

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
DO DESENVOLVIMENTO  
LABORATÓRIO DE CÉLULAS-TRONCO E REGENERAÇÃO  
TECIDUAL

DIANA HECK

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA EM BIOMATERIAIS  
BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA

Florianópolis  
2012



DIANA HECK

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA EM BIOMATERIAIS  
BASEADOS EM CELULOSE BACTERIANA

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biologia Celular e  
do Desenvolvimento, Centro de  
Ciências Biológicas, Universidade  
Federal de Santa Catarina (UFSC),  
como requisito parcial para  
obtenção de grau de Mestre em  
Biologia Celular e do  
Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez-Silva  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Derce de Oliveira Souza Recouvreur

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Heck, Diana

Avaliação da associação de células-tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana [dissertação] / Diana Heck ; orientador, Márcio Alvarez Silva ; co-orientadora, Derce de Oliveira Souza Recouvreux. - Florianópolis, SC, 2012.

86 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Biomateriais. 4. Celulose bacteriana. I. Alvarez Silva, Márcio. II. Recouvreux, Derce de Oliveira Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

*Dedico este trabalho à minha mãe,  
meu maior exemplo de mulher e ser humano.*



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva, pelos ensinamentos e por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste excelente grupo de pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Derce de Oliveira Souza Recouvreux, minha co-orientadora, que iniciou como colaboradora e, ao longo do trabalho, se tornou muito importante e especial para mim. Obrigada por toda paciência, estímulo e confiança.

Aos demais professores do Lacert, Dr<sup>a</sup>. Andréa Gonçalves Trentin, Dr. Giordano Wosgrau Calloni e Dr. Ricardo Castilho Garcez, pela colaboração e ajudas prestadas.

Aos professores da pós-graduação, que contribuíram para meu crescimento acadêmico.

Aos queridos colegas e amigos do Lacert, que foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Obrigada pelo companheirismo, auxílios nos experimentos, pelas ideias compartilhadas, pelas conversas confortantes e pelos momentos de descontração.

Agradecimento especial ao Aloísio que me ensinou não só sobre ciência, mas também grandes lições de vida. Obrigada pela paciência e prontidão em responder minhas incansáveis dúvidas e solucionar meus problemas, seja pessoalmente ou por longas conferências pelo Skype.

Às minhas little birds, Karina e Renata, pela amizade única e sincera. Por compartilharem comigo sonhos, decepções e realizações. Obrigada por estarem sempre ao meu lado!

Às minhas amigas de infância, por compreenderem minha distância e sempre me acolherem como se eu nunca tivesse saído de perto. Obrigada por existirem na minha vida!

À toda minha família, especialmente minha avó Ivone, pelas orações, carinho e incentivo.

Às duas pessoas mais importantes da minha vida. À minha mãe, Lilian, por tudo! Pela dedicação e amor incondicional, pela educação e por

sempre acreditar em mim. E à minha irmã, Aline, pelo apoio e pela amizade que só aumenta com o passar dos anos. Amo vocês!

Ao meu pai, que mesmo tendo partido cedo, está sempre em meu coração e pensamento.

Aos laboratórios Intelab e LBBMM por ter fornecido e me ajudado com a celulose.

Aos servidores dos laboratórios multiusuários, pelo auxílio nos experimentos. Especialmente, à Eliana e à Carmen do LCME, pelas inúmeras horas de análise no MEV e confocal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e também às agências financiadoras FAPESC, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), INTT, e PRONEX/CNPq.

E a todos que não foram aqui mencionados, mas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus agradecimentos sinceros.

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são amplamente estudadas por apresentarem potencial de auto-renovação e multidiferenciação, além de possibilidade de isolamento a partir de diversos tecidos. A placenta humana representa uma fonte de CTMs abundante, acessível e livre de questionamentos éticos. O comportamento celular está intimamente ligado ao microambiente tridimensional que as cercam no tecido nativo. Em vista disso, biomateriais vêm sendo desenvolvidos na tentativa de mimetizar *in vitro* esta complexidade tecidual. O hidrogel de celulose bacteriana (HCB), em particular, tem atraído grande interesse devido a sua nanoestrutura, biocompatibilidade e propriedades mecânicas. Por outro lado, a hidroxiapatita (HAp), tem sido usada como um biomaterial promissor para engenharia de tecido ósseo, devido a sua biocompatibilidade e propriedades osteoindutoras. O plasma rico em plaquetas (PRP) mostra-se como uma interessante fonte de fatores de crescimento a ser aplicada em biomateriais. O presente trabalho teve como objetivo principal, avaliar a interação e viabilidade de células-tronco mesenquimais derivadas da placenta humana (CTMPs) em HCB e em um compósito HCB-HAp, bem como analisar a influência do PRP na viabilidade e proliferação das CTMPs. Para isto, isolamos uma população de CTMPs, com morfologia, imunofenótipos e capacidade de diferenciação características de CTMs. Os HCBs foram produzidos por bactérias *Gluconacetobacter hansenii* cultivadas em um meio de cultivo apropriado e sob circunstâncias estáticas. A interação célula-HCB foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal. Os resultados revelaram que as CTMPs apresentam capacidade de aderir ao HCB, porém a interação foi superficial, apresentando pequena capacidade de migração para o interior do biomaterial. Compósitos HCB-HAp foram produzidos através da síntese biomimética de HAp, por imersão dos HCB já sintetizados em soluções de cálcio e fosfato, alternadamente. Foram testados compósitos com cinco concentrações de HAp. A microestrutura e a composição química dos compósitos foram verificadas por MEV e EDS e revelaram o aumento da deposição dos cristais de HAp ao longo dos ciclos. A interação célula-compósito foi verificada por MEV e microscopia confocal, assim como no HCB, a interação foi superficial. O aumento da concentração de HAp nos compósitos prejudicou a adesão e as células tenderam a formar agregados nos compósitos com maior concentração de HAp. Dentre os compósitos, o HCB-HAp1 (com apenas

um ciclo de deposição de HAp) foi considerado o ideal para estudos futuros. Os efeitos do PRP foram analisados sobre a viabilidade e proliferação celular e demonstrou ter efeito dependente da concentração utilizada, sendo 2% a concentração que mostrou aumento na proliferação celular. Desta forma, concluímos que, para ambos biomateriais, melhorias relacionadas à microestrutura e porosidade devem favorecer migração das CTMPs ao interior do hidrogel e, mediante a estas melhorias, a associação do compósito HCB-HAp com CTMPs e PRP, deve formar um sistema de cultivo tridimensional promissor para estudos em engenharia de tecido ósseo.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais. Placenta. Celulose bacteriana. Hidroxiapatita. Plasma rico em plaquetas.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are widely studied due to their self-renewal and differentiation potential, in addition to the possibility of isolation from several tissues. The human placenta represents an abundant source of MSCs, readily accessible and free of ethical questions. The unique cell behavior is closely related to the specialized, three-dimensional microenvironment that immediately surrounds them in native tissue. In this way, biomaterials are being developed in an attempt to mimic this complexity *in vitro*. In particular, bacterial cellulose hydrogel (BCH) has attracted great interest due to its unique nanostructure, biocompatibility and good mechanical properties. On the other hand, the hydroxyapatite (HAp) has been used as a ubiquitous biomaterial in bone tissue engineering due to its biocompatibility and osteoinductive properties. The platelet rich plasma (PRP) appears as an interesting source of growth factors that may be used together with biomaterials. In this study we evaluated the interaction and viability of human placenta derived mesenchymal stem cells (PMSCs) cultured in BCH and BCH-HAp composite, and analyzed the influence of PRP on the viability and proliferation of PMSCs. We isolate a population of PMSCs with morphology, immunophenotypes and differentiation ability, characteristics of MSCs. The BCHs were produced by *Gluconacetobacter hansenii* bacteria grown in a suitable culture medium under static conditions. The cell-BCH interaction was analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal microscopy. The results revealed that the PMSCs present the ability to adhere to BCH, but the interaction was superficial, presenting low ability to migrate into the biomaterial. BCH-HAp composites were produced by the HAp biomimetic synthesis, by immersing the synthesized BCH in calcium and phosphate solutions. Composites with five concentrations of HAp were tested. The microstructure and chemical composition of the composites were observed by SEM and EDS and revealed increased deposition of HAp crystals along the cycles. The cell-composite interaction was observed by SEM and confocal microscopy and, even as in HCB, the interaction was superficial. The increase of HAp concentration impaired the cell adhesion and the cells tended to form aggregates in the composites with higher HAp concentration. Among the composites, the BCH-HAp1 (with just one HAp deposition cycle) was considered ideal for future studies. The PRP effects were analyzed on cell viability and proliferation and demonstrate to have a concentration-dependent effect. The higher increase in cell proliferation

was achieved with 2% PRP. Thus, we conclude that, for both biomaterials improvements related to the microstructure and porosity would be favorable to the PMSCs migration. By these improvements, the association of the composite HCB-HAp1 with CTMPs and PRP must form a promising three-dimensional culture system for studies in bone tissue engineering.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells. Placenta. Bacterial cellulose. Hydroxyapatite. Platelet rich plasma.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ SMA: actina de músculo liso  
ANOVA: análise de variância de uma via  
BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina  
CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio  
CB: celulose bacteriana  
CT: célula-tronco  
CTM: célula-tronco mesenquimal  
CTMP: célula-tronco mesenquimal derivada de placenta  
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
EDS: espectroscopia por dispersão de energia  
EGF: fator de crescimento endotelial  
FITC: *Fluorescein isothiocyanate*  
HAp: hidroxiapatita  
HCB: hidrogel de celulose bacteriana  
HCB-HAp: hidrogel de celulose bacteriana com hidroxiapatita  
Ig: Imunoglobulina  
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*  
MEV: microscopia eletrônica de varredura  
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato dibásico de sódio  
PBS: tampão fosfato salino  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PE: *Phycoeritrin*  
PES: Etosulfato de fenanzina  
PerCP: *Peridinin chlorophyll protein complex*  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>  
PPP: plasma pobre em plaquetas  
PRP: plasma rico em plaquetas  
PS: penicilina/estreptomicina  
SBF: soro bovino fetal  
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido  
TGF- $\beta$ 1: fator de crescimento transformante  $\beta$ 1  
TGF- $\beta$ 2: fator de crescimento transformante  $\beta$ 2  
UFC-F: unidades formadoras de colônias fibroblastóides  
VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** Ilustração esquemática da formação da placenta
- Figura 2** Ilustração esquemática das regiões da placenta humana
- Figura 3** Estrutura química da celulose bacteriana
- Figura 4** Morfologia fibroblastóide das CTMPs
- Figura 5** Caracterização imunofenotípica das CTMPs
- Figura 6** Diferenciação osteogênica
- Figura 7** Diferenciação adipogênica
- Figura 8** Microestrutura do HCB
- Figura 9** Condições de cultivo
- Figura 10** Representação gráfica da viabilidade celular nas diferentes condições de cultivo
- Figura 11** Macroestrutura HCB
- Figura 12** Interação célula-HCB
- Figura 13** Composição química dos compósitos HCB-HAp por EDS
- Figura 14** Interação entre CTMPs e compósitos HCB-HAp
- Figura 15** Análise da viabilidade celular nos compósitos HCB-HAp:
- Figura 16** Análise da viabilidade celular após cultivo com PRP
- Figura 17** Análise da proliferação celular das CTMPs após cultivo com PRP

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** Marcadores de superfície de MSCs

**Tabela 2:** Marcadores de superfície utilizados na citometria de fluxo

**Tabela 3:** Condições de cultivo celular em HCB testadas

**Tabela 4** Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações imunocitoquímicas

**Tabela 5:** Composição química dos compósitos HAP-HAp



# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 CÉLULAS-TRONCO.....	19
<b>1.1.1 Células-tronco Mesenquimais.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.2 Placenta e CTMs.....</b>	<b>22</b>
1.2 BIOMATERIAIS PARA CULTIVO CELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS.....	25
1.3 HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA.....	25
<b>1.3.1 Compósito hidrogel de celulose bacteriana e hidroxiapatita.....</b>	<b>27</b>
1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	28
1.5 ENXERTOS ÓSSEOS.....	29
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA.....	33
3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA.....	34
<b>3.2.1 Imunofenotipagem.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.2 Diferenciação.....</b>	<b>35</b>
3.2.2.1 Diferenciação Adipogênica.....	36
3.2.2.2 Diferenciação Osteogênica.....	36
3.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA.....	36
<b>3.3.1 Análise da microestrutura do hidrogel de celulose bacteriana.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3.2 Padronização do cultivo das células-tronco mesenquimais de placenta humana no hidrogel de celulose bacteriana.....</b>	<b>38</b>
3.3.2.1 Ensaio de viabilidade celular nas diferentes condições.....	39
<b>3.3.3 Avaliação da interação célula-hidrogel.....</b>	<b>39</b>
3.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura.....	39
3.3.3.2 Microscopia confocal.....	39
3.4 PRODUÇÃO DO COMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA E HIDROXIAPATITA.....	40

3.4.1	Avaliação da interação célula-compósito HCB-HAp.....	41
3.4.2	Ensaio de viabilidade celular nos compósitos HCB-HAp.....	41
3.5	CULTIVO CELULAR COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	41
3.5.1	Preparo do plasma rico em plaquetas.....	41
3.5.2	Quantificação dos fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas.....	42
3.5.3	Avaliação dos efeitos do plasma rico em plaquetas sobre a viabilidade e proliferação celular.....	43
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA.....	45
4.2	MICROESTRUTURA DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA.....	47
4.3	PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA EM HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA.....	48
4.4	INTERAÇÃO CÉLULA-HCB.....	52
4.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HCB-HAp.....	53
4.6	INTERAÇÃO CÉLULA-COMPÓSITO HCB-HAp.....	56
4.7	CULTIVO CELULAR COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS.....	58
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>71</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

# INTRODUÇÃO

## 1.1 CÉLULAS-TRONCO

Classicamente as células-tronco (CTs) são definidas como uma população de células indiferenciadas capazes de se auto-renovar e se diferenciar em diferentes linhagens celulares (ODORICO *et al.*, 2001; THOMSON, 1998).

A auto-renovação destas células pode se dar por divisão simétrica ou assimétrica. Pela divisão simétrica, as CTs geram duas células filhas com as mesmas características, sem alterar seu estado indiferenciado. Já pela divisão assimétrica, são geradas tanto CTs indiferenciadas quanto células progenitoras, consideradas comprometidas fenotipicamente e que seguem uma via de diferenciação (SANDERS *et al.*, 2006).

Quanto ao potencial de diferenciação, as CTs são classificadas como totipotentes, quando capazes de dar origem a todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários. São consideradas pluripotentes, quando possuem habilidade de originar todos os tipos celulares do embrião exceto os anexos embrionários, ou multipotentes, quando capazes de gerar apenas algumas linhagens celulares (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

As CTs ainda podem ser classificadas, em relação a sua origem, como CTs embrionárias ou adultas. As CTs embrionárias são obtidas da massa celular interna do blastocisto e, *in vitro*, são capazes de se proliferar indefinidamente mantendo seu potencial de diferenciação em células de todos os folhetos embrionários (THOMSON, 1998). Já as CTs adultas, isoladas de diversos tecidos adultos e fetais, possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação limitadas quando comparadas com as embrionárias. Tradicionalmente são consideradas CTs comprometidas com tecidos ou órgãos específicos, e acredita-se que estão relacionadas principalmente com a manutenção da funcionalidade e reparo tecidual (SANDERS *et al.*, 2006). Entretanto, vem sendo demonstrado que as CTs adultas possuem plasticidade maior do que fora previamente descrito, sendo capazes de diferenciar em diversos tipos celulares (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Em relação a estudos e aplicações clínicas de CTs, ainda existem diversas controvérsias quanto ao uso das CTs embrionárias devido aos questionamentos éticos que envolvem o isolamento destas células. Além disto, problemas de rejeição imunológica e seu alto potencial para desenvolvimento de tumores, também dificultam o uso clínico destas células (ESPINOZA; PETERSON, 2012). Tais dificuldades podem ser

evitadas com o uso de CTs adultas. O fato de estas células poderem ser isoladas de tecidos autólogos descarta a possível indução de uma resposta imune, bem como os questionamentos éticos. Além disto, estas não têm sido relacionadas com a formação de tumores (CHAGASTELLES; NARDI, 2011).

Diversos tipos de células precursoras já foram isoladas de tecidos adultos. As células-tronco hematopoiéticas são o grupo de CTs adultas mais bem descrito, isoladas geralmente da medula óssea e do sangue do cordão umbilical, estas são responsáveis pela reposição das células sanguíneas (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Outras populações de CTs adultas também são conhecidas como as CTs epidérmicas, as CTs neurais e CTs mesenquimais (ALISON; ISLAM, 2009; BIANCO *et al.*, 2008).

### 1.1.1 Células-tronco Mesenquimais

Dentre as CTs adultas estão as chamadas células-tronco mesenquimais (CTMs), que foram assim denominadas por Caplan em 1991. Todavia, estudos envolvendo as células atualmente referidas como CTMs remontam aos anos 60 e 70, quando Friedenstein e colaboradores iniciaram as pesquisas com células fibroblastóides da medula óssea de roedores e coelhos. Inicialmente, estas células eram consideradas precursoras de fibroblastos derivadas da medula óssea e denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F). Mais tarde, descobriu-se que as colônias de células fibroblastóides derivadas da medula óssea eram capazes de se diferenciar em células com características de osteoblastos, condrócitos e adipócitos. A partir da constatação de que as UFC-F derivavam de uma porção estromal da medula óssea, as células aderentes ao plástico passaram a ser denominadas células estromais da medula óssea (BIANCO *et al.*, 2008). Todavia, o termo células estromais da medula óssea compreende todas as células que compõem o estroma medular, como fibroblastos, adipócitos e também macrófagos. Já o termo CTMs refere-se exatamente a esta população celular com morfologia fibroblastóide e aderente ao plástico, capaz de proliferar *in vitro* e diferenciar para linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, quando cultivadas em condições apropriadas (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009; CAPLAN, 2005).

CTMs com características semelhantes às derivadas da medula óssea vem sendo isoladas de diferentes tecidos, como o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), derme, tecido muscular esquelético (YOUNG

*et al.*, 2001), polpa dental (MIURA *et al.*, 2003), cordão umbilical e placenta (CAVALLO *et al.*, 2011). De fato, sugere-se que células com características de CTMs residem em todos os órgãos e tecidos pós-natais. Estes dados indicam a possível existência de uma extensa rede de CTMs no organismo (KASSEM *et al.*, 2004). Existem também evidências relacionando as CTMs com pericitos, sugerindo que a zona perivascular seria o nicho *in vivo* destas células, onde estímulos locais coordenariam a transição para progenitores e fenótipos celulares maduros (SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008).

A diversidade de fontes de obtenção das CTMs, juntamente com a variedade de métodos de isolamento e expansão descritos na literatura, dificultou a comparação e progresso dos estudos neste campo. Em uma tentativa de resolver este problema, critérios mínimos para caracterizar as CTMs humanas foram propostos pelo Comitê de Células-Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular. Primeiramente, CTMs devem ser aderentes ao plástico em condições de cultura padrão. Além disso, as CTMs devem expressar os marcadores de superfície CD105, CD90 e CD73 e, para assegurar uma população homogênea, não apresentar expressão para marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). Este painel foi sugerido em consenso para o isolamento das CTMs, porém existem outras moléculas de superfície expressas por estas células que podem ser úteis na pesquisa (Tabela 1) (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009). Por fim, as CTMs devem ter o potencial de diferenciação, *in vitro*, para osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI *et al.*, 2006).

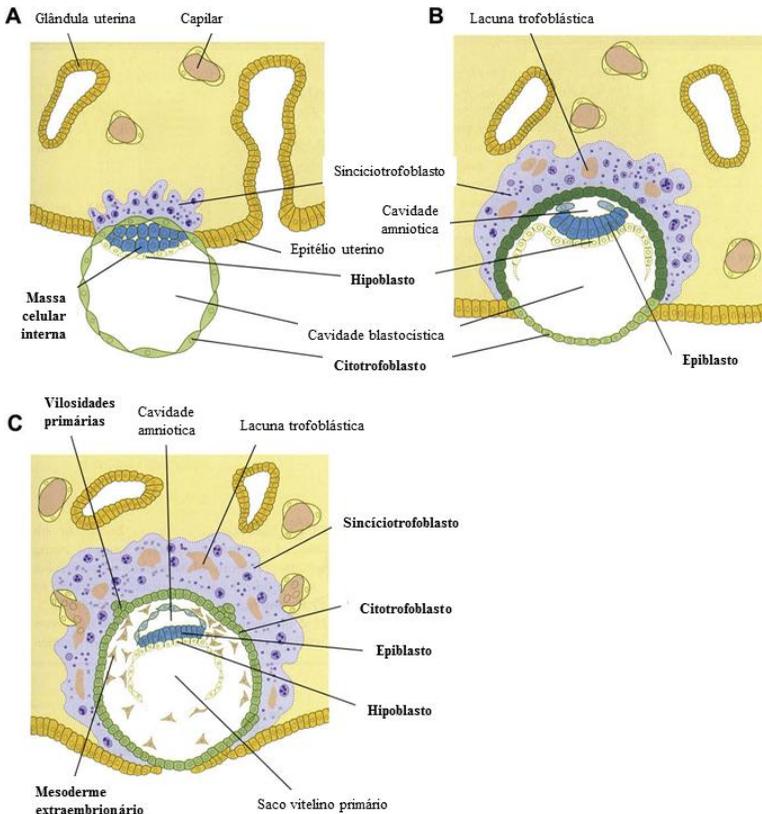
**Tabela 1** Marcadores de superfície de CTMs

<b>Presença de expressão</b>	<b>Ausência de expressão</b>
CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49(a,b,c,e), CD51, CD54, CD58, CD61, CD62L, CD71, CD73, CD90, CD102, CD104, CD105, CD106, CD109, CDw119, CD120(a,b), CD121a, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140(a,b), CD146, CD164, CD172a, Calponina, Desminina, Nestina, Stro-1, Vimentina, $\alpha$ SMA	CD4, CD11(a,b), CD14, CD15, CD18, CD25, CD31, CD34, CD45, CD49d, CD50, CD62E, CD62P, CD117, CD133, CD144, vWF

Fonte: SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009.

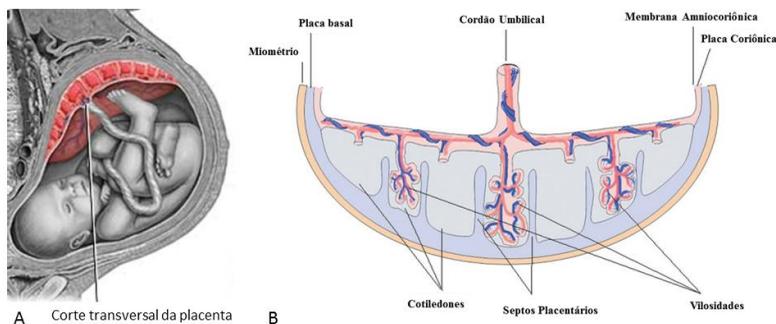
### 1.1.2 Placenta e CTMs

A placenta humana é um anexo embrionário que realiza as trocas fisiológicas entre a mãe e o feto durante o período de gestação. Durante o desenvolvimento embrionário, o embrião, o cordão umbilical e o epitélio amniótico são originados da massa celular interna do blastocisto, enquanto que a placenta é derivada do trofoblasto e do mesoderma extraembrionária (Figura 1)(ILANCHERAN *et al.*, 2009).



**Figura 1** Ilustração esquemática da formação da placenta. (A) Logo após a implantação a massa celular interna do blastocisto forma o disco embrionário bilaminar, composto pelas células do epiblasto e hipoblasto. Células do trofoblasto formam uma bicamada: sinciotrofoblasto e citotrofoblasto (B) Células do hipoblasto migram para extremidades do blastocisto e originam a mesoderme extraembrionária. (C) A proliferação do trofoblasto e da mesoderme extraembrionária origina a placenta. Fonte: ILANCHERAN *et al.*, 2009

Ao final do quarto mês de gestação a estrutura completa da placenta está formada, a termo, esta apresenta formato discoide, com diâmetro de 15 a 20cm e espessura de 2 a 3cm. A placenta é constituída de uma porção fetal, denominada placa coriônica, e uma porção materna, a decídua ou placa basal. A placa coriônica é uma estrutura de múltiplas camadas que envolve a cavidade amniótica e é constituída pelo amnio e pelo córion. Vilosidades originam a partir da placa coriônica e ancoram a placenta à placa basal e ao endométrio materno. Na porção materna, saliências da placa basal adentram as vilosidades coriônicas formando os septos placentários, que dividem o parênquima em cotilédones irregulares (Figura 2)(PAROLINI *et al.*, 2008).



**Figura 2 Ilustração esquemática das regiões da placenta humana.**(A) Estrutura e anatomia da placenta no útero materno. (B) Representação esquemática das regiões da placenta. Fonte: adaptado de A.D.A.M. Health Solutions, 2012 e PAROLINI *et al.*,2008.

Diversos estudos apontam a placenta como uma promissora fonte de CTs. Já foram descritos o isolamento de diferentes populações de CTs a partir deste órgão, como as CTs hematopoiéticas(ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003), CTMs, progenitores endodermis e CTs epiteliais amnióticas(PAROLINI *et al.*, 2008)

Diferentes partes da placenta, bem como o cordão e o sangue umbilical, abrigam CTMs. Estas podem ser facilmente isoladas, mecânica e enzimaticamente, e cultivadas *in vitro*. Entretanto, as CTMs isoladas das membranas amnióticas e coriônicas são as que têm atraído maior atenção (SEMENOV *et al.*, 2010).

Assim como as CTMs derivadas da medula óssea e outros tecidos, as células-tronco mesenquimais derivadas da placenta (CTMPs) devem seguir alguns critérios para serem assim consideradas. Estes

critérios incluem a adesão ao plástico, a formação de UFC-F, o mesmo padrão de expressão de marcadores de superfície descrito para CTMs, potencial de diferenciação para uma ou mais linhagens celulares e ainda, demonstrar origem fetal (PAROLINI *et al.*, 2008). Todavia, quanto ao último critério, estudos relatam que CTMs de origem materna possuem as mesmas características que as fetais, apresentando potencial de auto-renovação e diferenciação em diversas linhagens (IN'T ANKER *et al.*, 2004; SABAPATHY *et al.*, 2012).

O fato de os tecidos placentários originarem-se durante os primeiros estágios do desenvolvimento suportam a possibilidade que estes tecidos podem conter células que retém a plasticidade de células embrionárias das quais aplacentaderiva. Além disso, uma vez que a placenta é fundamental para manter a tolerância fetomaternal durante a gestação, acredita-se que este tecido apresente características imunoregulatórias, diminuindo a rejeição em tecidos (YUAN *et al.*, 2012). Estes dois aspectos fazem das células placentárias boas candidatas para possível uso em abordagens de terapia celular, oferecendo a possibilidade de prover células capazes de diferenciação em múltiplos tipos celulares e que, além disso, mostram propriedades imunológicas que permitiriam seu uso sem problemas de rejeição. Ademais, dado que a placenta é geralmente descartada após o parto, este tecido se torna uma fonte de volume significativo, no qual o isolamento das células não envolve nenhum procedimento invasivo, e sua utilização não gera nenhum questionamento de natureza ética (EVANGELISTA *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2012).

O comportamento ímpar de auto-renovação e diferenciação característico das CTs, só é possível graças ao microambiente tridimensional especializado que as cercam no tecido nativo. Este nicho proporciona as vias estruturais, bioquímicas, mecânicas e estimulatórias necessárias para o comportamento apropriado das CTs durante a homeostase e em resposta a mudanças fisiológicas. Quando removidas deste nicho tridimensional, são criadas variáveis que alteram a funcionalidade, fenótipo e capacidade de resposta aos estímulos ambientais. (LUND *et al.*, 2009).

## 1.2 BIOMATERIAIS PARA CULTIVO CELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS

Tendo em vista a relação íntima entre as CTs e seu microambiente tridimensional, arcabouços (*scaffolds*) feitos de materiais poliméricos ou compósitos biodegradáveis e bioabsorvíveis vêm sendo desenvolvidos. Estes estão sendo utilizados tanto para estudos do comportamento e mecanismos celulares *in vitro*, quanto para engenharia de tecidos e aplicações clínicas (DONG *et al.*, 2009; TUZLAKOGLU; REIS, 2009; WEIR; XU, 2010). Fundamentalmente, biomateriais para cultivo celular e engenharia de tecidos devem fornecer: um ambiente que favoreça a interação, proliferação e diferenciação celular; uma matriz permeável que permita difusão de nutrientes, gases e metabólitos; e ainda, suporte mecânico, para a reposição e regeneração do tecido (SERPOOSHAN *et al.*, 2010).

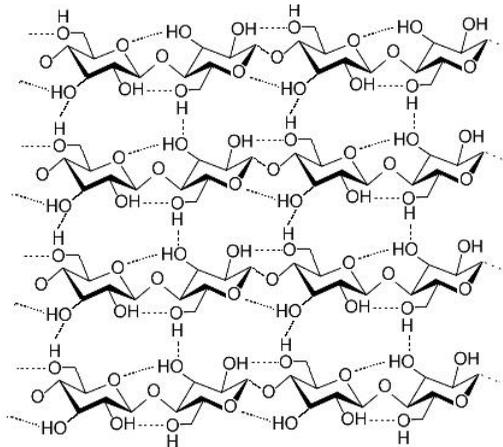
Recentemente, a busca de novas classes de biomateriais com propriedades específicas para uso em engenharia de tecidos tem atraído grande interesse. Para esta finalidade, uma variedade de materiais vem sendo avaliados, estes incluem polímeros naturais como o colágeno, polímeros sintéticos como o poliácido láctico, e ainda materiais inorgânicos como a hidroxiapatita (HAp) (FANG *et al.*, 2009). Hidrogéis ou polímeros com elevado teor de água (>99%) formam outra classe importante de biomateriais que tem sido extensivamente estudados devido à sua natureza tridimensional, biocompatibilidade e versatilidade no processamento (ZHANG; KOHN, 2012).

## 1.3 HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA

A celulose forma a base estrutural da parede celular de plantas, e também é produzida por outros organismos como algas, fungos e bactérias. Uma forma de obtenção da celulose é a partir de algumas cepas bacterianas não patogênicas, tais como as bactérias aeróbicas Gram-negativas do gênero *Gluconacetobacter*. Quando cultivadas em cultura estática, em meio líquido, essas bactérias sintetizam uma rede cristalina tridimensional de pura celulose que forma um hidrogel de celulose bacteriana (HCB) na interface entre o ar e o meio líquido (RECOUVREUX *et al.*, 2011).

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo composto por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de glicose, unidas por ligação do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicas. As moléculas longas e rígidas de celulose se combinam para formar nanofibras, cada uma consistindo de

várias cadeias de celulose (Figura 3). Estruturalmente, a CB consiste em uma rede destas nanofibras, interligadas por pontes de hidrogênio (RAMBOet al., 2008).



**Figura 3** Estrutura química da celulose bacteriana: Cadeias lineares de glicose unidas por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  glicosídicas que ligam-se entre si por ligações de hidrogênio, formando nanofibras de celulose. Fonte: Recouvreur, 2008.

OHCB apresenta propriedades únicas que o tornam potencialmente adequado para utilização como um biomaterial. Estas propriedades incluem alta capacidade de retenção de água, que compreende cerca de 99% do volume total do hidrogel, a formação de uma rede de nanofibras, que permite o crescimento e proliferação celular, além de elevada resistência à tração, possibilidade de ser moldada e baixo custo de produção (RAMBOet al., 2008).

A biocompatibilidade, característica importante quando se fala em engenharia de tecidos, foi comprovada por Helenius e colaboradores (2006) em um estudo *in vivo*. Neste estudo, foi demonstrado que a CB possui a capacidade de se integrar ao tecido hospedeiro sem provocar reação inflamatória. Entretanto, a CB possui lenta degradação no organismo humano, devido à ausência de celulases, enzimas necessárias para hidrólise das ligações entre as moléculas de glicose. Sugere-se que uma hidrólise não enzimática espontânea ocorra e justifique a lenta degradação da CB no corpo humano (PETERSEN; GATENHOLM, 2011).

Devido a estas características a CB tem sido utilizada em numerosas aplicações biomédicas, incluindo produção de micro vasos

artificiais(BÄCKDAHL *et al.*, 2006; KLEMM *et al.*, 2001), engenharia tecidual de cartilagem(ANDERSSON *et al.*, 2010; SVENSSON *et al.*, 2005) e em processos de cicatrização de feridas e queimaduras (CZAJA *et al.*, 2006).

Outra característica da CB que a torna um promissor biomaterial é a possibilidade de modificação da sua estrutura e composição. Tratamentos químicos, irradiação e incorporação de moléculas biologicamente ativas ou metais estão sendo investigados e oferecem utilidades promissoras em aplicações biomédicas (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Um exemplo é a incorporação de HAp ao HCB, para aplicação em regeneração óssea (GRANDE *et al.*, 2009).

### **1.3.1 Compósito hidrogel de celulose bacteriana e hidroxiapatita**

Diversos biomateriais baseados em hidrogéis têm sido modificados com a incorporação de peptídeos prevalentes em proteínas da matriz extracelular, formando compósitos biocompatíveis(ELISSEFF *et al.*, 2005). Compósitos são materiais que possuem em sua composição pelo menos dois componentes com propriedades físicas e químicas distintas, componentes que, quando misturados, formam um composto com propriedades impossíveis de se obter com apenas um deles.

Compósitos HCB e hidroxiapatita (HCB-HAp) vêm sendo desenvolvidos principalmente para regeneração e substituição óssea. A incorporação de HAp aos HCBs tem sido demonstrada suspendendo nanopartículas de HAp ao meio líquido durante a síntese do HCB ou ainda, de forma biomimética, através da imersão dos HCB já sintetizados em soluções de cálcio e fósforo(GRANDE *et al.*, 2009; HUTCHENS *et al.*, 2006).

A HAp é o principal componente inorgânico da matriz óssea e, portanto, mantém excelente biocompatibilidade. A HAp sintética tem sido utilizada no reparo de defeitos ósseos devido à sua excelente bioatividade e propriedades osteocondutivas(FANG *et al.*, 2009). Além disso, apresenta-se como um material não inflamatório, atóxico, nãoimunogênico(GRANDE *et al.*, 2009). Desta forma, arcabouços que combinem CB e HApresentam-se como um material altamente promissor para enxertos ósseos porque promovem a colonização por células quando implantados e degradam-se gradativamente enquanto são substituídos pelo novo tecido ósseo (HUTCHENS *et al.*, 2006).

Quando se deseja criar um sistema de cultivo celular tridimensional ou até mesmo um sistema de engenharia de tecidos, deve

ser considerado o tipo celular, o biomaterial escolhido e ainda, os sinais biológicos que devem ser fornecidos. Neste contexto, plasma rico em plaquetas (PRP) tem se destacado como uma fonte de fatores de crescimento com grande potencial e aplicabilidade. (ELISSEFF *et al.*, 2005)

#### 1.4 PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O plasma rico em plaquetas (PRP) define-se como uma porção do plasma sanguíneo com uma concentração plaquetária superior aos níveis de referência, obtida através de protocolos de centrifugação (DUAN *et al.*, 2011; MARX, 2004). Estão presentes no PRP, fatores de crescimento como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante  $\beta 1$  e  $\beta 2$  (TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$ ), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e prostaglandina  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) (CENNI *et al.*, 2010; KASTEN *et al.*, 2008). Assim, o PRP caracteriza uma fonte autóloga de fatores de crescimento e apresenta diversas vantagens sobre as fontes geralmente utilizadas (soro de animais ou fatores de crescimento recombinantes), essencialmente por causa de sua pronta disponibilidade e seu potencial clínico seguro e eficaz (FORMIGLI *et al.*, 2011).

Os fatores de crescimento relacionados ao PRP são pré-sintetizados e estocados nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas. A secreção destes fatores se inicia com o processo de formação do coágulo e consequente ativação plaquetária. Os grânulos se fundem com a membrana das plaquetas e os fatores são então secretados. Cerca de 95% dos fatores de crescimento pré-sintetizados são secretados dentro de 1 hora. Após a liberação inicial, as plaquetas sintetizam e secretam fatores de crescimento adicionais pelos, em média, sete dias restantes do seu ciclo de vida. Estudos têm demonstrado que as CTMs, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células epidermais expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento presentes no PRP. A ativação destes receptores resulta na expressão de sequências gênicas que controlam proliferação celular, síntese de colágeno e formação de matriz extracelular, estimulando o processo natural de cicatrização (GASSLING *et al.*, 2009; MARX, 2004).

O PRP demonstra ser efetivo na proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular, principalmente colágeno. Consequentemente, facilita o reparo tecidual, estimula a angiogênese, melhora a integração de enxertos, sejam eles ósseos,

cutâneos, cartilaginosos ou adiposos, bem como estimula a cicatrização de feridas(OKUDA *et al.*, 2003; VENDRAMIN *et al.*, 2009).

Recentemente, o uso do PRP tem ganhado considerável popularidade no proposito de liberação de fatores de crescimento locais a fim de promover a regeneração óssea (FENG *et al.*, 2010). O PRP vem sendo amplamente utilizado na área ortopédica, no tratamento de lesões em diversas disfunções ósseas, e também na área odontológica, em implantes dentários e cirurgias maxilofaciais. A sua utilização é segura e parece ter um efeito terapêutico benéfico, particularmente nas fases iniciais de formação óssea(ARVIDSON *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que melhores resultados *in vivo* são obtidos quando o PRP é utilizado juntamente com CTMs em biomateriais osteogênicos ou enxertos ósseos(HAKIMI *et al.*, 2010; KASTEN *et al.*, 2008; PANTOU *et al.*, 2012).

## 1.5 ENXERTOS ÓSSEOS

O tratamento de fraturas e perdas ósseas associadas com trauma e doenças musculoesqueléticas permanece como um significante desafio na área ortopédica. Tratando-se de regeneração óssea, atualmente, ossos autólogos, ossos alogênicos desmineralizados ou substitutos ósseos, caracterizam as alternativas utilizadas na prática(ZANETTA *et al.*, 2009).

A regeneração óssea é mediada por três elementos essenciais, a osteogênese, a osteoindução e a osteocondução, aliados a integração entre o enxerto e o osso hospedeiro, denominada osteointegração. O potencial osteogênico é representado por células progenitoras que podem proliferar e diferenciar para osteócitos, contribuindo para a ocupação do enxerto e regeneração do tecido. A osteoindução é proporcionada por fatores de crescimento que induzem a diferenciação dos osteoblastos precursores e também de CTMs presentes no tecido hospedeiro. Por fim, a osteocondução descreve as propriedades da superfície do enxerto em favorecer a adesão celular e formação do novo tecido(GIANNODIS *et al.*, 2005).

Os ossos autólogos, ou seja, de origem do próprio paciente, vêm sendo a alternativa mais empregada na área de regeneração óssea. O auto-enxerto é imunocompatível, possui propriedades osteocondutivas, osteoindutivas, e ainda osteogênicas (KOFRON, 2004). Embora os ossos autólogos ainda sejam considerados o padrão-ouro em transplantes, seu suprimento é limitado e geralmente exigem segundo procedimento cirúrgico para a obtenção do enxerto. Este procedimento

de coleta é invasivo e dolorido e ainda apresenta riscos de infecção e morbidade do sítio doador (O'KEEFE; MAO, 2011).

Ossos alogênicos, obtidos de um doador ou de banco de ossos, representam uma alternativa, particularmente em áreas com massiva perda óssea. Porém não estão livres de desvantagens. Por serem originados de um indivíduo geneticamente diferente, podem ser rejeitados e ainda, expor o paciente a patógenos infectantes (BERTOLDI *et al.*, 2010; O'KEEFE; MAO, 2011).

Uma série de substitutos ósseos está atualmente disponível e já são utilizados clinicamente. Entre estes estão os biomateriais como ossos desmineralizados e matrizes colagenosas e os materiais cerâmicos sintéticos como tricálcio fosfato, HAp e cimento de fosfato de cálcio. Estes substitutos podem oferecer propriedades como boa biocompatibilidade, reabsorção, suporte mecânico, estrutura semelhante ao osso natural e consequente osteocondutividade. Porém estes apresentam baixa, ou mesmo nenhuma, habilidade osteoindutiva e osteogênica (GIANNOUDIS *et al.*, 2005; O'KEEFE; MAO, 2011).

Um material ideal para regeneração do tecido ósseo, que não contenha limitações, ainda não foi desenvolvido. É consenso que o material ideal para enxerto ósseo deve exercer excelente biocompatibilidade, osteocondutividade, osteoindutividade, osteogenicidade e propriedades vasculogênicas. Uma das opções cirúrgicas mais promissoras é o uso de enxertos compostos, que aliam as propriedades estruturais dos substitutos ósseos à células osteogênicas e à fatores de crescimento osteoindutores (GIANNOUDIS *et al.*, 2005; SZPALSKI *et al.*, 2012).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a interação e viabilidade de CTMPs em biomateriais baseados em celulose bacteriana (HCB e compósito HCB-HAp).

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Padronizar o cultivo de CTMPs em HCB;
- Verificar a interação e viabilidade das CTMPs cultivadas em HCB;
- Analisar a interação e viabilidade das CTMPs cultivadas em compósitos HCB-HAp com diferentes ciclos de cálcio e fósforo, bem como determinar a concentração ideal destes minerais para cultivo celular;
- Analisar a influência do PRP na viabilidade e proliferação das CTMPs;



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados durante este trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através do número de protocolo 1962/11-CEPSH/PRPG.

#### 3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA

As placentas humanas foram obtidas em colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Estas foram coletadas, logo após o parto, de pacientes doadoras. Antes do parto as pacientes foram informadas quanto à seriedade e sigilo do projeto e autorizaram a coleta através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo 1). Somente foram selecionadas placentas oriundas de gestações a termo (37-42 semanas de gestação) e de mães com saúde qualificada, ou seja, pacientes que tiveram acompanhamento pré-natal e apresentaram sorologias negativas para rubéola, toxoplasmose, HIV e VDRL e nenhum indicativo de doenças gestacionais como diabetes e pressão alta (eclampsia) ou malformações. Estas foram encaminhadas para o Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular (LACERT – CCB/UFSC), onde foram processadas em ambiente estéril.

Para o isolamento CTMPs utilizou-se uma porção do córion próxima à inserção do cordão umbilical. Primeiramente, o âmnio foi retirado mecanicamente e o córion foi separado da decídua. Vasos proeminentes e coágulos foram cuidadosamente retirados e o fragmento restante foi lavado várias vezes com tampão fosfato salino (PBS). Sequencialmente, o fragmento de córion foi cortado em pequenos fragmentos e incubado em dispase (2,4U/mL, BD) por 8 minutos a 37°C para a remoção da camada trofoblástica. Após este período, realizou-se um rápido pulso de centrifugação (15 segundos) para sedimentação dos fragmentos e o sobrenadante foi descartado. Os fragmentos remanescentes foram submetidos à digestão enzimática com Colagenase IA (93,75 U/mL, Sigma) por 1 hora a 37°C. Decorrido o tempo de incubação, os fragmentos digeridos foram filtrados em *CellStrainer* 70µm (BD) e ao filtrado adicionou-se IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Invitrogen) suplementado com penicilina/estreptomicina (PS, 1U/µg, Gibco) e 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab) para bloqueio das enzimas por 5 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação (300 X g), as células que

formaram o *pellet* foram ressuspendidas em IMDM suplementado com PS e 10% SBF e novamente centrifugadas (300 X g) para eliminação de resíduos de enzima. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspendidas em IMDM suplementado com PS e 10% SBF e então plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm<sup>2</sup> (Corning) e mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 ou 3 dias o meio de cultura foi trocado e as células não aderentes descartadas. As CTMPs foram selecionadas pela adesão ao plástico e o meio de cultivo renovado periodicamente a cada 3 ou 4 dias. Assim que as células formaram uma monocamada com aproximadamente 80% de confluência, foram submetidas ao processo de tripsinização, utilizando-se tripsina/EDTA 0,05% (Gibco) para descolar as células da garrafa. As células contidas em uma garrafa foram divididas e replaqueadas em duas garrafas para expansão (passagem1). Este processo é repetido até a passagem4 ou 5, sendo estas as passagens utilizadas para os experimentos.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA

A fim de confirmar as características mesenquimais das células isoladas, foi realizada análise morfológica em microscópio de contraste de fase (Olympus CK40), buscando a visualização de células aderentes com morfologia fibroblastóide. Além disso, ainda foram realizados ensaios de imunofenotipagem e diferenciação para os fenótipos adipogênico e osteogênico, conforme descritos a seguir.

#### 3.2.1 Imunofenotipagem

A caracterização dos antígenos de superfície da população de células cultivadas foi realizada através de citometria de fluxo. Para isso, foram utilizados os anticorpos conjugados a fluorocromos descritos na tabela 2. Anticorpos anti-IgG1 conjugados aos mesmos fluorocromos foram utilizados como controles isotípicos. Para os marcadores CD34 e CD45 foram utilizadas células mononucleares como controle positivo, uma vez que as CTMPs devem ser negativas para tais marcadores de superfície.

Inicialmente as células foram tripsinizadas, contadas e ajustadas para 2x10<sup>6</sup> células/mL em PBS suplementado com 10% de SBF. Aliquotas de 50µL (10<sup>5</sup> células) foram distribuídas nos tubos previamente identificados com os diferentes marcadores ou isotipos. Em

seguida, os anticorpos conjugados ou isotipos foram adicionados aos devidos tubos e incubados durante 1h a 4°C protegido de luz. Após o período de incubação das amostras foram efetuadas duas lavagens adicionando 2mL de PBS suplementado com 10% de SBF a cada tubo e centrifugando-os a 300 X g por 5 minutos. Ao final, os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 100µL de PBS suplementado com 10% de SBF e procedeu-se a análise.

As análises das amostras foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB – CCB/UFC) utilizando o citometro de fluxo FACSCanto II (BD), os dados foram gerados pelo *software* FACSDiva 6.0 e analisados pelo *software* FlowJo.

**Tabela 2:** Marcadores de superfície utilizados na citometria de fluxo

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo conjugado</b>	<b>Concentração utilizada</b>
Anti-CD34	PE ( <i>Phycoeritrin</i> )	5µL
Anti-CD45	FITC ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )	5µL
Anti-CD73	PE ( <i>Phycoeritrin</i> )	5µL
Anti-CD90	FITC ( <i>Fluorescein isothiocyanate</i> )	1µL
Anti-CD105	PerCP ( <i>Peridinin chlorophyll protein complex</i> )	5µL

(Todos anticorpos utilizados são da marca BD)

### 3.2.2 Diferenciação

Para os ensaios de diferenciação foram usadas CTMPs entre as passagens 4 e 5. Estas foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) e após atingirem confluência aproximada de 80% foram induzidas a diferenciação adipogênica e osteogênica. Para isto, o meio de cultivo foi totalmente removido e substituído pelo respectivo meio de indução - adipogênico ou osteogênico. Para controle, o mesmo número de poços foi mantido simultaneamente com o meio IMDM acrescido de PS e 10% de SBF. Em ambos os tratamentos, os meios indutor e controle foram trocados a cada 2 ou 3 dias durante aproximadamente 24 dias e as culturas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2.1 Diferenciação Adipogênica

O meio indutor adipogênico é composto de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen) suplementado com PS e 10% SBF,  $10^{-8}$ M de dexametazona (Sigma), 2,5 $\mu$ g/mL de insulina (Sigma), 100 $\mu$ M de indometacina (Sigma) e 0,5mM de 3-isobutil-metilxantina (Sigma).

O fenótipo adipogênico foi confirmado pela presença de gotículas lipídicas intracelulares observadas pela técnica de coloração com *Oil Red O* (Sigma). Para isso, o meio indutor foi retirado, as culturas foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma) durante 30 minutos. A solução corante *Oil Red O* foi colocada sobre os poços tratados e controles durante 5 minutos em temperatura ambiente, após este período os poços foram lavados com PBS para retirada do excesso de corante e as células observadas em microscopia de contraste de fase. Os acúmulos lipídicos corados de vermelho-alaranjado identificaram a diferenciação adipogênica.

### 3.2.2.2 Diferenciação Osteogênica

O meio indutor osteogênico é composto de DMEM suplementado com PS e 10% SBF, 50 $\mu$ g/mL de ácido ascórbico (Sigma), 3,15mg/mL de  $\beta$ -glicerolfosfato (Sigma) e  $10^{-8}$ M de dexametazona (Sigma).

A diferenciação osteogênica foi detectada pela observação de depósitos de cálcio extracelular através da coloração com *Alizarin Red S* (Sigma). Após o período de tratamento, o meio indutor foi retirado, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% e então incubadas com o corante *Alizarin Red S* por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com PBS para retirada do excesso de corante e analisados em microscopia de contraste de fase para visualização de matriz extracelular calcificada corada de vermelho.

## 3.3 PRODUÇÃO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA

Os HCB bem como os compósitos HCB-HAp foram desenvolvidos em parceria com os laboratórios Laboratório de Tecnologias Integradas (Intelab, CTC, UFSC) e Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos (LBBMM, CCB, UFSC), seguindo os protocolos estabelecidos em Recouvreux (2008).

Para a produção dos HCBs foi utilizada a bactéria *Gluconacetobacter hansenii*, linhagem ATCC 23769, obtida da "Coleção da Cultura Tropical (CCT)", gentilmente fornecida pela Fundação André Tosello, Campinas – SP

As bactérias foram mantidas em meio de cultivo constituído de manitol (25 g/L), extrato de levedura (5g/L) e bactopectona (3g/L). Para produção dos HCBs, adicionou-se ao meio de cultivo 5% do inóculo preparado previamente contendo as bactérias. Alíquotas de 100µl da solução meio de cultivo e bactéria foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços (Corning) que serviram de molde para a formação do hidrogel. As placas foram mantidas fechadas em temperatura ambiente por um período de sete dias. Decorrido o tempo de cultivo, os hidrogéis foram coletados e submetidos ao tratamento de purificação, o qual consiste na imersão dos HCBs em uma solução de NaOH a 0,1 M por 24 horas, para remover as impurezas bacterianas e os eventuais resíduos contaminantes. Após esse tratamento os HCBs foram lavados com água destilada até atingir pH neutro, autoclavados e armazenada em PBS sob refrigeração para uso futuro.

### **3.3.1 Análise da microestrutura do hidrogel de celulose bacteriana**

A fim de verificar a microestrutura dos HCB, estes foram submetidos à análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Primeiramente as amostras foram fixadas com fixador Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão Cacodilato de sódio 0,1M) durante 4 horas em temperatura ambiente, submetidas a três lavagens de 15 minutos com tampão Cacodilato de sódio 0,1M, pós-fixadas com tetróxido Ósmio 1% por uma hora e novamente lavadas com Cacodilato de sódio 0,1M. Posteriormente, foi realizado o processo de desidratação em sequência de álcool em concentrações crescentes (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), as amostras foram incubadas em cada série durante 20 minutos, a última etapa (álcool 100%) foi repetida três vezes. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de CO<sub>2</sub> (Leica EM CPD 030), neste processo as partículas de álcool são substituídas por CO<sub>2</sub>. Ao final, as amostras foram metalizadas com uma cobertura de ouro de 30nm (metalizador Sputter Leica EM SCD 500) e então analisadas no microscópio eletrônico de varredura por captura de elétrons secundários em 15kV (Jeol JSM-6390LV). Os procedimentos de secagem em ponto crítico, a metalização e as análises no MEV foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### 3.3.2 Padronização do cultivo das células-tronco mesenquimais de placenta humana no hidrogel de celulose bacteriana

Para avaliar a condição de cultivo ideal e a concentração celular, foram testadas quatro condições diferentes de cultivo (Tabela 3) em quatro concentrações celulares.

**Tabela 3:** Condições de cultivo celular em HCB testadas

<b>Condição</b>	<b>Descrição</b>
<b>1 (HP)</b>	<b>Hidrogel puro:</b> HCBs foram colocados nos poços (placa de 96 poços) e as células foram plaqueadas sobre estes.
<b>2 (HM)</b>	<b>Hidrogel com meio:</b> HCBs foram imersos em meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SBF durante 4 horas, a fim de incorporar o meio nos hidrogéis. Após este período as células foram plaqueadas sobre os hidrogéis.
<b>3 (HD)</b>	<b>Hidrogel desidratado:</b> HCBs foram colocadas nos poços, deixados dentro do fluxo por 24 horas para desidratação. Após, as células foram adicionadas sobre os hidrogéis.
<b>4 (HDM)</b>	<b>Hidrogel desidratado com meio:</b> HCBs foram colocados nos poços, deixados dentro do fluxo por 24 horas para desidratação. Após este período, os hidrogéis foram colocados em meio IMDM acrescido com 10% de SBF durante 4 horas para uma possível reidratação com meio de cultivo. Finalmente, as células foram adicionadas sobre os hidrogéis.

Todas as condições acima foram testadas em duplicata nas quatro concentrações celulares:  $3,75 \times 10^3$ ;  $7,5 \times 10^3$ ;  $1,5 \times 10^4$  e  $3 \times 10^4$  células/poço. As células foram adicionadas a cada condição em 20  $\mu$ L de suspensão com meio IMDM+10%SBF, deixadas aderir por 2 horas e após foi adicionado mais 130  $\mu$ L de meio em cada poço. Realizou-se acompanhamento da morfologia celular e troca periódica dos meios durante sete dias. Após este período, as células cultivadas nos hidrogéis foram fixadas com paraformaldeído 4%, fotografadas em microscopia de contraste de fase. Para melhor visualização das mesmas, realizou-se coloração do núcleo com DAPI (50ng/mL, Sigma) e análise em microscópio confocal(Leica DMI6000) no LCME da UFSC.

### 3.3.2.1 Ensaio de viabilidade celular nas diferentes condições

Em experimento independente, foi aplicado o ensaio de MTS (Promega) para verificação da viabilidade celular nas condições descritas acima. O ensaio de MTS é um método colorimétrico baseado na biorredução do composto MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium], na presença de um acoplador de elétrons (etosulfato de fenanzina-PES) em um produto cromogênico solúvel em meio de cultura (formazan). Este processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, podendo ser medida em termos de absorbância. Em nossos experimentos, o MTS foi incubado durante 4 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e para leitura da absorbância realizada em leitora de placas (Tecan Infinite M200) em comprimento de onda ajustado para 490nm. Para evitar interferências de células que, por ventura, tenham aderido ao plástico, os HCBs foram transferidos para novos poços antes da incubação com MTS.

Para definição do método de cultivo foram analisadas a morfologia e viabilidade das células cultivadas em cada condição.

### 3.3.3 Avaliação da interação célula-hidrogel

#### 3.3.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de MEV foi empregada para verificar a capacidade de adesão e morfologia das CTMPs nos HCBs. Para isso as células foram cultivadas no hidrogel durante sete dias, conforme condição 2(HM) descrita no item 3.3.2, fixadas e preparadas conforme descrito no item 3.3.1 e então submetidas à análise em MEV.

#### 3.3.3.2 Microscopia confocal

Para verificar a interação e a capacidade de migração das CTMPs para o interior dos HCBs, lançou-se mão da microscopia confocal. Para visualização das células foi realizada marcação das mesmas utilizando anticorpos específicos para  $\beta$ -tubulina e  $\alpha$ -SMA, expressão dos quais já foi previamente testada nestas células em nosso laboratório (JEREMIAS, 2009).

As CTMPs foram cultivadas nos hidrogéis durante sete dias, conforme condição 2(HM) descrita no item 3.3.2, e a marcação celular foi feita através da técnica de imunocitoquímica. Após fixação com

paraformaldeído 4% por 30 minutos, as amostras foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF em PBS durante uma hora e após lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários específicos. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período de 14 horas a 4°C e, após este período, procederam-se três lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%). Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos durante uma hora. Os anticorpos primários e respectivos secundários conjugados estão descritos na tabela 4. Após nova lavagem com PBS-Tween, as células foram incubadas com DAPI (50ng/mL) durante 15 segundos, à temperatura ambiente, para marcação dos núcleos. Por fim os HCB foram incubados com Calcofluor (2μL/mL, Sigma) por um minuto para marcação do HCB e então analisadas em microscópio confocal.

**Tabela 4** Anticorpos primários e secundários utilizados nas reações imunocitoquímicas

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo secundário</b>
Anti-αSMA (anti alfa actina de músculo liso)	Anti-IgG2a de camundongo conjugado a Alexa 594
Anti-β-tubulina III	Anti-IgG1 de camundongo conjugado a Alexa 488

### 3.4 PRODUÇÃO DO COMPÓSITO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA E HIDROXIAPATITA

Para a preparação do compósito HCB-HAp foi utilizado o protocolo estabelecido por Hutchens et al. (2006) com modificações.

Os HCBs, produzidos conforme descrito no item 3.3, foram incubados por 24 horas a temperatura ambiente em solução de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>– 100mM) com pH ajustado em 4,83. Subsequentemente, as amostras foram lavadas com água destilada e novamente incubadas por mais 24 horas, sob as mesmas condições, em solução de fosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 60mM), com pH ajustado em 8,36. Este processo de incubação com CaCl<sub>2</sub> e posterior incubação com Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> visa a formação de HAp sobre o HCB e foi denominado ciclo de HAp. Foram realizados cinco ciclos de HAp e foram retiradas amostras de cada ciclo para a avaliação da melhor concentração de HAp para cultivo de CTMPs. Os compósitos foram identificados como HCB-HAp1,

HCB-HAp2, HCB-HAp3, HCB-HAp4 e HCB-HAp5 de acordo com o número de ciclos que foram submetidos.

A análise dos elementos químicos dos compósitos, bem como a quantificação dos minerais Ca e P, foram realizadas através de espectroscopia por dispersão de energia (EDS – *Energy Dispersive System*), que possibilita a determinação da composição química qualitativa e semi-quantitativa das amostras a partir da emissão de raios X característicos. A técnica de EDS é uma ferramenta do MEV, portanto foram utilizadas as amostras preparadas para este, como descrito a seguir.

### **3.4.1 Avaliação da interação célula-compósito HCB-HAp**

Para avaliação da interação entre as CTMPs e os compósitos HCB-HAp as células foram cultivadas, conforme condição 2(HM) descrita no item 3.3.2, durante sete dias nos compósitos de cada ciclo de HAp. Assim, como nos cultivos feitos nos HCB, a análise foi feita por MEV e microscopia confocal, o preparo das amostras foi feito conforme itens 3.3.1 e 3.3.2.2, respectivamente.

### **3.4.2 Ensaio de viabilidade celular nos compósitos HCB-HAp**

Para verificar a viabilidade das CTMPs cultivadas nos compósitos HCB-HAp de cada ciclo de cálcio e fósforo, foi realizado o ensaio de MTS. As células foram cultivadas em cada compósito em triplicada e então foi aplicado o ensaio conforme o item 3.3.2.1

## **3.5 CULTIVO CELULAR COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS**

### **3.5.1 Preparo do plasma rico em plaquetas**

O PRP foi preparado de acordo com Vendramin *et al.* (2009) com algumas modificações. Coletou-se sangue periférico de doadores mediante apresentação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE2 – Anexo 2). De cada doador foram coletados 8 mL de sangue distribuídos em dois tubos de coleta contendo EDTA. Para compensar as diferenças individuais nos níveis de fatores de crescimento, o PRP foi preparado com um *pool* de quatro doadores.

As amostras foram submetidas à centrifugação a 400 X g por 10 minutos, que resultou na formação de duas colunas: uma inferior contendo as hemácias e uma superior contendo plasma e plaquetas,

separadas por uma faixa esbranquiçada, denominada zona da névoa, contendo os leucócitos e plaquetas maiores. O plasma foi coletado até a zona da névoa e deste plasma foi reservado 200 µL de cada tubo para preparo da trombina autóloga, e o restante foi colocado em tubo estéril e centrifugado a 800 X g por 10 minutos. A segunda centrifugação resultou em um concentrado (*pellet*) de plaquetas no fundo do tubo. Deste retirou-se 2/3 do sobrenadante, que é denominado plasma pobre em plaquetas (PPP), e as plaquetas no fundo foram ressuspensas no restante do plasma, contadas e ajustadas para  $10^9$  plaquetas/mL utilizando o PPP, caso necessário. Este concentrado de plaquetas foi considerado PRP.

Para ativação do PRP e liberação dos fatores de crescimento foi utilizado trombina autóloga na concentração de 1:5. Para preparar a trombina autóloga foi adicionado 250µL de Gluconato de Cálcio 10% para cada 1mL de plasma (retirado após a primeira centrifugação) e mantido a 37°C por 15 minutos, ocorrendo a gelificação do plasma. Após, o gel formado foi submetido à centrifugação a 800 X g por 10 minutos, o que resultou na separação de um líquido claro onde continha a trombina.

Essa trombina autóloga foi adicionada ao PRP e minutos após formou-se um gel de PRP resultante da formação do coágulo. Uma vez que o PRP foi utilizado em forma líquida juntamente com o meio de cultura, o gel formado foi submetido à centrifugação a 800 X g por 10 minutos, resultando em um precipitado do coágulo e um líquido contendo os fatores, denominado PRP ativado.

### **3.5.2 Quantificação dos fatores de crescimento presentes no plasma rico em plaquetas**

As concentrações dos fatores de crescimento TGF-β1, PDGF-BB e IGF-I contidos no PRP foram mensuradas através do método de ELISA utilizando kits específicos para cada fator de crescimento (R&D Systems) e procedimentos conforme instruções do fabricante. Brevemente, padrões e amostras foram pipetados nos poços contendo anticorpo primário específico para cada fator de crescimento e incubado por tempo determinado para cada fator. Após a remoção de moléculas não ligadas e lavagem com tampão específico, um segundo anticorpo específico conjugado a uma enzima foi adicionado aos poços e novamente incubado por tempo determinado para cada fator. Posteriormente à lavagem, um substrato que reage com a enzima foi adicionado gerando um produto cromogênico. A intensidade de cor,

proporcional a quantidade de antígeno presente, foi mensurada em leitora de placas (Tecan Infinite M200) em comprimento de onda de 450nm.

### **3.5.3. Avaliação dos efeitos do plasma rico em plaquetas sobre a viabilidade e proliferação celular**

Para avaliar os efeitos do PRP sobre a viabilidade e proliferação celular, CTMPs foram cultivadas com diferentes concentrações de PRP.

Para isto, as CTMPs foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^3$  células/poço em IMDM suplementado com 10% de SBF durante 24 horas para permitir a aderência e garantir as mesmas condições celulares em todos os poços. Após este período o meio de cultivo foi totalmente removido substituído por IMDM com 2%, 5%, 10% ou 15% de PRP, para fim de comparação foram mantidos poços com IMDM suplementado com 10% de SBF bem como IMDM livre de SBF. Todas as condições foram cultivadas em triplicata e foram realizados três experimentos independentes.

O ensaio de viabilidade por MTS foi realizado conforme o item 3.3.2.1 após três dias de cultivo nas condições experimentais descritas acima.

A proliferação foi analisada 24 horas após a substituição dos meios através do ensaio de incorporação de BrdU (5-bromo-2-deoxiuridina), que corresponde a um análogo da timidina que incorpora-se ao DNA das células que estão proliferando. As células cultivadas com PRP (2%, 5%, 10% ou 15%) bem como os controles (10% SBF e IMDM livre de SBF) foram incubadas com BrdU (1:100, Invitrogen) pelo período de 24 horas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com água destilada e então as células foram incubadas em ácido clorídrico 2N por 30 minutos a 37°C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e submetidas à marcação imunocitoquímica (descrita no item 3.3.3.2) utilizando o anticorpo primário anti-BrdU e em seguida anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo conjugado a Alexa 488.

O experimento foi realizado em triplicata e, ao total, foram analisados 12 diferentes campos de cada condição experimental. A proliferação celular foi expressa como proporção de células BrdU positivas em relação ao número total de células, obtido por contagem direta dos núcleos corados com DAPI.

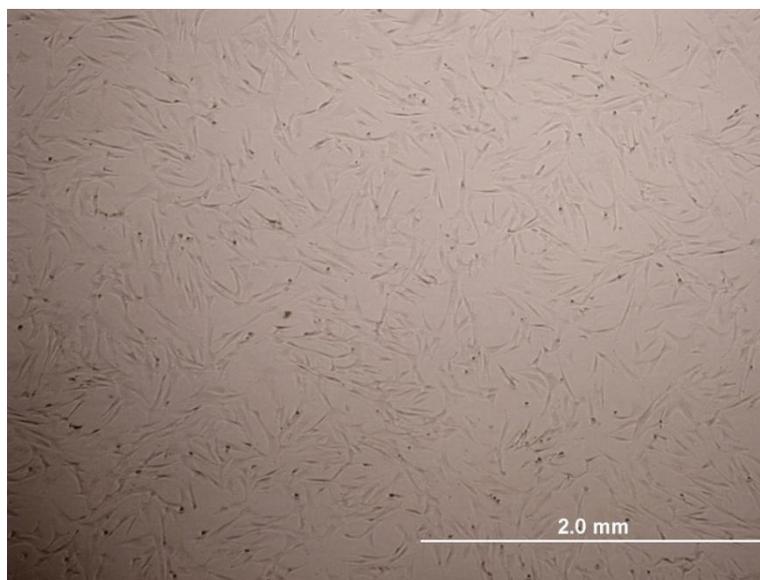
### 3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de teste de múltipla comparação de Bonferroni pelo programa Graphpad Prism5. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA

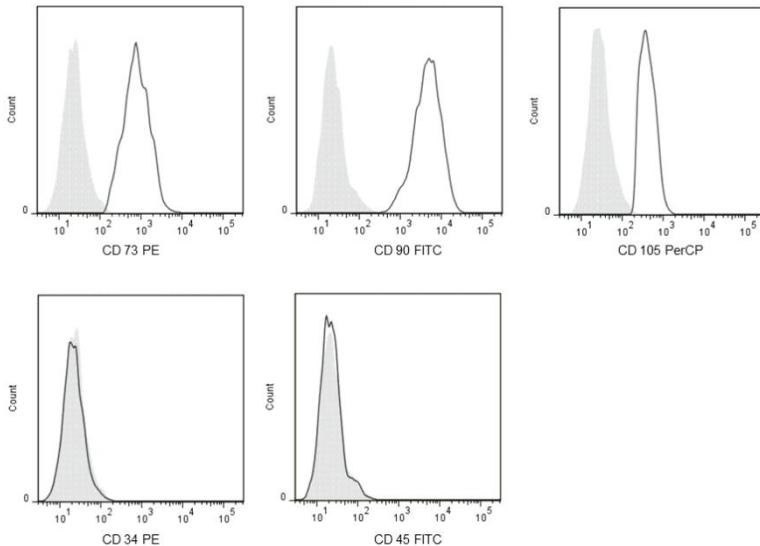
As CTMPs foram isoladas pela sua característica de aderência ao plástico após dissociação mecânica e digestão enzimática, e então analisadas quanto a suas características mesenquimais. A análise morfológica das células foi realizada rotineiramente em todas as amostras durante os processos de expansão e manutenção das culturas. Observamos que as células formaram monocamadas de células com morfologia fibroblastoide, como demonstrado na figura 4.



**Figura 4 Morfologia fibroblastoide das CTMPs** Fotografia representativa das culturas de CTMPs (passagem 5) visualizadas em microscópio de contraste de fase com aumento de 40x.

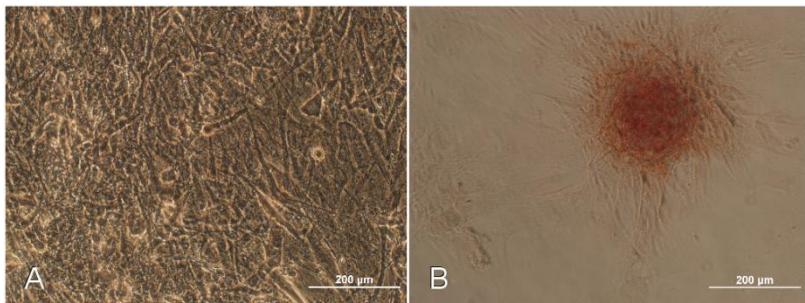
Além disso, as CTMPs foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para isso, foram utilizadas culturas de três placentas e estas células foram analisadas quanto à expressão dos marcadores de superfície CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105. Todas as amostras se mostraram uniformemente positivas para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e negativas para os marcadores de linhagem

endotelial e hematopoiética CD34 e CD45 (Figura5). Como controle do experimento, foram utilizadas células mononucleares positivas para os marcadores CD34 e CD45, o que nos permitiu validar a ausência da expressão de tais marcadores nas CTMPs.

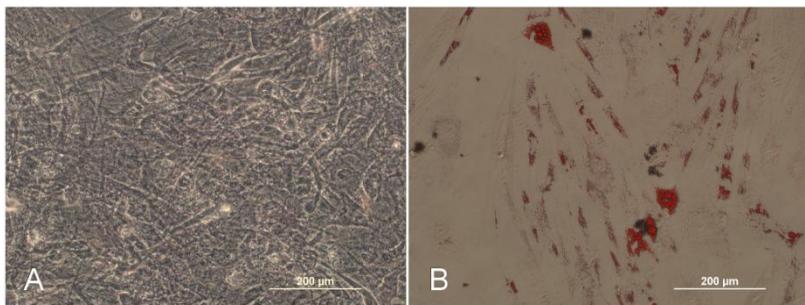


**Figura 5 Caracterização imunofenotípica das CTMPs:** Representação em histogramas do perfil imunofenotípico das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD105-PerCP, CD34-PE e CD45-FITC.

E ainda, foram realizados ensaios de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico, pelo cultivo em meio indutor específicos de cada fenótipo. A diferenciação osteogênica foi evidenciada pela presença de depósitos de cálcio extracelular após coloração com *Alizarin Red S*, o que não foi observado nos controles mantidos com o meio de cultivo convencional sem suplementos (Figura 6). Já a diferenciação adipogênica foi comprovada pela presença de acúmulos lipídicos no interior das células corados com *Oil Red O*, também ausentes nos controles (Figura 7).



**Figura 6** Diferenciação osteogênica: Imagens representativas dos ensaios de diferenciação osteogênica coradas com *Alizarin Red S* e fotografadas em microscópio contraste de fase com aumento de 200x. (A) Controle, células mantidas em IMDM 10% SBF. (B) Células tratadas com meio indutor osteogênico (DMEM, 10% SBF, ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerolfosfato e dexametasona).

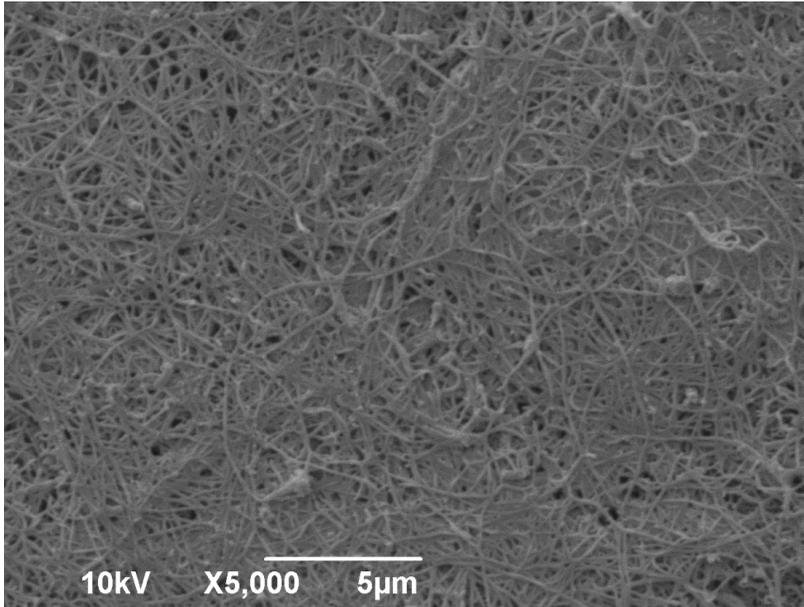


**Figura 7** Diferenciação adipogênica: Imagens representativas dos ensaios de diferenciação adipogênica coradas com *Oil Red O* e fotografadas em microscópio contraste de fase com aumento de 200x. (A) Controle células mantidas em IMDM 10% SBF. (B) Células tratadas com meio indutor adipogênico (DMEM, 10% SBF, dexametasona, insulina, indometacina e isobutilmetilxantina).

#### 4.2 MICROESTRUTURA DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA

A microestrutura dos hidrogéis foi analisada através de observações de MEV (Figura 8). Podemos observar que o hidrogel é composto por uma rede de nanofibras de celulose que formam poros

interconectados. A ausência de bactérias evidencia que o tratamento de purificação do HCB para eliminar as bactérias produtoras das nanofibras foi eficaz.



**Figura 8 Microestrutura do HCB:** Micrografia de MEV da superfície do HCB, mostrando a rede de nanofibras de celulose que compõe o hidrogel.

#### 4.3 PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMIAIS DE PLACENTA HUMANA EM HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA

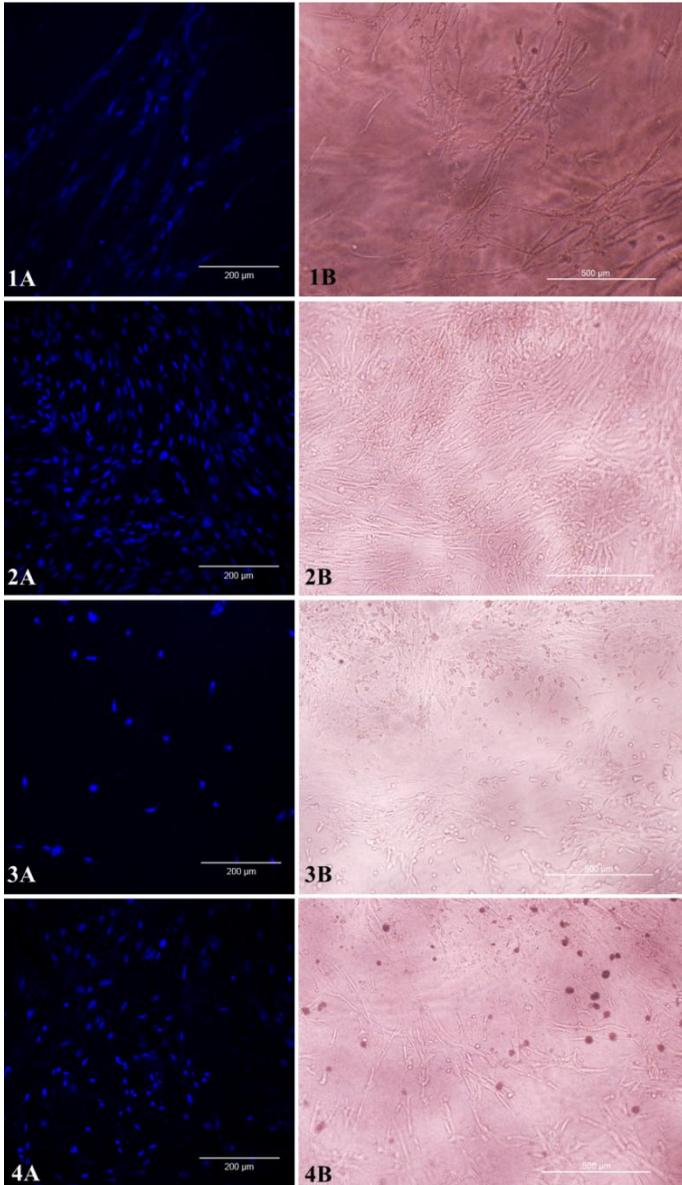
Como cultivo celular em HCB não era uma técnica utilizada em nosso laboratório foi necessário realizar sua padronização. Primeiramente buscamos determinar a quantidade ideal de células a serem cultivadas nos hidrogéis produzidos em placas de cultura de células de 96 poços ( $0,36 \text{ cm}^2$ ). Para isso, testamos quatro diferentes concentrações celulares ( $3,75 \times 10^3$ ;  $7,5 \times 10^3$ ;  $1,5 \times 10^4$  e  $3 \times 10^4$  células/poço) e observamos que uma concentração intermediária a  $7,5 \times 10^3$  e  $1,5 \times 10^4$  proporcionaria uma melhor distribuição das células nos HCBs. Desta forma passamos a utilizar  $1 \times 10^4$  células/poço.

Além disso, testamos quatro diferentes condições de cultivo com variações no preparo do hidrogel e na forma de aplicação das células, conforme descritas na tabela 3 do item 3.3.2. A figura 9 mostra a adesão e morfologia das células cultivadas nas diferentes condições e observadas em microscópio confocal após coloração dos núcleos com DAPI (imagens A) e em microscópio de contraste de fase (imagens B). Já o gráfico representado na figura 10, mostra a viabilidade celular analisada pelo ensaio de MTS. Não houve diferenças significantes na viabilidade celular independente da composição do substrato utilizado para o cultivo celular.

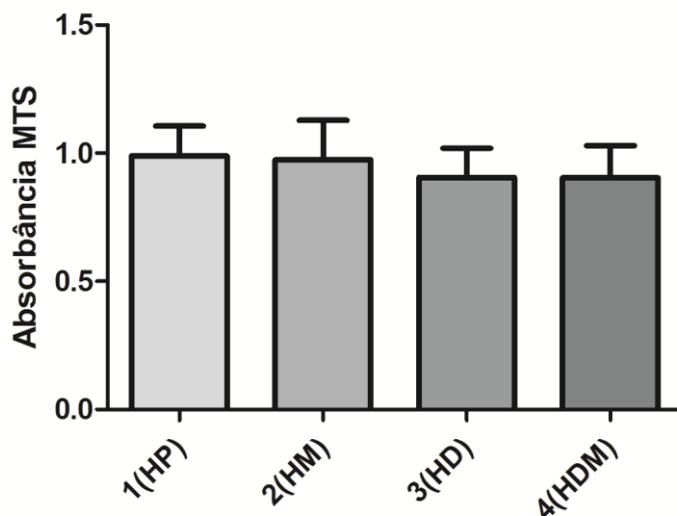
Nas condições em que os hidrogéis foram incorporados com meio de cultivo IMDM suplementado com 10% de SBF (condições 2 e 4), observamos um aparente aumento no número de células aderidas (figura 9 - imagens 2A/2B e 4A/4B). Entretanto, comparando a morfologia das células cultivadas nas condições 2 e 4, observamos que na condição 2 as células apresentaram morfologia mais próxima à característica de CTMPs.

Os hidrogéis desidratados e posteriormente reidratados com meio de cultivo não recuperaram sua conformação tridimensional original, como pode ser observado na figura 11.

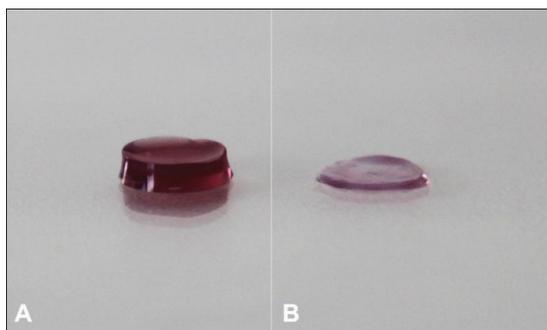
A partir destes resultados, optamos por utilizar a condição 2(HM) nos experimentos seguintes. Resumidamente, a metodologia padronizada para o cultivo de CTMPs em HCB consiste na incorporação de meio de cultivo aos biomateriais, através da imersão destes em IMDM suplementado com 10% SBF durante quatro horas. Em seguida, aplicação de 20 $\mu$ L da suspensão celular ( $1 \times 10^4$  células) e incubação durante duas horas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final, adição de 130 $\mu$ L de IMDM suplementado com 10% SBF e trocas de meio de cultivo a cada três ou quatro dias.



**Figura 9 Condições de cultivo:** CTMPs cultivadas em HCB em diferentes condições, descritas na tabela 3 do item 3.3.2:(1A e 1B) condição 1 (HP), (2A e 2B) condição 2 (HM), (3A e 3B) condição 3 (HD), (4A e 4B) condição 4 (HDM). Imagens A microscopia confocal com marcação do núcleo com DAPI e imagens B microscopia de contraste de fase com aumento de 100x.



**Figura 10 Representação gráfica da viabilidade celular nas diferentes condições de cultivo:** Ensaio de MTS das células cultivadas nas diferentes condições descritas na tabela 3 do item 3.3.2. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. Análise estatística realizada por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni.



**Figura 11 Macroestrutura HCB:** (A) HCB em sua conformação original após 4 horas de imersão em meio de cultivo. (B) HCB desidratado durante 24 horas em temperatura ambiente e submetido à imersão em meio de cultivo durante 4 horas, demonstrando a alteração de sua conformação tridimensional.

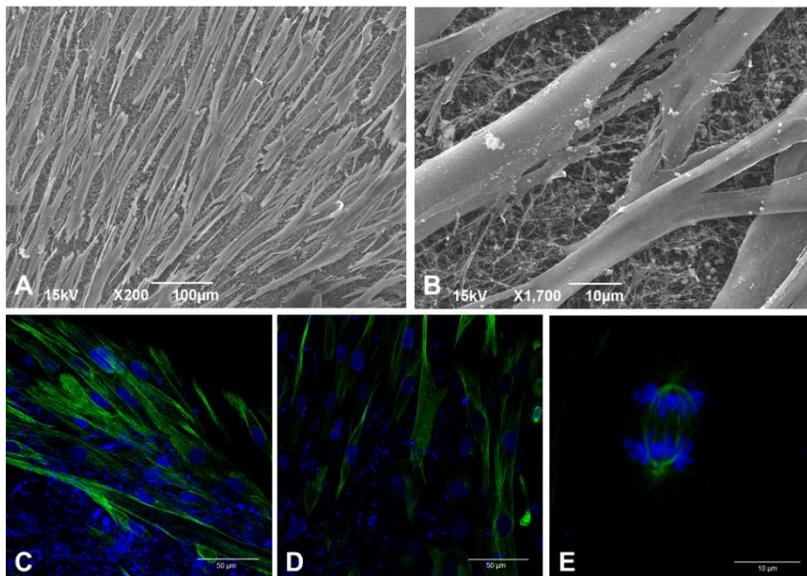
#### 4.4 INTERAÇÃO CÉLULA-HCB

A interação entre as CTMPs e os HCBs foi analisada em termos de capacidade de adesão e morfologia adquirida, através da técnica de MEV. Observamos que as células têm a capacidade de aderir sobre o hidrogel, estabelecendo pontos de adesão focal e apresentando a morfologia fibroblastóide característica (Figuras 12 A e B).

Também avaliamos a capacidade de migração das células para o interior do hidrogel, por meio de análises em microscópio confocal. Através da projeção máxima do eixo Z, uma ferramenta que sobrepõe imagens de um eixo perpendicular ao plano, analisamos a profundidade máxima do HCB onde foi possível visualizar células e assim, determinamos a capacidade de migração celular. Em nossos experimentos, esta análise foi feita a partir da superfície do HCB onde as células foram plaqueadas (Figura 12D) seguindo perpendicularmente para o interior do hidrogel, sendo possível observar a presença de células até uma profundidade de 15 $\mu$ m. Na imagem de máxima projeção (Figura 12C) podemos observar que a maioria das células encontra-se na superfície do hidrogel, porém em alguns pontos percebemos a presença de celulose (corada em azul) sobre as células.

Este resultado, juntamente com as micrografias de MEV, demonstra que as células tendem a aderir na superfície do HCB, interagindo com as fibras mais superficiais e apresentando pequena capacidade de migração para o interior hidrogel.

Durante as análises em microscopia confocal, observamos células em fase de divisão celular (Figura 12E), o que comprova que a proliferação celular ocorre no HCB.



**Figura 12 Interação célula-HCB:** (A e B) Micrografias de MEV, em (A) aumento de 200x, mostra uma visão geral da adesão celular no HCB e em (B) aumento de 1700x, mostra detalhes da adesão celular no HCB. (C, D e E) Microscopia confocal, em (C) máxima projeção (sobreposição) do eixo Z, mostrando pequena capacidade de migração, em (D) células aderidas na superfície do HCB e em (E) detalhe de uma célula cultivada em HCB em fase divisão. Marcação imunocitoquímica: Anti- $\beta$ -tubulina III conjugado a Alexa 488 (verde), coloração de núcleo com DAPI (azul) e celulose marcada com Calcofluor (fundo azul).

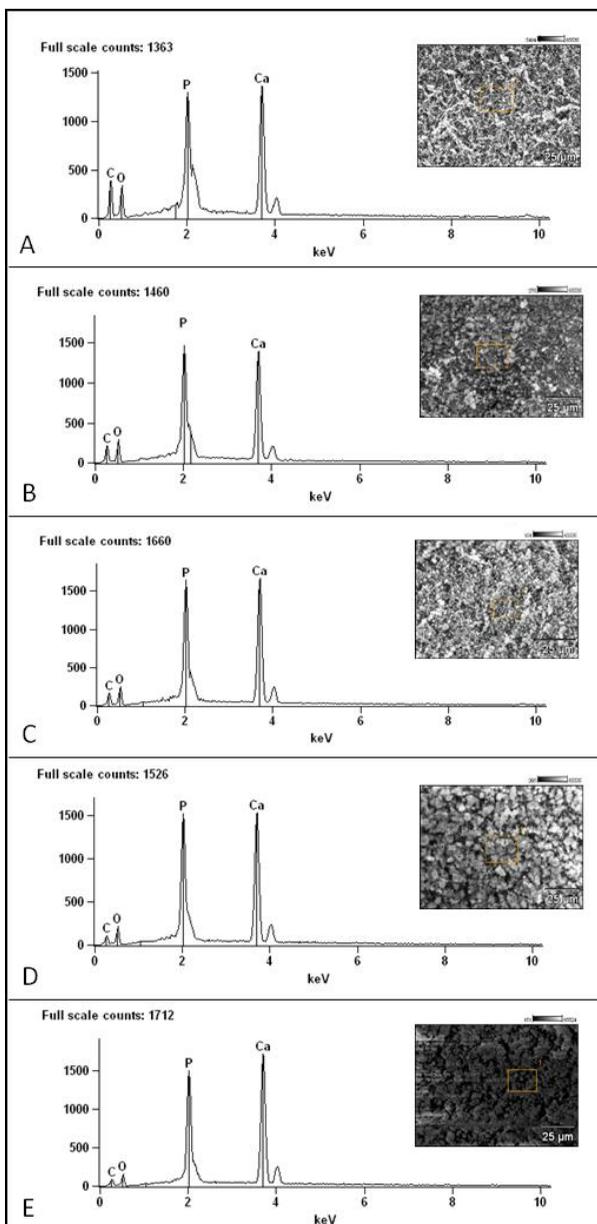
#### 4.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS COMPÓSITOS HCB-HAP

Os compósitos HCB-HAP foram analisados quanto à sua composição química por EDS, uma ferramenta acoplada ao MEV que possibilita a determinação qualitativa e semi-quantitativa da composição química dos compósitos. Os resultados representados na figura 13, indicam que os cinco compósitos (diferentes ciclos HAp) apresentam os compostos químicos inorgânicos cálcio (Ca) e fósforo (P), o que sugere a deposição de HAP à superfície das nanofibras do HCB. Além disso, verifica-se no espectro de EDS a presença de carbono (C) e oxigênio (O) correspondente às nanofibras de celulose, constituinte base do hidrogel. A tabela 5 apresenta o percentual de átomos de Ca e P, bem como a razão Ca/P de cada compósito.

As micrografias obtidas por MEV (Figuras 13 A-E) mostram que a precipitação de HAp foi distribuída homogeneamente na superfície das nanofibras do HCB. No entanto, pode-se observar um aumento do número de partículas de HAp ao longo dos ciclos da síntese biomimética. Este resultado vai ao encontro aos espectros de EDS que mostram um aumento na intensidade dos picos de Ca e P.

**Tabela 5:** Composição química dos compósitos HCB-HAp

	<b>HCB-HAp1</b>	<b>HCB-HAp2</b>	<b>HCB-HAp3</b>	<b>HCB-HAp4</b>	<b>HCB-HAp5</b>
<b>% átomos Ca</b>	14,51	16,49	22,65	26,25	31,96
<b>% átomos P</b>	5,86	9,63	11,28	13,12	14,96
<b>Ca/P</b>	2,48	1,71	2,01	2,00	2,14



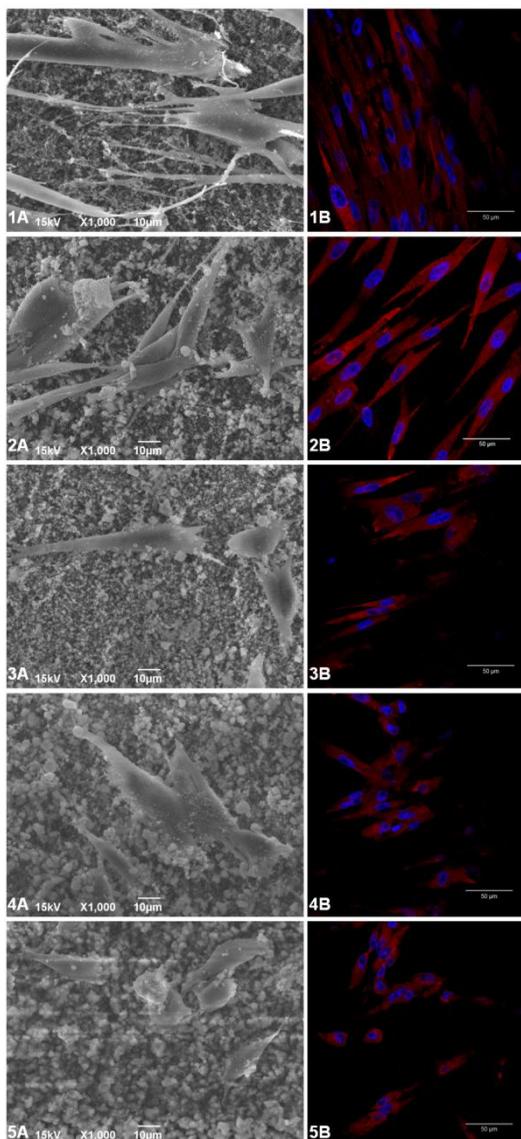
**Figura 13** Composição química dos compostos HCB-HAP por EDS. Espectros de EDS e micrografias dos compostos (A) HCB-HAP1; (B) HCB-HAP2; (C) HCB-HAP3; (D) HCB-HAP4; (E) HCB-HAP5.

#### 4.6 INTERAÇÃO CÉLULA-COMPÓSITO HCB-HAp

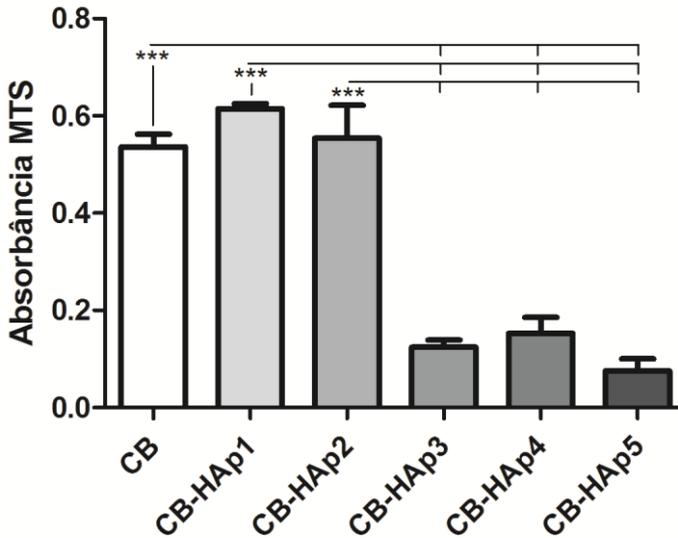
Assim como nos HCB, a interação entre as células e os compósitos HCB-HAp foi analisada através das técnicas de MEV e microscopia confocal. As micrografias de MEV (Figuras 14 1-5A) revelaram que as CTMP mantêm a capacidade de aderir aos compósitos, porém com o aumento dos ciclos de HAp observamos uma mudança na morfologia das células e ainda, uma aparente diminuição do número das mesmas. Nos compósitos HCB-HAp1 e HCB-HAp2 a morfologia observada se mostrou semelhante à morfologia fibroblástico característica das CTMP, sendo possível a visualização da emissão de pseudópodes pelas células e a formação de pontos de adesão. Já nos compósitos HCB-HAp3, HCB-HAp4 e HCB-HAp5, observamos que, com o aumento da concentração de HAp as células diminuam a emissão de pseudópodes e aparentavam tamanho reduzido. Além disso, nestas condições, as CTMP tenderam a formar agregados, preferindo interagir entre elas ao invés de interagir com os compósitos, o que indica uma possível dificuldade de adesão.

As imagens de microscopia confocal (Figuras 14 1-5B), confirmam os resultados de MEV e, além disso, revelam, através da ferramenta de projeção máxima, a pequena capacidade de migração das células para o interior dos compósitos, a qual oscilou entre 10 e 17 $\mu$ m.

Além de análises microscópicas, o ensaio de MTS foi realizado para verificação da viabilidade das células cultivadas por sete dias nos compósitos HCB-HAp. Os resultados representados no gráfico representado na figura 15, mostram a diminuição da viabilidade celular a partir do terceiro ciclo de HAp. Entre o HCB e os compósitos HCB-HAp1 e HCB-HAp2 não foram observadas diferenças significativas.



**Figura 14** Interação entre CTMPs e compósitos HCB-HAP: Micrografias representativas da interação entre as CTMPs e os compósitos HCB-HAP. (1A e 1B) HCB-HAp1, (2A e 2B) HCB-HAp2, (3A e 3B) HCB-HAp3, (4A e 4B) HCB-HAp4, (5A e 5B) HCB-HAp5. Imagens A: micrografias de MEV e imagens B microscopia confocal, marcação imunocitoquímica: Anti- $\alpha$ -SMA conjugado a Alexa 594 (vermelho), coloração de núcleo com DAPI (azul).



**Figura 15 Análise da viabilidade celular nos compósitos HCB-HAp:** Representação gráfica da viabilidade celular por ensaio de MTS das células cultivadas nos compósitos. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,001$  por ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

#### 4.7 CULTIVO CELULAR COM PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O PRP foi preparado a partir de um *pool* de plasma de quatro doadores. Os fatores de crescimento presentes no PRP TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB e IGF-I foram quantificados por ELISA. O PRP ativado apresentou 65,15ng/mL de TGF- $\beta$ 1, 2,43ng/mL de PDGF-BB e 248,9ng/mL de IGF-I.

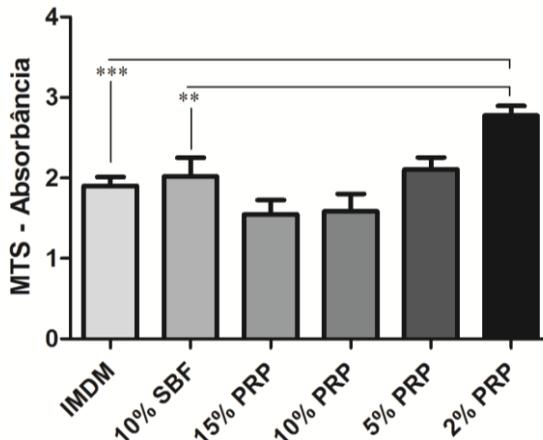
Para avaliar os efeitos do PRP em nossos experimentos, as CTMPs foram cultivadas com diferentes concentrações do mesmo (2%, 5%, 10% e 15%) e então avaliadas quanto à viabilidade e proliferação celular. Como controle utilizamos células cultivadas no modo convencional (IMDM suplementado com 10% SBF) e também somente com meio de cultivo (IMDM) sem suplemento com soro.

A análise da viabilidade foi feita pelo ensaio de MTS após três dias de cultivo nas diferentes concentrações de PRP e os resultados estão representados no gráfico da figura 16. Verificamos que as CTMPs apresentaram maior viabilidade quando cultivadas com 2% de PRP.

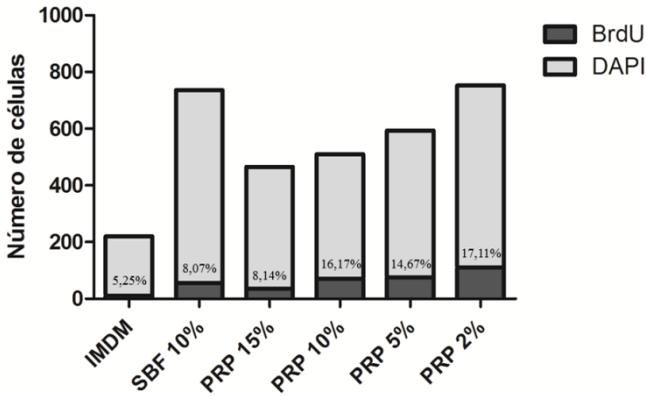
Observamos também uma queda na viabilidade celular nas concentrações 10% e 15% de PRP, porém esta não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

O efeito do PRP na proliferação celular foi analisado por meio do ensaio de incorporação de BrdU, após um dia de cultivo nas diferentes concentrações de PRP. A taxa de proliferação foi determinada a partir da quantidade de células que incorporaram BrdU em um total de células marcadas com DAPI, os resultados podem ser vistos no gráfico da figura 17. Observamos que quando cultivadas com 2% de PRP as CTMPs aumentam sua taxa de proliferação em aproximadamente 9%, quando comparado com o controle IMDM suplementado com 10% SBF e 12% quando comparada com o controle IMDM sem suplemento. Não foi aplicada estatística a este experimento, pois este foi realizado complementarmente ao teste de viabilidade em apenas uma amostra, todavia esta foi feita em triplicata e foram analisados o total de 12 campos de cada condição experimental.

Estes resultados descritos demonstram que o PRP pode influenciar viabilidade e proliferação celular, sendo esta influência dependente da concentração aplicada.



**Figura16 Análise da viabilidade celular após cultivo com PRP:** Representação gráfica da viabilidade celular por ensaio de MTS após cultivo com 2%, 5%, 10% e 15% de PRP, como controles: IMDM sem suplementação e IMDM suplementado com 10% SBF. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão de triplicata de 3 experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,001$  e \*\* $P < 0,01$  por ANOVA uma via seguido de teste de Bonferroni



**Figura 17** Análise da proliferação celular das CTMPs após cultivo com PRP: Representação gráfica da quantidade de células que incorporam BrdU após cultivo com 2%, 5%, 10% e 15% de PRP, como controles: IMDM sem suplementação e IMDM suplementado com 10% SBF.

## 5 DISCUSSÃO

Devido as suas propriedades de auto-renovação e diferenciação em múltiplos tipos celulares, as CTs tem atraído grande interesse no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para restaurar a funcionalidade de tecidos e órgão lesados. Contudo, ainda persiste a necessidade de identificação de uma fonte segura, acessível, que forneça um rendimento elevado de células e que seja eticamente aceitável (EVANGELISTA *et al.*, 2008). O uso de CT embrionárias ainda é um assunto polêmico devido a questões de natureza ética que envolvem seu isolamento e seu potencial de desenvolvimento de tumores (ESPINOZA; PETERSON, 2012). Em contrapartida, entre as CT adultas, destacam-se as CTMs que podem ser isoladas de diversos tecidos e apresentam o potencial de diferenciação e auto-renovação. A medula óssea é a fonte de CTMs comumente utilizada, porém apresenta algumas limitações quanto a sua disponibilidade e obtenção. Estas células constituem somente cerca de 0,001 a 0,01% da celularidade da medula óssea e sua obtenção exige um procedimento cirúrgico invasivo. Além disso, o seu número total e seu potencial de diferenciação diminuem com o aumento da idade (ABUMAREE *et al.*, 2012).

Neste contexto, a placenta humana representa uma candidata a ser considerada como fonte de CTMs. Por ser descartada após o parto, esta se torna uma fonte abundante, acessível e livre de questionamentos éticos. Ademais, apresenta capacidade de diferenciação para múltiplos tipos celulares e também exerce efeitos imunomodulatórios (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

Segundo consenso descrito por Parolini *et al.* (2008), as CTMPs são obtidas por meio de protocolos que envolvem dissociação mecânica e enzimática de diferentes regiões da placenta e são isoladas a partir de sua capacidade de aderência ao plástico. Quanto a sua caracterização, as CTMPs devem apresentar, além de aderência ao plástico, colônias de morfologia fibroblastóide, um padrão específico de expressão de antígenos de superfície e ainda potencial de diferenciação para uma ou mais linhagens celulares, geralmente osteogênica, adipogênica e/ou condrogênica.

Nossos resultados demonstram que o protocolo de isolamento das CTMPs utilizado foi eficiente, nos permitindo isolar células aderentes ao plástico com morfologia fibroblastóide. Estas foram também submetidas à imunofenotipagem, na qual os resultados foram consistentes com o padrão de expressão de antígenos de superfície, as células mostraram-se positivas para CD73, CD90 e CD105 e

consideradas negativas para CD34 e CD45. Adicionalmente, quando tratadas com meios indutores específicos, as CTMPs apresentaram a capacidade de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico. Estes resultados demonstram que as células isoladas e estudadas neste trabalho seguem os critérios necessários para serem consideradas CTMs e suportam a ideia de a placenta ser uma interessante fonte de CTMs.

Grande parte dos tecidos é composta por mais de um tipo celular, organizados em uma microescala com a matriz extracelular e os componentes secretados por esta. Uma vez que a funcionalidade destes tecidos está relacionada com esta complexa arquitetura tridimensional, biomateriais vêm sendo desenvolvidos e pesquisados na tentativa de mimetizar *in vitro* esta complexidade tecidual (ZORLUTUNA *et al.*, 2012). Uma gama de biomateriais vem sendo testados quanto a suas propriedades mecânicas, estruturais e ainda quanto a sua biocompatibilidade e capacidade de interação com células progenitoras ou do tecido que se pretende tratar. No presente trabalho, avaliamos a associação de CTMPs em biomateriais baseados em CB com o objetivo de proporcionar um sistema de cultivo tridimensional.

A resistência, pureza e biocompatibilidade do HCB têm contribuído para o crescente interesse na utilização deste polímero natural como um biomaterial. Este hidrogel é formado por uma rede de nanofibras interligadas, que imita, de certa forma, as propriedades da matriz extracelular (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Em nossos resultados, esta estrutura foi ilustrada através de micrografias de MEV (Figura 8). As micrografias revelaram uma rede de nanofibras de CB interconectadas, semelhante ao descrito em outros estudos envolvendo HCB (RAMBO *et al.*, 2008; KLEMM *et al.*, 2006; KRAMER *et al.*, 2006; SVENSSON *et al.*, 2005).

Quando se trata de engenharia de tecidos e cultivo tridimensional, um dos aspectos mais importantes a ser considerado é a técnica de cultivo utilizada. Uma técnica bem sucedida permite que as células sejam plaqueadas uniformemente sobre todo o biomaterial mimetizando características do tecido nativo (ANDERSSON *et al.*, 2010). Em vista disso, dentre as concentrações celulares testadas em nosso trabalho, consideramos  $1 \times 10^4$  células como a concentração que apresentou melhor densidade e distribuição no HCB produzido em placas de cultura de 96 poços. Passando a ser esta a concentração utilizada nos demais experimentos.

É bem estabelecido que o HCB é altamente hidratado, sendo a água cerca de 99% da sua composição (HELENIUS *et al.*, 2006;

RAMBO *et al.*, 2008). Esta é uma característica atrativa quando se trata de biocompatibilidade, porém pode prejudicar o cultivo *in vitro*, pois pode acarretar na diluição do meio de cultivo e de seus nutrientes. Considerando este aspecto testamos diferentes formas de cultivo a fim de avaliar essa possível interferência da água do hidrogel. Testamos a incorporação de IMDM suplementado com 10% SBF aos hidrogéis, através da simples imersão destes em meio de cultivo por um período de quatro horas ou submetendo os HCB a desidratação e subsequente reidratação com o meio de cultivo. O método de desidratação e subsequente reidratação não foi adequado, pois o HCB não recuperou sua forma tridimensional após a reidratação. Este comportamento indica um possível colapsos das nanofibras de celulose que compõem o hidrogel e conseqüentemente alteração na porosidade e interconectividade da rede de nanofibras. Optamos então, pela incorporação de meio de cultivo pela imersão dos HCBs em IMDM suplementado com 10% SBF durante quatro horas. Apesar de não apresentar diferença na viabilidade celular, julgamos pertinente que o HCB estivesse incorporado com meio de cultivo antes do plaqueamento celular em vista dos benefícios, relacionados à aderência e proliferação celular, trazidos pelo SBF e demais nutrientes presentes no meio de cultivo. Este possível benefício foi visto nas imagens de microscopia, onde percebemos que nesta condição (2HM) houve um aparente aumento do número de células aderidas e estas apresentaram morfologia mais próxima à característica de CTMPs.

Outros estudos já demonstraram a capacidade de adesão de diversos tipos celulares à biomateriais baseados em celulose bacteriana, como células de músculo liso (BÄCKDAHL *et al.*, 2006), condrócitos (ANDERSSON *et al.*, 2010) e osteoprogenitores (BRACKMANN *et al.*, 2012). Porém, nenhum estudo abordando CTMPs e HCB foi encontrado na literatura.

Para isto, utilizamos técnicas de MEV e microscopia confocal, para melhor ilustrar e analisar a adesão e morfologia adquirida pelas células (Figura 12). As micrografias revelaram que as células foram capazes de estabelecer pontos de adesão e adquiriram morfologia fibroblastóide característica. Este resultado corrobora os estudos citados acima, que utilizaram diferentes células caracteristicamente aderentes, e tem importância na validação do HCB como um biomaterial para o cultivo de CTMPs.

Apesar da adesão celular ter sido satisfatória, as CTMPs tenderam a interagir com as fibras mais superficiais do HCB, sendo a capacidade máxima de migração para o interior do HCB de 15  $\mu$ m. Isto

provavelmente ocorre pela dimensão dos poros do hidrogel em relação ao tamanho das células, dificultando o acesso das mesmas ao interior do HCB.

Segundo Bäckdahl *et al.* (2006), a definição de um tamanho de poro específico não é relevante para um hidrogel formado por fibras, como é o caso do HCB, porque as nanofibras podem ser deslocadas por células no processo de migração. Porém, a densidade da rede de nanofibras pode influenciar na distância que as células podem migrar para o interior do biomaterial. Para melhorar a migração celular no HCB, poros podem ser introduzidos ao biomaterial por meio da incorporação de porogênicos durante a síntese do hidrogel pelas bactérias. Estes porogênicos devem ser materiais que são inicialmente incorporados para ocupar um espaço e, após a síntese do HCB, podem ser removidos sem danificar o biomaterial formando um poro no espaço que ocupava (PETERSEN; GATENHOLM, 2011). Zaborowska *et al.* (2010) produziram poros no HCB pela incorporação de microesferas de parafina como um agente porogênico, durante a síntese do hidrogel pelas bactérias em um sistema de biorreator. As microesferas de parafina foram retiradas com auxílio de uma solução surfactante, formando poros de aproximadamente 300-500  $\mu\text{m}$  que posteriormente foram, com sucesso, colonizados por células. Já Grande *et al.* (2009) demonstraram que, adicionando carboximetilcelulose ao meio de cultura durante a síntese do hidrogel, a microestrutura do HCB foi alterada. Observou-se que as fibras formadas apresentavam diâmetro menor e consequentemente poros maiores, provavelmente por ter aumentado a densidade do meio de cultura alterando o comportamento e movimentação das bactérias durante a síntese (GRANDE *et al.*, 2009). Estas informações reforçam a suposição de que modificações na microestrutura, bem como na porosidade do HCB devem favorecer o povoamento de CTMPs no interior do hidrogel.

A possibilidade de modificação da microestrutura do HCB é uma característica interessante deste biomaterial e vem sendo abordada de diversas formas. Além das modificações na porosidade citadas acima, modificações na orientação das fibras do HCB podem também ser alcançadas. Um exemplo é um estudo de SANO *et al.* (2010) no qual, através da aplicação de um campo eletromagnético externo, foi possível orientar o movimento das bactérias durante a síntese, resultando no alinhamento das nanofibras de CB. Modificações mais simples e alcançáveis podem ser obtidas por meio da incorporação de moléculas ativas biologicamente, a fim de direcionar a interação e o comportamento celular para finalidades especificamente desejadas.

Dentro desta proposta, a incorporação HAp ao HCB tem atraído interesse na proposta de desenvolvimento de um biomaterial para regeneração e substituição óssea. Sabe-se que o osso natural é um biocompósito de cristais HAp dispostos em uma matriz de colágeno orgânico. Estruturalmente, o compósito HCB-HAp é semelhante à matriz óssea, o que indica que o possa oferecer excelente biocompatibilidade e osteocondutividade. Além disso, o compósito apresenta outras características favoráveis já mencionadas, como alta resistência mecânica, possibilidade de ser moldado e superfície favorável para aderência celular (HONG *et al.*, 2006).

A incorporação de HAp pode ser realizada de forma biomimética, através da imersão dos HCB já sintetizados em soluções de cálcio e fosfato, conforme descrito por Hutchens *et al.* (2006) e reproduzida no presente trabalho. Grupamentos funcionais na superfície de biomateriais desempenham um papel decisivo para a modificação das propriedades da superfície. A celulose possui em sua estrutura química grupamentos aniônicos  $\text{OH}^-$  livres que permitem a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$ , numa solução ácida de  $\text{CaCl}_2$ . Os íons fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), em solução básica de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , podem então ligar-se ao cálcio, formando fosfato de cálcio (HUTCHENS *et al.*, 2006).

A morfologia e distribuição das partículas HAp precipitadas sobre as nanofibras foram analisadas por MEV (Figura 13) e mostraram que a rede de nanofibras foi homogênea e recoberta pelos cristais de HAp, isso provavelmente foi favorecido pela estrutura regular da rede de nanofibras que compõem o HCB. Os grupos funcionais das nanofibras celulósicas do HCB induziram a deposição de HAp, formando um sistema bifásico onde as fibras estão dispersas entre as partículas de HAp.

Tendo em vista que a HAp pode influenciar a bioatividade do material, testamos cinco diferentes concentrações de HAp. As diferentes concentrações foram alcançadas por meio de ciclos alternados das soluções de Ca e P, tendo sido testados de 1 a 5 ciclos. Em nossos resultados percebemos o aumento da deposição dos cristais de HAp ao longo dos ciclos da síntese biomimética, evidenciado tanto na porcentagem de átomos de Ca e P, analisados por EDS, quanto nas micrografias de MEV, que apresentam um aumento no recobrimento das nanofibras pelas partículas de HAp.

Geralmente utiliza-se a razão Ca/P para analisar um componente ósseo, uma vez que as alterações nos valores de Ca e P em apatitas biológicas podem ocorrer de forma não simultânea. Uma diminuição na densidade óssea pode ser devido a uma diminuição em qualquer dos

componentes Ca ou P, ou ainda a uma diminuição em ambos(ZAICHICK; TZAPHLIDOU, 2003). Entretanto, a razão Ca/P variou não uniformemente entre 1,71 e 2,48 e observou-se que a razão Ca/P em todas as amostras foi maior que a razão estequiométrica característica de hidroxiapatita que é de 1,67.

Estudos realizados por Zaichick e Tzaphlidou (2003) para a determinação das concentrações de Ca e P e a razão Ca/P no osso trabecular do colo do fêmur de seres humanos saudáveis (homens e mulheres com idade entre 15 e 55 anos) obtiveram a razão Ca/P de 2,07 tanto para homens quanto para mulheres. O que indica que fisiologicamente, a HAp não é encontrada em sua forma estequiométrica. Essa razão foi obtida de uma porcentagem média de 11,45% de Ca e 5,58% de P. Dentre os compósitos testados neste trabalho, o compósito HCB-HAp1 apresentou composição química mais próxima ao osso natural, sendo a razão Ca/P 2,48, resultante de 14,51% de Ca e 5,86% de P.

Fang *et al.* (2009) verificaram que a presença de HAp pode beneficiar a bioatividade do compósito, facilitando a adesão e proliferação de CTMs da medula óssea. Em nossos resultados observamos que este benefício está, possivelmente, relacionado com a concentração dos minerais Ca e P. As micrografias de MEV (Figura 14) demonstraram que em HCB-HAp1 e HCB-HAp2 as células mantiveram a capacidade de adesão nos compósitos, apresentando distribuição homogênea, emissão de pseudópodes e pontos de adesão. Nos demais compósitos (HCB-HAp3, HCB-HAp4 e HCB-HAp5) percebemos que as células mudaram o comportamento, diminuindo os pontos de adesão e apresentando uma tendência a formar agregados entre as mesmas. Acreditamos que isso possa ser resultado da diminuição dos poros decorrente do aumento da deposição de HAp e também devido a uma possível diminuição da maleabilidade das nanofibras celulósicas. Como comentado anteriormente, a rede de nanofibras que formam o HCB é conectada por pontes de hidrogênio, ligações fracas que podem ser rompidas pelas células no processo de migração para o interior do HCB(BÄCKDAHL *et al.*, 2006). Com a deposição de HAp sobre estas nanofibras supomos que estas fiquem mais rígidas prejudicando a interação e dificultando ainda mais o acesso das CTMPs ao interior do compósito.

Estas observações a partir das micrografias de MEV foram confirmadas pelo ensaio de MTS, que demonstrou uma acentuada queda na viabilidade celular nos compósitos HCB-HAp3, HCB-HAp4 e HCB-HAp5. Neste caso, acreditamos que esta queda não estejadiretamente

ligada à viabilidade das células cultivadas nos compósitos, mas sim relacionada com a diminuição da adesão e consequente do número celular nestes compósitos.

A afinidade das células em aderir aos biomateriais é um dos fatores que mais contribuem para sua morfologia, proliferação, função e consequente organização tecidual (FANG *et al.*, 2009). Desta forma, analisando os resultados de interação e viabilidade celular juntamente com os resultados da composição química dos compósitos, julgamos que o compósito HCB-HAp1 seria o mais adequado para futuros estudos envolvendo a diferenciação e reparo ósseo. Todavia, da mesma forma que o HCB puro, as células interagiram superficialmente com os compósitos e a capacidade de migração para o interior dos compósitos não foi satisfatória. Acreditamos que as modificações na microestrutura e porosidade sugeridas para o HCB trariam benefícios também para o compósito HCB-HAp.

Uma abordagem em engenharia de tecidos para regeneração de ossos inclui o uso de um biomaterial que favoreça a adesão e suporte celular, células viáveis e fatores bioativos, aplicados isoladamente ou em combinação na tentativa de mimetizar o ambiente natural do sítio lesado (KOFRON *et al.*, 2004). Considerando a ideia de mimetizar o ambiente fisiológico, o PRP torna-se uma interessante fonte de fatores de crescimento, uma vez que as plaquetas atuam diretamente no reparo e cicatrização dos tecidos.

A agregação e ativação plaquetária, após dano vascular, resulta na liberação de diversos fatores de crescimento que afetam a quimiotaxia, proliferação e diferenciação de CTMs e outras células progenitoras durante o processo de reparação tecidual e cicatrização. Porém, quando se trata de reparo e formação óssea, os benefícios do PRP tornam-se um assunto controverso. Enquanto alguns trabalhos sugerem que a adição do PRP exerça um efeito estimulante na diferenciação e regeneração óssea (CENNI *et al.*, 2010; FENG *et al.*, 2010), outros demonstraram haver nenhum resultado significativo (FROUM *et al.*, 2002) ou ainda detectaram efeito inibitório (VOGEL *et al.*, 2006). Embora nestes estudos existam diversas variações quanto ao modo de preparo do PRP, tipo celular utilizado e presença de biomateriais, uma possível razão para tais resultados conflitantes no uso do PRP pode estar relacionada com as variações nas concentrações de fatores de crescimento (ORYAN *et al.*, 2011).

É importante considerar que existem diferenças na concentração dos fatores de crescimento entre indivíduos, sendo que estas concentrações podem variar de acordo com a idade e a quantidade

plaquetária(CHOet *al.*, 2011). Para compensar estas diferenças entre indivíduos, em nossos experimentos utilizamos um *pool* de quatro doadores e a concentração plaquetária foi ajustada previamente à ativação em  $1 \times 10^9$  plaquetas/mL. Complementarmente, os níveis de TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB e IGF-I foram quantificados e consideramos nossos resultados relacionados a tais concentrações de fatores de crescimento.

Dentre as diferentes moléculas liberadas na ativação plaquetária, TGF- $\beta$ 1, IGF-I, PDGF tem efeitos estimulante no processo de cicatrização e regeneração óssea. OTGF- $\beta$ 1 atua de forma parácrina, ativando células adjacentes, especialmente fibroblastos, CTMs e pré-osteoblastos, que também produzem TGF- $\beta$ 1. Também age de forma autócrina, sendo as funções mais relevantes deste fator envolvidas com a quimiotaxia, mitogênese de osteoblastos e, além disso, inibiçãoda formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. As atividades mais importantes ligadas ao PDGF incluem mitogênese, angiogênese e ativação de macrófagos, que atuam no processo de cicatrização(HAKIMI *et al.*, 2010), além de exercer forte efeito quimiotáxico sobre osteoblastos e CTMs.Já o IGF-I atua estimulando a mitose e a diferenciação de células osteoprogenitoras, contribuindo para o aumento de osteoblastos funcionais maduros (ALLORI *et al.*, 2008). Outros fatores de crescimento presentes no PRP como VEGF e EGF não foram dosados, porém também exercem efeitos indiretos na osteogênese. O VEGF atua principalmente na formação de novos vasos sanguíneos, na vasodilatação e permeabilidade dos vasos, aumentando o fluxo sanguíneo e entrega de fatores de crescimento e células que atuam na reparação óssea. Já o EGF atua indiretamente na reabsorção e remodelamento ósseo (ALLORI *et al.*, 2008).

Em vista de todos os efeitos favoráveis à regeneração óssea o PRP se mostrou uma boa ferramenta osteoindutiva para enriquecer nosso sistema de cultivo envolvendo o compósito HCB-HAp.

Considerando as discrepâncias no modo de preparo e na concentração de fatores de crescimento, em estudos envolvendo o PRP, julgamos pertinente testar primeiramente seus efeitos diretamente sobre as CTMPs sem adicionar outra variável. Os efeitos do PRP sobre as CTMPs foram analisados em termos de viabilidade e proliferação celular, aplicando diferentes concentrações de PRP.

Em nossos resultados, houve um aumento na viabilidade das células quando cultivadas com baixa concentração de PRP (2%). É importante ressaltar que o ensaio de MTS, utilizado para avaliar a viabilidade celular, pode ser influenciado pela quantidade de células. Uma vez que este foi aplicado três dias após início do tratamento com

PRP, julgamos que esta diferença poderia estar relacionada não somente com a viabilidade celular, mas com o aumento do número de células nas diferentes condições. Desta forma aplicamos o ensaio de incorporação de BrdU, complementarmente, para verificar a proliferação celular. O resultado deste ensaio foi ao encontro com nossa suposição, mostrando que a proliferação celular estava acentuada nesta mesma condição. Este resultado corrobora estudos anteriores (CHO *et al.*, 2011; FORMIGLI *et al.*, 2011; GRAZIANI *et al.*, 2006) que demonstraram que o PRP atua de forma dose-dependente. Nestes trabalhos foi afirmado que altas concentrações de PRP não promovem ou mesmo suprimem a proliferação celular e que esta é melhor estimulada com baixas concentrações do mesmo. Ainda ressaltaram que a concentração ideal pode variar de acordo com o tipo celular e o modo de preparo do PRP.

Desta forma, constatamos que o PRP, preparado de acordo com o protocolo descrito, estimula a proliferação de CTMPs quando aplicado em baixa concentração (2% em meio de cultivo). Mostrando-se como uma potencial fonte de fatores de crescimento a ser estudada juntamente com o compósito HCB-HAp como um sistema de cultivo tridimensional para engenharia de tecido ósseo em estudos futuros.



## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- As CTMPs utilizadas neste estudo foram devidamente caracterizadas como CTMs, apresentando a morfologia característica, expressão dos marcadores de superfície celular propostos para CTMs, bem como potencial de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico.
- O cultivo de CTMP nos HCB foi padronizado, permitindo o estabelecimento de um modelo de cultivo celular em HCB e consequentemente a continuidade dos experimentos.
- As CTMPs apresentaram a capacidade de aderir ao HCB, porém a interação foi superficial, tendo apresentado pequena capacidade de migração para o interior do hidrogel.
- As CTMPs apresentaram a capacidade de aderir aos compósitos HCB-HAp, porém, assim como no HCB, a interação foi superficial.
- O aumento da concentração de HAp nos compósitos prejudicou a adesão e as células tenderam a formar agregados. Dentre os compósitos, o HCB-HAp1 foi considerado o ideal para estudos futuros.
- O PRP manteve a viabilidade celular e estimulou a proliferação das CTMPs quando utilizado em baixa concentração.
- Para estudos futuros, melhorias na microestrutura e porosidade dos biomateriais devem favorecer migração das CTMPs para o interior tanto do HCB quanto do compósito HCB-HAp. Mediante a estas melhorias, a associação do compósito HCB-HAp1 com CTMPs e PRP deve formar um sistema de cultivo tridimensional promissor para estudos em engenharia de tecido ósseo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUMAREE, M. H.; AL JUMAH, M. A; KALIONIS, B. *et al.* Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi of Human Term Placenta. **Stem cell reviews**, v. DOI 10.100, 2012.

ADAM HEALTH SOLUTION, 2012. Disponível em <www.adam.com>. Acesso em: 20 de junho de 2012.

ALISON, M. R.; ISLAM, S. Attributes of adult stem cells. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 144-160, 2009.

ALLORI, A. C.; SAILON, A. M.; WARREN, S. M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. **Tissue engineering. Part B**, v. 14, n. 3, p. 259-273, 2008.

ALVAREZ-SILVA, M.; BELO-DIABANGOUAYA, P.; SALAÜN, J.; DIETERLEN-LIÈVRE, F. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5437-5444, 2003.

ANDERSSON, J.; STENHAMRE, H.; BA, H.; GATENHOLM, PAUL. Behavior of human chondrocytes in engineered porous bacterial cellulose scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, n. 4, p. 1124-1132, 2010.

ARVIDSON, K.; ABDALLAH, B M; APPLGATE, L. A; *et al.* Bone regeneration and stem cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 4, p. 718-746, 2011.

BERTOLDI, S.; FARÈ, S.; DENEGRI, M. *et al.* Ability of polyurethane foams to support placenta-derived cell adhesion and osteogenic differentiation: preliminary results. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 21, n. 3, p. 1005-1011, 2010.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BRACKMANN, C.; PH, D.; ZABOROWSKA, M. *et al.* In situ Imaging of Collagen Synthesis by Osteoprogenitor Cells in Microporous Bacterial Cellulose Scaffolds. **Tissue engineering. Part C**, v. 18, n. 3, p. 227-234, 2012.

BÄCKDAHL, H.; HELENIUS, G.; BODIN, A. *et al.* Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, n. 9, p. 2141-2149, 2006.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells : Cell-Based Reconstructive Therapy. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 7, p. 1198-1211, 2005.

CAVALLO, C.; CUOMO, C.; FANTINI, S. *et al.* Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1418-1430, 2011.

CENNI, E.; AVNET, S.; FOTIA, C.; SALERNO, M.; BALDINI, N. Platelet-rich plasma impairs osteoclast generation from human precursors of peripheral blood. **Journal of orthopaedic research**, v. 28, n. 6, p. 792-797, 2010.

CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, NANCE B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney International Supplements**, v. 1, n. 3, p. 63-67, 2011.

CHO, H. S.; SONG, I. H.; PARK, S.-Y. *et al.* Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich plasma and its influence on human mesenchymal stem cells. **The Korean journal of laboratory medicine**, v. 31, n. 3, p. 212-218, 2011.

CZAJA, W.; KRZYSTYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN, R. M. Microbial cellulose--the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 2, p. 145-151, 2006.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DONG, Y.; LIAO, S.; NGIAM, M.; CHAN, C. K.; RAMAKRISHNA, S. Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 15, n. 3, p. 333-351, 2009.

DUAN, J.; KUANG, W.; TAN, J. *et al.* Differential effects of platelet rich plasma and washed platelets on the proliferation of mouse MSC cells. **Molecular biology reports**, v. 38, n. 4, p. 2485-2490, 2011.

ELISSEEFF, J.; PULEO, C.; YANG, F.; SHARMA, B. Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 8, n. 3, p. 150-161, 2005.

ESPINOZA, N.; PETERSON, M. How to depolarise the ethical debate over human embryonic stem cell research (and other ethical debates too!). **Journal of medical ethics**, p. DOI: 10.1136/medethics-2011-100099, 2012.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 33-42, 2008.

FANG, B.; WAN, Y.-Z.; TANG, T.-T.; GAO, C.; DAI, K.-R. Proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells on hydroxyapatite/bacterial cellulose nanocomposite scaffolds. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 5, p. 1091-1098, 2009.

FENG, Y.; SUN, Y.; JIA, W.; ZHANG, C. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 5, p. 635-642, 2010.

FORMIGLI, L.; BENVENUTI, S.; MERCATELLI, R. *et al.* Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration.

**Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. DOI: 10.10, 2011.

FRIEDENSTEIN, A.; CHAILAKHJAN, R.; LALYKINA, K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FROUM, S. J.; WALLACE, S. S.; TARNOW, D. P.; CHO, S.-C. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, v. 22, n. 1, p. 45-53, 2002.

GASSLING, V. L. W.; AÇIL, Y.; SPRINGER, I. N.; HUBERT, N.; WILTFANG, J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 108, n. 1, p. 48-55, 2009.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36 n. 3, p. S20-S27, 2005.

GRANDE, C. J.; TORRES, F. G.; GOMEZ, C. M.; BAÑÓ, M. C. Nanocomposites of bacterial cellulose/hydroxyapatite for biomedical applications. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 5, p. 1605-1615, 2009.

GRAZIANI, F.; IVANOVSKI, S.; CEI, S. *et al.* The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. **Clinical oral implants research**, v. 17, n. 2, p. 212-219, 2006.

HAKIMI, M.; JUNGLUTH, P.; SAGER, M. *et al.* Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs. **Injury**, v. 41, n. 7, p. 717-723, 2010.

HELENIUS, G.; BÄCKDAHL, H.; BODIN, A. *et al.* In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 76, n. 2, p. 431-438, 2006.

HONG, L.; WANG, Y. L.; JIA, S. R. *et al.* Hydroxyapatite/bacterial cellulose composites synthesized via a biomimetic route. **Materials Letters**, v. 60, p. 1710-1713, 2006.

HUTCHENS, S. A.; BENSON, R. S.; EVANS, B. R.; O'NEILL, H. M.; RAWN, C. Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. **Biomaterials**.v. 27, p, 4661-4670, 2006

ILANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPIILLAI, U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 2-10,2009.

IN'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, 2004.

JEREMIAS, T. S. **Efeito dos Fatores FGF-2, EGF e  $\beta$ -catenina no Potencial de Diferenciação das Células Tronco Mesenquimais de Placenta Humana**, 2009,93p. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, BASEM M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 95, n. 5, p. 209-214, 2004.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; BEYEN, I. *et al.* Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 2, p. 169-188, 2008.

KASTEN, P.; VOGEL, J.; GEIGER, FLORIAN; *et al.* The effect of platelet-rich plasma on healing in critical-size long-bone defects. **Biomaterials**, v. 29, n. 29, p. 3983-3992, 2008.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F. *et al.* Nanocelluloses as Innovative Polymers in Research and Application. **Advanced in Polymers Science**, n. 205, p. 49-96, 2006.

KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; UDHARDT, U.; MARSCH, S. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, n. 9, p. 1561-1603, 2001.

KOFRON, M. D.; LI, X.; LAURENCIN, C. T. Protein- and gene-based tissue engineering in bone repair. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 399-405, 2004.

KRAMER, F.; KLEMM, D.; SCHUMANN, D. *et al.* Nanocellulose Polymer Composites as Innovative Pool for (Bio)Material Development. **Macromolecular Symposia**, v. 244, n. 1, p. 136-148, 2006.

LUND, A. W.; YENER, B.; STEGEMANN, J. P.; PLOPPER, G. E. The natural and engineered 3D microenvironment as a regulatory cue during stem cell fate determination. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 15, n. 3, p. 371-380, 2009.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M. *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem cells**, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.

OKUDA, K.; KAWASE, T.; MORMOSE, M. *et al.* Platelet-Rich Plasma Contains High Levels of Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- $\beta$  and Modulates the Proliferation of Periodontally Related Cells In Vitro. **J Periodontol**, v. 74, n. 6, p. 849-857, 2003.

ORYAN, A.; MEIMANDI PARIZI, A.; SHAFIEI-SARVESTANI, Z.; BIGHAM, A. S. Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, histopathological and biomechanical evaluation. **Cell and Tissue Banking**, v. DOI 10.100, 2011.

O'KEEFE, R. J.; MAO, J. Bone Tissue Engineering and Regeneration : From Discovery to the Clinic — An Overview. **Tissue engineering. Part B**, v. 17, n. 6, p. 389-392, 2011.

PANTOU, A L.; MARKOPOULOU, C. E.; DEREKA, X. E. *et al.* The effect of platelet-rich plasma (PRP) combined with a bone allograft on human periodontal ligament (PDL) cells. **Cell and tissue banking**, v. 13, n. 1, p. 81-88, 2012.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology**, v. 91, p. 1277-1286, 2011.

RAMBO, C R; RECOUVREUX, D O S; CARMINATTI, C. A.; PITLOVANCIV, A. K. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membranes for tissue engineering. **Materials Science**, v. 28, p. 549 - 554, 2008.

RECOUVREUX, D. O. S. **Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos**, 2008 124p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RECOUVREUX, DERCE O.S.; RAMBO, CARLOS R.; BERTI, F. V. *et al.* Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 151-157, 2011.

SABAPATHY, V.; RAVI, S.; SRIVASTAVA, V.; SRIVASTAVA, A.; KUMAR, S. Long-term cultured human term placenta-derived mesenchymal stem cells of maternal origin displays plasticity. **Stem cells international**, v. DOI:10.115, p. 174328, 2012.

SANDERS, R. C.; SLAYTON, W. B.; COGLE, C. R.; FISHER, R. C.; SCOTT, E. W. Stem cell research. **Paediatric respiratory reviews**, v. 7, n. 2, p. 135-140, 2006.

SANO, M. B.; ROJAS, A. D.; GATENHOLM, PAUL; DAVALOS, R. V. Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers. **Annals of biomedical engineering**, v. 38, n. 8, p. 2475-2484, 2010.

SEMENOV, O. V.; KOESTENBAUER, S.; RIEGEL, M. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 202, n. 2, p. 193.e1-193.e13, 2010.

SERPOOSHAN, V.; JULIEN, M.; NGUYEN, O. *et al.* Reduced hydraulic permeability of three-dimensional collagen scaffolds attenuates gel contraction and promotes the growth and differentiation of mesenchymal stem cells. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3978-3987, 2010.

SILVA MEIRELLES, L; NARDI, N B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Nicotine & tobacco research : official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, v. 14, n. 7, p. 4281-4298, 2009.

SILVA MEIRELLES, LINDOLFO; CAPLAN, A. I.; NARDI, NANCE BEYER. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

SVENSSON, A; NICKLASSON, E.; HARRAH, T. *et al.* Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. **Biomaterials**, v. 26, n. 4, p. 419-431, 2005.

SZPALSKI, C.; WETTERAU, M.; BARR, J.; WARREN, S. M. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques; Part I: Scaffolds. **Tissue Engineering, Part B**, DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0427, 2012.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TUZLAKOGLU, K.; REIS, R. L. Biodegradable polymeric fiber structures in tissue engineering. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 15, n. 1, p. 17-27, 2009.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C. M.; HU, W.-S. Culture systems for pluripotent stem cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 12-27, 2005.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Método de obtenção do gel de plasma rico em plaquetas autólogo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.

VOGEL, J. P.; SZALAY, K.; GEIGER, F; *et al.* Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. **Platelets**, v. 17, n. 7, p. 462-469, 2006.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WEIR, M. D.; XU, H. H. K. Culture human mesenchymal stem cells with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 93, n. 1, p. 93-105, 2010.

WISLET-GENDEBIEN, S.; HANS, G.; LEPRINCE, P.; RIGO, J.-MICHEL. Plasticity of Cultured Mesenchymal Stem Cells: Switch from Nestin-Positive to Excitable Neuron-Like Phenotype. **Stem Cells**, v. 23, p. 392-402, 2005.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A; *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

YUAN, W.; ZONG, C.; HUANG, Y. *et al.* Biological, immunological and regenerative characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cell isolated using a time-gradient attachment method. **Stem cell research**, v. 9, n. 2, p. 110-123, 2012.

ZAICHICK, V.; TZAPHLIDOU, M. Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 58, n. 6, p. 623-627, 2003.

ZANETTA, M.; QUIRICI, N.; DEMAROSI, F. *et al.* Ability of polyurethane foams to support cell proliferation and the differentiation of MSCs into osteoblasts. **Acta biomaterialia**, v. 5, n. 4, p. 1126-1136, 2009.

ZHANG, N.; KOHN, D. H. Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. **Birth defects research. Part C**, v. 96, n. 1, p. 63-81 2012.

ZORLUTUNA, P.; ANNABI, N.; CAMCI-UNAL, G. *et al.* Microfabricated biomaterials for engineering 3D tissues. **Advanced materials**, v. 24, n. 14, p. 1782-1804, 2012.

ZUK, P. A; ZHU, M.; MIZUNO, H. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

## ANEXOS

ANEXO1 – TCLE1: Coleta da placenta para isolamento das CTMPs



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA  
E GENÉTICA**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva, RG

**Pesquisador(es) participante(s):** Aloisio Luiz Benedetti, Maristela Martini, Diego Amarante da Silva, Diana Heck, Sarah Carneiro, Mariane Dahmer, Camila Etcheverria

**Telefones para contato:** (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva. A seguir lhe serão apresentadas informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Célula-tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Este estudo tem por objetivo desenvolver um sistema de cultura com células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da placenta humana em um hidrogel de celulose produzido por bactérias não patogênicas. As CTMs são principalmente obtidas da medula óssea, mas também podem ser obtidas de diversos outros tecidos, como tecido adiposo, polpa dentária e da placenta. Esta última apresenta a vantagem de ser um material que é descartado após o parto, dessa forma, sua

aquisição não envolve riscos e custos ao doador, não é invasiva e não é limitada em disponibilidade. E ainda, apresentam características de reduzida imunogenicidade e potencialidade equivalentes às CTMs de medula óssea. As CTMs são células jovens/indiferenciadas que podem formar tecidos como muscular, ósseo, sanguíneo e neural. Neste projeto estamos interessados em estimular a diferenciação destas CTMs derivadas da placenta humana em tecido ósseo utilizando um arcabouço tridimensional que mimetiza o ambiente natural destas células e fatores de crescimento que possam estimular esta diferenciação, bem como a proliferação/crescimento celular.

Após o parto, fragmentos da placenta serão coletados e devidamente transportados ao laboratório onde serão processados, as CTMs serão isoladas e mantidas em cultura até a utilização em experimentos para o estudo de seu comportamento.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a coleta da placenta, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

### **CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”, e concordo em participar do estudo, como voluntário.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

\_\_\_\_\_ **RG:** \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

ANEXO 2 – TCLE2: Coleta de sangue para preparo do PRP



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA  
E GENÉTICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva, RG

**Pesquisador(es) participante(s):** Diana Heck

**Telefones para contato:** (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva. A seguir lhe serão apresentadas informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Célula-tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Este estudo tem por objetivo desenvolver um sistema de cultura com células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da placenta humana em um hidrogel de celulose produzido por bactérias não patogênicas. O hidrogel representa uma sustentação onde as células serão cultivadas de forma tridimensional, as CTMs são células jovens/indiferenciadas que podem se diferenciar e formar tecidos como muscular, ósseo, sanguíneo e neural. Este sistema será enriquecido com o plasma rico em plaquetas (PRP), que é uma fração do sangue rica em plaquetas, as quais liberam diversos fatores que parecem atuar aumentando a proliferação das células. Associando estes três componentes, as CTMs o hidrogel de celulose e o PRP, pretendemos

estudar a diferenciação das CTMs para células ósseas visando a futura utilização deste sistema para terapia regenerativa de danos ósseos.

Para a fabricação do PRP, utilizaremos sangue periférico. Faremos uma coleta de aproximadamente 8mL de sangue, utilizando agulha e seringa descartáveis. As amostras serão levadas para o laboratório para serem processadas. O PRP será adicionado à cultura de CTMs nos cultivos tridimensionais e seu efeito será avaliado com auxílio de técnicas de microscopia, coloração e moleculares.

A coleta de sangue não envolve riscos consideráveis se executado de forma correta. A formação de hematoma é a complicação mais comum da punção venosa, quando ocorre um extravasamento do sangue para o tecido, durante ou após a punção, sendo visualizado na forma de uma protuberância de cor arroxeada. A dor é o sintoma de maior desconforto ao paciente, e eventualmente, pode ocorrer a compressão de algum ramo nervoso. Entretanto, serão tomadas todas as medidas de segurança para que os riscos e as complicações decorrentes desta atividade sejam mínimos para os doadores voluntários.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a coleta de seu sangue, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

### **CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Avaliação da proliferação e diferenciação óssea de células tronco de placenta humana em arcabouço hidrogel”, e concordo em participar do estudo, como voluntário.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

**RG:** \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.