ensinou em matéria de vida, à viver, ou melhor à sobreviver. Levo comigo para sempre esse período que passamos juntas, todas as conversas, ensinamentos, problemas, piadas, risadas e alegrias. Na minha opinião não há nada mais encorajador, construtivo e que traz experiência de vida do que viajar e morar com alguém até então "desconhecido". O meu muito obrigada por ser tão competente, honesta, inteligente, sábia, perspicaz, racional e tão aplicada! Seu jeito as vezes aéreo*

*descontraí um pouco a seriedade. Você é muito especial para mim, e certamente será uma mulher brilhante no que se dedicar. Obrigada!*

*À Isabele Silveira Rosa o meu muito obrigada por dividir seus dias ensolarados comigo. Sua alegria e entusiasmo são irradiantes! Esforço e curiosidade são palavras que também te definem. Desejo-te muito sucesso e êxito nas suas escolhas.*

*À Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves pela prontidão e atenção particulares. A dedicação vontade de ensinar certamente a levarão ao sucesso como educadora. Muito obrigada por me ajudar e me iniciar nesse projeto de pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. Andrei Moroz pela grande ajuda, ensinamentos, dicas, conselhos e por compartilhar o vasto conhecimento adquiridos nesses anos de pesquisa. Obrigada pelas "puxadas de orelha", pois com elas aprendi a zelar pela qualidade e excelência no trabalho.*

*À Ondina Sílvia Cotrim, o meu muito obrigada, por tantas vezes "quebrar o galho", pela destreza e facilidade em ajudar sempre. Obrigada também pelos ensinamentos e broncas! foram de grande valia para minha evolução.*

*À Aparecida Vitória Gonçalves de Souza o meu muito obrigada pelo bom humor! Sempre disposta à ajudar e ensinar.*

*Ao Woner Mion pela amizade e parceria cultivados durante o desenvolvimento dos nossos projetos*

*À toda equipe do Laboratório de Engenharia Celular: Aline Aparecida Del'vescovo, Ana Claudia Simões, Armando de Mattos Carvalho, Caroline Mitiká, Giovana Casarin, Larissa Hermeto Costa, Leandro Garcia Alvarado, Natália Melo de Carvalho, Renato Felix, Rodrigo Almeida Simone da Silva Ferreira, Wilson Rodrigo Alves Carvalho.*

*Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu: Marjorie de Assis Golim, Mariana Sartori e Léia*

*Ao pessoal do Hemocentro: Janisse Aparecida Bispo Pena, Cléo, Esmite, Luciana Jesuina Barbosa, Daniela Quevem, Parré, Marcelo e Adáise Garcia, pela gentileza, e por estarem sempre dispostos à ajudar. Obrigada!*

*Às funcionárias responsáveis pela limpeza do Hemocentro e em especial nosso Laboratório sempre deixando os ambientes impecáveis e agradáveis. Sem a limpeza e higienização diária, nossos trabalhos não seriam possíveis.*

*Ao departamento de Ortopedia e Cirurgia do HC-FMB em especial Prof. Dr. Aristides Palhares, Fausto Viterbo, Dr. Ricardo Coelho e Dra. Juliana*

*À Regiane do Laboratório de ...da Clínica da FMB*

*Ao Departamento de Química e Bioquímica do IBB. Em especial à Profa. Dra. Margarida Juri Saeki e seu aluno Murilo Longo por compartilharem seus*

*conhecimentos sobre a quitosana, dando-nos dicas preciosas em relação à produção dos scaffolds.*

*Ao laboratório de Matriz Extracelular do Departamento de Morfologia do IBB, coordenado pelo Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino em especial Sérgio Alexandre Alcântara dos Reis, Amanda, e à Profa. Dra. Flávia Karina Delella minha futura orientadora de doutorado! Muito obrigada pela gentileza de cederem o laboratório, serem sempre solícitos e prestativos. Amigos que fiz durante o mestrado e que vou levar e cultivar durante o doutorado. O meu muito obrigada!*

*Ao Laboratório de Nutrigenômica e Toxicogenômica do Departamento de Patologia do HC-FMB coordenado pela Profa. Dra. Daisy Maria Salvatori Fávero, João Paulo de Castro Marcondes e Elaine Aparecida Camargo pela atenção, gentileza e prontidão em ensinar a técnica do Cometa e me auxiliar.*

*Agradeço à minha família: minha mãe Angela Vieira Caputo, meu pai Augusto da Cunha Nunes, meu irmão Ivan Vieira Nunes, minha avó Elza Vieira Caputo, minha tia Marta Vieira Caputo e minha tia Beatriz Vieira Caputo pela minha criação e sempre me proporcionarem o melhor.*

*Agradeço ao Danilo Masson Mattos pelo amor. Pelos anos de convivência, amizade, parceria, dedicação, aprendizado e incentivo irrestrito. O meu muito obrigada por compartilhar sua vida comigo.*

## *Lista de Figuras*

<b>Figura- 1</b>	Quadro ilustrativo Medicina regenerativa e suas vertentes dentro das grandes áreas do conhecimento científico.....	33
<b>Figura- 2</b>	Estrutura química quitina e quitosana mostrando os grupos acetil nos quais são excluídos para a formação da quitosana.....	34
<b>Figura- 3</b>	Morfologia e fisiologia plaquetária.-a) conteúdo intra-plaquetário, b), plaquetas inativas; c) ativação plaquetária ocorrida na adesão com formação de pseudópodes e liberação dos fatores de crescimento.....	36
<b>Figura- 4</b>	Curativos bioativos . -a) gel de plaquetas laminar; b) gel de plaquetas-Emulgel.....	37
<b>Figura- 5</b>	Curativos bioativos . Cola de fibrina-Biofibrin.....	37
<b>Figura- 6</b>	Esquema ilustrativo anatomia pele.....	38
<b>Figura- 7</b>	Tipos de feridas - a). úlcera venosa; b) mal plantar ou úlcera diabética; c) úlcera de pressão ou escara.....	39
<b>Figura - 8</b>	Esquema ilustrativo epiderme.....	43
<b>Figura- 9</b>	Dependências do Laboratório. Laboratório de Atividades Complementares.....	51
<b>Figura- 10</b>	Dependências do Laboratório. Sala de <i>screening</i> área limpa.....	51
<b>Figura- 11</b>	Dependências do Laboratório. Antessala Nicho 1 área limpa.....	51
<b>Figura- 12</b>	Dependências do Laboratório. Sala Nicho área limpa.....	51
<b>Figura- 13</b>	Material de pesquisa -a) fragmento total retirado abdominoplastia; b) derme sendo separada mecanicamente da epiderme; c) fragmento isolado de epiderme.....	52
<b>Figura- 14</b>	Tecidos separados e técnicas a serem empregadas para isolamento das células.....	53
<b>Figura- 15</b>	Modelo esquemático representando o padrão a ser seguido durante o processo de contagem de células na Câmara de Neubauer.....	55
<b>Figura- 16</b>	Contador manual.....	56
<b>Figura- 17</b>	Esquema ilustrativo Câmara de Neubauer com células.....	56
<b>Figura- 18</b>	Câmara de contagem para o contador automático e modelo ilustrativo Countess BD®.....	57
<b>Figura- 19</b>	Diferentes graus de confluência de células em cultura- a) cultura de células tronco mesenquimais tecido adiposo, paciente 14 em 2ªpassagem, mostrando o início do crescimento sob a placa de cultura; b) fibroblastos paciente 2, mostrando a aderência de explantes e a colonização e espraiamento celular ao seu redor; c) cultura mista queratinócitos/fibroblastos mostrando a nítida segregação populacional; d) fibroblastos dérmicos paciente 7 em início de cultura mostrando a semelhança morfológica com a cultura de células tronco-mensenquimais derivadas de tecido adiposo.....	59
<b>Figura- 20</b>	Ampolas de criopreservação acondicionadas em caixas específicas.....	62
<b>Figura- 21</b>	Cultura tecido adiposo P5 passagem 0. Possível contaminação fúngica. Detalhe: hifas filamentosas.....	63
<b>Figura- 22</b>	Cultura tecido adiposo P5 passagem 0. Possível contaminação bacteriana. Detalhe: possíveis bacilos.....	63

<b>Figura-23</b>	Esquema geral de produção dos <i>scaffolds</i> .....	64
<b>Figura-24</b>	Exemplo de um experimento com amostras de 2 pacientes em triplicata.....	65
<b>Figura-25</b>	Componentes preparo gel de quitosana 4% ácido acético.....	67
<b>Figura-26</b>	Preparo dos <i>scaffolds</i> - a) insumos utilizados para o preparo dos <i>scaffolds</i> gel de plaquetas e cola de fibrina; b) esquema geral do preparo dos experimentos; c) solução de quitosana pronta para preparo do <i>scaffold</i> e/ou dopagem com a medição de pH realizada; d) pool de plaquetas pronto para ser incorporado ao gel de quitosana. Medição de pH realizada; e) gel de quitosana incorporado ao pool de concentrado de plaquetas; f) vista ao microscópio invertido (aumento 10X) experimento <i>scaffold</i> cola de fibrina com células aderidas.....	68
<b>Figura-27</b>	Fluxograma esquema análises.....	69
<b>Figura-28</b>	Esquema etapas da técnica de imunocitoquímica.....	72
<b>Figura-29</b>	Formas de degeneração celular.....	74
<b>Figura-30</b>	Esquema ilustrativo vias de morte celular.....	75
<b>Figura-31</b>	Diferentes graus de confluência de células em cultura- a) cultura de células tronco mesenquimais tecido adiposo, P14 em 2ª passagem, início do crescimento; b) fibroblastos P2, mostrando a aderência de explantes, colonização e espraiamento; c) cultura mista queratinócitos/fibroblastos mostrando a nítida segregação populacional ; d) fibroblastos dérmicos P7 em cultura inicial mostrando a semelhança morfológica com a cultura de células tronco-mesenquimais derivadas de tecido adiposo. ....	78
<b>Figura-32</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Tecido adiposo oriundas do pacientes P14 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73.....	81
<b>Figura-33</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Tecido adiposo oriundas do pacientes P10 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73.....	82
<b>Figura-34</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P4 utilizando os marcadores CD34, CD44, CD45 e CD90.....	83
<b>Figura-35</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P5 utilizando os marcadores CD34, CD44, CD45 e CD90.....	83
<b>Figura-36</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P7 utilizando os marcadores CD105, Stro-1 e CD73.....	84
<b>Figura-37</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P14 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73.....	84
<b>Figura-38</b>	Apoptose/necrose das células <i>pré-scaffolds</i> .....	86
<b>Figura-39</b>	Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao <i>scaffold</i> gel de plaquetas.....	86
<b>Figura-40</b>	Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao <i>scaffold</i> cola de fibrina.....	87
<b>Figura-41</b>	Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao <i>scaffold</i> quitosana pura.....	87

<b>Figura-42</b>	Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao <i>scaffold</i> quitosana dopada.....	88
<b>Figura- 43</b>	Esquema ilustrativo "Gangorra" das principais citocinas humanas.....	89
<b>Figura-44</b>	Diferenciação adipogênica de CTM-TA- a) verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle); b) células na presença de indutor e coradas com Oil Red O®.....	93
<b>Figura-45</b>	Diferenciação osteogênica de CTM-TA- a) verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle); b) células na presença de indutor e coradas com Alizarin Red®.....	93
<b>Figura-46</b>	Diferenciação condrogênica de CTM-TA- a) verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle); b) células na presença de indutor e coradas com Alcian Blue®.....	93
<b>Figura- 47</b>	Imunocitoquímica de fibroblastos humanos sob os diferentes <i>scaffolds</i> - a) Paciente7 <i>scaffold</i> gel de plaquetas corado com anti-colágeno I aumento 20x; b) Paciente 7 <i>scaffold</i> cola de fibrina corada com anti-vimentina.aumento 40x; c) Paciente 4 <i>scaffold</i> quitosana dopada corado com hematoxilina na ausência de anticorpo - controle negativo. Aumento 40x.....	94
<b>Figura 48-</b>	Imunocitoquímica de fibroblastos humanos sob os diferentes <i>scaffolds</i> - a) Paciente 5 <i>scaffold</i> gel de plaquetas corado com anti-colágeno I (aumento 20x); b) Paciente 7 <i>scaffold</i> cola de fibrina corado com anti-vimentina (aumento 40x); c) Paciente 4 <i>scaffolds</i> quitosana controle - corado com hematoxilina na ausência de anticorpo - controle negativo. Aumento 40x.....	95
<b>Figura 49-</b>	Células do paciente P4 utilizando quitosana dopada como <i>scaffold</i> corado com anti-colágeno I (aumento 40x).....	96

## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 1 -</b>	Principais curativos de 1ª geração e biomateriais .....	40
<b>Tabela 2 -</b>	Valor dos produtos para tratamento de feridas .....	41
<b>Tabela 3 -</b>	Pesquisa de dados sobre as principais palavras chaves correlatas ao trabalho .....	45
<b>Tabela 4 -</b>	Organização dos experimentos .....	64
<b>Tabela 5 -</b>	Marcadores de superfície para CTM-TA e Fibroblastos .....	71
<b>Tabela 6 -</b>	Delineamento experimental do projeto .....	79
<b>Tabela 7 -</b>	Resultados em porcentagem de expressão dos marcadores utilizados nas análises de imunofenotipagem pré- <i>scaffolds</i> por citometria de fluxo .....	85

## *Lista de Gráficos*

<b>Gráfico 1</b> – Curva Padrão das citocinas (Diluições 1:2) .....	90
<b>Gráfico 2</b> – Quantificação das citocinas IL8, IL1- $\beta$ , IL6, IL10, TNF $\alpha$ e IL12-P70 em três momentos : 24, 48 E 72H após o plaqueamento dos fibroblastos na membrana de quitosana <i>in natura</i> .....	91
<b>Gráfico 3</b> – Média dos valores de concentração de citocinas IL8, IL1b, IL6, IL10, TNF e IL12-p70, em pg/ml nos diferentes arcabouços em três momentos: 24, 48 e 72h .....	91
<b>Gráfico 4</b> – Análise do desempenho da produção de citocinas de fibroblastos do Paciente (P7) plaqueadas em: membranas de quitosana <i>in natura</i> , quitosana dopada, gel de plaquetas e cola de fibrina no momento 24 horas pós plaqueamento .....	92

## *Lista de Abreviaturas*

<b>ACP -</b>	Agente crioprotetor
<b>ADSCs -</b>	<i>adipose derived stem cells</i>
<b>BSL-3 -</b>	<i>Biosafety level 3</i>
<b>BNDES -</b>	Banco Nacional do Desenvolvimento
<b>CBA -</b>	<i>Citometric Bead Array</i>
<b>CO2-</b>	Dióxido de carbono
<b>Col I-</b>	Colágeno I
<b>CP -</b>	Concentrado de plaquetas
<b>CTM-TA -</b>	Célula tronco mesenquimal tecido adiposo
<b>DAB -</b>	Diaminobenzidina
<b>DMEN-F12-</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO -</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA-</b>	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>EDTA -</b>	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<b>EGF -</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>ELISA -</b>	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i>
<b>EPI -</b>	Equipamento de proteção individual
<b>FAPESP -</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
<b>FCAP Array-</b>	<i>Flow Capture Array</i>
<b>FINEP-</b>	Financiadora de Estudos e Projetos
<b>FITC -</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FP-4 -</b>	Fator plaquetário 4
<b>HEPA-</b>	<i>High Efficiency Particulate Air</i>
<b>IBGE -</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>ICC -</b>	Imunocitoquímica
<b>IL-6 -</b>	Interleucina 6
<b>IL-8 -</b>	Interleucina 8
<b>ISCT -</b>	<i>International Society for Cell Therapy</i>
<b>KGF -</b>	<i>Keratinocyte-Growth-Factor</i>
<b>LAC -</b>	Laboratório de Aitvidades Complementares
<b>M199 -</b>	Medium 199
<b>MEC -</b>	Matriz extra celular
<b>OMS -</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS -</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PDGF -</b>	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>

<b>PE -</b>	Ficoeritrina
<b>PFC -</b>	Plasma fresco congelado
<b>PI -</b>	Iodeto de propídeo
<b>PRP -</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>SFB -</b>	Soro fetal bovino
<b>TCLE -</b>	termo de concentimento livre e esclarecido
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming-Growth-Factor</i>
<b>Vim -</b>	Vimentina
<b>VEGF -</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

*Resumo e Abstract*

## ESTUDO COMPARATIVO DE TRÊS DIFERENTES SCAFFOLDS PARA CRESCIMENTO DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL, FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS

**Introdução:** A Engenharia de Tecidos consiste na regeneração de órgãos e tecidos, obtidos através da coleta de partes de órgãos ou tecidos do indivíduo, que, dissociados em células, são cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos (*scaffolds*), tendo como principal premissa o reestabelecimento e recuperação da funcionalidade do tecido lesado ou perdido. Esta tecnologia, portanto, abre novos caminhos para gerar transplantes funcionais e vitais. Dentro da Engenharia Biomédica e de Biomateriais, o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu possui, desde 2001, pesquisas na área de produção de curativos biológicos, que são aqueles que interagem de forma ativa nas diversas fases do processo cicatricial, nos vários tipos de feridas. Diante da realidade de que o tratamento das feridas crônicas englobam altos custos econômicos, sociais e humanos, comprometendo a vida dos indivíduos acometidos e da necessidade de se otimizar e minimizar o impacto negativo do descarte de hemocomponentes excedentes da prática transfusional, o desafio é buscar alternativas de *scaffolds* para Terapia Celular. **Objetivos:** Avaliar o desempenho de diferentes arcabouços biológicos como a cola de fibrina, gel de plaquetas e membrana de quitosana dopada com fatores de crescimento extraídos de plaquetas, para cultura de células. **Material e Métodos:** Foi coletado um fragmento de pele e um de gordura de cinco pacientes diferentes. Estes tecidos foram submetidos a protocolos de dissociação mecânica, enzimática e por explante, seguido de isolamento, semeadura e expansão das células obtidas: células-tronco mesenquimais, fibroblastos e queratinócitos. As células foram cultivadas até ao menos a quarta passagem, caracterizadas e separadas em dois grupos: testes pré-*scaffold* e pós-*scaffold*, que consistiu nas análises de imunofenotipagem, imunocitoquímica, dosagem de citocinas inflamatórias no sobrenadante de cultura, teste do cometa e teste anexinaV/Iodeto de propídeo-apoptose/necrose. **Resultados e Discussão:** As culturas obtidas foram cultivadas e amplificadas, no entanto, os queratinócitos foram de difícil cultivo, inviabilizando-se a continuidade dos experimentos. Tanto as células tronco mesenquimais tecido adiposo (CTM-TA) quanto os fibroblastos, foram amplamente isolados, amplificados, e o banco celular estabelecido. Nas análises de imunocitoquímica com os anticorpos específicos houve 100% de expressão, comprovando-se assim, o fenótipo de fibroblasto para essa análise. Para as CTM-TA e fibroblastos, as análises de citometria de fluxo tanto a imunofenotipagem quanto o teste de apoptose/necrose e dosagem de citocinas pré e pós-*scaffolds* foram coerentes com os resultados esperados, não encontrando dessa maneira, resultados discrepantes entre os grupos. Os *scaffolds* foram obtidos com sucesso assim como o cultivo das células sob tais estruturas. **Conclusões:** os *scaffolds* apresentaram-se de forma geral, como bons arcabouços para o cultivo de CTM-TA e fibroblastos, tornando-se dessa forma viável a incorporação de células.

**Palavras-chave:** engenharia de tecidos, *scaffolds*, curativos biológicos, células tronco, terapia celular.

## COMPARATIVE STUDY OF THREE DIFFERENT SCAFFOLDS TO DEVELOPING OF MESENCHIMAL STEM CELL, FIBROBLASTS AND KERATINOCYTES

**Introduction:** Tissue engineering comprises in organ and proper tissue regeneration achieved by collecting small tissue fragments that are dissociated into cells and then cultivated into biological or synthetic scaffolds. The main characteristic of these constructs is their capacity to behave as their biological matrix counterparts, providing mechanical support and the required micro environment to the cells. This technology paves the way for the creation of functional and vital tissues for transplants. Within Biomedical Engineering and Biomaterials, the Cell Engineering Laboratory of the Botucatu Blood Transfusion Center has been investigating these topics since 2001, starting with the production of biological dressings. Biological dressings interact actively with the several phases of chronic wounds, which involves high economic, social and psychological costs, often condemning the patients quality of life. Considering this reality, the contribution of tissue engineering is to develop alternatives on cell therapy using scaffold technology. **Aims:** To assess the performance of different biological scaffolds such as fibrin glue, platelet gel and chitosan membrane for cell culture. **Material and Methods:** Five fragments of adipose tissue and skin were collected, dissociate with mechanical, enzymatic and explant techniques, and the resulting cells were seeded on tissue culture flasks, amplified and characterized using multiparameter techniques. Following characterization, these cells were cultivated into three different scaffolds made of fibrin glue, platelet gel and chitosan - which was performed in two distinct ways, on its natural form and incorporated with platelet-derived growth factors to analyze this interaction. **Discussion and Results:** cell cultures were amplified and cultivated making a good cell bank. However, keratinocytes were difficult to grow and the rest of experiments were unfeasible to drawn up. Immunocytochemistry analysis were 100% staining positive giving to fibroblasts cultures the confirmation of it cell type. For adipose derived stem cells (ADSCs) and fibroblasts, flow cytometry analysis both immunophenotyping and apoptosis/necrosis tests were satisfactory, thus no outliers results were found. **Conclusions:** Broadly speaking, scaffolds behaved well in terms of being liveable to cells.

**Palavras-chave:** Tissue engineering, *scaffolds*, bioactive dresses, adipose derived stem cell, Cell Therapy.

*Sumário*

I- Introdução.....	30
I.1- Medicina Regenerativa.....	31
I.2- Quitosana .....	33
I.3- Hemocomponentes.....	35
I.4- Gel de Plaquetas.....	35
I.5- Cola de fibrina.....	37
I.6- Anatomia e fisiologia da pele.....	38
I.7- Feridas Crônicas.....	39
I.8- Células.....	41
I.8.1- Célula tronco mesenquimal tecido adiposo.....	41
I.8.2- Fibroblastos.....	42
I.8.3- Queratinócitos.....	42
II- Justificativa.....	44
II.1- Relevância do Tema.....	45
III- Objetivos.....	46
III.1- Objetivo Geral.....	47
III.2- Objetivos Específicos.....	47
IV- Casuística e Métodos.....	49
IV.1- Instalações.....	50
IV.2- Coleta do Material.....	52
IV.3- Isolamento Celular.....	53
IV.4- Contagem e Viabilidade Celular.....	55
IV.5- Rotina de Cultura Celular.....	57
IV.6- Criopreservação.....	60
IV.6.1 - O processo.....	61
IV.7- Contaminações.....	62
IV.8- <i>Scaffolds</i> .....	64
IV.9- Análises.....	69
IV.9.1- Imunofenotipagem.....	70
IV.9.2- Imunocitoquímica.....	72
IV.9.3- Apoptose/Necrose.....	73
IV.9.4- Diferenciação Tri-linhagem.....	76
IV.9.5- Dosagem de citocinas.....	76
V- Resultados e Discussão.....	77
V.1- Cultura celular.....	78

V.2- Citometria de fluxo.....	80
V. 2.1 - Imunofenotipagem <i>pré-scaffold</i> .....	80
V.3-Apoptose/Necrose.....	85
V.3.1 - Teste de Anexina/Iodeto de Propídeo.....	85
V.4 - Dosagem de Citocinas.....	88
V.5 - Diferenciação Tri-linhagem.....	92
V.6 - Imunocitoquímica.....	94
VI- Conclusão.....	97
VI. 1 - Conclusões Gerais.....	98
VI. 2 - Conclusões Específicas.....	98
VII. - Perspectivas.....	100
VIII. - Referências.....	102
IX- Anexos.....	110

## *I. Introdução*

## I.1- Medicina Regenerativa

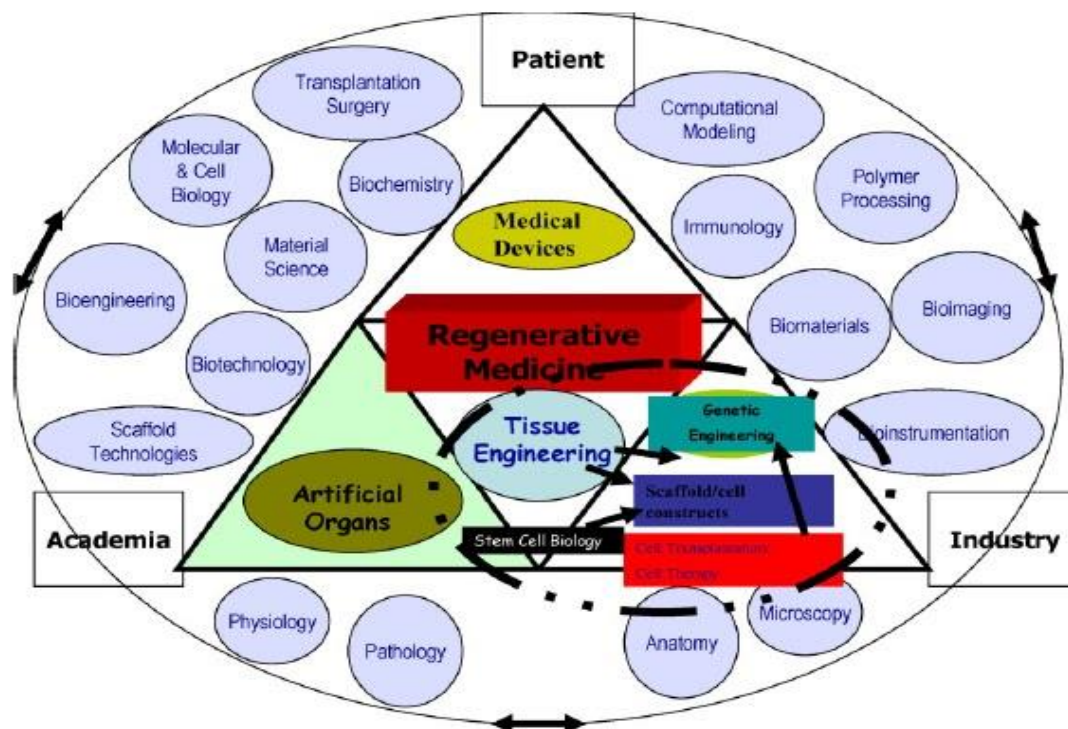
A medicina regenerativa consiste na construção, reparo ou substituição de tecidos ou órgãos manipulados *in vitro* para serem utilizados *in vivo*. Esse novo ramo da medicina reúne conhecimentos advindos de áreas também relativamente novas como a engenharia de tecidos, a terapia celular, a tecnologia dos *scaffolds*, a engenharia genética entre outras. Em 1993, Langer & Vacanti publicaram um artigo de revisão sobre as possibilidades de criação de tecidos em laboratório, visando o reparo de órgãos lesados e as consequências do envelhecimento, abrindo-se então o campo de estudos da engenharia tecidual (Rehen, 2007). Em 1997 Whithman DH *et al.* realizaram a experiência de integrar o plasma rico em plaquetas (PRP) com cola de fibrina dando início assim ao começo de inúmeros experimentos relacionados. Seguindo na mesma linha Marx *et al.*(1998) demonstraram que o PRP era capaz de induzir a regeneração óssea no joelho. Em 2001 Deffune e Rossi iniciam a aplicação do plasma humano na composição de biocurativos, ou curativos bioativos cuja base fundamental é o conjunto de proteínas do sangue. Após criteriosa avaliação, e estudos em modelos animais, a linha de biocurativos recebe a aprovação do CONEP (2003) para estudos em seres humanos (Garcia, 2004). Em 2005 iniciam-se avaliações da cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea cultivadas em meio enriquecido com hormônios derivados de plaquetas(HDP) na diferenciação osteogênica e análise de adesão celular a pinos de titânio para implantes dentários ( Franzolin,2008). Em 2007, a partir do sucesso terapêutico utilizando tanto a cola de fibrina *home made* (Biofibrin), como o gel de plaquetas laminar (Biogel) deparou-se com dificuldades na aplicação tópica: material estéril, escorregadio exigindo pessoal altamente qualificado, além da necessidade de armazenamento à 4°C e da curta vida de prateleira(15dias), o grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Celular(LEC) do Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu iniciam a produção de novos *scaffolds* utilizando os HDP com foco na engenharia de tecidos com foco na restauração de lesões crônicas de pele utilizando celulose bacteriana e quitosana (Araújo, 2007;Carvalho, 2009;Moroz,2009;Moroz, 2010;Assunção, 2011;Moroz,2012;Carvalho,2013;Moroz, 2013).

A engenharia de tecidos consiste na regeneração de órgãos e tecidos, através do recrutamento de tecidos do paciente, dissociados em células que são cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos (*scaffolds*), para serem reinseridos no paciente. Esta tecnologia, portanto, abre novos caminhos para gerar transplantes funcionais e vitais (Bucheler & Haisch, 2003; Bittencourt, 2008; Neagu, Suci, Ordodi, Păunescu, 2005; Freshney, 2000; Birchall, & Macchiarini, 2008; Bertanha, 2013). A terapia celular, no entanto, surge como uma vertente da medicina regenerativa, que consiste no tratamento personalizado e específico de uma região ou área lesada que com a manipulação de células tronco retiradas, isoladas, cultivadas e caracterizadas desse próprio indivíduo serão reinseridas e atuarão de forma natural num dado processo de cicatrização e/ou regeneração. A fim de proporcionar suporte e microambiente favorável à essas células, a

tecnologia dos *scaffolds* ou suportes biológicos atua como esteio indispensável ao amparo mecânico e confere a reprodução ambiental nos conformes bioquímicos necessários àquele nicho específico. Por meio de composições variadas de biomateriais sintéticos e não sintéticos, com a adição de meios de cultura específicos, condições ambientais de gases, luz e temperatura controladas, consegue-se mimetizar um determinado microambiente celular.

Os biomateriais podem ser definidos como todo material utilizado para substituir, no todo ou em parte, sistemas biológicos. Estes devem possuir a capacidade de permanecer em contato com tecido vivo e recompor partes lesadas do organismo, ou ainda, auxiliar na recuperação. Podem agir de modo contínuo ou intermitente, entrando em contato com fluídos corpóreos, mesmo que localizados fora do corpo (Freshney, 2000). Os biomateriais podem ser produtos metálicos, cerâmicos, poliméricos sintéticos ou naturais, destacando-se o colágeno purificado, as fibras proteicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados (Birchall, & Macchiarini, 2008). A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar que engloba não apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor sendo, portanto, biocompatíveis e funcionais (Santos Jr, 2001). Neste contexto, deve-se ressaltar que o conceito de biocompatibilidade se resume na habilidade de um material em induzir no paciente uma resposta adequada a uma aplicação específica (Moryson, 1998).

Os biomateriais a base de polímeros podem ainda ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários. Os bioestáveis são materiais utilizados na substituição, por tempo indeterminado, de um tecido lesado, devendo possuir, portanto, características mecânicas e físico-químicas compatíveis com tal função. Os materiais bioabsorvíveis são aqueles degradados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sendo, portanto, utilizados como dispositivos temporários (Tormala; Pohjonen; Rokkanen, 1998) como é o caso da quitosana. A figura abaixo mostra um esquema ilustrativo sobre as diversas áreas básicas do conhecimento científico que são necessárias para se formar novas áreas e, dessa forma, compor a vasta e promissora área da medicina regenerativa que é regida pela tríade: academia ou "bancada" (universidades e institutos de pesquisa, nos quais as perguntas e dúvidas tentam ser solucionadas através de hipóteses e dessa forma, são traduzidas em experimentos), a indústria que pode transformar em produtos e processos os achados da academia e por fim, o paciente ou "leito" que é a razão inicial, a finalidade do estudo pelo qual o conhecimento é produzido.

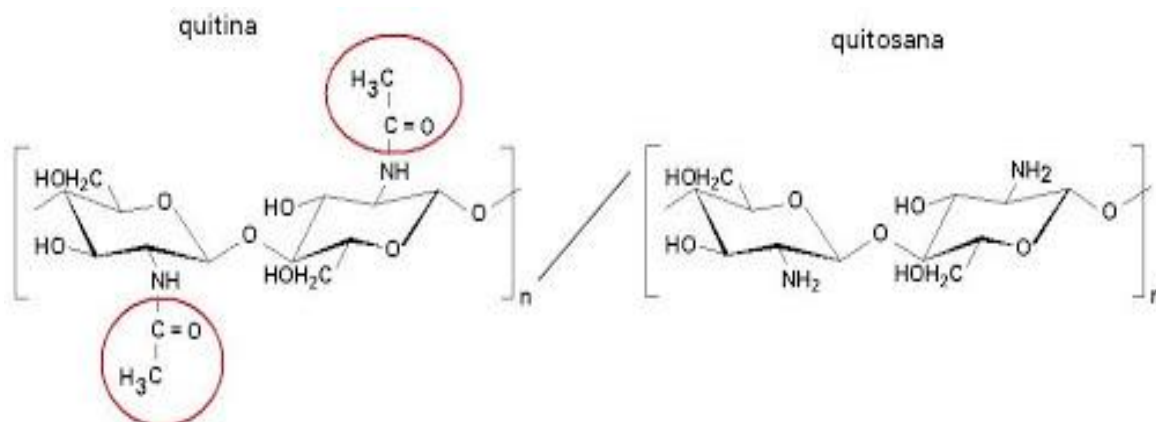


**Figura 1:** Esquema ilustrativo Medicina regenerativa e suas vertentes dentro das grandes áreas do conhecimento científico. Fonte: não encontrada.

## I.2- Quitosana

A quitosana é um biopolímero hidrofílico obtido a partir da quitina (termo derivado da palavra grega *Khitón*, que significa carapaça, casca ou caixa de revestimento), e que designa um polissacarídeo abundante na natureza (proveniente de carapaças de crustáceos e fungos), perdendo apenas para a celulose em quantidade produzida anualmente (Senel & McClure, 2004). A quitosana é um polissacarídeo originado a partir da reação de desacetilação parcial de quitina, geralmente por tratamento alcalino (Chen *et al*, 2005) sendo quimicamente conhecida como seu derivado N-desacetilado. Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, biodegradáveis, biocompatíveis originados por fontes naturais renováveis tendo sua utilização explorada nos últimos setenta anos (Roberts, 1992; Goosen, 1996). Ambas as estruturas são constituídas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopiranosose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1-4)$  entretanto, os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade (Azevedo *et al*, 2007). Na estrutura da quitina, no qual apresenta-se insolúvel na maioria dos solventes, predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopiranosose enquanto que na quitosana, que é predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose, é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos (Roberts, 1992; Goosen, 1996; Mathur & Narang, 2007). A literatura costuma aceitar materiais obtidos a partir da quitina, com grau de desacetilação superior a 75% e solúveis em ácidos como o acético e o fórmico, como sendo quitosana (Ravi Kumar,

2000). A figura abaixo mostra a estrutura química da quitina e da quitosana, ressaltando a retirada dos grupos acetila para que se tenha a molécula de quitosana propriamente dita:



**Figura 2:** estrutura química quitina e quitosana mostrando os grupos acetil nos quais são excluídos para a formação da quitosana. Fonte: <http://www.olharnano.com/artigos/1003/11001/S%C3%ADntese-de-quitosana-magn%C3%A9tica>

Características como biocompatibilidade e a biodegradabilidade são propriedades fundamentais da quitosana (Senel *et al*, 2000), e, devido a estas características biológicas, foram encontradas diversas aplicações para este biomaterial, dentre elas: na agricultura, na indústria de alimentos e, recentemente, na área médica (Senel *et al*, 2000; Singla & Chawla, 2001).

Sendo a quitosana biocompatível e naturalmente degradada no organismo, apresenta a propriedade de formar géis em soluções ácidas fracas, o que possibilita sua utilização em formulações farmacêuticas para aplicações tópicas em ferimentos, queimaduras e/ou vesículas oriundas de agressões fúngicas ou bacterianas (Muzzarelli *et al*, 1980). Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais, além de apresentarem propriedades cicatrizante e antimicrobiana, são totalmente absorvíveis pelo organismo.

A dissolução da quitosana dá origem a géis, que podem ser utilizados diretamente ou transformados em outros materiais na tentativa de utilização como biomateriais. Fatores como pH do solvente utilizado, concentração e peso molecular da quitosana estão diretamente relacionados à viscosidade do gel obtido, bem como às propriedades do biomaterial final. Embora a literatura seja escassa ao fornecer dados sobre os diferentes resultados obtidos para diferentes solventes utilizados e valores dos parâmetros supracitados (Senel *et al*, 2000; Singla & Chawla, 2000; Muzzarelli *et al*, 1980), essas informações são importantíssimas para a sua aplicabilidade.

A quitosana possui grande aplicabilidade no campo da Engenharia Biomédica e de biomateriais, devido à sua habilidade em acelerar a cicatrização de lesões cutâneas. Alguns estudos indicam propriedades antimicrobianas (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática), além de ser indicado como bioadesivo, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura e até mesmo

material para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas ou soluções (Spin-Neto *et al*, 2008). Seus metabólitos residuais também são atóxicos tornando a quitosana, um material de grande potencial de aplicação na área médica-farmacêutica (Hirano,1996).

Mesmo com a intensa pesquisa na área de biomateriais, nota-se a existência de poucos trabalhos na literatura científica, enfocando a produção de membranas, contendo simultaneamente quitina e quitosana (assim como outros agentes ativos em sua composição), informações detalhadas sobre as condições para a obtenção e utilização destas membranas, fatores que influenciam nas características físicas, químicas, mecânicas e biológicas destes materiais e resultados comparativos entre as características de membranas densas e porosas bem como da padronização nos métodos de caracterização destes biomateriais.

Biopolímeros *blend* (polímeros misturados) têm surgido na literatura, desde 2006, entre os mais descritos encontra-se o colágeno com quitosana. Neste trabalho, propomo-nos a incorporar fatores de crescimento extraídos do interior das plaquetas humanas como: Fator XIII, enzimas lisossomais, fibrinogênio, fibronectina, Fator de Von Willebrand, PDGF, VEGF, EFG, TGF- $\beta$  e FP-4, “permeando” a quitosana.

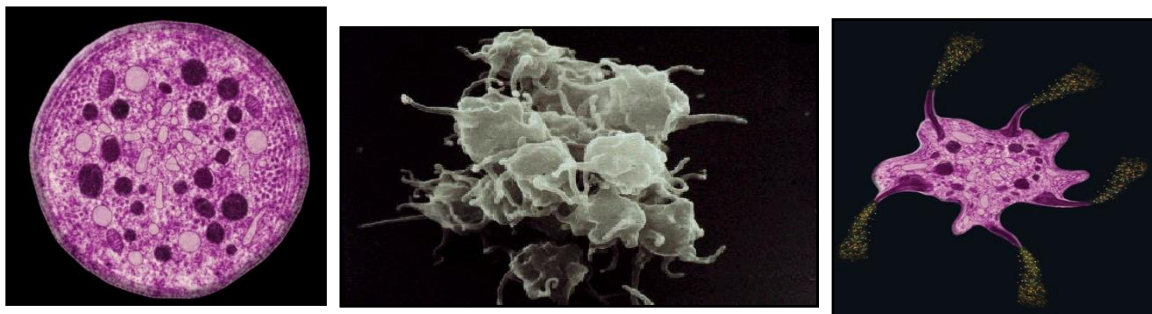
### **I.3- Hemocomponentes excedentes da prática clínica**

A hemoterapia é o emprego terapêutico do sangue, no qual pode ser transfundido com seus componentes e derivados. Tais componentes são produtos obtidos através de processos físicos como centrifugação ou congelamento e são eles: concentrado de hemácias (CH), plasma rico em plaquetas (PRP), plasma fresco congelado (PFC), concentrado de plaquetas (CP) e o crioprecipitado. Desde os experimentos de Whithman DH *et al*, (1997) até os dias atuais, os hemocomponentes são amplamente utilizados na terapêutica experimental e clínica para tratamento de inúmeras enfermidades sendo a gestão de estoques de muita complexidade. Desta forma, a ótica é de trabalhar com estoque estratégico que atenda a demanda mesmo que haja excedentes. Diante disto, o hemocomponente maior demanda é o concentrado de hemácias, havendo em toda a rede nacional um excedente de PFC e de CP que ultrapassam o tempo legalmente previsto para uso venoso. Este material, estéril e rico em proteínas era então descartado. A partir desta linha de pesquisa em 2001, todo o excedente da prática hemoterápica se torna matéria prima para o processamento de biocurativos, no LEC(Laboratório de Engenharia Celular) do Hemocentro de Botucatu.

### **I.4- Gel de Plaquetas *Home made* (Biogel)**

As plaquetas são fragmentos anucleados formados a partir da fragmentação de longas e finas protrusões do citoplasma de megacariócitos. Possuem forma discóide e, quando ativadas, modificam para pseudópode. Agem na hemostasia através da adesão, secreção, agregação e atividade procoagulante e também estão envolvidas na resposta

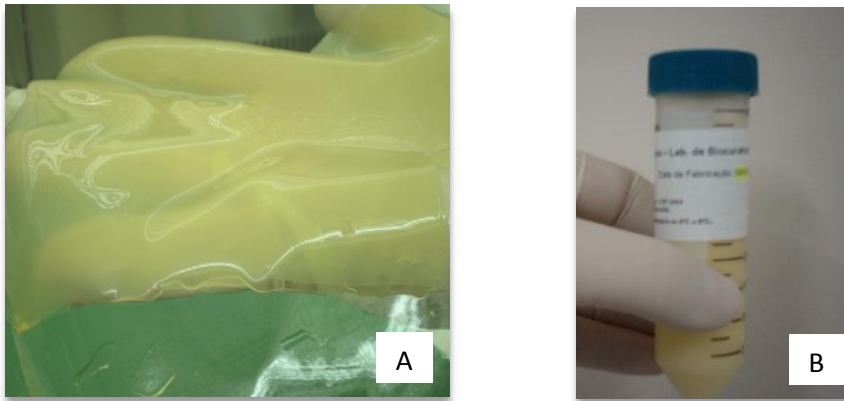
imune, na cicatrização tecidual e nas metástases hematogênicas (D'Amico, 2008) Em seu citoplasma há inúmeras proteínas de grande relevância clínica. Possui 3 tipos de grânulos: lisossomas, grânulos densos e os grânulos  $\alpha$ , onde se encontram os fatores ou moduladores do crescimento (Yao & Eriksson, 2000).



**Figura 3:** Roman, P. *et al*, 2007 em Gobo-Oliveira, 2011. Em “A”, conteúdo intra-plaquetário. Em “B”, plaquetas inativas. Em “C”, ativação plaquetária ocorrida na adesão com formação de pseudópodes e liberação dos fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento são proteínas que desempenham papel essencial na migração, diferenciação e proliferação celular. Há um grande número de proteínas descritas, mas as mais importantes são PDGF (*Growth factor derived from platelets*) TGF-B (*Transformed beta growth factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*), VEGF. (*Vascular endothelial growth factor*), e IGF (*Insulin-Growth factor*) (Abrams, 2008).

O gel de plaquetas é um produto obtido por técnicas de fragilização da membrana plaquetária utilizando a técnica de congelamento/descongelamento e choque osmótico. Os *debris* de membrana são desprezados. Com o sobrenadante, duas diferentes formas farmacêuticas são obtidas: emulgel ou laminar. Em ambas as apresentações já testadas pelo Laboratório de Engenharia Celular o constituinte chave é o concentrado de plaquetas. Na forma laminar, o produto adquire consistência gelatinosa que é formado quando a trombina e o gluconato de cálcio são adicionados ao sobrenadante rico em fatores de crescimento em condições estéreis (Gobo, 2011). A matriz-gel é rica nos fatores de crescimento tais como PDGF, VEGF, fibronectina entre outros (Moroz, 2013). Moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento) solúveis estão presentes no Biogel e favorecem a migração, a proliferação e a diferenciação celular contribuindo para a modulação da resposta cicatricial.



**Figura 4:** "A" gel de plaquetas laminar. "B" gel de plaquetas-emulgel. Fonte: Gobo & Deffune, 2011.

### I.5- Cola de Fibrina (Biofibrin)

A fibrina é uma proteína cruzada derivada do fibrinogênio contido no plasma. Os fatores presentes, proteínas adesivas, citocinas, fatores de coagulação, são integrantes indispensáveis da formação do coágulo e da rede de fibrina. A fibrina é uma malha rica que promove a adesão de células e interage com meio estimulando a formação da MEC (matriz extracelular) e do colágeno; No, entanto, a fibrina endógena (paciente) é frágil, ineficaz pelo intenso processo inflamatório persistente e assim, acaba não retendo as células (fibroblastos) por sua fragilidade. A cola de Fibrina ou Biofibrin trata-se de um produto obtido a partir do plasma fresco humano com adição de trombina humana purificada e gluconato de cálcio à 10% enriquecido com vitaminas A e E, flavonóides e óleo de amêndoas doce. A apresentação farmacêutica é de emulgel produzido como um hemocomponente de uso tópico. Assim, a partir de sua formulação inicial, idealizou-se a produção de um *scaffold* obtido da cola de fibrina. A figura abaixo mostra a forma tópica da cola de fibrina-Biofibrin para aplicação em feridas crônicas de origem venosa.



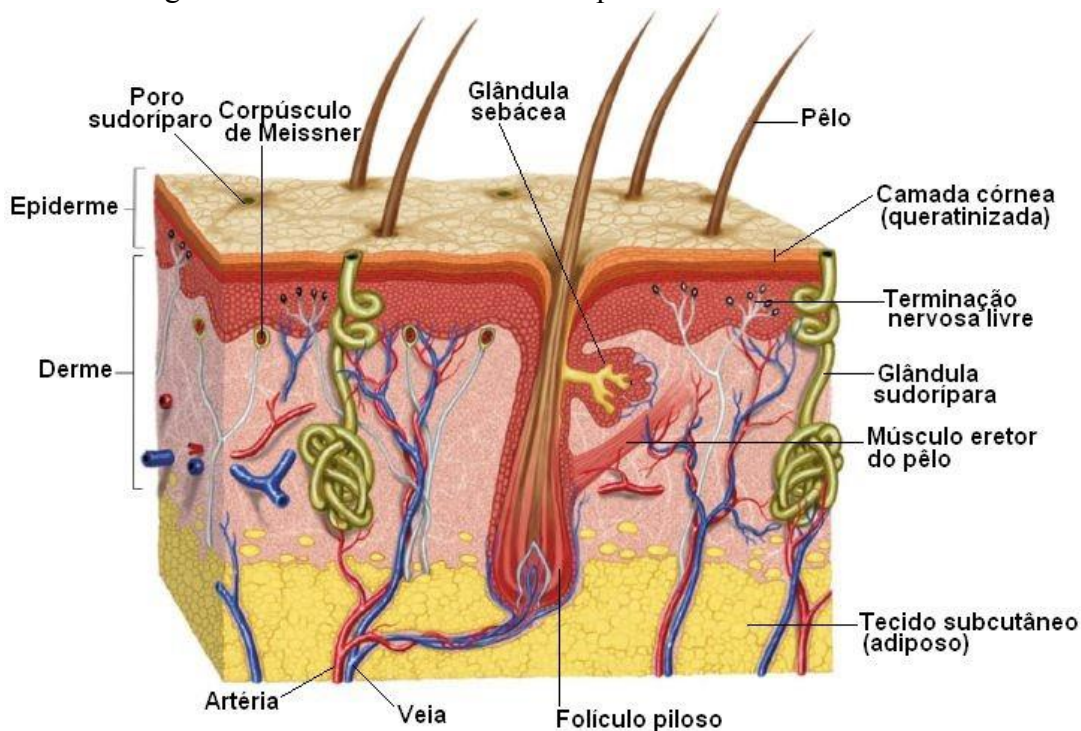
**Figura 5:** cola de fibrina-Biofibrin.

## I.6-Anatomia e Fisiologia da pele

A pele é o maior órgão de revestimento do corpo. Sua superfície mede, aproximadamente,  $1,50\text{m}^2$  e é responsável por 16% do peso corporal. É constituída pela epiderme, derme e tecido subcutâneo, composta por tipos de tecidos diferentes nos quais apresentam funções distintas. A epiderme tem função de manter a integridade e atuar como barreira física. É uma camada fina, derivada do folheto embrionário ectoderma. É avascular e consiste em camadas organizadas de epitélio estratificado definidas pelas alterações que envolvem a formação da queratina, que são: basal, espinhosa, granulosa e córnea. As principais células presentes são os queratinócitos, que constituem a barreira física. Outras células são os melanócitos (produzem melanina que por sua vez protege o núcleo dos queratinócitos contra a ação dos raios UV-ultravioleta), células de Langerhans (agem no sistema imune) e as células de Merkel (função sensorial). A derme possui como função oferecer resistência, suporte sanguíneo e oxigênio. Deriva do folheto embrionário mesoderma e é formada por duas camadas: papilar e reticular. Contêm vasos sanguíneos, folículos pilosos, vasos linfáticos, glândulas sebáceas e sudoríparas. É composta por fibroblastos, colágeno e fibras elásticas. O colágeno é o elemento mais abundante, fabricado principalmente pelos fibroblastos. O tecido subcutâneo é composto por tecido adiposo e conjuntivo, além de grandes vasos sanguíneos, nervos e vasos linfáticos. Está envolvido na termorregulação, provisão de energia, reserva nutricional e papel cosmético (Gobo, 2011).

A pele exerce diversas funções, como: proteção; sensação; equilíbrio hídrico; regulação térmica; produção de vitamina D e atua na regulação da resposta imune (Gobo, 2011).

A figura abaixo ilustra a anatomia da pele:



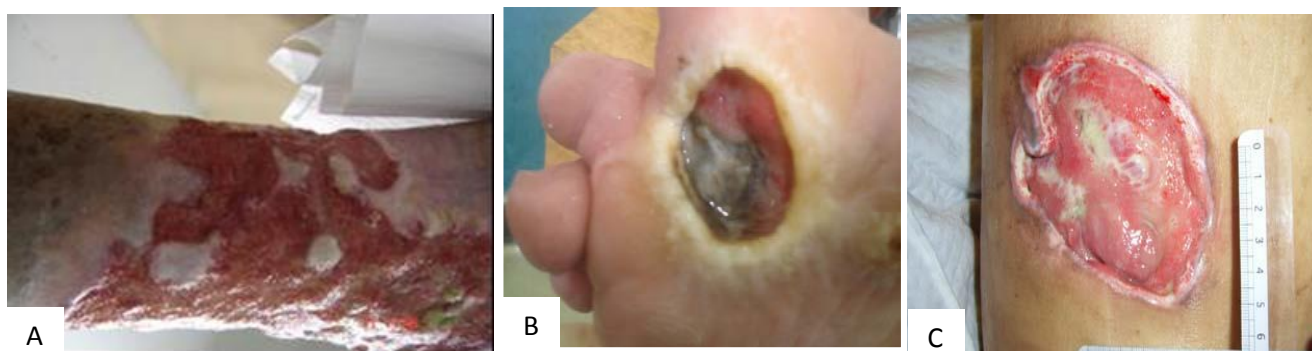
**Fig.6** Esquema ilustrativo anatomia pele. Fonte:<http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>

Quando a pele sofre uma ação de descontinuidade que forme qualquer lesão, é denominada ferida. Pode ser causada por trauma, intencional, isquemia e/ou pressão.

Temporalmente, as feridas podem ser classificadas como agudas e crônicas (Dealey, 2001).

### I.-7 Feridas Crônicas

As feridas crônicas são impactantes do ponto de vista de saúde pública sendo consideradas como doenças negligenciáveis atingindo preferencialmente mulheres de faixa etária entre 55-90 anos. O aumento da longevidade da população brasileira tem determinado o aparecimento das feridas crônicas como um problema de difícil abordagem terapêutica. A prevalência está em torno de 1 a 1,5% no mundo ocidental, sendo semelhante no Brasil (Araújo, 2013). Os fatores determinantes das feridas crônicas são multicausais, no entanto, o aumento da longevidade acarreta maior número de co-morbidades como a hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, insuficiência venosa, diminuição da mobilidade física, transformando-as em grande desafio médico. Levando em consideração dados do IBGE/2010 de que o índice de envelhecimento aponta para mudanças na estrutura etária da população brasileira, onde em 2008, para cada grupo de 100 crianças de 0 a 14 anos existem 24,7 idosos de 65 anos ou mais e em 2050, o quadro muda: para cada 100 crianças de 0 a 14 anos existirão 172,7 idosos, a abordagem das feridas crônicas se torna imprescindível para redução dos índices de cronicidade com o uso da geração de curativos biológicos. As figuras abaixo mostram tipos, tamanhos, tempo e locais de feridas de diferentes etiologias:



Fonte: Araújo, I.C.F, 2007

**Figura 7:** A. úlcera venosa. B. mal plantar ou úlcera diabética. C. úlcera de pressão ou escara. Deffune, 2011.

Da variedade de produtos no mercado, duas gerações são bem definidas: curativos interativos ou biológicos ( 1ª geração) e curativos baseados em terapia celular com uso de células tronco tecido específico ( 2ª geração).

Os **curativos de 1ª geração** são coberturas que interagem com o leito da ferida e levam a redução da dor, protegem de infecções, controlam exsudato, promovem desbridamento, hemostasia e preenchimento de espaços cavitários. São exemplos: fitoterápicos, enzimas (papaína, collagenase), e semi-oclusivos como hidrocolóides, hidrogéis, carvão ativado, entre outros, conforme demonstrado no Tabela 1(Goossens & Cleenewerck, 2010).

**Tabela 1.** Principais curativos de 1ª geração e biomateriais. (Modificado de Goossens e Cleenewerck, 2010).

Classificação	Produtos comercializados
Alginatos	Algisite® (Smith and Nephew) Algostérial® (Brothier) Comfeel-Seasorb® (Coloplast) Dosastéryl® (LDM) Kaltostat® (Convatec) Melgisorb® (Mölnlycke) Sorbalgon® (Hartmann) Sorbsan® (Braun-Biotrol) Urgosorb® (Urgo)
Membrana de Poliuretano (hidrocelular) absorvente	Allevyn® (Smith and Nephew) Askina transorbent (Braun-Biotrol) Biatain® Ulcere (Coloplast) Cellosorb® (Urgo) Combiderm® (Convatec) Cutinova foam (BDF) Lumiderm 6000® (Sarbach) Lyomousse (Seton Health Care Group) Tielle® (Johnson and Johnson)
Hidrocolóides	Algoplaque®/Urgoderm (Urgo) Askina Biofilm® (Braun-Biotrol) Comfeel® plus (Coloplast) Duoderm® E (Convatec) Hydrocoll® (Hartmann) Restore® (Incare) Sureskin® (Euromédec) Tegasorb® (3M) Urgomed® (Urgo)
Hidrofibras	Aquacel® (Convatec)
Hidrogéis	Comfeel Purilon® (Coloplast) Duoderm Hydrogel® (Convatec) Hydrosorb® (Hartmann)
Interfaces	Adaptic® (Johnson and Johnson) Mépitel® (Mölnlycke)
Curativo com carbono	Actisorb®, Actisorb plus® (Johnson and Johnson) Carboflex® (Convatec) Carbonet® (Smith and Nephew) Lyomousse C (Seton Health Care Group)
Curativo com ácido hialurônico	Hyalofill® (Convatec)
Curativos enzimáticos	Elase® (Parke Davis) Pulvo 47®
Tecidos	Vaselitulle® (Sarbach) Unitulle® (Cassenne) Lomatuell® (Lohmann) Jelonet® (Smith and Nephew)

Os **curativos interativos bioativos de 1ª geração** são coberturas feitas a partir de biomateriais, incluindo produtos de engenharia tecidual com derivados naturais ou artificiais. Normalmente combinam polímeros e por serem parte de matriz de tecido natural, agem ativamente na cicatrização e na formação de novos tecidos (Goossens & Cleenewerck, 2010). A aplicação de fatores de crescimento tem sido realizada com maior frequência baseando-se no pressuposto de que as feridas crônicas possuem uma desordem celular, resultado em escassez dos fatores de crescimento exigidos para a cicatrização normal (Boateng *et al.*, 2008).

Nos **curativos de 2ª geração**, as células tronco tecido específicas são incorporadas a produtos de mercado, também são chamados de substitutos biológicos da pele, são elaborados para reproduzir o mais fielmente possível a estrutura e a função da pele. Incluem filmes biodegradáveis formados a partir de, por exemplo, colágeno e glicosaminoglicanas. Há alguns produtos disponíveis comercialmente, um exemplo é o Apligraf® que é derivado da combinação de um gel de colágeno bovino do tipo I com fibroblastos homólogos neonatais, cobertos por uma camada epidérmica queratinizada, Já o Dermagraft® é fabricado também a partir de fibroblastos humanos derivados de tecidos de prepúcio recém-nascido associado com um *scaffold* bioabsorvível de poligalactina e matriz extracelular. Certamente são produtos com resultados satisfatórios, porém seus fatores limitantes são o tempo necessário para cultura de células autólogas, os riscos biológicos de material homólogo e os custos relacionados ao preparo destes materiais, representados na Tabela 2 (Dadalti *et al*, 2007; Boateng *et al*, 2008).

**Tabela 2** – Valor dos produtos para tratamento de feridas [www.internationalpharmacy.com](http://www.internationalpharmacy.com).

PRODUTOS	VALOR (US\$)
Interativos (Kollagenase®) – 50 g	24,85
Interativos (Duoderm®) – placa 10x10 cm	15,71
Bioativos (Regranex®) – 15 g	792,04
Bioativos (Gel de plaquetas <i>home made</i> ) – disco 10 cm	2,92*
Terapia celular (Apligraf®) – disco 7,5 cm	998,97
Terapia Celular (Dermagraft®) – disco 5 - 7,5 cm	427,36

\* custo indireto de insumo - FONTE: DADALTI, 2007;

## I.- 8 Células

### I. 8.1 Células tronco mesenquimais tecido adiposo

Células tronco adultas tem sido isoladas e caracterizadas à partir de diferentes tipos de tecidos como medula óssea, cordão umbilical, encéfalo, epitélios, polpa dentária e mais recentemente tecido adiposo (Yarak & Okamoto, 2010). O tecido adiposo subcutâneo representa uma fonte acessível e abundante na obtenção de células tronco mesenquimais (CTMs) devido à grande concentração destas no mesmo (Birchall & Macchiarini, 2008). Tal tecido possui alta variedade celular sendo composto por adipócitos maduros em sua grande maioria, pré-adipócitos, fibroblastos, células de músculo liso da fração vascular, células endoteliais, monócitos e macrófagos e linfócitos (Caspar-Bauguil *et al*, 2005)

As CTMs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas

atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (Bobis *et al*, 2006; Wan *et al*, 2008; Fraser *et al*, 2006) De todas as linhagens de células-tronco somáticas estudadas até o presente momento, as CTMs apresentam maior plasticidade, originando tecidos mesodermis e não mesodermis. Contudo, os mecanismos de plasticidade ainda não são totalmente compreendidos (Fraser *et al*, 2006).

### I. 8.2 Fibroblastos Dérmicos

O fibroblasto é uma célula constituinte do tecido conjuntivo e sua função é formar a substância intersticial que age como cimento intercelular possuindo diferentes fenótipos na dependência do tecido em que está inserido (Nolte *et al*, 2008).

Na pele duas formas distintas de fibroblastos podem ser encontradas. Ambas relacionadas com a posição na derme. Estas sub-populações são denominadas “mitoticamente ativas”, ou seja, replicando fibroblastos progenitores e fibrócitos pós-mitóticos. De acordo com citomorfologia, o potencial replicativo e a habilidade de sintetizar citocinas específicas e fatores de crescimento, como *transforming-growth-factor*(TGF)  $\beta$  e *keratinocyte-growth-factor* (KGF), os fibroblastos progenitores podem ser classificados nos seguintes tipos de células: I, II e III. Células tipo I possuem a maior capacidade replicativa e podem incluir cerca de 25-30 divisões celulares antes da diferenciação em células tipo II, sendo que este tipo de célula pode se dividir aproximadamente 15-20 vezes antes da diferenciação no subtipo III. Este último possui um potencial de apenas 5-8 ciclos de divisão celular antes da diferenciação espontânea em fibroblastos pós-mitóticos (fibrócito).

Vários marcadores parcialmente específicos caracterizam os fibroblastos: anti-colágeno-I, II, III e IV anti-vimentina, fibronectina, CD13 CD33, CD34, CD44, CD45 e CD49. Estas marcações ocorrem tanto em sub-populações de fibroblastos I, II e III como em fibrócitos. Outro dado importante é que além da matriz bem estabelecida há evidências experimentais de que fibroblastos derivados de tecidos mesenquimais da epiderme regulam a produção do fator de crescimento epitelial (EGF) (Green, 1991).

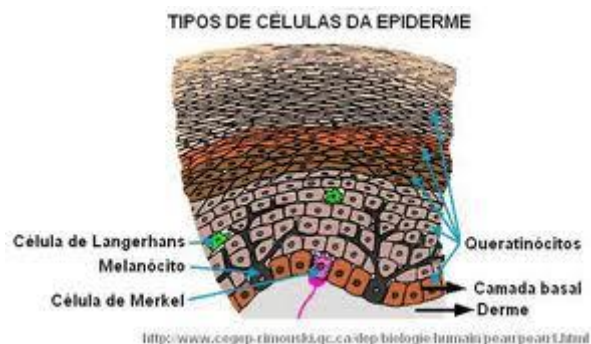
Tanto a reepitelização de feridas cutâneas, como proliferação e migração de queratinócitos é fortemente dependente dos fatores produzidos por estas células mesenquimais. Os fibroblastos são capazes de secretar várias interleucinas tais como IL-6, IL-8, e KGF todos os quais são conhecidas por estimular proliferação e migração de queratinócitos (Green, 1991).

### I. 8.3 Queratinócitos

Os queratinócitos de todas as camadas epidermais e seu metabolismo tornam-se progressivamente menores e menos ativos quanto mais distantes do estrato basal. São ausentes no estrato córneo constituindo uma estrutura dupla, composta de queratina envolta por um envelope, no qual era previamente a membrana celular e lipídeos, ambos

responsáveis pela sobrevivência humana através da retenção e manutenção de líquidos e proteínas no microambiente, impedindo a invasão de microorganismos externos. O estrato córneo da epiderme é também responsável por resistir à agressões físicas e químicas, e manter a permeabilidade da pele à água. (Gragnani, 2010).

Os queratinócitos proliferativos são pequenas células que residem no topo da membrana basal e normalmente apresentam uma taxa mitótica baixa como anteriormente citado. As novas células servem de substitutas para aquelas que sofreram a diferenciação terminal e descamação. É necessário 3 à 4 semanas para as novas células migrarem do estrato basal para o estrato córneo. O conhecimento desse processo de diferenciação é importante, pois quando as células são separadas das outras por enzimas para assim formar a suspensão celular para a cultura, algumas células são incapazes de formar colônias pois elas estão no estágio de diferenciação terminal. Somente 3 à 4% dos queratinócitos isolados proliferam e formam colônias em condições ótimas de cultura. As células sofrem o processo de diferenciação terminal normal na área central da colônia, e, com a confluência da colônia, isso ocorre em toda a superfície (Gragnani, 2010). Para ilustrar, a figura abaixo mostra os tipos de células que compõem a epiderme:



**Figura 8:** esquema ilustrativo epiderme. Fonte: [www.itc.nutes.ufrj](http://www.itc.nutes.ufrj)

## *II. Justificativa*

Diante da realidade de que o tratamento das feridas crônicas englobam altos custos econômicos, sociais, humanos comprometendo a vida dos indivíduos acometidos e da necessidade de se otimizar e minimizar o impacto negativo do descarte de hemocomponentes excedentes da prática transfusional, nosso desafio é buscar alternativas de *scaffolds* na Terapia Celular de fáceis armazenamento, aplicação e transporte.

## II.1 Relevância do Tema

A temática envolvendo feridas crônicas e terapia celular tem crescido nos últimos anos. Tal afirmação pode ser corroborada pelo levantamento de revisão de publicações realizado através da base de dados Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, 7 de julho de 2013). Já o número absoluto de artigos publicados relacionados à célula tronco mesenquimal tecido adiposo, fibroblastos, queratinócitos, *scaffolds* e quitosana apresentam-se escassos. A tabela a seguir mostra tais dados em números.

**Tabela 3:** pesquisa de dados sobre as principais palavras chaves correlatas ao presente trabalho

Assuntos buscados	Nº de publicações
<i>Chronic wounds</i>	38.983
<i>Chronic wounds and cell therapy</i>	2750
<i>Scaffold and chitosan</i>	702
<i>Chronic wounds and tissue engineering</i>	273
<i>Adipose derived stem cell and fibroblast and keratinocyte</i>	2

Fonte: base de dados Pubmed, julho 2013.

### *III. Objetivos*

### III.1 Objetivo Geral

Avaliar a contribuição dos curativos bioativos como *scaffold* para amplificação de células tronco, fibroblastos e queratinócitos.

### III.2 Objetivos Específicos

#### Quanto à cultura celular:

- Isolar, cultivar e amplificar células advindas de tecido adiposo, derme e epiderme humanos;
- Estabelecer um banco de células em condições de criopreservação.

#### Quanto às análises das células tronco mesenquimais tecido adiposo:

- Comprovar o fenótipo de célula tronco mesenquimal através da análise por citometria de fluxo com os marcadores CD 14, 34, 45, 73, 90 e 105.
- Induzir a diferenciação celular da célula tronco mesenquimal através do Kit Stem Pro para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica;
- Realizar as colorações específicas da cultura de células tronco mesenquimais com os corantes Oil Red, Alcian Blue e Alizarin Red;

#### Quanto às análises dos fibroblastos:

- Comprovar o fenótipo de fibroblasto através da análise por citometria de fluxo com os marcadores CD 14, 34, 45, 73, 90 e 105.
- Realizar técnica de imunocitoquímica com os anticorpos anti-colágeno I e anti-vimentina.

#### Quanto às análises dos queratinócitos:

- Realizar técnica de imunocitoquímica com o anticorpo anti-human Beta catenina

Quanto às análises comuns à todas as culturas:

- Analisar o índice de dano de DNA das células cultivadas pela técnica de Cometa;
- Monitorar a secreção de citocinas no sobrenadante das células em cultura em contato com os *scaffolds*; por citometria de fluxo com o kit CBA.
- Realizar teste por citometria de fluxo quanto a presença/ ausência de apoptose/necrose pelo Kit Anexina V e Caspase 3.

Quanto aos experimentos:

- Analisar o desempenho de três diferentes *scaffolds* para cultivo de células aderentes com foco em terapia celular para aplicação dermatológica;
- Comparar o desempenho do cultivo/amplificação de CTM-TA, fibroblastos e queratinócitos em *scaffolds* de cola de fibrina *home made*, gel de plaquetas in natura e membrana de quitosana dopada com hormônios de crescimento derivados de plaquetas;

#### *IV. Casuística e Métodos*

#### IV.1- Instalações e Infraestrutura Laboratorial

Este trabalho foi realizado nas seguintes instalações do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu: Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro sendo utilizados dois laboratórios: LAC (Laboratório de Atividades Complementares) e Área Limpa, no qual foram realizadas todas as etapas de processamento de tecidos, isolamento e cultura celular bem como a obtenção e preparo dos *scaffolds*. O Centro Cirúrgico do Departamento de Cirurgia Plástica e Ortopédica onde foram coletadas as amostras de pele e gordura; e ainda, a Clínica de Cirurgia Plástica Dr. Fausto Viterbo, o Laboratório de Citometria de Fluxo, Laboratório de Química e Bioquímica do Depto de Química do Instituto de Biociências (IBB), no qual a primeira etapa da produção da membrana de quitosana foi realizada, Laboratório de Matriz Extra Celular do Depto de Morfologia do Instituto de Biociências (IBB) no qual as análises imunocitoquímicas foram realizadas e Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica onde ocorreu a realização do teste do Cometa.

O LAC integra a seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu tendo iniciado suas atividades em dezembro de 1992. Ao longo deste período, graças às fontes de financiamento de pesquisas vigentes no país, em especial FAPESP, CNPq, BNDES, FINEP e FNS que foram entidades de suporte à pesquisa, as atividades tiveram um vertiginoso crescimento dando hoje vazão a três diferentes linhas de atuação. Tais linhas são: a) diferenciação de células-tronco de diferentes espécies, b) obtenção de anticorpos monoclonais murinos, c) produção de curativos bioativos com foco na terapêutica humana. Essas três linhas de pesquisa ocupam uma área correspondente a 1200m<sup>2</sup> classificados nas categorias:

Laboratório convencional ou *standard* – Laboratório de Atividades Complementares (LAC) onde são desenvolvidas tais atividades: viabilidade celular, contagem celular, técnica de ELISA, preparo de tampões, eletroforese de proteínas em gel de agarose ou poliacrilamida, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, *Western blotting*, imunodifusão (*Ouchterlony*), imunofenotipagem, técnicas de hemaglutinação, entre outras (Figura 8).



**Figura 9:** Laboratório de Atividades Complementares. Foto: SILVA, R.A.M, 2010



**Figura 10:** Sala de screening, área limpa. Foto: SILVA, R.A.M, 2010



**Figura 11:** antessala Nicho 1 área limpa. Foto: Arquivo pessoal, 2012.



**Figura 12:** Sala Nicho 1 área limpa. Foto: Arquivo pessoal, 2012.

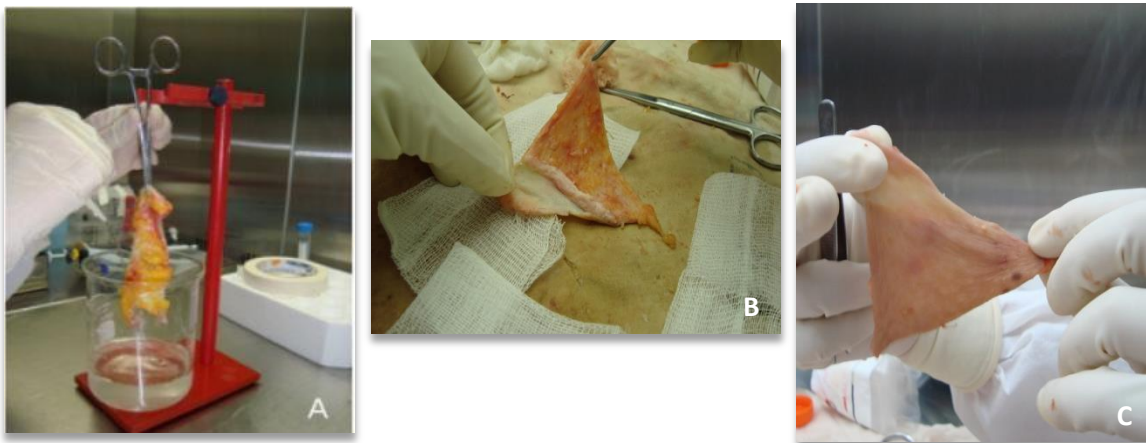
Área Limpa classificada 10.000. Laboratório de contenção de nível III de segurança, P3 ou BSL-3 dentro da classificação internacional do matiz da OMS de laboratórios segundo a periculosidade, presença ou não de medidas preventivas e de vacinação além do risco para o meio ambiente e para o homem. Nesta área o conceito laboratorial diferenciado tem sistema de ar filtrado com filtros *bag in bag out* e pressão negativa. Tal área possui ar filtrado sob pressão positiva com filtros HEPA, apresenta vestiário específico com ducha na entrada e colocação de equipamentos de proteção individual (EPIs) de circulação interna para diferenciar de aventais de circulação convencional em corredores ou em outros laboratórios. Dentro dessa área encontra-se equipada e em funcionamento a chamada área de *screening* (Figura 9) a qual se constitui de uma ante-sala dos três nichos de cultura celular com ar filtrado individualizado. Em todos os nichos existem dois ambientes: microscopia (Figura 10) seguida da área de manipulação estéril propriamente dita (Figura 11).

No primeiro nicho são desenvolvidas atividades relacionadas à diferenciação de células-tronco; no segundo nicho estão as pesquisas relacionadas à produção de anticorpos monoclonais murinos e no terceiro nicho são desenvolvidas as atividades das pesquisas com os curativos bioativos.

#### IV.2- Coleta do Material

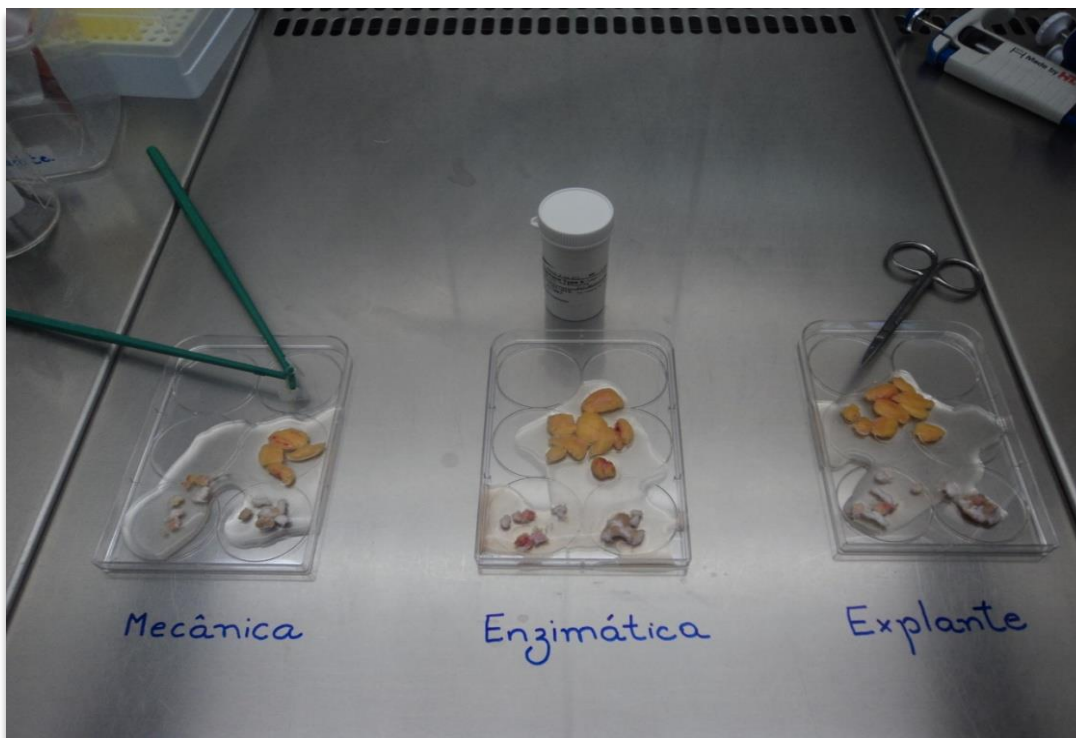
As células utilizadas durante todo o trabalho foram coletadas de pacientes sadios na maioria do sexo feminino com idades variando (média) entre 23 à 42 anos. Os pacientes previamente receberam informações à respeito do presente projeto de pesquisa por meio do TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido) optando ou não pela doação do material. Os pacientes que se submeteram à abdominoplastias e lipoaspirações abdominais foram o grupo alvo do trabalho devido a literatura correlata demonstrar ser o tecido adiposo uma rica fonte de células pluripotentes (Yarak, 2010).

Os fragmentos de pele e gordura foram retirados de cada paciente durante o procedimento cirúrgico e imediatamente colocados em frascos contendo solução HEPES suplementado com penicilina, streptomina e anfotericina (Gibco®) em ambiente estéril (centro cirúrgico). Os frascos foram levados até o Lab. de Engenharia Celular no qual permaneceram em temperatura 4°C durante 24h em solução HEPES. Após esse período, o fragmento foi levado ao fluxo laminar e em condições estéreis, procedeu-se a lavagem do fragmento em solução fisiológica. O fragmento contendo tecido adiposo, derme e epiderme foi separado com a ajuda de tesoura e bisturi. Depois de obter cada tecido separado macroscopicamente, realizou-se um dos três protocolos de isolamento celular em cada tipo de fragmento separado. As três técnicas realizadas foram: dissociação mecânica, dissociação enzimática e a técnica de explante e foram empregadas para todas as amostras, afim de se obter maior rendimento no número de células. A figura 12 mostra o fragmento total de gordura e pele. Após separação mecânica, os três fragmentos foram isolados para serem posteriormente dissociados. A figura 13 mostra as três técnicas de dissociação empregadas durante o trabalho.



Fonte: Cleto, 2011.

**Figura 13:** A: fragmento total retirado abdominoplastia. B: derme sendo separada mecanicamente da epiderme. C: fragmento isolado de epiderme.



Fonte: arquivo pessoal 2013.

**Figura 14:** tecidos separados e técnicas a serem empregadas para isolamento das células

### IV.3- Isolamento Celular

Os métodos para isolamento de células foram inicialmente propostos por Rodbell & Cols. em meados dos anos 1960 (Caspar-Bauguil *et al*, 2005; Bobis *et al*, 2006). Atualmente, são utilizadas três diferentes técnicas para se obter células provenientes de tecidos; são elas:

Dissociação mecânica: ela consiste na técnica de desmembrar mecanicamente o tecido com a ajuda de ferramenta chamada *Cell scrapper* (Corning®). Após o tecido ser coletado em centro cirúrgico, o frasco contendo meio HEPES foi adicionado de antibiótico e antimicótico de amplo espectro (Gibco®, 1%) permanecendo em geladeira à 4°C durante 24h. Em fluxo laminar, o tecido foi lavado abundantemente em solução fisiológica. O tecido então é separado com a ajuda de tesoura e bisturi nos três fragmentos: tecido adiposo, derme e epiderme. Em placa de Petri, o tecido foi dissociado e adicionado HEPES. Após 15 minutos de dissociação, o conteúdo líquido foi sugado com uma seringa (60ml) deixando-a com o bisel posicionado para baixo durante 15 minutos para que houvesse a decantação do material celular embebido em meio e o sobrenadante repleto de restos celulares (*debris*) separassem. Após tal período, o conteúdo celular foi colocado em tubo Falcon BD® (50ml) no qual, ao final do processamento havia 3 tubos: "T.A", "derme" e "epiderme" e cada conteúdo foi centrifugado à 1200rpm por 10 minutos, obtendo-se um botão celular (*pellet*) de células, (conjunto de células sedimentadas no fundo do tubo). O sobrenadante foi então aspirado e o *pellet* ressuspensão em 1 ml do meio de cultura DMEM F12 (*Dulbecco's*

*Modified Minimal Essential Medium*) Invitrogen®. Retirou-se alíquota de 30µl do *pellet* para realizar o protocolo de contagem e viabilidade celular em câmara de Neubauer e/ou contador automático Countess BD®. O restante do conteúdo celular presente no tubo foi plaqueado em frascos de acordo com os resultados da contagem e as células foram mantidas em estufa à 37°C com atmosfera úmida controlada a 5% de CO<sub>2</sub> e 95% oxigênio.

A dissociação enzimática consiste na obtenção de células através de processamento químico (enzimático) do tecido de interesse. O fragmento contendo tecido adiposo, derme e epiderme foi submetido ao protocolo de acondicionamento e prevenção de possível contaminação como descrito no item anterior. Após a separação mecânica dos três fragmentos, estes foram lavados três vezes em solução fisiológica abundantemente. Cada fragmento foi colocado em placa de Petri e pesado em balança de precisão (GR200 modelo D0001, A&D Company). Logo após a pesagem os fragmentos foram embebidos em meio HEPES e reservados em fluxo laminar. Paralelamente as soluções contendo concentrações específicas de colagenase tipo I responsável por quebrar ligações entre aminoácidos neutros e glicina na sequência Pro-X-Gly-Pro, no qual é encontrado em alta frequência nas fibras colágenas de tecidos conjuntivos como pele tendões, vasos sanguíneos e osso. A colagenase tipo I atua de forma satisfatória sobre a digestão de gordura, adrenais, fígado e outros tecidos (Gibco®). Utiliza-se 2 ml de meio HEPES por grama de tecido e uma solução de 2mg/ml de colagenase tipo I, foi preparada de acordo com o peso de tecido de cada fragmento. Diluiu-se a colagenase no meio HEPES em um tubo tipo Falcon, obtendo a solução final de 2 mg/ml e em seguida procedeu-se a sua homogeneização. Com o auxílio de um bisturi e uma pinça anatômica foi realizado o corte dos tecidos em pequenos pedaços. Foi adicionado a solução de 2mg/ml de colagenase diluída em meio HEPES à placa com o tecido fatiado. A placa foi levada a estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*. No dia seguinte pela manhã, o meio foi passado para um tubo tipo Falcon e então adicionou-se igual volume de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e procedeu-se a centrifugação do conteúdo à 1500rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação foi realizado a aspiração do meio, mantendo somente o *pellet* no tubo. Repete-se o mesmo processo trocando o meio de cultura contendo 10% SFB realizando novamente a centrifugação. O sobrenadante então foi aspirado mantendo-se apenas o *pellet* no tubo. Adicionou-se 3 ml de meio específico para o tipo celular ao *pellet* e homogeneizou-se o meio com a própria pipeta. Retirou-se uma amostra de 100 µL e colocou-se em um tubo de hemólise. Retirou-se 60 µL da amostra e colocou-se em outro tubo adicionando igual volume de azul de Tripán procedendo-se à contagem manual em Câmara de Neubauer.

O isolamento por método de explante (Vangipuram *et al*, 2013) (modificado) é aquele no qual o tecido coletado é submetido ao mesmo procedimento de armazenamento, manutenção da viabilidade e possível descontaminação como citado nos itens anteriores. Em capela de fluxo laminar, o tecido foi separado em tecido adiposo, derme e epiderme como já citado. Com os tecidos segregados, cada um foi gentilmente cortado com a ajuda de tesoura e bisturi em pequenos pedaços. Os pequenos pedaços foram ainda cortados em pedaços menores variando entre 4 à 8mm

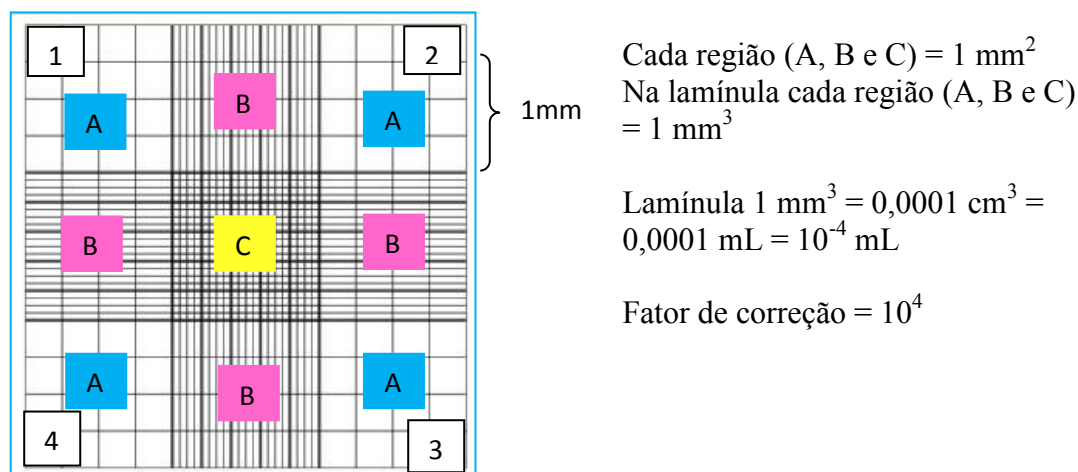
de área. Os fragmentos foram delicadamente colocados com a ajuda de uma pinça cirúrgica sob a camada tratada para cultura aderente dos frascos de cultivo celular. Meios de cultura específicos para cada tecido foram adicionados aos poucos tomando cuidado para não provocar o desprendimento dos fragmentos previamente fixados. O meio foi trocado parcialmente após 72h. Após 7 à 10 dias observa-se o desprendimento celular do tecido para a placa em células oriundas da derme; já para o tecido adiposo foi observado que esse período pode se estender até 30 dias após o plaqueamento inicial; e, para epiderme houve pouco ou nenhum desprendimento (Vangipuram *et al*, 2013).

#### IV.4- Contagem e Viabilidade Celular

São parâmetros essenciais na prática da cultura celular. Tal procedimento deve ser realizado primeiramente ao final do processo de isolamento e depois a cada tripsinização ou experimento no qual necessita-se saber a quantidade aproximada de células por área do frasco. A contagem e viabilidade também é realizada quando se procede as técnicas de criopreservação.

##### Contagem Manual

A câmara de Neubauer é o método pelo qual realiza-se a contagem manual das células. Após as células serem isoladas do tecido proveniente, elas são diluídas em meio de cultura, assim, uma alíquota é retirada e adicionada de igual volume de corante azul de Tripán. As células que se corarem de azul marinho serão consideradas não viáveis, devido ao fato de suas membranas terem rompido-se corando-as e as células que permanecerem refringentes sob a luz do microscópio serão as que mantiveram suas membranas íntegras. A câmara de Neubauer apresenta a seguinte disposição:



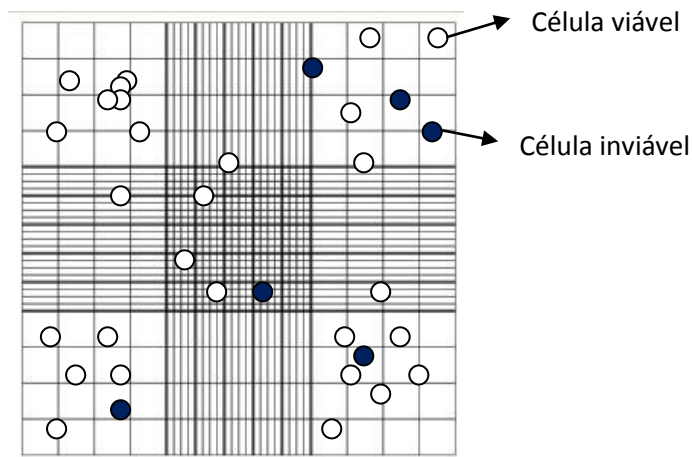
**Figura15:** Modelo esquemático representando o padrão a ser seguido durante o processo de contagem de células na Câmara de Neubauer. Fonte: Instituto de Física de São Paulo, USP. <http://web.if.usp.br/ifusp/>

A câmara é disposta em quatro quadrantes cada um com uma área de  $1 \text{ mm}^2$  no qual ocorre a contagem celular (Figura 16). A numeração dos quadrantes indica o sentido da contagem que é realizada com auxílio de um contador manual representado pela figura 15.



**Figura 16:** Contador manual. Fonte: Eikonal do Brasil.

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



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

**Figura 17:** Esquema ilustrativo Câmara de Neubauer com células.

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

### Cálculos

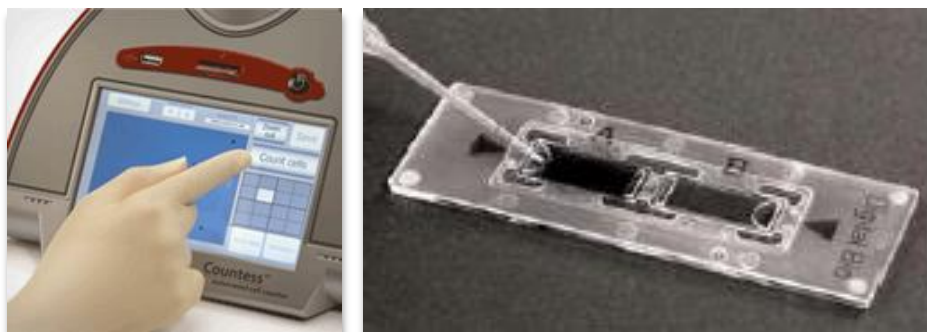
Com o *pellet* de células no tubo após uma a última centrifugação de lavagem, adiciona-se 3ml de meio de cultura homogeneizando o conteúdo. Uma alíquota de 30 $\mu$ L é retirada e colocada em tubo de hemólise e logo após, 30 $\mu$ L de azul de Tripan é adicionado e igualmente homogeneizado com a ajuda de uma pipeta.

A lâmina é então levada ao microscópio e procede-se ao seguinte protocolo de contagem: total de células vivas nos 4 quadrantes, ou, se a quantidade de células em cada quadrante for maior que 100, conta-se o primeiro quadrante e multiplica-se por 4. Faz-se o mesmo com as células mortas e depois calcula-se o total geral.

Assim; número de células/mL = nº de células contadas/ nº de quadrantes contados x Diluição x Fator de correção da câmara ( $10^4$ )

## Contagem Automática

O aparelho Countess™ é um contador de células automatizado, que utiliza mecanismos de ótica e análise de imagem para automatizar a contagem de célula na bancada, possibilitando além da contagem de células, a quantificação da viabilidade (vivas, mortas, e o número de células totais) com rigor e precisão, utilizando a técnica de azul tripano padrão. O contador leva 30 segundos por amostra para a contagem das células e é compatível com uma grande variedade de células eucarióticas fornecendo informação sobre tamanho da célula. Uma única medição, em 30 segundos fornece: concentração de células vivas e mortas/mL, concentração total de células/mL, viabilidade, porcentagem de células vivas para as células totais. As figuras abaixo mostram a câmara de contagem que é inserida no aparelho:



Fonte: <http://www.lifetechnologies.com.br>

**Figura18:** câmara de contagem para o contador automático e modelo ilustrativo Countess BD®

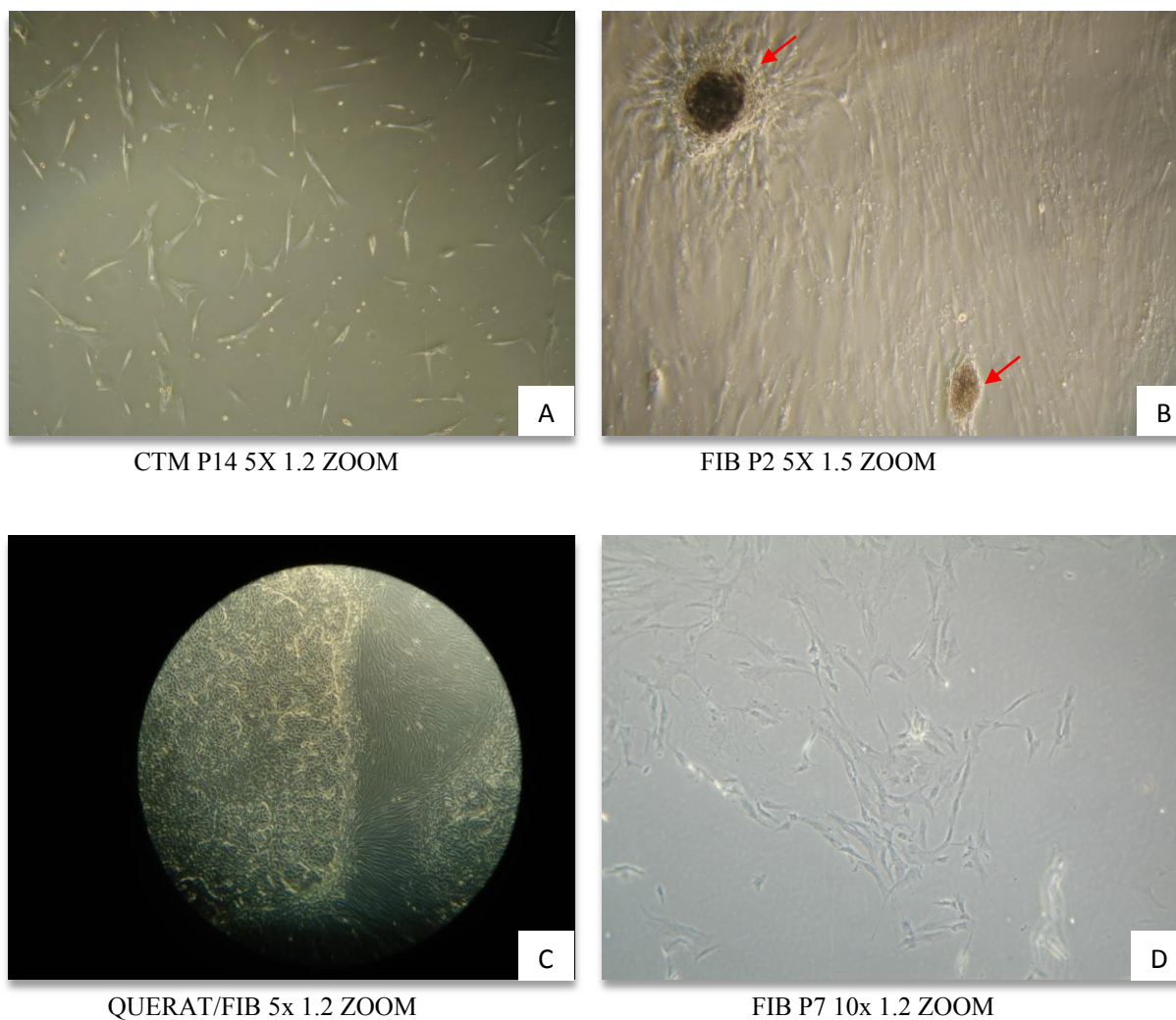
## IV.5- Rotina de Cultura Celular

Após contagem e plaqueamento das células de acordo com sua densidade, inicia-se assim a contagem cronológica *ex vivo*, ou seja as passagens. A cultura de células é classificada em duas vertentes principais distintas; a cultura de células em suspensão e a cultura de células aderentes, no qual esta última é a abordada no presente trabalho. As células em cultura possuem, inicialmente, características semelhantes aos seus tecidos de origem. Assim, células provenientes de tecidos epiteliais terão uma maior dependência de interação célula-célula, enquanto células hematopoiéticas não necessitam de nenhuma interação (Alves & Guimarães, 2013). Uma vez que o isolamento não é um processo no qual possibilita o isolamento de um único tipo celular, a cultura subsequente à tal processo apresenta-se heterogênea. Por exemplo, no isolamento de células tronco advindas de tecido adiposo, a cultura primária pode conter pré-adipócitos, adipócitos, células sanguíneas como hemácias e glóbulos brancos, fibroblastos, e as células tronco, sendo que todas essas populações excluindo-se as células sanguíneas apresentam-se como aderentes sob condições de cultura.

Após o plaqueamento as células aderentes iniciam o processo de amplificação com sucessivas mitoses. O meio de cultura é trocado a cada 48h sendo que cada tipo

celular exige um meio de cultura específico que satisfaça suas necessidades bioquímicas. As células tronco mesenquimais tecido adiposo requerem meios de cultura como: O meio DMEM-F12®, que é um meio que une em sua concentração 1:1 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e Ham's F-12 mistura nutriente sendo um meio basal amplamente utilizado em cultura de mamíferos. O meio Knockout® que contém todos os componentes necessários para cultura de células pluripotentes. É um meio utilizado para manutenção de crescimento e fenótipo de células estaminais embrionárias de primatas humanos e não humanos (CES) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Já os fibroblastos são tratados com meio M199® no qual foi desenvolvido originalmente para estudos nutricionais com fibroblastos de embriões de galinha sendo um excelente meio para fibroblastos humanos, e o meio Keratinocyte® para cultura de queratinócitos no qual é um meio completo livre de soro fetal bovino quando suplementado com fator de crescimento epidermal recombinante (rEGF) e extrato de pituitária bovina (BPE). Há também o tampão HEPES® (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)) que é um agente químico orgânico dipolar, de caráter anfótero tamponador caracterizado por ser um "Good buffer" no qual deriva de uma série de tampões descritos por Dr. Norman Good e seus colaboradores em 1966 (Good *et. al.*, Biochemistry 1966).

A confluência celular é um parâmetro utilizado na cultura para determinar a taxa de crescimento das células em relação à área disponível no frasco ou placa; assim, quando a cultura atinge a confluência de 80% parâmetro este, visível ao microscópio, no qual as células apresentam-se justapostas quase formando um tecido. As figuras abaixo mostram diferentes graus de confluência bem como tipos celulares distintos. Em A observa-se pequeno número de células aderentes, fibroblastóides. Em B, dois *clusters* identificados pela seta vermelha, com fundo da placa coberto por monocamada de células fibroblastóides confluentes. Em C, co-cultura de queratinócitos e fibroblastos em pequeno aumento (5X) e em D cultura de fibroblastos dérmicos. Toda a fotodocumentação foi realizada em microscopia invertida com contraste de fase (Axiovert 200 Zeiss®).



**Figura 19:** Diferentes graus de confluência de células em cultura. A: cultura de células tronco mesenquimais tecido adiposo, paciente 14 em 2ªpassagem, mostrando o início do crescimento sob a placa de cultura. B: fibroblastos paciente 2, mostrando a aderência de explantes e a colonização e espraiamento celular ao seu redor. C: cultura mista queratinócitos/fibroblastos mostrando a nítida segregação populacional e D: fibroblastos dérmicos paciente 7 em início de cultura mostrando a semelhança morfológica com a cultura de células tronco-mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Fotos tiradas utilizando microscópio Axiovert Zeiss.

Quando da obtenção de confluência de 80% é realizada a tripsinização, tal processo é essencial para que haja a amplificação celular e o número de células desejadas para que determinado experimento seja alcançado, desse modo é que ocorre o processo de passagens e assim a contagem cronológica *ex-vivo* das células. Este processo consiste no descolamento das células do plástico de cultura: a dissociação enzimática é uma das principais aplicações das enzimas na cultura de células. Proteases são necessárias para romper a matriz extracelular e, assim, obter células individualizadas com a finalidade de transferir as culturas para um novo substrato. A

enzima proteolítica inespecífica mais utilizada é a tripsina, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearranjarem seu citoesqueleto. Devido à inespecificidade da enzima, não se deve deixar a célula muito tempo em sua presença, para não haver lise celular (Alves & Guimarães, 2013) sendo assim, após 5 à 8 minutos em contato com a enzima, a cultura deve ser lavada com meio de cultura HEPES adicionado 10% de SFB no qual inativa a enzima.

#### IV.6- Criopreservação

Criopreservação é o processo de congelamento de material biológico à baixas temperaturas, geralmente à  $-196^{\circ}\text{C}$  temperatura esta conhecida como temperatura criogênica no qual os gases encontram-se liquefeitos à pressão atmosférica (Rubinsky, 2003).

É um processo no qual mantém a integridade e preservação cronológica das culturas sendo o único e com maior grau de confiabilidade conhecido (Farrant, 1980). À temperatura criogênica, todas as reações químicas, processos biológicos, bem como as atividades intra e extracelulares estão suspensas, portanto, teoricamente, numa célula ou tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente (Sheikhi *et al*, 2013). Linhagens estabelecidas ou culturas primárias estão propensas à diferenciação, desdiferenciação<sup>1</sup> ou instabilidade fenotípica<sup>2</sup> e senescência, no caso de linhagens finitas, contaminações por microorganismos, contaminação cruzada<sup>3</sup>, instabilidade genética<sup>4</sup> se permanecerem por muito tempo em processo de amplificação. Sendo assim, há inúmeras razões para se congelar células. Outras razões também envolvem economia de insumos e materiais, estabelecimento de banco celular e distribuição de amostras do banco estabelecido à outras pesquisas (Freshney, 2000).

---

1- desdiferenciação: processo no qual uma célula ou população diferenciada inicia um processo de indiferenciação voltando ao estado inicial.

2- instabilidade fenotípica: consequência do processo de diferenciação e/ou desdiferenciação no qual uma célula ou população que apresenta determinados marcadores de superfície, por diversas razões passa a expressar outros marcadores.

3 - contaminação cruzada: ocorre quando tipos celulares distintos convivem na mesma placa de cultura.

4 - instabilidade genética: propensão às células em cultura de sofrerem mitoses irregulares, ocorrendo assim mutações em seu DNA.

#### IV.6.1 O processo

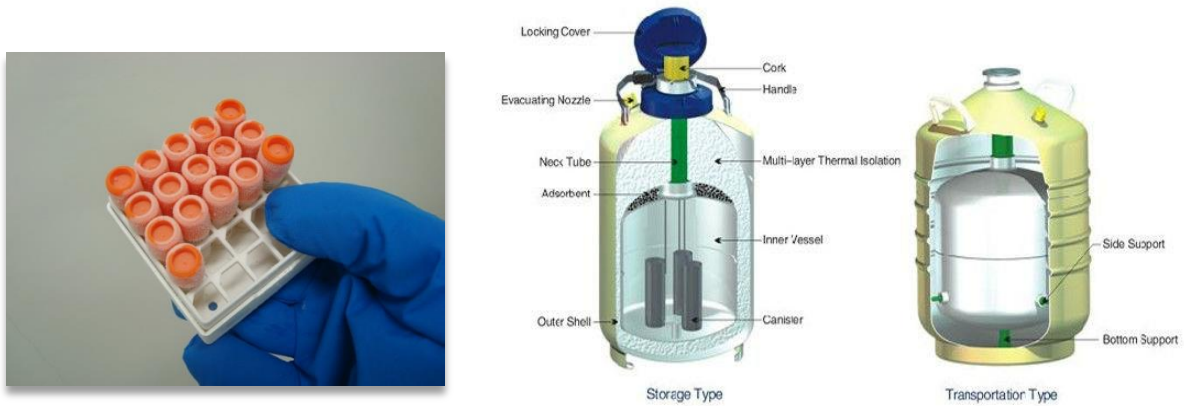
O processo consiste em expôr as células à um agente crioprotetor sob baixas temperaturas. Existem dois métodos de criopreservação: o congelamento gradual ou lento e a vitrificação. Inerente à técnica empregada, o método baseia-se em cinco etapas fundamentais:

- 1) exposição ao ACP (agente crioprotetor), com a finalidade de permitir a difusão desses agentes nos compartimentos celulares;
- 2) resfriamento com redução da temperatura de forma gradual (congelamento lento) ou súbita (vitrificação), na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a temperatura criogênica;
- 3) armazenamento ou estocagem, permitindo a preservação do material em temperatura ultrabaixa por períodos indefinidos;
- 4) descongelação ou aquecimento, etapa na qual ocorre o resgate do material criopreservado e retomada do metabolismo celular; e
- 5) diluição ou remoção do ACP, a fim de evitar, na presença de temperatura fisiológica ou ambiente, a produção de metabólitos secundários, o que intensificaria a ação tóxica destes aditivos (Castro *et al*, 2011).

Os agentes crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula (Rall.; Reid & Polge, 1984). O etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e o propanodiol são os crioprotetores intracelulares mais utilizados por apresentarem uma capacidade de penetração superior a do glicerol e baixa toxicidade. No entanto, a eficácia destes ACPs variam em função da estrutura (célula ou tecido) a ser criopreservada, do tipo e concentração e tempo de exposição utilizados antes do processo de criopreservação propriamente dito (Fuller & Paynter, 2004). Em nosso laboratório utilizamos o DMSO, que, por ser um álcool dipolar é capaz de interagir ou combinar-se com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração das moléculas (Sojka *et al*, 1990). Essa substância é considerada relativamente atóxica (Wusteman *et al*, 2008) e é encontrada em diversas espécies vegetais e animais, incluindo o homem (Lee.; Mora.; Levasseur, 1999) O DMSO interage com as membranas, atravessando-as rapidamente por meio de difusão (Alvarado, 2012).

No caso das culturas estabelecidas no presente trabalho; o método consiste em realizar a tripsinização de uma determinada cultura em processo de amplificação. Após realizar o protocolo de tripsinização, contagem e viabilidade celular, que deve estar acima de 90%, o *pellet* de células formado deve ser colocado em contato com um agente crioprotetor que no caso é uma solução de DMSO (dimetil sulfóxido) à 10% com o restante de SFB à temperatura de 4°C, no qual as ampolas de criopreservação são então transportadas em caixa refrigerada e colocadas no freezer -20° situado na área limpa até serem levadas ao freezer -80°C onde permanecem durante 1 semana, quando depois são acondicionadas nos containers de nitrogênio líquido à -196°C. Exige-se o cuidado em manter a temperatura sempre a partir de 4°C, devido ao fato do DMSO ser tóxico à célula em temperatura ambiente. As figuras abaixo mostram a maneira na qual as

ampolas são acondicionadas e a outra figura um exemplo de container de nitrogênio mostrando sua compartimentação interna.

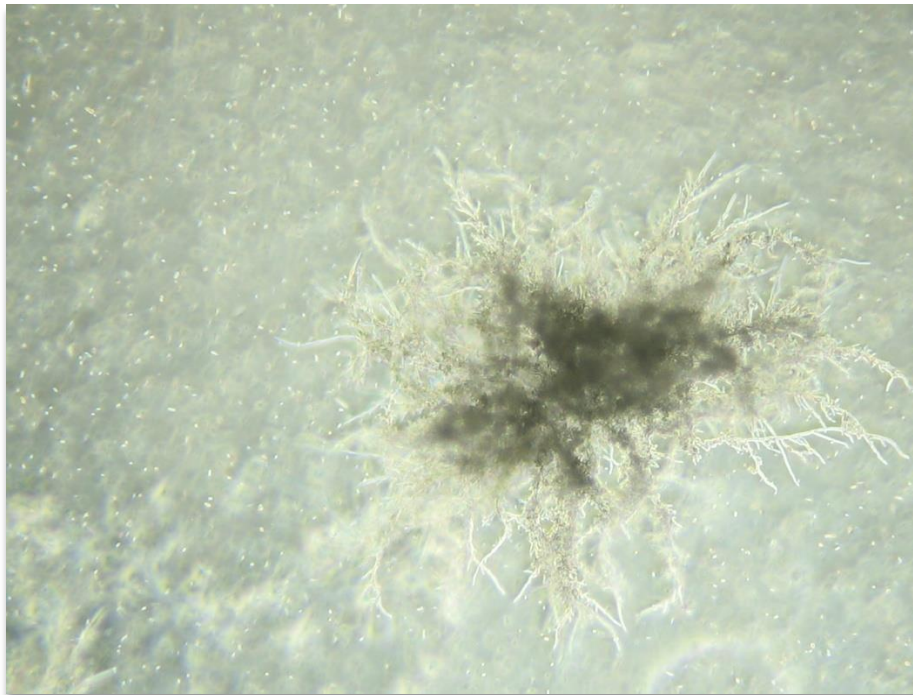


Fonte: SILVA, R.A.M, 2010. Container nitrogênio líquido mostrando compartimentação interna Fonte: Longer:[http://i01.i.aliimg.com/img/pb/021/308/548/548308021\\_040.jpg](http://i01.i.aliimg.com/img/pb/021/308/548/548308021_040.jpg)

**Figura 20:** ampolas de criopreservação acondicionadas em caixas específicas.

#### IV.7- Contaminações

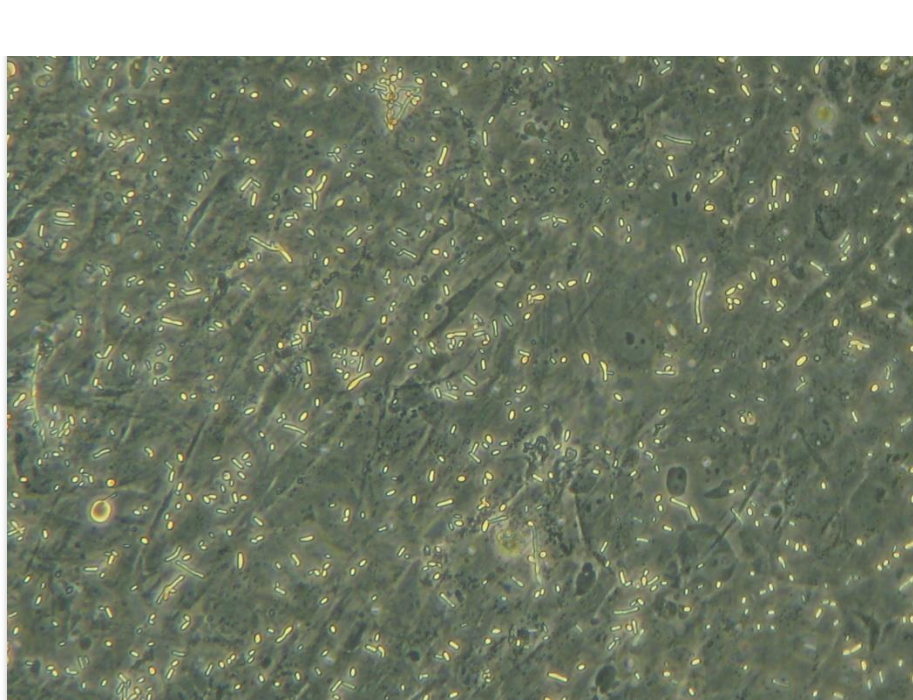
As contaminações são fenômenos que ocorrem durante o processo de cultivo celular devido à vários fatores. As contaminações dentro do período de quarentena, estão frequentemente dentro da normalidade dependendo das condições de retirada dos tecidos e os sítios anatômicos nos quais essas células são oriundas. A pele, por exemplo é um tecido de difícil descontaminação devido a flora residente. No entanto, as maiores causas de contaminações em culturas já estabelecidas e fora do período de quarentena são erros de manipulação relacionados à má limpeza das mãos e objetos que entram em contato com as culturas, condições desfavoráveis de esterilidade de bancadas, equipamentos, objetos, ar dentro das salas de cultura, estufas e fluxos laminares e contaminações de meios de cultura e soro fetal bovino, no qual este último deve ser de procedência confiável afim de se evitar a contaminação por micoplasma. As empresas responsáveis pela fabricação dos soros fetais devem providenciar certificados de qualidade. A cultura celular como um todo envolve um complexo ritual de comportamentos e etapas à serem seguidas pelo manipulador durante seu treinamento para que se previna o risco de contaminações.



Fonte: arquivo pessoal, 2014

**Figura 21:** cultura tecido adiposo P5 passagem 0. Possível contaminação fúngica.

Detalhe: hifas filamentosas



Fonte: arquivo pessoal, 2014

**Figura 22:** cultura tecido adiposo P5 passagem 0. Possível contaminação bacteriana. Detalhe: possíveis bacilos

#### IV.8- Scaffolds

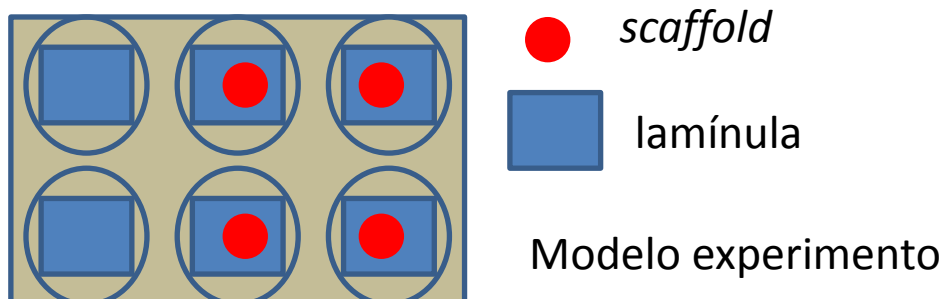
Os *scaffolds* desenvolvidos durante o presente trabalho foram:

1. Cola de fibrina
2. Gel de plaquetas
3. Quitosana dopada com hormônios plaquetários

Os dois primeiros *scaffolds* foram desenvolvidos à partir dos curativos bioativos previamente descritos (páginas X e Y). Já a quitosana é um biomaterial recentemente incorporado ao *hall* das linhas de pesquisa do nosso laboratório. Trabalhos recentes como "Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas (Alvarado,2012)" e "Modelo Experimental de Ampliação vesical em coelhos utilizando técnicas de Engenharia de tecidos em *scaffold* de quitosana (Silva, 2012) " foram os alicerces para a continuação dos trabalhos utilizando a quitosana como *scaffold* sendo que a partir do presente trabalho é a primeira vez que se verifica sua interação com células humanas. Abaixo apresenta-se o esquema geral de produção dos *scaffolds* bem como a organização dos experimentos:

**Tabela 4:** Organização dos experimentos

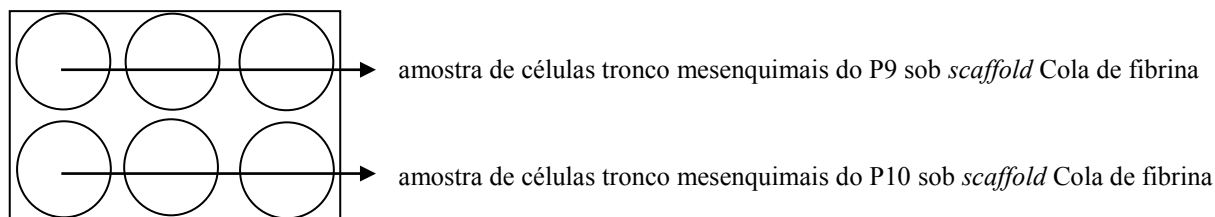
Scaffold/Tipo celular	CTM-TA	Fibroblastos	Queratinócitos
Cola de Fibrina	Exp1	Exp2	Exp3
Gel de Plaquetas	Exp4	Exp5	Exp6
Quitosana	Exp7	Exp8	Exp9



**Figura 23:** Esquema geral de produção dos *scaffolds*

Cada placa de 6 poços representa 1 experimento com amostras de 2 pacientes todos realizados sempre em triplicata.

Ex: Experimento.1 Paciente 9 e Paciente 10



**Figura 24:** Exemplo de um experimento com amostras de 2 pacientes em triplicata

O experimento consiste por sua vez em obter o *scaffold* e plaquear células sob essa estrutura, durante uma semana. A troca de meio ocorreu a cada 48h e esse meio de cultura "usado" foi armazenado e congelado em alíquotas em tubos 15ml para posterior dosagem de citocinas pelo kit CBA. A cada troca de meio as células foram analisadas em microscópio invertido observando nos três aumentos, a taxa de aderência, crescimento dentro e fora do *scaffold* e morfologia celular.

O *scaffold* cola de fibrina é produzido a partir de bolsas de plasma fresco congelado, nas quais foram submetidas à realização de pool com controle de isogrupo, trombina humana purificada e gluconato de cálcio. Volumes micrométricos são combinados em proporções as mesmas para a obtenção dos curativos bioativos uma vez que todo processo ocorre em condições de esterilidade. Por final, após o processo de gelificação do *scaffold*, que leva em média 1-2h em fluxo laminar, células na quantidade de  $1 \times 10^5$  céls/ml são plaqueadas nesses arcabouços recém formados sempre embebidas em meio de cultura específico evitando assim o ressecamento e sofrimento celular. Logo após esse processo os "experimentos" são colocados em estufa e assim inicia-se o período de 1 semana de "follow up".

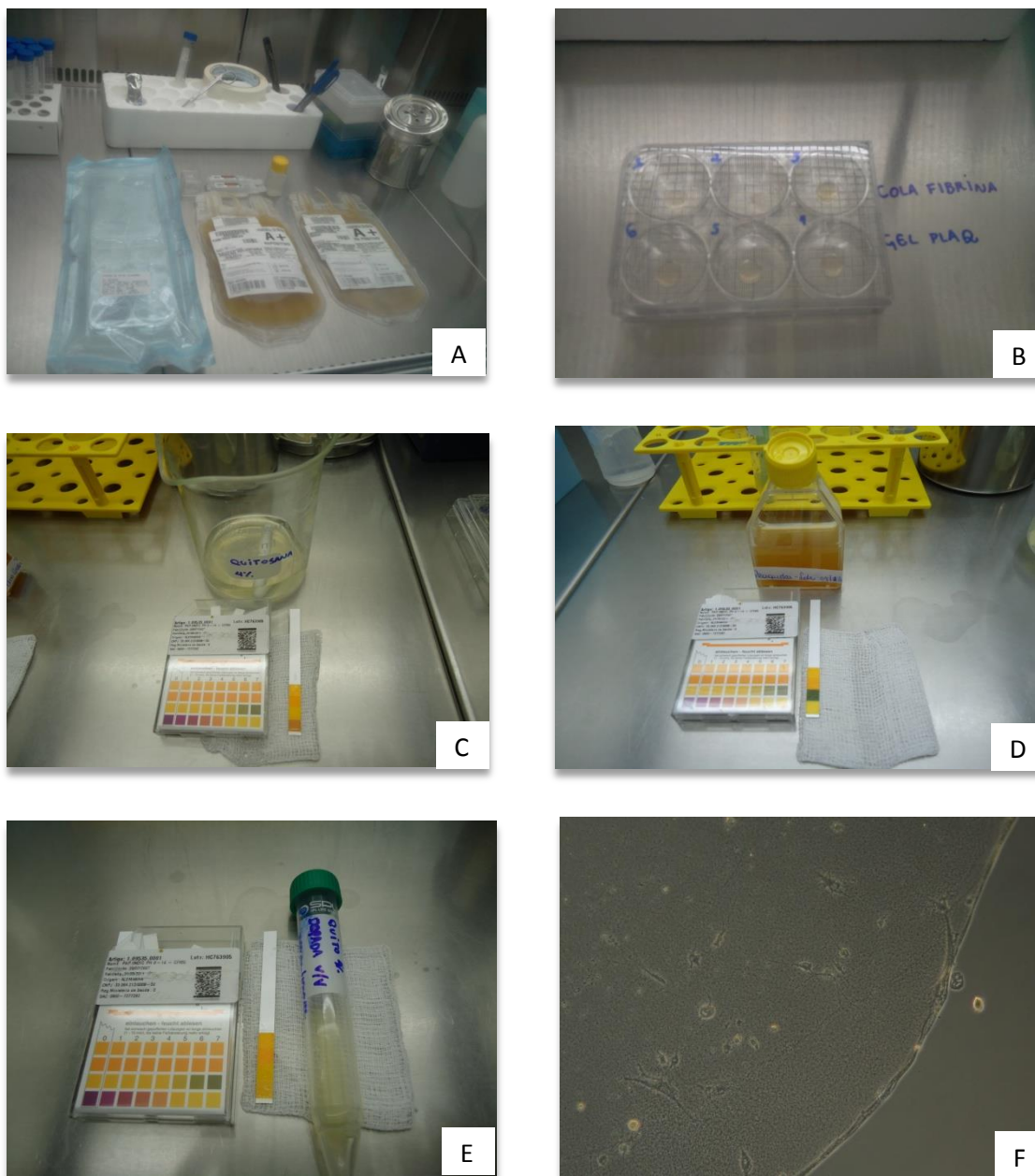
O *scaffold* gel de plaquetas é produzido a partir de *pools* de bolsas de concentrado de plaquetas frescos e os mesmos componentes da cola de fibrina (gluconato de cálcio e trombina humana purificada). O mesmo processo foi realizado para a confecção deste *scaffold*; no entanto, para obtenção dos fatores de crescimento plaquetários (PDGF, VEGF), um protocolo padrão de extração foi realizado. O protocolo consiste em submeter o CP (concentrado de plaquetas) à seguidas centrifugações, nas quais separam o plasma (sobrenadante) do *pellet* formado (plaquetas); assim, após esse processo, o sobrenadante contém os fatores de crescimento plaquetários que foram liberados das plaquetas.

O *scaffold* quitosana apresenta um protocolo de preparo mais longo e complexo. Determinada quantidade de quitosana purificada (Sigma®) obtida da carapaça de crustáceos em pó foi adicionada à um becker contendo água destilada e

ácido acético (Synth®) pH 4,0. Essa mistura foi homogeneizada e permaneceu sob agitação constante durante 24h. Após esse período o gel formado foi levado até o fluxo laminar e filtrado com filtro Millipore® 0,22 $\mu$  afim de se evitar contaminações e possíveis cristais de quitosana não diluída. Após isto, ainda permaneceu mais 24h à temperatura de 4°C para estabilização da solução. Os *scaffolds* foram confeccionados adicionando-se 15 $\mu$ l dessa solução à lamínula e deixados em fluxo laminar por mais 24h para completa secagem. Após tal período, as membranas foram lavadas com solução de NaOH 50M afim de neutralizar o pH. Após isto foi lavado também com água de injeção e o pH foi medido. O *scaffold* nessa etapa apresentou-se com pH 7,0 . Para a obtenção de membranas porosas, permite-se a parcial evaporação do solvente(ácido acético) a 60°C por 60 min em estufa e para as membranas densas, evapora-se totalmente o solvente por 180 min. Mais algumas horas foram necessárias para que houvesse a secagem completa do arcabouço e assim pronto para receber as células que foram plaqueadas da mesma maneira como nos outros *scaffolds*. Para a realização da dopagem; o concentrado de plaquetas (10%) foi preparado da mesma maneira para o *scaffold* "gel de plaquetas" e inserido na solução de quitosana no momento em que ainda estava em estado aquoso. Abaixo encontram-se figuras relativas à todo o preparo dos três tipos de *scaffolds*.



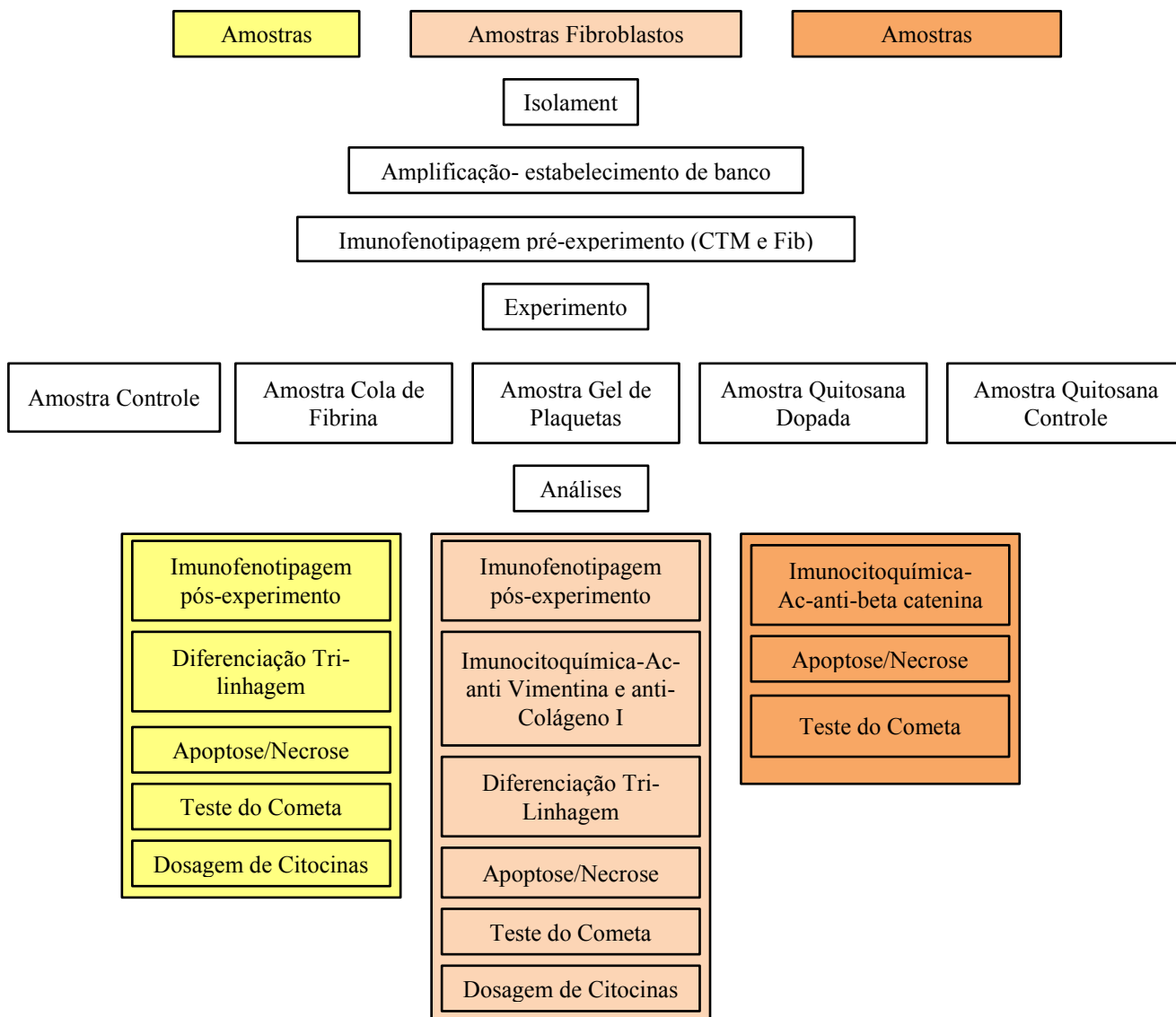
**Figura 25:** componentes para o preparo do gel de quitosana 4% ácido acético.



**Figura 26:** Em A, insumos utilizados para o preparo dos *scaffolds* gel de plaquetas e cola de fibrina. Em B, esquema geral do preparo dos experimentos. Em C, solução de quitosana pronta para preparo do *scaffold* e/ou dopagem com a medição de pH realizada. Em D, pool de plaquetas antes da centrifugação para ser incorporado ao gel de quitosana. Medição de pH realizada. Em E, gel de quitosana incorporado ao pool de concentrado de plaquetas. Em F, vista ao microscópio invertido (aumento 10X) experimento *scaffold* cola de fibrina com células aderidas.

#### IV.9- Análises

As análises relativas à todos os experimentos foram organizadas da seguinte maneira para cada tipo celular:



**Figura 27:** Fluxograma esquema análises

#### **IV.9.1- Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica a laser que analisa partículas suspensas em meio líquido sob fluxo contínuo, sendo um sistema multiparamétrico de análise. A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica capaz de acessar e analisar populações heterogêneas de células com o propósito de identificar a presença e proporções de várias populações de interesse. Anticorpos marcados com fluorocromos são utilizados para identificar células por detectarem antígenos específicos expressos por essas células nos quais são chamados marcadores. Esses marcadores são proteínas de membrana envolvidas em comunicação celular, adesão ou metabolismo. Alguns marcadores celulares imunológicos são marcadores de superfície sendo comumente utilizados para detecção em citometria de fluxo para populações imunologicamente específicas e subpopulações (Abcam, 2013).

Como pré-requisito básico, as CTM-TA devem expressar os seguintes antígenos ou marcadores de superfície: CD, 73, 90 e 105, expressam também altos níveis de CD 13, 29, 44 e 106. Stro-1. No entanto, não devem expressar antígenos hematopoiéticos como CD 34, 45 e HLA-DR um perfil também encontrado em CTM (Yarak, 2010).

Como já citado no ítem I.12.2 pág x os marcadores parcialmente específicos que caracterizam os fibroblastos são: CD13 CD33, CD34, CD44, CD45 e CD49.

Sendo assim, para melhor entendimento apresenta-se abaixo uma tabela discriminando os tipos celulares e marcações positivas e negativas prováveis para cada população em questão.

**Tabela 5** - Marcadores de superfície para CTM-TA e Fibroblastos

Marcadores	CTM-TA	FIBROBLASTO
CD 13	+	+
CD 29	+	?
CD 31	-	-
CD 33		+
CD 34	-	+
CD 44	+	+
CD 45	-	+
CD 49		+
CD73	+	+
CD 90	+	+
CD 105	+	?
CD 106.	+	?
STRO-1	+	?
HLA-DR	-	?

De todos esses marcadores, os que estão em vermelho foram os utilizados no presente trabalho. A cor rosa refere-se à positividade ou negatividade simultânea e a azul diferença entre os 2 tipos celulares.

Preparo das Amostras: as células foram cultivadas durante diferentes passagens até obter-se quantidade necessária à todas as análises. Para uma análise de imunofenotipagem são necessários  $1.10^6$  células por ml de cada amostra a ser passada no citômetro. Todos os anticorpos utilizados foram da marca Biolegend® com afinidade para antígenos humanos. O preparo das amostras consistiu em tripsinizá-las realizando todos os passos desse protocolo seguido de contagem e viabilidade celular. Se o total de células contadas fossem maiores do que  $1.10^6$  células por ml, o *pellet* formado era então

submetido à fixação com paraformaldeído BD®, diluído para o total de testes e assim marcado com os anticorpos em questão, verificando se o fluorocromo utilizado era FITC(isotiocianato de fluoresceína) ou PE(ficoeritrina) deixando que a reação antígeno-anticorpo ocorresse durante 15 minutos no escuro.

#### IV.9.2- Imunocitoquímica

Técnica de coloração mediante reação antígeno-anticorpo utilizada para analisar expressão proteica em cultura celular. Amplamente usada em pesquisa básica e clínica, em linhagens celulares estabelecidas ou culturas primárias. Pode-se também utilizar conjugados fluorescentes(ICC-IF) durante o procedimento (Abcam, 2012). Os experimentos permaneceram durante 1 semana em estufa, com trocas de meio sendo realizadas à cada 48h e esse sobrenadante de cultura armazenado e congelado para dosagem de citocinas. Após tal período as placas de cultura foram levadas até o Laboratório de Matriz extracelular situado no Departamento de morfologia do Instituto de Biociências. Os experimentos foram submetidos ao protocolo de imunocitoquímica. Como foi realizado cultura de células, o protocolo de imunocitoquímica foi iniciado a partir do processo de recuperação e bloqueio já que não trabalhou-se com tecido propriamente dito, por isso não houve a etapa de parafinização, desparafinização e hidratação. Assim, células cultivadas sobre lamínulas foram fixadas com solução a 4% de formol tamponado ou metanol, após a fixação foram mergulhados em solução contendo 3% de peróxido de hidrogênio diluído em metanol para o bloqueio das peroxidases endógenas. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e embebidos em solução contendo 3% de albumina de soro bovino para o bloqueio das interações proteína-proteína inespecíficas. Posteriormente, os cortes foram incubados “*overnight*” com anticorpo primário contra Vimentina (abcam, ab92547) e contra colágeno I (Abcam, ab292). Em seguida, os cortes foram lavados em PBS e incubados com anticorpo secundário anti-Rabbit (Abcam, ab6741) marcado com peroxidase. A marcação foi revelada pela diaminobenzidina (DAB) e as lamínulas foram contra-coradas pela hematoxilina. Os resultados foram analisados ao microscópio e fotodocumentados.



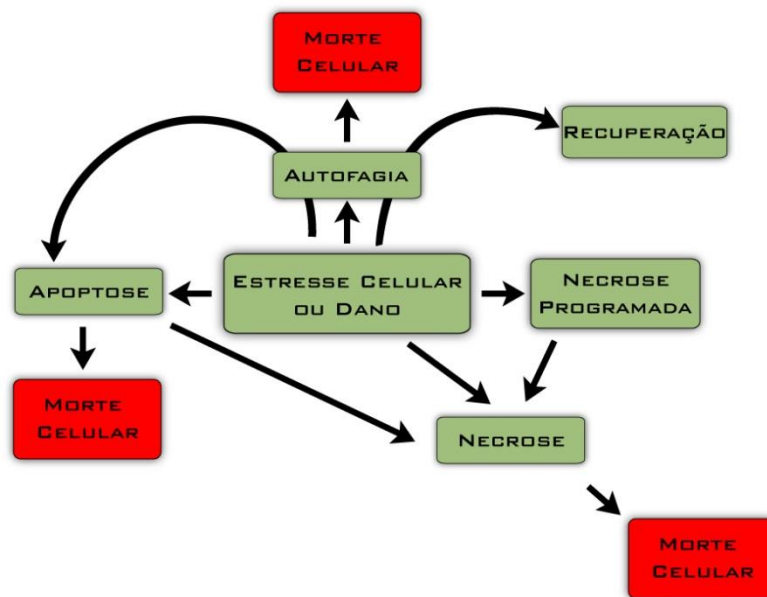
**Figura 28:** esquema etapas da técnica de imunocitoquímica. Fonte: Abcam, 2013.

Os anticorpos utilizados foram: O anti-colágeno I sendo o colágeno I um membro do grupo I de colágenos (colágeno fibrilar). Formador das fibras dos tendões ligamentos e ossos, localiza-se e é secretado na matriz extra celular.

A anti-vimentina sendo a vimentina pertencente à classe III de filamentos intermediários encontradas em várias células não epiteliais especialmente as células mesenquimais. A vimentina é atraída pelo núcleo do retículo endoplasmático e mitocôndria, lateralmente ou terminalmente. Altamente expressa em fibroblastos, alguma expressão em linfócitos B e T e baixa ou nenhuma expressão em células de linfoma de Burkitt, alguns carcinomas mamários, hormônio dependente. Localiza-se no citoplasma (Abcam).

#### **IV.9.3- Apoptose/Necrose**

O fenômeno da morte celular pode ser desencadeado por uma série de fatores ou injúrias tais como: danos de DNA, hipóxia tissular, agressão imunológica, infecciosa e tóxica, entre outros. A morte celular pode ser dividida em duas categorias: a programada, denominada fisiopatológica e a patológica (ou necrótica). A primeira é o tipo de morte onde a célula possui todo o aparato genético para a produção e/ou ativação e/ou inativação de proteínas específicas que geram uma sequência de eventos ininterruptos os quais levam a sua própria destruição. Essa pode ocorrer tanto em processos patológicos quanto em processos fisiológicos normais, sendo que pode ser dividida em 3 grandes grupos ou vias: morte autofágica, apoptose (dependente ou não de caspases) e outros mecanismos. A morte celular fisiopatológica do tipo autofágica (também definida como lisossomal ou “tipo II”) é sempre independente da via das caspases e caracterizada pela presença de lisossomos primários (os quais realizam a digestão de organelas e partículas intracelulares), autofagossomos e vacúolos autofágicos, nem sempre levando a morte celular (Lockshin & Zakeri, Guimarães & Lindem, 2004. Baehrecke, 2002. Vaux & Korsmeyer, 1999). O esquema abaixo representa os tipos e vias de morte celular:



**Figura 29:** Formas de degeneração celular. Adaptado de Guilherme, G. R. B.; 2009 in SILVA, R.A.M.

2011

A apoptose é um tipo de morte celular programada que possui mudanças morfológicas típicas, tais como: fragmentação nuclear, condensação da cromatina, exposição da fosfatidilserina pela membrana, perda de controle iônico, encolhimento do citoplasma, perda das organelas tornando a célula picnótica e formação de corpos apoptóticos. A ativação da via das caspases (proteínas efetoras) é observada na forma clássica, podendo a apoptose ser independente ou dependente dessas vias. Ainda sim, a apoptose dependente da via das caspases pode estar relacionada a meios extrínsecos (receptor se superfície celular) ou intrínsecos, relacionados aos mecanismos respiratórios mitocondriais (despolarização da mitocôndria) ou a mecanismos ligados ao retículo endoplasmático, não gerando resposta inflamatória (Lockshin & Zakeri, Guimarães & Lindem, 2004. Baehrecke, 2002. Vaux & Korsmeyer, 1999).

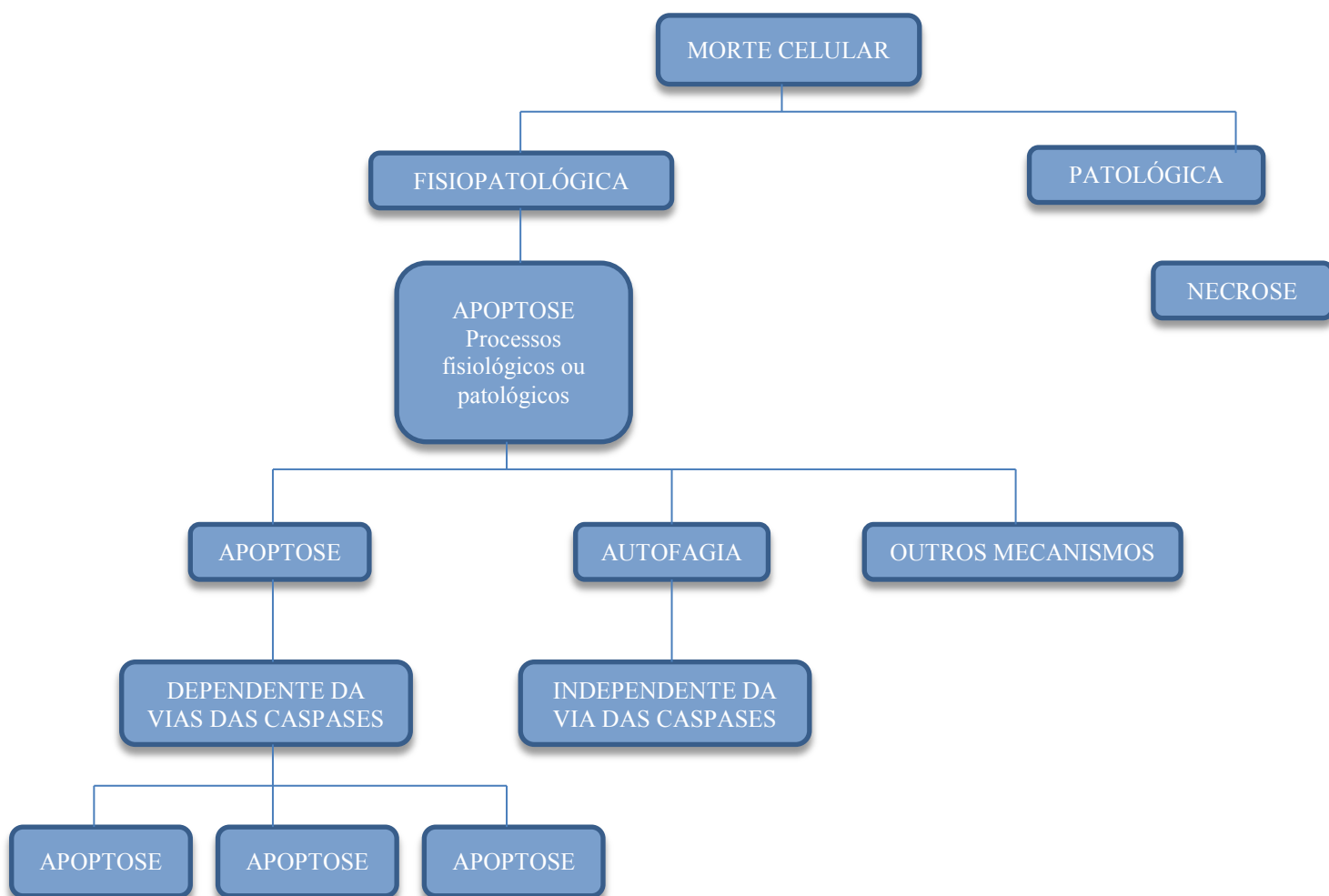
A segunda forma de morte celular, a patológica, é aquela que determina a necrose. Esta pode ser secundária à injúria celular que pode ser determinada pelos fatores citados anteriormente. Tais modificações apresentam-se como parte de um programa de morte com regulação intracelular, que pode ser inibido ou ativado dependendo de estímulos, sejam esses fisiológicos ou patológicos (Lockshin & Zakeri, 2004).

A morte celular fisiológica, ou seja, ocorrida por autofagia das células, determinada por alterações citoplasmáticas, posterior condensação da cromatina e diminuição do volume celular seguido da formação dos autofagossomos, (Guimarães & Lindem, 2004. Baehrecke, 2002). pode ser medida tecnicamente de duas formas:

A primeira seria a realização de testes de viabilidade e determinação da exposição das fosfatidilserinas (proteínas intrínsecas da parede interna da membrana as

quais são externalizadas quando as células apresentam-se em apoptose independente da via das Caspases) (Guimarães & Lindem, 2004. Baehrecke, 2002).

A segunda seria aquela em que são realizados testes mais complexos, os quais devem evidenciar o comprometimento dos receptores de morte, do retículo endoplasmático e da via respiratória mitocondrial, no caso da apoptose dependente da via das Caspases. Tal via de apoptose pode ser identificada por testes de citometria de fluxo medindo-se a Caspase-3, que é uma protease chave ativada durante o estágio inicial da apoptose (Guimarães & Lindem, 2004. Baehrecke, 2002). O esquema abaixo mostra mais especificamente as vias de morte celular:



**Figura 30:** esquema ilustrativo vias de morte celular. Adaptado de Bertanha, 2011.

As amostras P7 e P14 foram submetidas ao protocolo de marcação com o Kit Anexina V apoptosis kit BD® no qual possui anexina V e PI (iodeto de propídeo), verificando assim tanto apoptose com o processo de necrose. O protocolo baseia-se na mesma quantidade mínima de células para análise no citômetro ( $1.10^6$  céls/ml), diluições e marcação semelhantes assim como para a imunofenotipagem, sendo que a anexina V é marcada com o fluorocromo FITC e o PI com ficoeritrina (PE).

#### IV.9.4- Diferenciação Tri-linhagem

O processo de diferenciação tri-linhagem é realizado através do kit Stem Pro-Gibco® desenvolvido para induzir a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica de células tronco mesenquimais em culturas de células ou tecidos *in vitro*. Três meios de cultura específicos são administrados a cada 48h nas culturas durante 14 ou 21 dias. Após esse período as culturas são fixadas e procede-se às colorações específicas. Para tal, utiliza-se o corante Oil red® para coloração da cultura que foi submetida ao protocolo adipogênico, pois tal corante possui afinidade com gotículas de lipídeo que por ventura serão produzidas caso a cultura se diferencie em adipócitos. Para a cultura osteogênica, o corante Alizarin Red® é utilizado, pois cora fragmentos de cálcio que por ventura serão produzidos durante a diferenciação em osteócitos. Já o corante Alcian Blue® cora deposições de colágeno nas culturas induzidas à condrogenicidade. As amostras, P5, P9 e P14 foram submetidas ao processo de diferenciação.

#### IV.9.5- Dosagem de Citocinas

Citocinas são pequenas proteínas sinalizadoras que possuem pesos moleculares que variam entre 8 à 40,000 Daltons. Quase todas as células nucleadas são capazes de sintetizar essas proteínas e por sua vez, responderem à elas. Suas propriedades biológicas nos permitem agrupá-las em diferentes classes. Citocinas controlam a regulação de respostas à infecções, respostas imunes, inflamação e trauma. (perguntar Dra. de onde é essa referencia).

A dosagem de citocinas foi realizada através do Kit BD® CBA *Human Inflammatory Cytokines*. Tal kit mede quantitativamente níveis de interleucina (IL-8), interleucina-1 $\beta$ , interleucina-6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), fator tumorigenicidade/necrose (TNF), e interleucina 12p70 (IL-12p70) em amostras individuais. A dosagem pode ser realizada em amostras de sobrenadante de cultura de tecidos, plasma tratado com EDTA(*Ethylenediaminetetraacetic acid*) e soro.

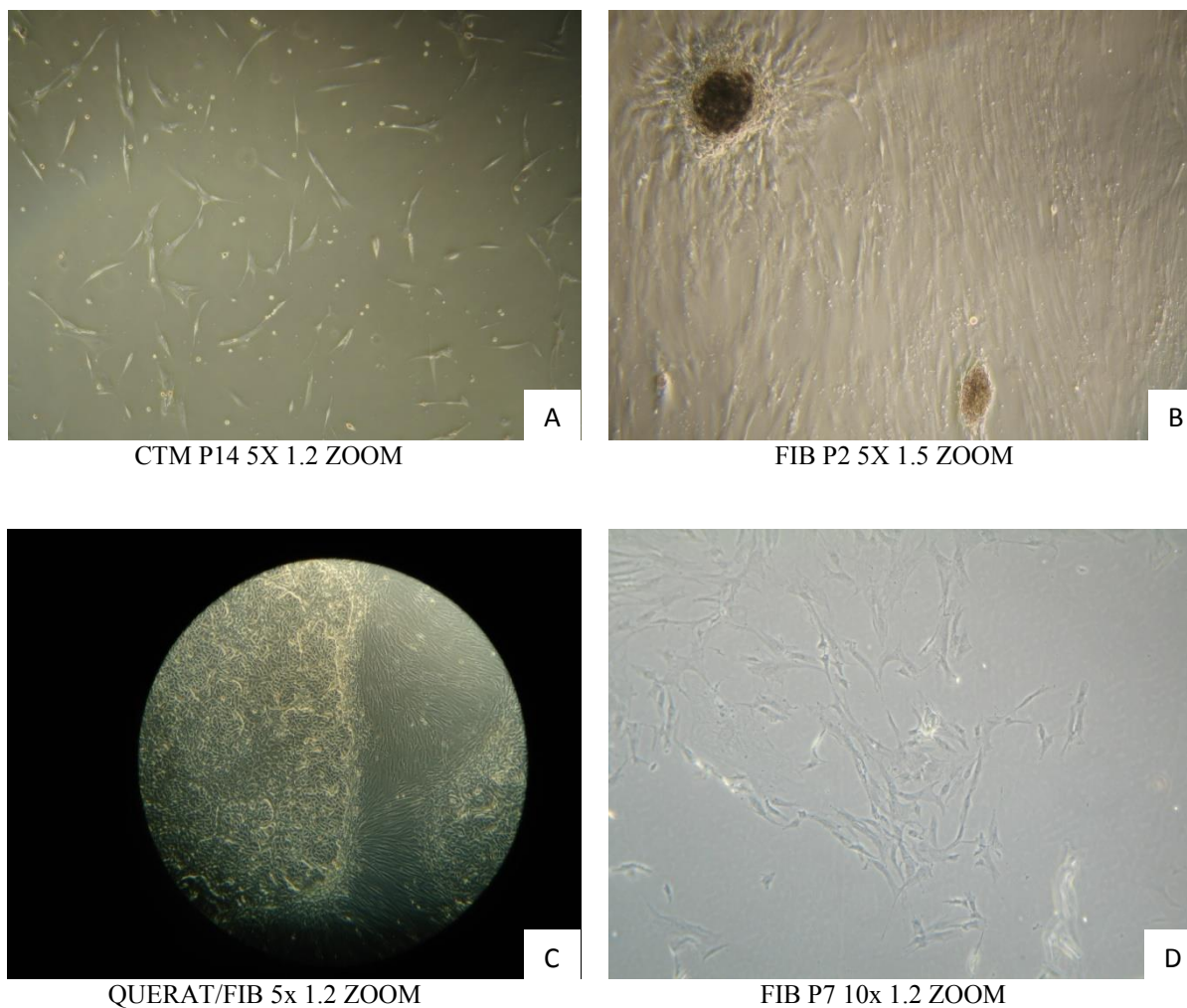
Princípio do teste: é um método de captura de analitos solúveis através de *beads*(carreadores) com tamanho e fluorescências conhecidas, tornando dessa forma passíveis de serem analisados por citometria de fluxo. Cada *bead* de captura específica é conjugada com um anticorpo específico. A detecção da reação é promovida com uma mistura de PE conjugado aos anticorpos, na qual gera um sinal fluorescente de acordo com a proporção à quantidade de analitos que se ligaram durante a reação. As amostras P7 e P14 foram submetidas ao Kit CBA (BD® Biosciences).

## *V. Resultados e Discussão*

### V.1- Cultura celular

As células foram isoladas, dissociadas, amplificadas, submetidas aos experimentos e/ou congeladas para obtenção e estabelecimento de banco celular para realização do presente trabalho e para trabalhos futuros.

Foram obtidas culturas de 14 pacientes durante o desenvolvimento do projeto. A Figura 17 mostra os diferentes graus de confluência das células em cultura provenientes de 3 pacientes distintos: paciente P14, paciente P2 e paciente P7. O objetivo das imagens é mostrar a fase inicial das culturas e o seu padrão morfológico em cada fase.



**Figura 31:** Diferentes graus de confluência de células em cultura. **A:** cultura de células tronco mesenquimais tecido adiposo, P14 em 2ª passagem, início do crescimento. **B:** fibroblastos P2, mostrando a aderência de explantes, colonização e espraiamento. **C:** cultura mista queratinócitos/fibroblastos mostrando a nítida segregação populacional e **D:** fibroblastos dérmicos P7 em cultura inicial mostrando a semelhança morfológica com a cultura de células tronco-mesenquimais derivadas de tecido adiposo. (Microscópio Axiovert Zeiss)

Para a cultura de CTM-TA, dos 14 pacientes que foram retirados fragmentos de tecidos, somente 4 amostras se mantiveram vivas, viáveis, isoladas e diferenciadas até o final de todas as passagens e experimentos. As amostras foram: P9, P10, P11 e P14.

Para a cultura de Fibroblastos, as amostras viáveis foram as obtidas dos pacientes P4, P5, P7 e P14.

Para os queratinócitos, como citado anteriormente no item "2.7 Contaminações", as frequentes contaminações foram o grande empecilho para o isolamento e amplificação da epiderme. Das 14 amostras coletadas, somente 2 conseguiram ser isoladas e amplificadas até 3ª e 4ª passagens e assim, congeladas para composição do banco. Alguns meses depois de congeladas, procedeu-se ao descongelamento para realização de novas culturas. Ambas as amostras não aderiram ao plástico dos frascos, inviabilizando, dessa maneira, a continuidade do trabalho para esse tipo celular.

O delineamento experimental completo está descrito na Tabela 6:

**Tabela 6** - Delineamento experimental do projeto.

<b>Tipo celular</b>	<b>Análises</b>
CTM-TA Banco estabelecido P9 P10 P11 P14	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Imunofenotipagem pré-experimento</li> <li>2. Diferenciação tri-linhagem</li> <li>3. Teste do Cometa</li> <li>4. Teste Apoptose/Necrose</li> <li>5. Dosagem Citocinas Teste CBA</li> <li>6. Imunofenotipagem pós-experimento</li> </ol>
FIBROBLASTOS Banco estabelecido P4 P5 P7 P14	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Imunofenotipagem pré-experimento</li> <li>2. ICC (anti Col I/ anti Vimentina)</li> <li>3. Diferenciação Tri-linhagem*</li> <li>4. Teste do Cometa</li> <li>5. Teste Apoptose/Necrose</li> <li>6. Teste CBA-dosagem citocinas</li> <li>7. Imunofenotipagem pós-experimento</li> </ol>
QUERATINÓCITOS Banco estabelecido P2 P5	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ICC anti-beta catenina</li> <li>2. Teste do Cometa</li> <li>3. Teste Apoptose/Necrose</li> <li>4. Teste CBA- dosagem citocinas</li> </ol>

Os resultados pertinentes à cada análise encontram-se nas páginas subsequentes.

## **V.2- Citometria de fluxo**

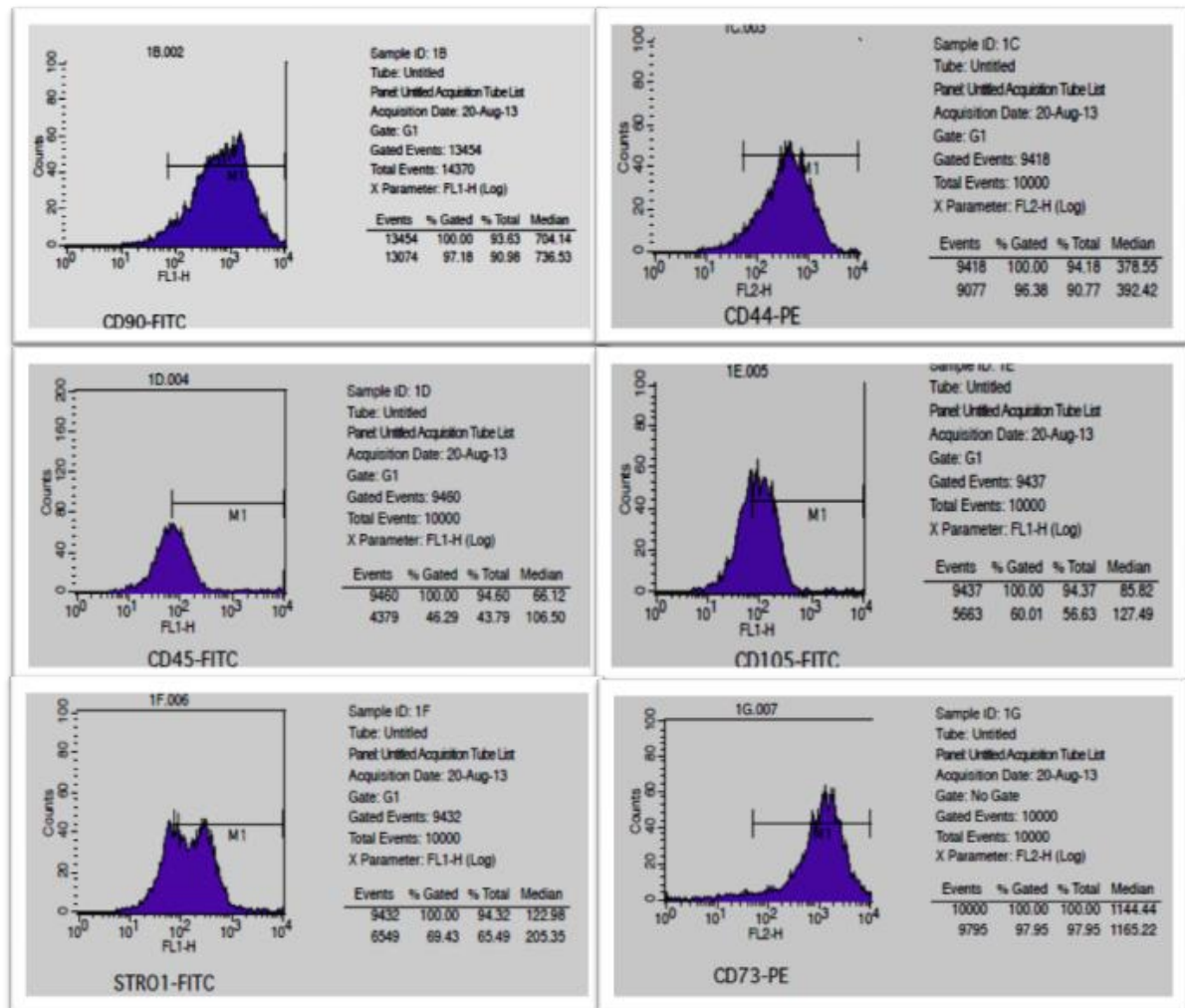
Os resultados destas análises estão apresentados abaixo na forma de histogramas. Na Figura 18 estão demonstradas as análises de CTM-TA referentes ao Paciente 14 onde foram analisados os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73. Observa-se que as células isoladas desta linhagem expressaram todos os marcadores analisados.

Para as células do paciente P10, a expressão fenotípica das mesmas está mostrada na Figura 19. Verifica-se uma fraca expressão de CD45.

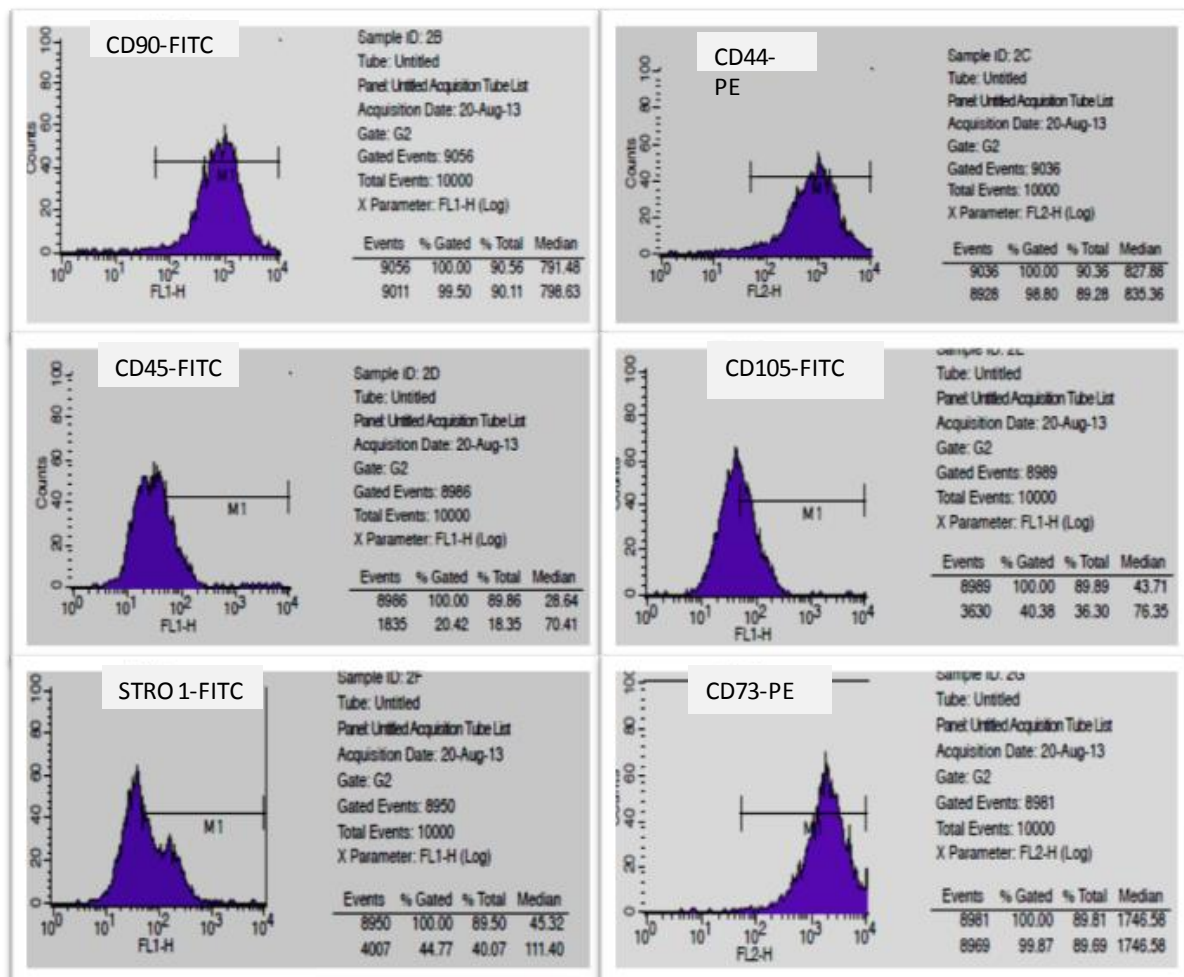
Nas análises dos fibroblastos, a Figura 20 mostra a expressão fenotípica das células provenientes do Paciente P4 onde houve expressão de todos os marcadores analisados. O mesmo ocorreu para o paciente P5. Com o objetivo de verificar o comportamento imunofenotípico dos fibroblastos em relação à possível similaridade de expressão fenotípica com as CTMs, analisamos as células provenientes do paciente P7 para outros marcadores, que foram CD105, Stro-1 e CD73. De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), para se confirmar um fenótipo característico de CTM é necessário que as células expressem os marcadores CD73, CD90 e CD105 e não expressem os marcadores CD 34, 45.

### **V.2.1- Imunofenotipagem pré-*scaffold***

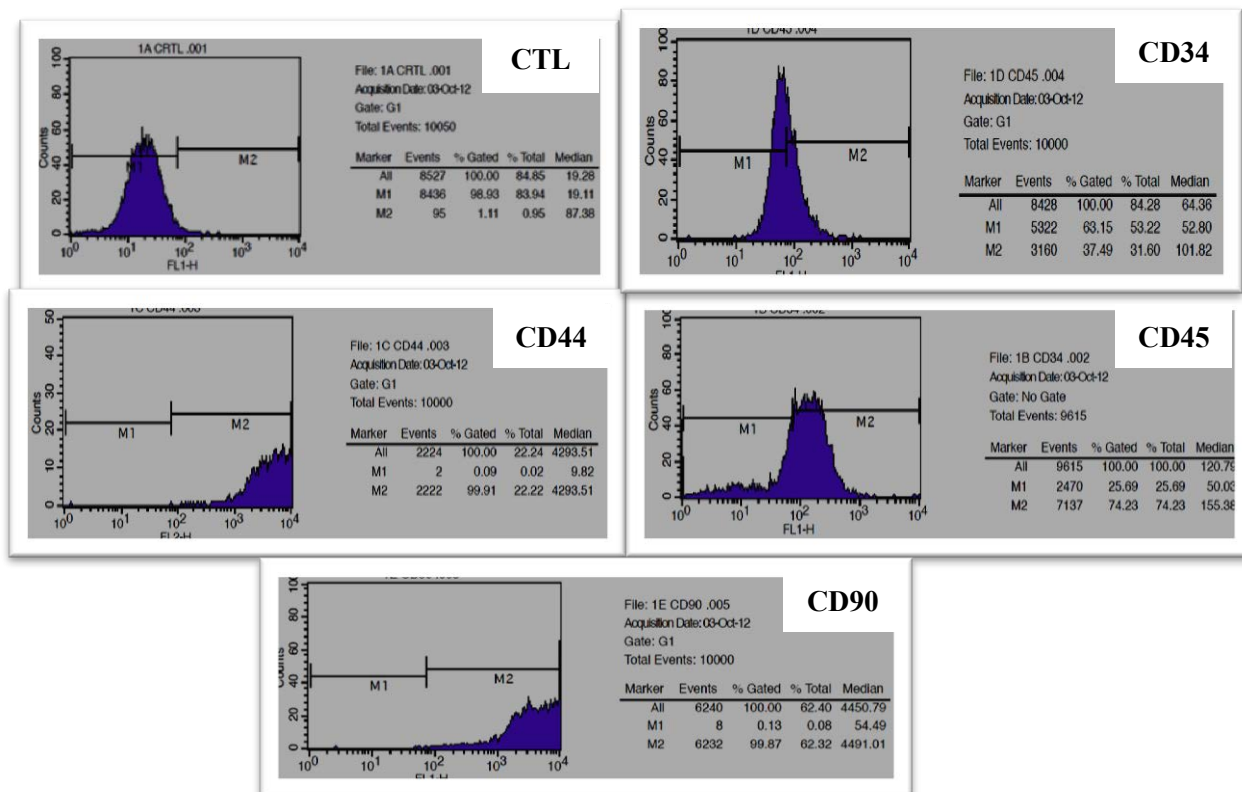
Amostras de 7 pacientes foram submetidas à imunofenotipagem para se constatar ou não a expressão de determinados marcadores, afim de se estabelecer o fenótipo das células em cultura.



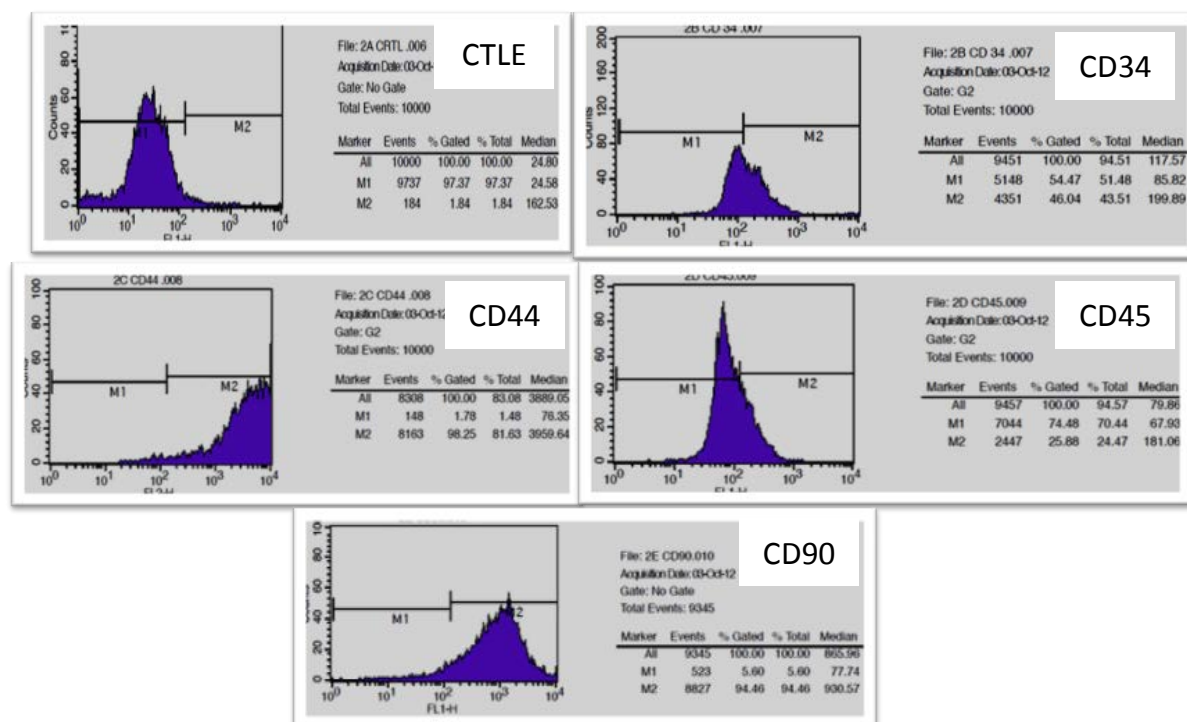
**Figura 32** - Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Tecido adiposo oriundas do paciente P14 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73



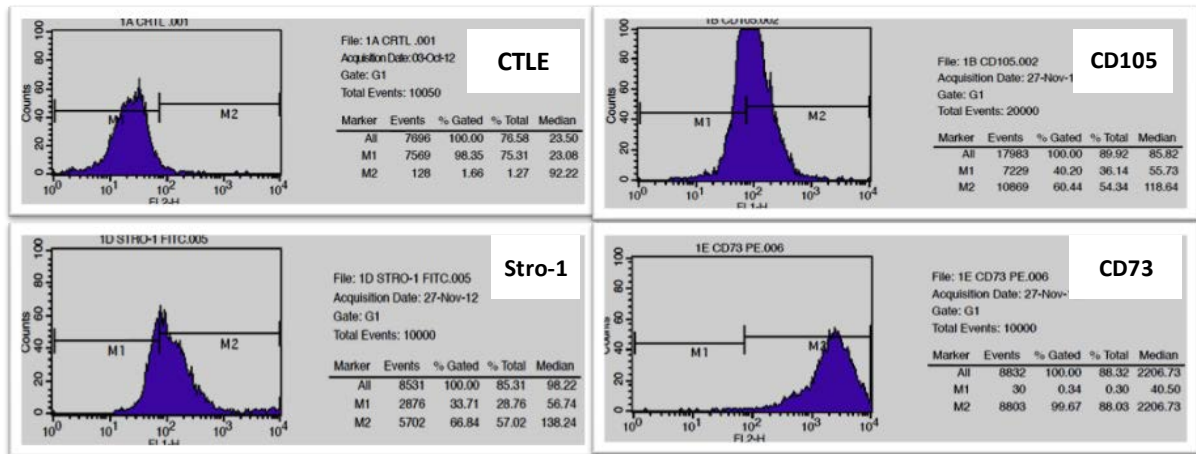
**Figura 33** – Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Tecido adiposo oriundas de pacientes P10 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73.



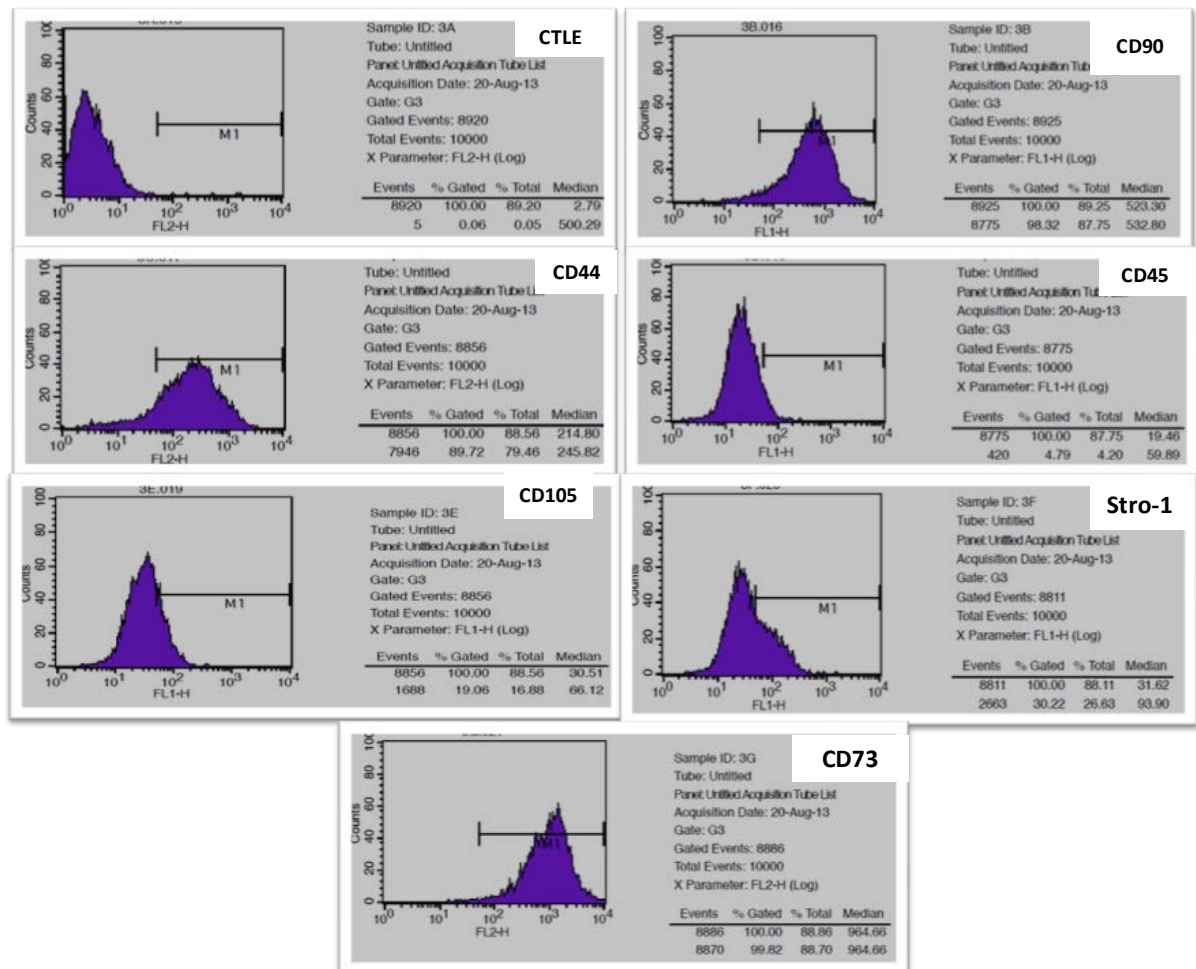
**Figura 34** - Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do paciente P4 utilizando os marcadores CD34, CD44, CD45 e CD90.



**Figura 35** - Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do paciente P5 utilizando os marcadores CD34, CD44, CD45 e CD90.



**Figura 36** - Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P7 utilizando os marcadores CD105, Stro-1 e CD73.



**Figura 37** - Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células obtidas de Derme oriundas do pacientes P14 utilizando os marcadores CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73.

De acordo com o quadro abaixo, verifica-se que ambas as linhagens celulares estão expressando o marcador CD90. Como citado anteriormente, a ISCT preconiza que CMTs devam expressar os CD73, CD90 e CD105, o que foi claramente observado nas análises realizadas. O mesmo ocorreu para a expressão dos marcadores CD34, CD45, CD90 e Stro-1 para a linhagem fibroblástica, que também segundo ISCT, são os marcadores que fibroblastos devem expressar.

Tal achado reforça a hipótese de que, segundo Hematti, 2012, culturas de CTMs e Fibroblastos expandidas *ex vivo* são indistinguíveis pela morfologia, marcadores de superfície, potencial de diferenciação e propriedades imunológicas. Corroborando com estes achados, Lorenz et al, 2008 demonstrou que fibroblastos dérmicos humanos não só expressam todos os marcadores de superfície para CTM e podem diferenciarem-se nas linhagens adipogênica e osteogênica, como são similares à CTM em seu citoesqueleto e composição de matriz.

**Tabela 7** - Resultados em porcentagem de expressão dos marcadores utilizados nas análises de imunofenotipagem pré-*scaffolds* por citometria de fluxo

		Expressão em CTM			Expressão em Fibroblasto			
		CD73	CD90	CD105	CD34	CD45	CD90	Stro-1
	Tecido Utilizado	Resultados CF (%)			Resultados CF (%)			
Paciente P10	Tecido Adiposo	99,87	99,5	40,38				
Paciente P14	Tecido Adiposo	97,95	97,18	60,01				
Paciente P4	Derme				74,34	4,79	98,32	30,22
Paciente P5	Derme				46,04	25,88	94,46	

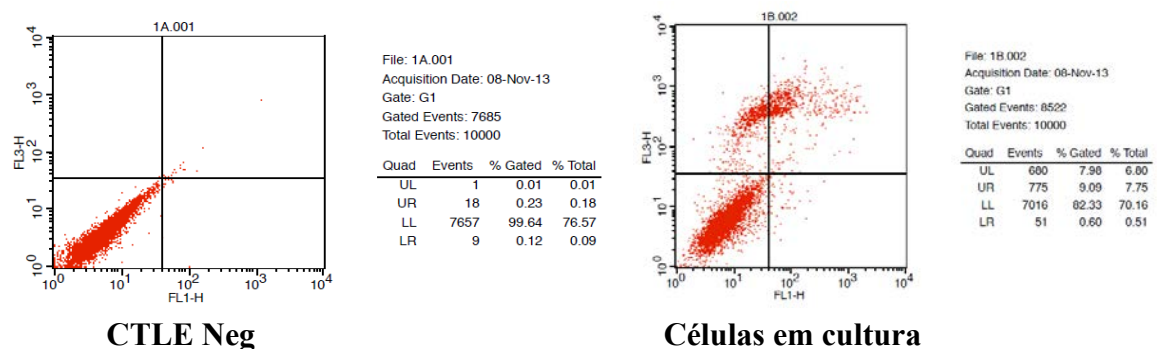
### V.3 - Apoptose/Necrose

#### V.3.1 - Teste de Anexina/Iodeto de Propídeo

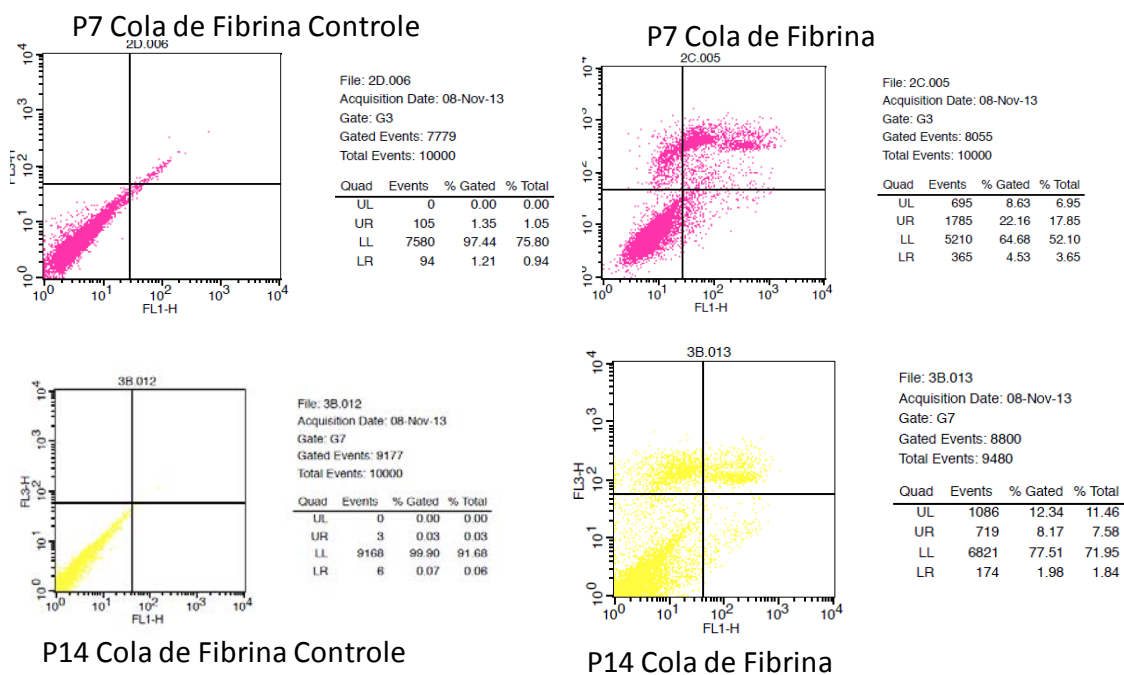
A Figura 38 representa graficamente o comportamento das células provenientes do paciente P14 em cultura. Esta análise tem por objetivo verificar o perfil apoptótico/necrótico antes de serem cultivadas sobre os *scaffolds*. As Figuras abaixo (38 à 42) mostram o comportamento apoptótico das células provenientes dos pacientes P7 e P14 cultivadas sobre os 04 *scaffolds* (gel de plaquetas, cola de fibrina, quitosana pura e quitosana dopada).

Analisando-se o padrão de apoptose das células provenientes do paciente P14 antes de serem colocadas nos 04 *scaffolds* (análise pré-*scaffold* - Figura 38) e análise

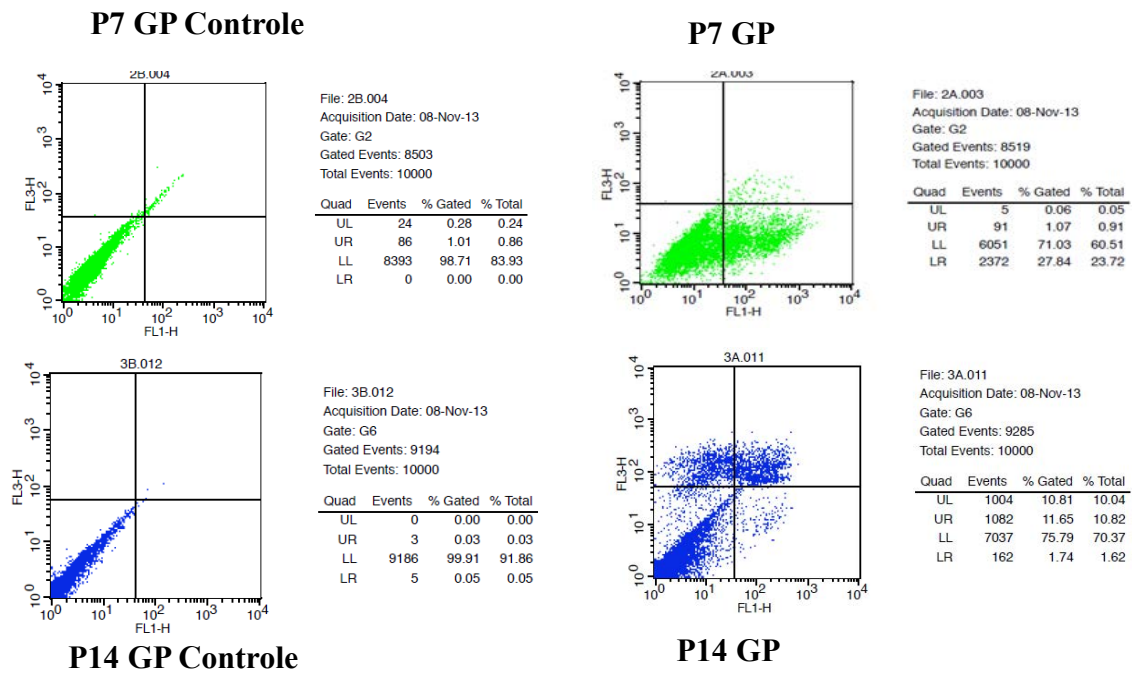
pós-*scaffolds* (Figuras 39 a 42), percebe-se que não há diferença aparente. Analisando as porcentagens obtidas das análises verifica-se que as células em cultura ANTES de serem colocadas nos respectivos *scaffolds* apresentavam padrão apoptótico/necrótico dentro da normalidade (9,09% - Figura 38). Estas mesmas células após serem cultivadas sobre os *scaffolds*, apresentaram as seguintes porcentagens de apoptose/necrose: para Gel de plaquetas ( 11,65% - Figura 39); para cola de fibrina (8,17% - Figura 40) ; para quitosana pura (4,5% - Figura 41) e quitosana dopada (6,13% - Figura 42). Estes resultados evidenciam que nenhum dos *scaffolds* foi responsável por altos índices de morte celular, podendo, portanto, serem utilizados em cultura *ex vivo*. As células do paciente P7 não puderam ser comparadas pois não foi possível realizar a análise das células em relação ao índice apoptótico pré-*scaffold*.



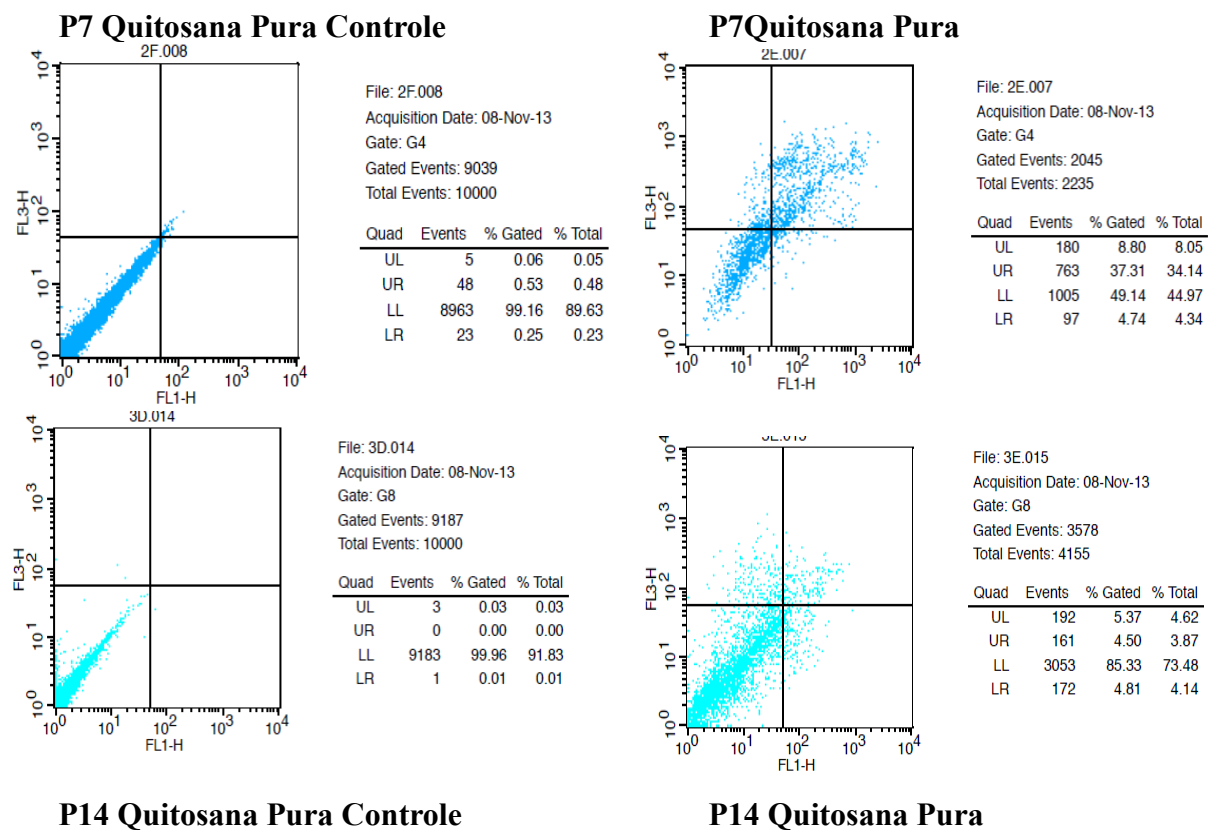
**Figura38** - Análise apoptose/necrose das células pré-*scaffolds*.



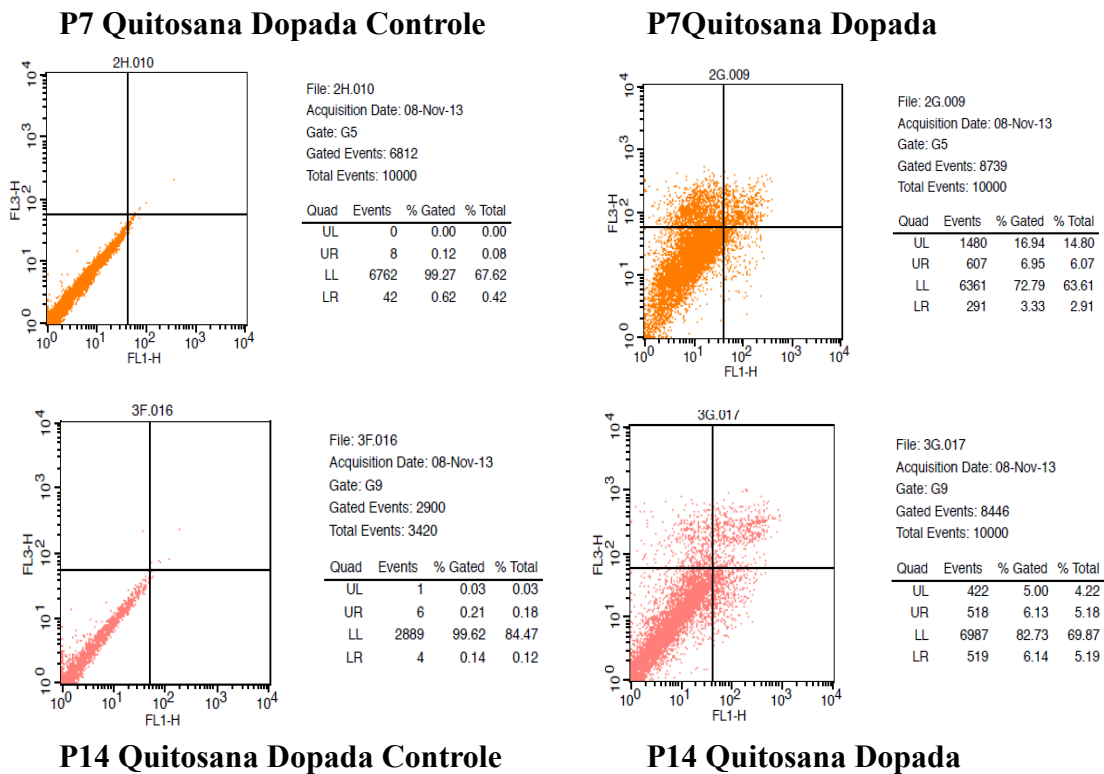
**Figura 39**- Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao *scaffold* gel de plaquetas



**Figura 40** - Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao *scaffold* cola de fibrina



**Figura 41** - Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao *scaffold* quitosana pura

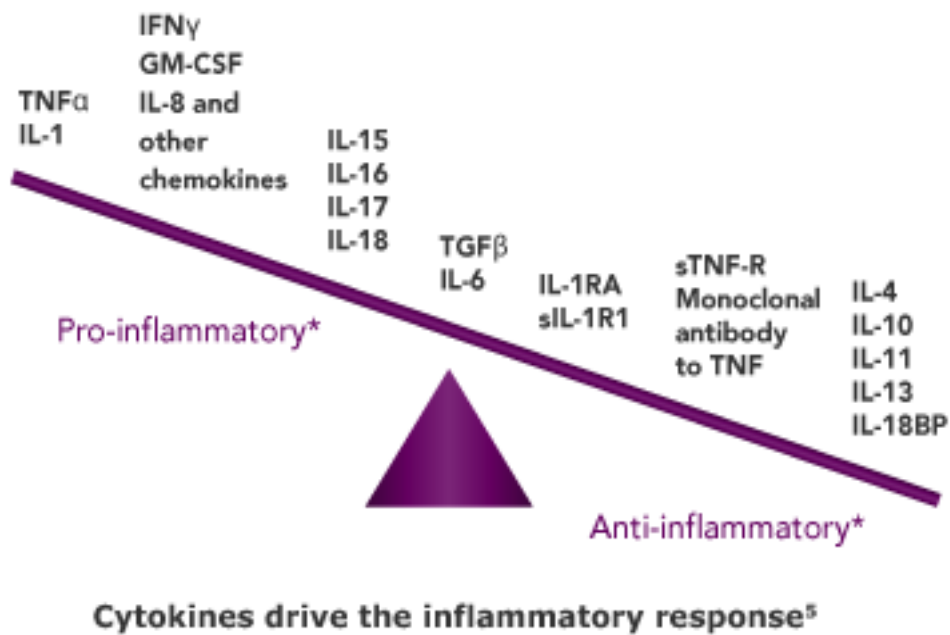


**Figura 42** - Análise apoptose/necrose das células provenientes dos pacientes P7 e P14 submetidas ao *scaffold* quitosana dopada

#### V.4 - Dosagem Citocinas

A análise da dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura, tanto das células em cultura cultivadas em monocamada - *pré-scaffolds* quanto *pós-scaffolds* foram realizadas utilizando o Kit CBA BD® como citado anteriormente e analisadas pelo software FCAP Array Administrator BD®.

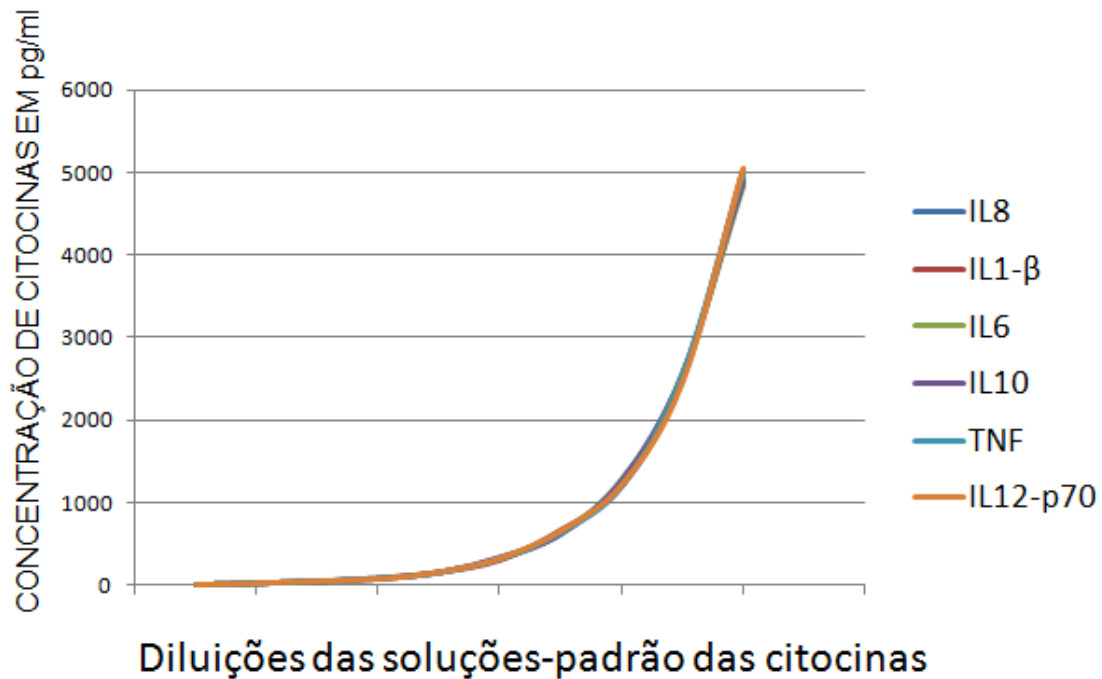
As citocinas analisadas foram: IL-6, IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-12-p70 e TNF. A figura seguinte mostra um esquema ilustrativo no qual coloca as citocinas de acordo com suas propriedades pró e antiinflamatórias, bem como o comportamento ambíguo de algumas citocinas.



Fonte: Wick, G., Backovic, A, Rabenstein, E., et. al. The immunology of fibrosis: innate and adaptive responses. Trends Immunol\_ 2010

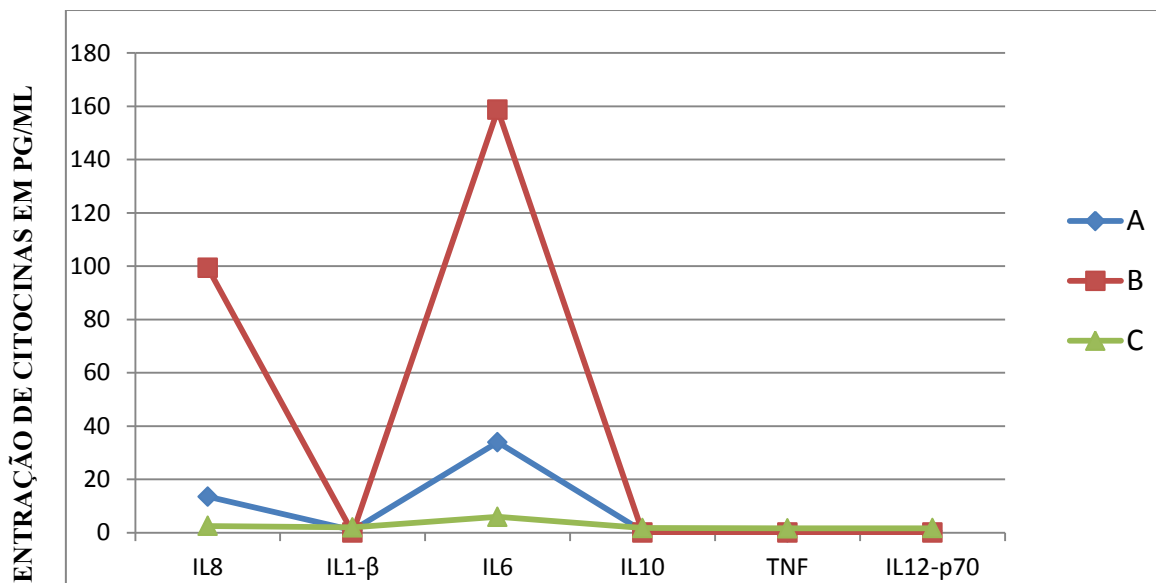
**Figura 43** - Esquema ilustrativo "Gangorra" das principais citocinas humanas

Os Gráficos abaixo representam amostras dos pacientes P4, P5 e P7 com a coleta do sobrenadante de cultura realizada nos momentos 24h, 48h e 72h pós plaqueamento, sobre os diferentes *scaffolds*: gel de plaquetas (GP), cola de fibrina (CF), quitosana *in natura* (QUIT in nat) e quitosana dopada (QUIT dop) com fatores de crescimento plaquetários. O gráfico 1 representa as curvas padrão das citocinas analisadas:

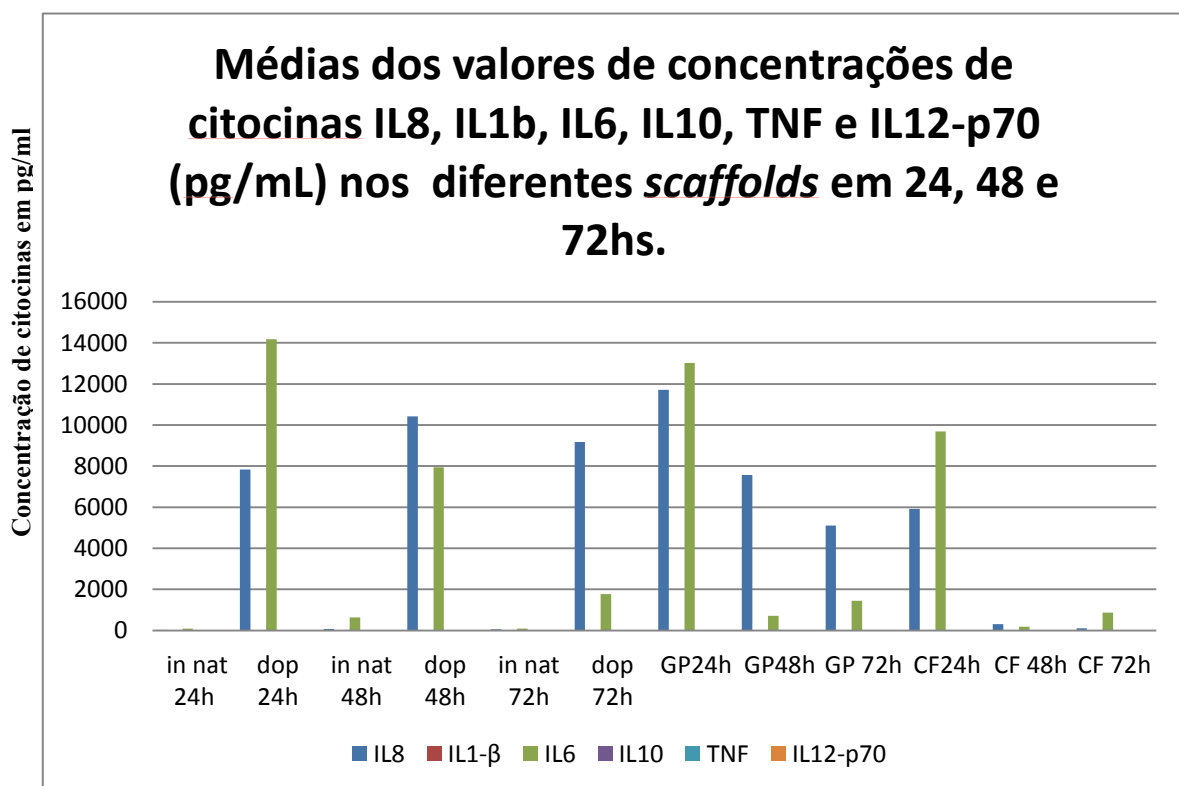


**Gráfico 1** - Curva Padrão das citocinas (Diluições 1:2)

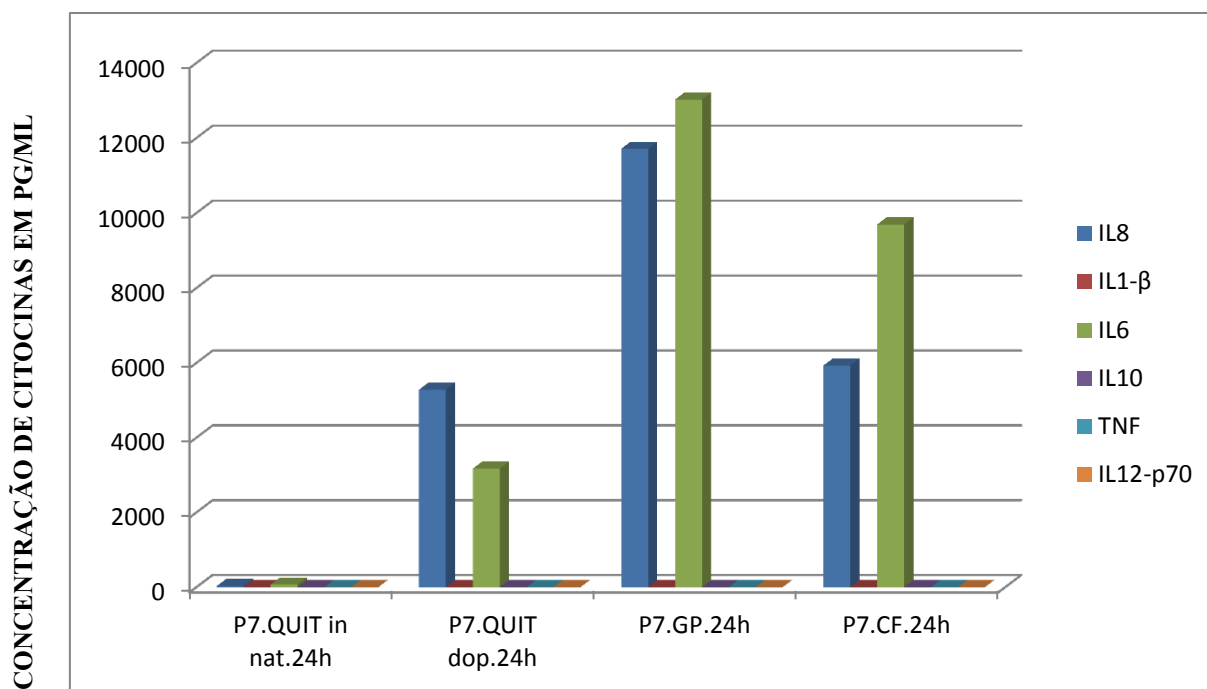
O objetivo do gráfico acima é obter uma curva padrão de concentração-resposta para as citocinas analisadas com concentrações conhecidas



**Gráfico 2** - Quantificação das citocinas IL8, IL1-β, IL6, IL10, TNFα e IL12-P70 em três momentos : 24, 48 e 72h após o plaqueamento dos fibroblastos na membrana de quitosana *in natura*



**Gráfico 3** - Média dos valores de concentração de citocinas IL8, IL1b, IL6, IL10, TNF e IL12-p70, em pg/ml nos diferentes arcabouços em três momentos: 24, 48 e 72h



**Gráfico 4** - Análise do desempenho da produção de citocinas de fibroblastos do Paciente (P7) plaqueadas em: membranas de quitosana *in natura*, quitosana dopada, gel de plaquetas e cola de fibrina no momento 24 horas pós plaqueamento

### V.5- Diferenciação Tri-linhagem

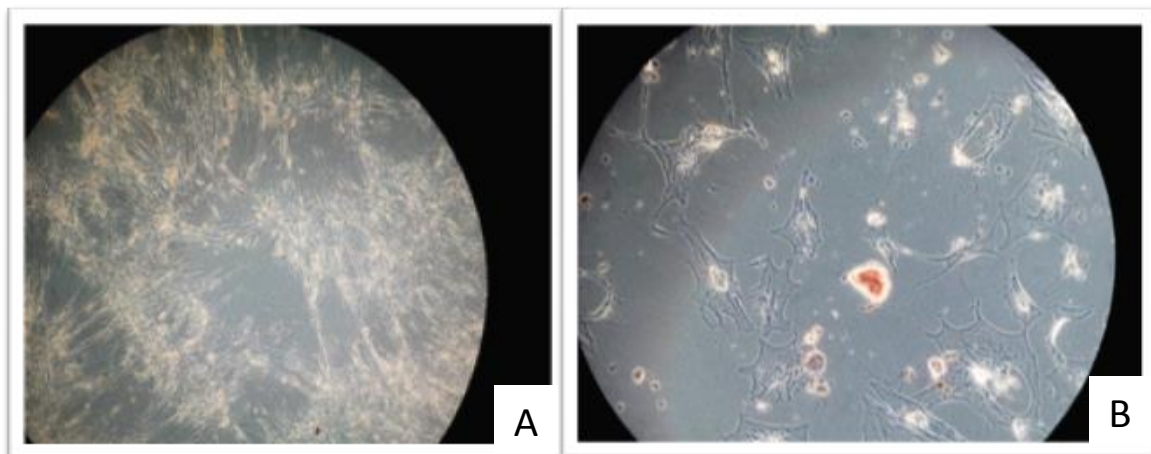
As amostras P5, P9 e P14 foram submetidas aos protocolos do teste de diferenciação tri-linhagem. Todas as amostras foram coradas com os corantes específicos. Nestes resultados pudemos verificar que o objetivo da diferenciação foi alcançado. Os teste adipogênico e osteogênico foram realizados em placa de cultura (monocamada), com exceção do teste condrogênico, onde as células necessitam estar justapostas em estrutura tridimensional.

A Figura 44 mostra a diferenciação adipogênica de CTM-TA provenientes do paciente P14. As análises foram feitas em duplicata na 12<sup>a</sup> passagem. Verifica-se que houve a diferenciação em adipócitos.

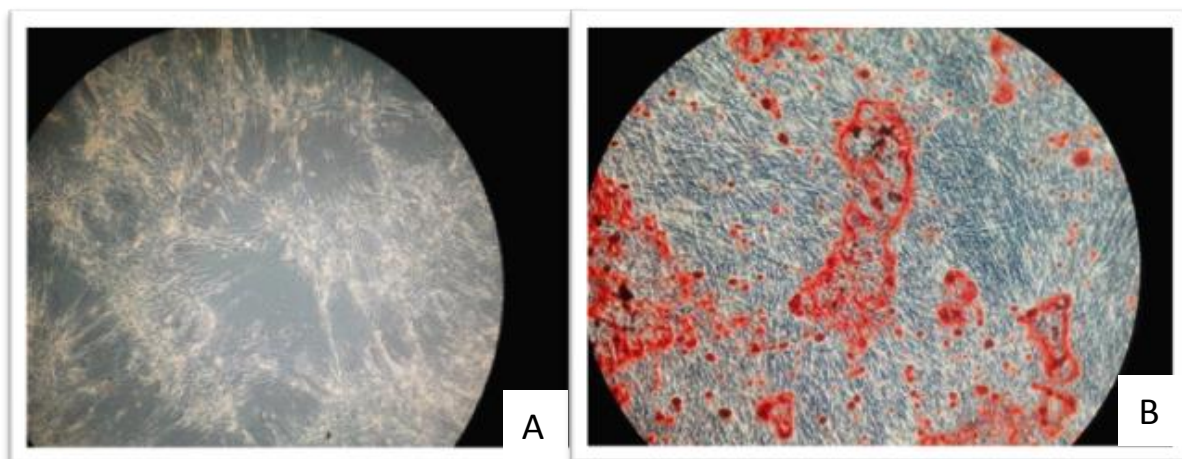
Em relação à diferenciação osteogênica de CTM-TA, a figura 45 mostra que houve essa diferenciação.

A diferenciação condrogênica de CTM-TA utilizou o corante Alcian Blue como mostram a Figura 46. Verifica-se que as imagens apresentaram coloração azulada evidenciando agrupamentos de colágeno.

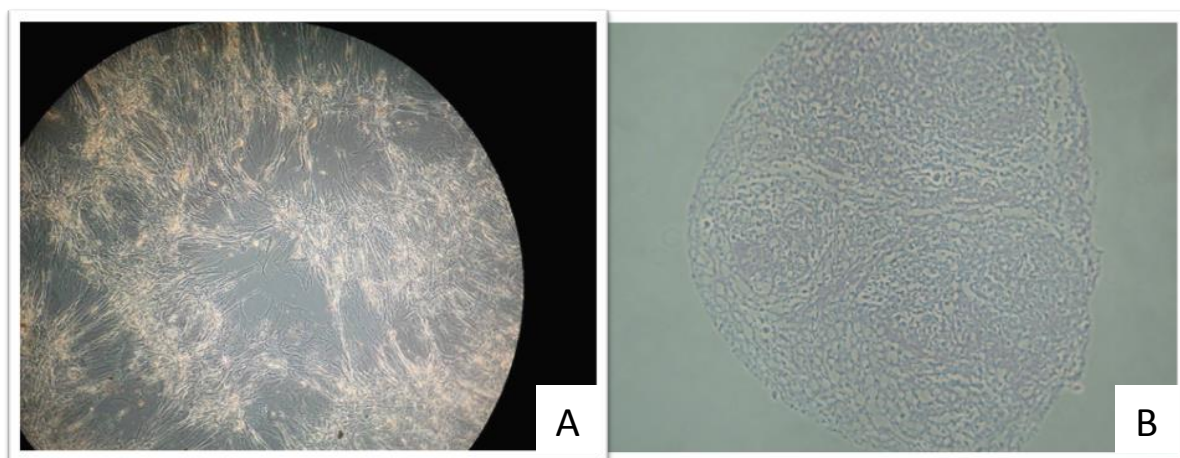
Para a linhagem fibroblástica, as culturas de células com os meios indutores foram feitas em triplicata. A Figura 44 mostra a diferenciação adipogênica de fibroblastos provenientes do paciente P5. Neste caso também foi verificada a diferenciação em adipócitos. Na diferenciação osteogênica dos fibroblastos também verifica-se positividade com o corante utilizado (Figura 45), bem como para a diferenciação condrogênica (Figura 46).



**Figura 44** - Diferenciação adipogênica de CTM-TA. Em A, Em A verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle) e B células na presença de indutor e coradas com Oil Red O®.



**Figura 45** - Diferenciação osteogênica de CTM-TA. Em A, Em A verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle) e B células na presença de indutor e coradas com Alizarin Red®.



**Figura 46** - Diferenciação condrogênica de CTM-TA. Em A, Em A verifica-se a cultura de células sem a utilização do meio indutor (Controle) e B células na presença de indutor e coradas com Alcian Blue®.

## V.6- Imunocitoquímica

Os fibroblastos foram submetidos à análise por Imunocitoquímica (ICC) com os anticorpos anti-vimentina e anti-colágeno I. Os experimentos 2, 5 e 8 foram realizados com as amostras dos pacientes P4, P5 e P7.

A cultura de queratinócitos foi de difícil estabelecimento devido ao fato de durante o isolamento da epiderme, somente 3 à 4% do total de células serem queratinócitos provenientes do estrato basal, ou seja, queratinócitos proliferativos (vide página x, ítem I.12.3). Além disso, a microbiota residente da pele também foi um fator de difícil transposição, pois as contaminações geralmente após 1 semana de cultura foram frequentes. Sendo assim, foram estabelecidos apenas o banco celular de 2 pacientes, nos quais foram congelados. Com o descongelamento posterior foi constatado que as células de ambos os pacientes não aderiam, portanto, não foi possível realizar o teste de imunocitoquímica com o anticorpo anti-betacatenina, sendo que todas as outras análises também não puderam ser realizadas.

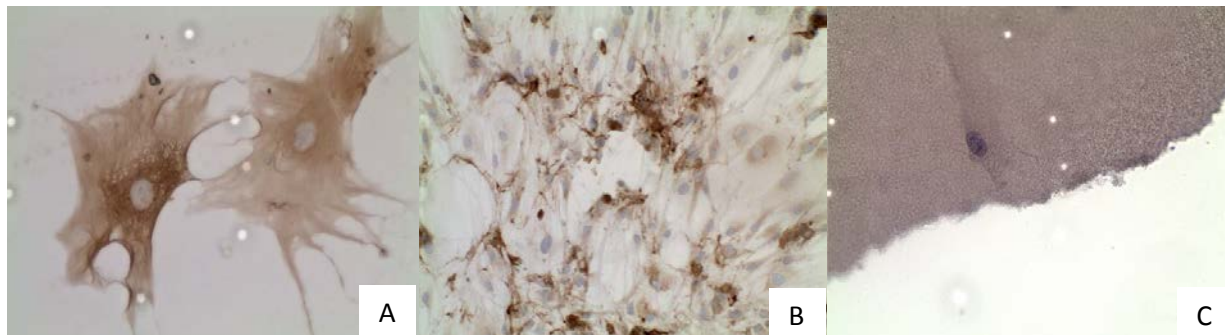
A Figura 47 mostra imagens da cultura de fibroblastos provenientes dos pacientes P4 e P7. Para melhor entendimento, o protocolo para fibroblastos destes pacientes foi cultivado sobre 04 tipos de *scaffolds* diferentes. São eles: Gel de plaquetas, cola de fibrina, quitosana e quitosana dopada com hormônios plaquetários. Cada uma destas culturas foi submetida à coloração por imunocitoquímica com anti-colágeno I e anti-vimentina.

Na Figura A observa-se que as células cultivadas sob o *scaffold* gel de plaquetas coraram-se fortemente pelo Colágeno I (20X), o que indica a presença de grande quantidade de matriz extracelular, que é rica em colágeno. Na Figura B (aumento de 40X) observa-se que as células cultivadas sob o *scaffold* cola de fibrina, coraram-se fortemente pela anti-vimentina. A vimentina é altamente expressa em fibroblastos sendo atraída pelo núcleo do retículo endoplasmático e mitocôndria lateralmente ou terminalmente. Este resultado indica que as células isoladas possuem características de fibroblastos. Para comprovação dos resultados positivos, a Figura C (aumento de 40X) mostra a culturas das células, agora cultivadas sob o *scaffold* quitosana dopada, coradas com hematoxilina na ausência do anticorpo.



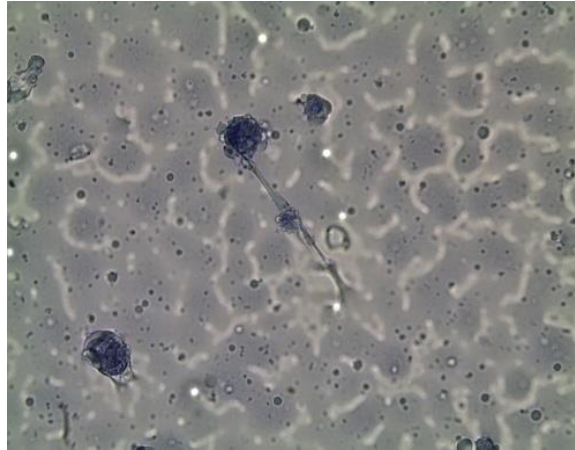
**Figura 47:** "A"- Paciente7 *scaffold* gel de plaquetas corado com anti-Colágeno I aumento 20x. "B" Paciente 7 *scaffold* cola de fibrina corada com anti-Vimentina.aumento 40x. "C" Paciente 4 *scaffold* quitosana dopada corado com hematoxilina na ausencia de anticorpo - controle negativo. aumento 40x.

Com o objetivo de mostrar que o mesmo tipo celular obtido de pacientes diferentes, apresentaram o mesmo padrão de coloração cultivados sob *scaffolds* também diferentes. A Figura 41 mostra a cultura de células provenientes dos pacientes P4 e P5 e P7. Em A as células foram provenientes do paciente P5 cultivadas sob *scaffold* gel de plaquetas corado com anti-colágeno I. Também é verificada intensa coloração, inclusive evidenciando agrupamentos de estruturas de colágeno. Em B, as células foram provenientes do paciente P7 cultivadas sob *scaffold* cola de fibrina corado com anti-vimentina e em C as células cultivadas sob o *scaffold* quitosana controle, coradas com hematoxilina na ausência do anticorpo



**Figura 48:** "A". Paciente 5 scaffold gel de plaquetas corado com anti-colágeno I (aumento 20x). "B" Paciente 7 scaffold cola de fibrina corado com anti-Vimentina (aumento 40x). "C". Paciente 4 scaffold quitosana controle - corado com hematoxilina na ausência de anticorpo - controle negativo. aumento 40x.

A utilização da quitosana como possível *scaffold* na cultura celular é recente em nosso laboratório. Em virtude disto, alguns imprevistos aconteceram na sua preparação e, principalmente, na padronização e interação desta com as células. As primeiras micromembranas de quitosanas confeccionadas não possuíam as características básicas de um biomaterial, cuja principal é mimetizar o microambiente celular. Observou-se que as primeiras micromembranas produzidas eram totalmente desprovidas de poros, impedindo assim a sobrevivência das células por não conseguirem realizar trocas com o meio de cultura. Esta dificuldade foi solucionada com a modificação do protocolo de obtenção. Abaixo, a Figura 32 mostra a não aderência das células cultivadas sobre a quitosana sem porosidades. Na imagem verifica-se que as células não confluíram de forma desejada e a coloração dos testes de imunocitoquímica foram todos negativos.



**Figura 49:** Células do paciente P4 utilizando quitosana dopada como *scaffold* corado com anti-colágeno I (aumento 40X).

Os resultados obtidos mostraram que todos os testes de imunocitoquímica obtiveram marcação positiva para os anticorpos em questão, com exceção das células cultivadas sobre o *scaffold* de quitosana confeccionado pelos primeiros protocolos

## *VI. Conclusões*

## VI. 1 - Conclusões Gerais

A membrana de quitosana dopada com hormônios de crescimento derivados de plaquetas apresenta-se como bom *scaffold* para o crescimento de células tronco mesenquimais e fibroblastos, no entanto, não foi possível avaliar o desempenho quanto ao crescimento de queratinócitos. A quitosana *in natura* inibe a secreção de citocinas pelos fibroblastos dérmicos, não sendo portanto indicada isoladamente, como curativo bioativo apesar de suas propriedades mecânicas e anti-bacterianas.

## VI. 2 - Conclusões Específicas

### Quanto à cultura celular:

- ✓ A cultura de CTM oriundas de tecido adiposo tem o POP estabelecido, sendo a linhagem de mais fácil cultivo e reprodutível cuja imunofenotipagem apresenta-se positiva para CD90, CD44, CD45, CD105, Stro-1 e CD73, sendo que para o marcador CD90, a menor expressão foi de 97,18%.
- ✓ A derme humana é uma fonte rica em células em especial de fibroblastos dérmicos. Não houve diferença significativa nos percentuais de marcação para anti-CD90 obtido nos fibroblastos quando comparados com valores obtidos em CTM de tecido adiposo 94%).
- ✓ Foi realizado o banco de células tronco mesenquimais e de fibroblastos dérmicos humanos, mantidos em condição de criopreservação a -196°C, em nitrogênio líquido.
- ✓ Não se obteve sucesso com a cultura de queratinócitos em função de contaminações bacterianas provavelmente oriundas da flora residente da pele, indicando a necessidade de melhorias no processo de cultura de queratinócitos.

### Quanto às análises das células tronco mesenquimais tecido adiposo:

- ✓ Comprovou-se o fenótipo de célula tronco mesenquimal através da análise por citometria de fluxo com os marcadores CD34, 45, 73, 90, 105 e Stro-1.
- ✓ Foi obtida a diferenciação celular da CTM e fibroblastos dérmicos através do Kit Stem Pro para diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica corroborando achados prévios da literatura especializada pertinentes à semelhança biológica entre esses dois tipos celulares.
- ✓ Os testes citoquímicos com colorações específicas da cultura de CTM e fibroblastos dérmicos na presença de meio condicionado, com os corantes Oil Red, Alcian Blue e Alizarin Red confirmou o potencial na diferenciação da tri-linhagem, além dos achados imunohistoquímicos.

Quanto às análises dos fibroblastos:

- Comprovou-se o fenótipo de fibroblasto através da análise por citometria de fluxo com os marcadores CD 14, 34, 45, 73, 90 e 105.
- Foi realizada a técnica de imunocitoquímica com os anticorpos anti-colágeno I e anti-vimentina obtendo-se 100% de marcação nas amostras analisadas.

Quanto às análises comuns à todas as culturas:

- ✓ O índice de dano de DNA das células cultivadas realizado pela técnica de Cometa não pode ser finalizado até o presente momento.
- ✓ O monitoramento da secreção de citocinas no sobrenadante das células em cultura em contato com os *scaffolds*, por citometria de fluxo com o kit CBA, evidencia que a quitosana *in natura* tem efeito inibitório sobre a secreção das células enquanto que na dopada a inibição é muito menor. A cultura controle na presença de FGF teve valores médios de 18.661pg/ml de IL8 e 8.690pg/ml após 48 horas de plaqueamento, para IL6. A quitosana *in natura* apresentou valores de 68,09 e 631,47 respectivamente (poder inibitório evidente). Os valores para a quitosana dopada foram de 10.415 pg/ml para IL8 e 7.945pg/ml para IL6. Os valores de IL1 $\beta$ , IL10, TNF e IL12-p70, foram muito próximo a zero.
- ✓ A avaliação dos índices de apoptose e necrose realizados pelos Kits de Anexina V/Iodeto de Propídeo e anti-Caspase 3 mostra que a quitosana *in natura* não estimula a apoptose ou necrose celular havendo uma tendência a maior sofrimento celular no *scaffold* de gel de plaquetas, seguido da cola de fibrina, quitosana dopada e o menor índice é o da membrana de quitosana *in natura*. Estes achados corroboram os da literatura de que o biopolímero de quitosana apresenta boa integração com tecidos biológicos.

## *VII. Perspectivas*

- ✓ Padronização/Realização do teste Cometa ;
- ✓ Propor estudo de fase I ( protocolo clínico) com uso da quitosana dopada como forma de tratamento para feridas crônicas de difícil abordagem terapeutica monitorando citocinas no exsudato da lesão antes e durante a aplicação da membrana e
- ✓ Implementar o protocolo de cultura de queratinócitos diretamente, sobre membrana de quitosana dopada, em função das propriedades bactericidas da quitosana.

## *VIII. Referências*

1. Abrams, CS; Plow, EF. The molecular basis of platelet function. In: Hoffman, R. et al. *Hematology: basic principles and practice*. 5 ed. 2008.
2. Alvarado, G L. Membrana transdérmica de liberação controlada utilizando quitosana, plasma e plaquetas para a regeneração de feridas (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2012.
3. Alves, E. A. ; Guimarães, A. C. R. Cultivo celular. In: Eteécia Moraes Molinaro; Luzia Caputo; Regina Amendoeira. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. Histórico de desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos*. 1ª edição. (Rio de Janeiro): Ed. Fiocruz; 2010. v. 2, p. 215-253. Disponível em; [http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo\\_5\\_vol2.pdf](http://www.epsjv.fiocruz.br/upload/d/capitulo_5_vol2.pdf). Acesso em 17 abril, 2013.
4. Araújo, I.C.F. Tratamento de Úlceras Crônicas com uso de Biocurativo (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2007.
5. Araújo, I.C.F; W.B, Yoshida; L.P.F. Abbade; E Deffune The pernicious cycle of VLUs in Brazil: epidemiology, pathogeny and auxiliary healing methods (209kb). *Journal of wound care* 22 (4), 186-193, 2013
6. Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM- "Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais" *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, 2007; 2.3:27-34.
7. Baehrecke, E.H How Death Shapes life during development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* v.3, p.779-787, 2002.
8. M Bertanha, A Moroz, R Almeida, FC Alves, MJ Acorci Valério, R Moura, MAC Tissue-engineered blood vessel substitute by reconstruction of endothelium using mesenchymal stem cells induced by platelet growth factors. *Journal of vascular surgery*, 2013
9. Birchall M, Macchiarini P. Airway transplantation: a debate worth having? *Transplantation*. 2008; 85: 1075-80.
10. Bittencourt RAC. Cultura de Condrócitos para uso terapêutico: reconstituição de cartilagem. [tese] Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.
11. Boateng JS; et al. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2008; 97 (8).

12. Bobis, S. et al. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 44:215-230, 2006.
13. Bucheler M, Haisch A. Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA Cell Biol*. 2003; 22: 549-63.
14. Caspar-Bauguil S, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Galinier A, Periquet B, et al. Adipose tissues as an ancestral immune organ: Site-specific change in obesity. *FEBS Lett*. 2005;579:3487-92.
15. Castro, S.V, Carvalho, A.A. Silva, C.M.G. et al. Intracellular Cryoprotant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2011. 39(2): 957.
16. Carvalho, A.M; A.L.G, Alves, M.A Golim; A, Moroz; C.A Hussni, Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary immunology and immunopathology* 132 (2), 303-306, 2009
17. Catherine M Kolf\*, Elizabeth Cho\* and Rocky S Tuan Mesenchymal stromal cells Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation Cartilage Biology and Orthopaedics Branch, National Institute of Arthritis, and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 50 South Drive, Bethesda, MD 20892, USA 19 February 2007 *Arthritis Research & Therapy* 2007, 9:204 (doi:10.1186/ar2116)
18. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on biocompatibility of complexes of collagenchitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif Organs*.2005;29:104-13.
19. D'Amico, EA. Fisiologia Plaquetária. In: Maffei FHA. et al. *Doenças vasculares periféricas*. 4ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
20. Dadalti, P; et al. Substitutos biológicos da pele. *Rev Bras de Medicina* :64 (7). Jul 2007. Disponível em: [http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?id\\_materia=3603&fase=imprime](http://www.cibersaude.com.br/revistas.asp?id_materia=3603&fase=imprime).
21. Dealey, C. *Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 216 p.

22. Farrant, J. General Observations on cell preservation. In Ashwood-Smith, M. J., & Farrant, J (eds), Low temperature preservation in medicine and biology. London, Pitman Medical, 1980, pp 1-18. In Freshney, I.: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Liss: Canada; 2000.
23. Ferreira, R.R; E, Navarro, M. gobo, I.C de Araujo, E Deffune. Bioactive dressings: Study of the pharmaceutical form, shelf life and quality control Wound Repair and Regeneration 18 (6), a80-a80, 2010
24. Fraser, J.K., Wulur, I., Afonso, Z., Hedrick, M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 24, 150-154, 2006.
25. Franzolin, S.O.B; C.E, Francischone, R.A.C, Bittencourt, S.L Felisbino, E Deffune. Diferenciação de célula-tronco hematopoética periférica humana em osteoblasto sobre diferentes superfícies de implantes de titânio; Cell differentiation of human haematopoietic stem cell (hHSC) to osteoblast in different surfaces of titanium implant Rev. dental press periodontia implantol 2 (2), 68-79, 2008.
26. Freshney RI. Cryopreservation. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Liss: Canada; 2000. p. 297-298.
27. Freshney RI. Introduction. In: Culture of animal cells: a manual of basic technique. 4<sup>th</sup> ed. Wiley-Liss: Canada; 2000. p. 1-8.
28. Fuller B, & Paynter S 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive BioMedicine Online*. 9:680-869.
29. Garcia, M.A. Uso de biocurativo em úlceras de pressão (dissertação). Botucatu:Faculdade de Medicina de Botucatu,Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2004.
30. Gobo M O, Estudo comparativo de gel de plaquetas *home made versus* hidrocolóide no processo de cicatrização de úlceras crônicas de etiologia venosa. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2011. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2011. 96p.
31. Goosen, M. E. A – “Applications of chitin and chitosan”, *Technomic Publishing Company*,1996; Lancaster.
32. Goossens A e Cleenewerck MB, New wound dressing: classification, tolerance. *Eur J Dermatol*. 2010; 20 (1): 24-6.

33. Green H. Cultured cells for the treatment of disease: The successful growth of human skin cells in culture has made it possible to restore epidermis after severe burns and other forms of damage. *Sci Am* 1991 265(5); 96-102.
34. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ: Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003, 116:1827-183
35. Guimarães C.A Lindem, R; Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur. J. Biochem.* v.271, p 1638-1650, 2004.
36. Hematti, P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*, 2012; 14: 516–521.
37. Herzog, E.L. et al. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 102:3483-3493, 2003
38. Hirano, S.; *Biotechnology. Annual Research.* 2, 237-258, 1996.
39. <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=12121> Acessado em 18 abril de 2013.
40. Huss, R. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem. *Stem Cells.*18:1;1-9, 2000.
41. Kleimam, I., Simões, M.J.; Goldenberg, S. Aspectos atuais do processo de reparação tecidual. *Acta Cir. Bras*, v.2, n.1, p.19-21, 1987.
42. Kleimam, I., Simões, M.J.; Goldenberg, S. Aspectos atuais do processo de reparação tecidual. *Acta Cir. Bras*, v.2, n.1, p.19-21, 1987.
43. Langer R, Vacanti JP, Tissue engineering. *Science*, 1993; 14: 260(5110):920-6.
44. Lee P.A., Mora S. J. & Levasseur M.A. 1999. Review of dimethylsulfoxide in aquatic environments. *Atmosphere-ocean*.
45. Leigh IM, Lane EB, Watt FM. *The Keratinocyte Handbook*. 1st ed. Cambridge: University Press; 1994. p. 566.
46. Life Technologies. [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com). Life Sciences-Cell Culture. USA Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/life-science/cell-culture.html>. Acesso em 18 set. 2013.

47. Lorenz, K, Sicker M, Schmelzer, E; Rupf T, Salvetter, J, Schulz-Siegmund M et al. Multilineage differentiation potential of lineage human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008; 17: 925-32.
48. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62(4):489-96.
49. Mathur NK, Narang CK. – "Polymers as aids in organic chemistry" In: Azevedo VVC, Chaves SA, Bezerra DC, Lia Fook MV, Costa ACFM- "Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais" *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*,2007; 2.3:27-34.
50. Moryson M. Leg Ulcers. In: Moryson M. *Nursing Management of chronic wounds*. Cap. 10, p.177-220. Mosby, London, 2<sup>nd</sup> edition, 1998.
51. Moroz, A; RAC Bittencourt, RP Almeida, SL Felisbino, E Deffune. Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: An improved approach in cartilage tissue engineering. *Platelets* 24 (3), 219-225, 2012
52. Moroz, A; RC Bittencourt, SL Felisbino, R Rossi-Ferreira, E Deffune Evaluation of Two Novel Proposals of Three Dimensional (3D) Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell Culture and Chondrogenesis: Platelet-rich Plasma (Prp3d) and Bacterial Cellulose (Bc) in Comparison to Alginate Beads (AlgB) *Transfusion* 49, 23A-24A, 2010.
53. Muzzarelli RA, Tanfani F, Scarpini G, Laterza G. The degree of acetylation of chitins by gas chromatography and infrared spectroscopy. *J Biochem Biophys Methods*. 1980;2:299-306.
54. Neagu M, Suciu E, Ordodi V, Păunescu V. Human mesenchymal stem cells as basic tools for tissue engineering: isolation and culture. *Rom J Biophys*. 2005; 15: 29-34.
55. Nolte, S.V. et al. Diversity of Fibroblasts: a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissue Organs*, v.187, p.165-176, 2008.
56. Rall W.F., Reid D.S. & Polge C. 1984. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*. 21: 106-121.
57. Rathke TD, Hudson SM. Determination of the degree of N-deacetylation in chitin and chitosan as well as their monomer sugar ratios by near infrared spectroscopy. *Polym Sci, Polym Chem Ed*. 1993;31:749.

58. Ravi Kumar NMV. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*. 2000;46:1-27.
59. Reichert, L da Silva Assunção; R, Colenci, CC Ferreira do-Amaral, CK Sonoda ... Periodontal Tissue Engineering After Tooth Replantation *Journal of periodontology* 82 (5), 758-766, 2011
60. Rehen S, Paulsen B, Células-tronco: o que sao? para que servem? 1ª ed. Rio de Janeiro: Vieira e Lent; 2007.
61. Roberts GA F. - "Chitin Chemistry", *The Macmillan Press*, 1992; London.
62. Rubinsky B. Principles of low temperature cell preservation. *Heart Failure Reviews*. 2003.8: 277-284
63. Santos Jr., A. Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico. Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2001. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2001. 150p.
64. Schultz, GS, *et al.* Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Rep Reg* 2003;11:1–28.
65. Senel S, Ikinç G, Kas S, Yousefi-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. *Int J Pharm*. 2000;193:197-203.
66. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56:1467-80.
67. Sheikhi M., Hultenby K., Niklasson B., Lundqvist M. & Hovatta O.. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. *Human Reproduction*. 2011 (In press).
68. Silva, R.A.M. Modelo Experimental de Ampliação vesical em coelhos utilizando técnicas de Engenharia de tecidos em *scaffold* de quitosana. (dissertação). Botucatu:Faculdade de Medicina de Botucatu,Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2012.
69. Simmons PJ, Torok-Storb B: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991, 78:55-62.
70. Singla AK, Chawla M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects--an update. *J Pharm Pharmacol*. 2001;53:1047-67.

71. Sojka J.E., Brisson-Kimmick S.V., Carlson G.P., Coppoc G.L. 1990. Dimethyl sulfoxide update – New applications and dosing methods. *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*. 36: 683-690.
72. Spin-Neto R, Pavone C, Freitas RM, Marcantonio RAC e Marcantonio-Junior E. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. 2008). *Revista de Odontologia da UNESP*. 2008; 37(2): 155-161 © 2008 - ISSN 1807-2577.
73. Tormala, P.; Pohjonen, T. e Rokkanen, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (Part H)*, v.212, p.101-111, 1998.
74. Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, Schüle B. J Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *Vis Exp*. 2013 Jul 7;(77):3779.
75. Vaux, DL ; Korsmeyer, SJ. Cell Death in Development. *Cell* v.96 p. 245-254, 1999.
76. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112:1821-30.
77. Yao E, Eriksson E. Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regener* 2000;8:443-51.
78. Yarak, S, Okamoto O K: Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives *An Bras Dermatol.*;85(5):647-56, 2010.
79. Wan, C.D et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 7:29-33, 2008.
80. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55(11):1294-9.
81. Wusteman M., Rauen U., Simmonds J., Hunds N. & Pegg D.E. 2008. Reduction of cryoprotectant toxicity in cell in suspension by use of a sodium-free vehicle solution. *Cryobiology*. 56: 72-79.

*IX. Anexos*

O presente trabalho foi patrocinado pela FAPESP e pertence ao auxílio pesquisa fluxo contínuo. Bolsa treinamento técnico nível TT/3 nº processo: 2011/21862-5



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



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



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de Outubro de 2013

OF. 151/2013-CEP

Ilustríssima Senhora  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Rossi Ferreira  
Divisão de Hemocentro da  
Faculdade de Medicina de Botucatu  
São Paulo- SP.

Prezada Dr<sup>a</sup> Rosana,

Com referência ao Projeto de Pesquisa "Estudo comparativo de três diferentes scaffolds para crescimento de célula tronco mesenquimal, fibroblastos e queratinócitos" aprovado por este CEP em 05/09/2011, fica com a equipe assim constituída:

**Autor:** Helga Caputo Nunes

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosana Rossi Ferreira

**Colaboradores:** Elenice Deffune, Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves,  
Margarida Júri Saeki e Sérgio Luiz Felisbino

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg  
Coordenador do CEP.