

Addeli Bez Batti Angulski

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE CULTIVO DE  
CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA EM HIDROGEL  
DE CARRAGENANA EXTRAÍDO DA ALGA VERMELHA  
*KAPPAPHYCUS ALVAREZII*.**

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.

Florianópolis  
2012

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

Angulski, Addeli Bez Batti

Desenvolvimento de um modelo de cultivo de células-tronco da derme humana em hidrogel de carragenana extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (dissertação) / Addeli Bez Batti Angulski ; orientador, Giordano Wosgrau Calloni ; co-orientador, Marcelo Maraschin. - Florianópolis, SC, 2012. 143 P. ; 21 cm

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. Ambiente tridimensional
4. Hidrogel de carragenana. I. Calloni, Giordano Wosgrau





*Dedico este trabalho aos meus pais  
Nazareno e Edla,  
à minha irmã Hanna e ao meu noivo  
Charles por todo apoio,  
carinho e amor transmitidos ao longo  
desta jornada.  
Amo muito vocês!*



## AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador Dr. Giordano Wosgrau Calloni, pelos ensinamentos, conhecimentos e incentivo transmitidos ao longo deste trabalho. Eles foram essenciais para a construção do meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada por ter confiado em mim e acreditado que juntos poderíamos vencer todos os desafios que estavam a nossa frente.

Ao meu co-orientador Dr. Marcelo Maraschin por ter aceitado fazer parte deste grupo de pesquisa. Obrigada pela ajuda, contribuições, correções e confiança.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Leila Hayashi pelo apoio incondicional dado a este projeto desde o início do seu desenvolvimento. Sua motivação e estímulo foram fundamentais para a construção deste projeto. “Um dia ainda ficaremos ricos e famosos,”, não é mesmo Dra. Leila? Obrigada por tudo!

Aos professores do laboratório Dra. Andréa Gonçalves Trentin, Dr. Marcio Alvarez da Silva e Dr. Ricardo Castilho Garcez pela colaboração e incentivo.

À prof<sup>a</sup> Dra. Claudia Nedel que esteve comigo durante esses dois anos, sendo a professora supervisora da minha bolsa REUNI. Obrigada por me ensinar a como ser uma excelente professora em sala de aula. Seus conselhos e ensinamentos foram fundamentais para a minha formação profissional.

Aos demais professores da pós-graduação que contribuíram para a minha formação e crescimento acadêmico.

As queridas colegas de laboratório, Diana, Talita, Meline e Fernanda que sempre me apoiaram e incentivaram. Obrigada por toda ajuda, pelas inúmeras dúvidas respondidas, auxílio na bancada e pelo companheirismo. Vocês foram fundamentais para a construção e conclusão deste trabalho. Meu eterno agradecimento.

À minha aluna de IC Michele por ter entrado neste projeto e me ajudado a construir uma importante etapa de minha vida. Obrigada pela confiança depositada, pelo estímulo e por toda ajuda com os experimentos. Parte deste trabalho devo a você!

Aos demais colegas de laboratório Bia, Aloisio, Camila, Diego, Pri, Silvia, Bibiane, Raul, Rafa, Rogério, Mari, Denise, Ana Tchica e as ex-alunas Bianca e Bruna pelo apoio, companheirismo, amizade, conversas reconfortantes e por todos os momentos de descontração.

Às alunas do LAMAR Tici e Carmen por toda ajuda prestada com o microscópio Confocal e pelas sugestões e ideias transmitidas a esse trabalho.

Aos servidores dos laboratórios multiusuários pelo auxílio nos experimentos. Especialmente à Eliana e Chirle pelas inúmeras horas de trabalho no Confocal e criostato.

Ao professor Kildare Rocha de Miranda e ao aluno de Pós-doutorado Daniel Gonçalves Iucif do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por terem aberto as portas do seu laboratório para realizarmos as análises de MEV através do equipamento Crio-fratura.

Às minhas queridas amigas de faculdade Amanda, Gabi, Lucy e Ida que desde os tempos de graduação compartilham comigo sonhos, ideias e conquistas. Eu sei que mesmo estando longe vocês estão torcendo pelo meu sucesso!

Às minhas amigas de infância por fazerem parte da minha vida desde os meus primeiros anos neste planeta. Obrigada pela amizade sincera, companheirismo e por estarem sempre ao meu lado!

Aos meus pais Nazareno e Edla que tanto amo e admiro por sempre terem acreditado no meu potencial e me apoiado incondicionalmente, sem nunca medir esforços para proporcionar todas as oportunidades que me fizeram chegar até aqui.

À minha irmã Hanna por todo amor, carinho e companheirismo que sempre tivemos uma pela outra, eles são essenciais na minha vida. Obrigada por sempre estar ao meu lado me incentivando a correr atrás dos meus sonhos!

Ao meu noivo Charles pelo constante apoio, incentivo e inspiração. Fico muito feliz em saber que você faz parte da minha história e que pôde vivenciar junto comigo o meu amadurecimento e crescimento profissional. Obrigada por existir na minha vida. Amo muito você!

Àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) apresentam características como a multipotencialidade, auto-renovação e rápida expansão *in vitro* que as colocam numa posição estratégica e promissora para o uso em terapias celulares e na medicina regenerativa. A pele representa uma fonte de CTMs abundante, acessível e menos suscetível a questionamentos éticos. Atualmente, as células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH) tem sido pesquisadas quanto a sua habilidade em agir na cura, regeneração e reparo do tecido lesionado. O comportamento celular está intimamente associado ao complexo microambiente tridimensional presente no tecido nativo. Nesse sentido, *scaffolds*, feitos de polímeros naturais ou sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis vem sendo desenvolvidos. O hidrogel de carragenana tem atraído grande interesse devido a sua estrutura 3D e biocompatibilidade, conseguindo assim, mimetizar o microambiente encontrado pelas células *in vivo*. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um modelo para o cultivo de CTMDH, baseado na utilização do hidrogel produzido a partir de carragenana extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, cultivada no litoral do estado de Santa Catarina. Para isto, isolamos CTMDH a partir de fragmentos oriundos de cirurgias de *lifting* facial. Estas células foram cultivadas sob dois modelos: (1) CTMDH foram cultivadas sobre o hidrogel de carragenana; (2) CTMDH foram cultivadas encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial (Sigma®). Os resultados do cultivo das CTMDH sobre o hidrogel de carragenana mostraram que nesta condição as células formaram dermo-esferas, as quais permaneceram em suspensão e num estado quiescente, com baixa taxa proliferativa. Devido a este comportamento atípico, as dermo-esferas foram transplantadas para placas de plástico. Nesta condição verificamos que as dermo-esferas conseguiram aderir e proliferar em superfície plástica. Elas também apresentaram marcação positiva para os marcadores de pluripotencialidade e para marcadores de CTMs diferenciadas. Além disso, estas células mantiveram a expressão dos antígenos característicos de CTMs e capacidade de diferenciação nos fenótipos adipogênico e

osteogênico. Por outro lado, quando as CTMDH foram encapsuladas nos hidrogéis de carragenanas observou-se que as células apresentaram morfologia arredondada, apresentando pouca interação com gel. O ensaio de viabilidade por MTS e Qtracker demonstrou que no sétimo e oitavo dia há um aumento no número de células viáveis, porém no décimo quarto dia a viabilidade celular decaiu consideravelmente. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que a microestrutura dos hidrogéis de carragenanas é composta por uma estrutura altamente porosa. Desta forma, concluímos que o modelo de cultivo sobre o hidrogel de carragenana não apresentou desempenho satisfatório para sustentar a adesão, proliferação e sobrevivência das CTMDH. Por outro lado, verificamos que foi possível desenvolver um bom modelo 3D com a técnica de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.

**Palavras chave:** células-tronco mesenquimais da derme humana, ambiente tridimensional, hidrogel, carragenana.

## ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) exhibit features such as multipotentiality, self-renewal and rapid expansion *in vitro* that place them in a promising and strategic position for use in cell therapy and regenerative medicine. The skin represents an abundant source of MSCs, readily accessible and less susceptible to ethical questions. Currently, mesenchymal stem cells from human dermis (MSCHD) are being researched for its ability to act in healing, regeneration and injured tissue repair. The unique cell behavior is closely related to the complex three-dimensional microenvironment present in native tissue. Thus, scaffolds made of natural or synthetic polymers, biocompatible and biodegradable are being developed. Carrageenan hydrogel has attracted great interest due to its 3D structure and biocompatibility. This study aimed to develop a model for growing MSCHD based on the use of a hydrogel made from carrageenan, a polysaccharide extracted from red seaweed *Kappaphycus alvarezii* grown on the coast of the state of Santa Catarina. MSCHD were obtained from fragments originated from facial-lifting. These cells were cultured in two models: (1) MSCHD were cultured on carrageenan hydrogel; (2) MSCHD were cultured encapsulated in native and commercial (Sigma®) carrageenan hydrogels. The results revealed that MSCHD cultured on carrageenan hydrogel formed dermo-spheres, which remained in suspension and in a quiescent state, with low proliferative rate. Due to its unusual behavior the dermo-spheres were transplanted to plastic dishes. In this condition we found that the dermo-spheres were able to adhere and proliferate on the plastic surface. Furthermore, dermo-spheres showed positive staining for markers of pluripotency and MSC differentiation. In addition, these cells maintained the expression of characteristic antigens of MSC and the ability to differentiate into osteogenic and adipogenic phenotypes. On the other hand, when MSCHD were encapsulated in native and commercial carrageenan hydrogels, they exhibited a rounded morphology displaying little interaction with the gels. The viability test by MTS and Qtracker demonstrated that in the seventh and eighth day there was an increase in the number of viable cells. However, in the fourteenth day cell viability decreases considerably. Scanning electron

microscopic (SEM) revealed that carrageenan hydrogels microstructure is composed of a highly porous structure. Thus, we conclude that the culture of MSCHD on carrageenan hydrogel had not provided satisfactory performance to support adhesion, proliferation and cell survival. On the other hand, we were able to develop a good 3D model using encapsulation technique of MSCHD in native and commercial carrageenan hydrogels.

**Keywords:** mesenchymal stem cell from human dermis, three-dimensional microenvironment, hydrogel, carrageenan.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ SMA: alfa actina de músculo liso  
BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina  
CD73: ecto 5` nucleotidase  
CD90: Thy-1  
CD105: endoglin  
CTs: células-tronco  
CTM: célula tronco mesenquimal  
CTMDH: célula tronco mesenquimal derivada da derme humana  
DAPI: 4'-6-diamino-2-fenilindol  
DMEM/F12: *dulbecco`s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12*  
DNA: ácido desoxiribonucleico  
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetracético  
EGF: fator de crescimento epidérmico/epidermal  
FITC: *fluorescein isothiocyanate*  
FGF: fator de crescimento de fibroblasto  
HCN: hidrogel de carragenana nativa  
HCC: hidrogel de carragenana comercial  
HN: hidrogel natural  
HS: hidrogel sintético  
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
KCl: cloreto de potássio  
MEV: microscopia eletrônica de varredura  
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium  
PBS: tampão fosfato salino  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PE: *phycoeritrin*  
PEG: poly(ethylene glycol)  
PerCP: *peridinin chlorophyll protein complex*  
PLGA: poly(lactide-co-glycotide)  
PLLA- ácido polilático  
PS: penicilina/streptomicina  
SBF: soro bovino fetal  
TGF  $-\beta$ 1: fator de crescimento transformante  $\beta$ 1  
TxRd: vermelho do texas  
UFC-F: unidade formadora de colônias fibroblastóide

UV: ultravioleta

2D: bidimensional

3D: tridimensional

$\kappa$ : kappa

$\iota$ : iota

$\lambda$ : lambda

$\mu$ : mu

$\nu$ : nu

$\text{cm}^2$ : centímetro quadrado

ml: mililitro

mg: miligrama

ng: nanograma

M: molar

mM: milimolar

$\mu\text{g}$ : micrograma

$\mu\text{M}$ : micromolar

$\mu\text{m}$ : micrometro

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração esquemática das três camadas que compõem a pele.....	7
<b>Figura 2.</b> Ilustração esquemática da importância do ambiente 3D para as funções celulares.....	11
<b>Figura 3.</b> Detalhe da estrutura dimérica básica formadora da cadeia de carragenana.....	19
<b>Figura 4.</b> Detalhes das estruturas químicas dos dissacarídeos constituintes dos principais tipos de carragenana.....	20
<b>Figura 5.</b> Fotografia representativa do teste realizado para determinar a melhor concentração dos hidrogéis de carragenana para sustentar o cultivo das CTMDH.....	36
<b>Figura 6.</b> Detalhes da morfologia das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e superfície plástica.....	38
<b>Figura 7.</b> Aspecto morfológico das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e superfície plástica.....	40
<b>Figura 8.</b> Capacidade de adesão e migração das dermo-esferas e células oriundas das dermo-esferas que foram transplantadas para superfície plástica.....	42
<b>Figura 9.</b> Proliferação celular nas dermo-esferas e CTMDH cultivadas sobre superfície plástica.....	43
<b>Figura 10.</b> Expressão de Nanog e Oct3/4 nas dermo-esferas e nas CTMDH cultivadas sobre a superfície plástica.....	44
<b>Figura 11.</b> Expressão de $\beta$ Tubulina III e $\alpha$ SMA nas dermo-esferas e nas CTMDH cultivadas sobre superfície plástica.....	45
<b>Figura 12.</b> Imunofenotipagem das dermo-esferas e CTMDH.....	48
<b>Figura 13.</b> Expressão dos marcadores de superfície CD90 e CD105 nas dermo-esferas cultivadas sobre hidrogel de carragenana e nas CTMDH cultivadas sobre o plástico.....	49
<b>Figura 14.</b> Diferenciação osteogênica.....	51

<b>Figura 15.</b> Diferenciação adipogênica.....	53
<b>Figura 16.</b> Detalhes da microestrutura dos hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.....	80
<b>Figura 17.</b> Detalhes da distribuição e morfologia das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial..	81
<b>Figura 18.</b> Detalhes da morfologia das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.....	82
<b>Figura 19.</b> Morfologia diferenciada das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.....	83
<b>Figura 20.</b> Microscopia Confocal representativa das CTMDH encapsuladas em diferentes profundidades nos hidrogéis de carragenanas.....	84
<b>Figura 21.</b> Gráficos representativos da análise estatística da viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial através do ensaio por MTS.....	86
<b>Figura 22.</b> Análise da viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa e comercial através do ensaio pelo marcador Qtracker®.....	88

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Marcadores de superfície de CTMs.....	4
<b>Tabela 2.</b> Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímicas..	32
<b>Tabela 3.</b> Variáveis analisadas à padronização da metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenana nativa e comercial.....	70
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros avaliados para a padronização da metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.....	77
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros selecionados a partir dos testes de padronização para compor a metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.....	79



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 CÉLULAS-TRONCO.....	1
1.1.1 <i>Células-tronco mesenquimais.....</i>	<i>3</i>
1.1.2 <i>Pele e CTMs.....</i>	<i>6</i>
1.1.3 <i>CTs e ambientes tridimensionais.....</i>	<i>9</i>
1.2 HIDROGÉIS PARA O CULTIVO CELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS.....	13
1.3 CARRAGENANAS.....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>CAPÍTULO II – CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA SOBRE HIDROGEL DE CARRAGENANA.</b>	<b>25</b>
<b>2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA DERME HUMANA.....	27
2.2.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA.....	27
2.2.3 PREPARO DO HIDROGEL DE CARRAGENANA.....	28
2.2.3.1 <i>Determinação da concentração do hidrogel de carragenana.....</i>	<i>29</i>
2.2.4 PREPARO DO HIDROGEL ÁGAR.....	29
2.2.5 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA SOBRE HIDROGEL DE CARRAGENANA E ÁGAR.....	30

2.2.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR INCORPORAÇÃO COM BRDU.....	31
2.2.7 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA.....	31
2.2.8 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CTMDH.....	32
2.2.9 ANÁLISE DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTMDH.....	33
<b>2.3 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
2.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HIDROGEL DE CARRAGENANA.....	35
2.3.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA, ADESÃO E SOBREVIVÊNCIA DAS CTMDH CULTIVADAS SOBRE HIDROGEL DE CARRAGENANA.....	36
2.3.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DAS DERMOSFERAS EM SUPERFÍCIE ADERENTE (PLÁSTICO).....	41
2.3.3.1 Adesão e proliferação celular das dermo-esferas cultivadas em superfície aderente.....	41
2.3.3.2 Avaliação da expressão fenotípica nas dermo-esferas cultivadas em superfície aderente.....	43
2.3.3.3 Identificação da expressão dos marcadores de CTMs nas dermo-esferas cultivadas em superfície aderente.....	46
2.3.3.4 Avaliação do potencial de diferenciação para fenótipos mesenquimais das dermo-esferas cultivadas em superfície aderente.....	49
<b>2.4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>2.5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO III – CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANAS.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
3.2.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA DERME HUMANA.....	69

3.2.2	ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA.....	69
3.2.3	PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA NATIVA E COMERCIAL.....	69
3.2.4	PREPARO DOS HIDROGÉIS DE CARRAGENANA.....	71
3.2.4.1.	<i>Avaliação da microestrutura dos hidrogéis de carragenana.....</i>	<i>72</i>
3.2.5	CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA.....	73
3.2.6	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR.....	73
3.2.6.1	<i>Ensaio da viabilidade por MTS.....</i>	<i>73</i>
3.2.6.2	<i>Ensaio da viabilidade por Qtracker.....</i>	<i>74</i>
3.2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	75
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>77</b>
3.3.1	PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ENCAPSULAMENTO DAS CTMDH EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA.....	77
3.3.2	MICROESTRUTURA DOS HIDROGÉIS DE CARRAGENANA.....	79
3.3.3	MORFOLOGIA E ADESÃO DAS CTMDH ENCAPSULADAS EM HIDROGEL DE CARRAGENANA.....	81
3.3.4	VIABILIDADE DO CULTIVO DE CTMDH ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA.....	85
3.3.4.1	<i>Ensaio da viabilidade por MTS.....</i>	<i>85</i>
3.3.4.2	<i>Ensaio da viabilidade por Qtracker.....</i>	<i>87</i>
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>89</b>
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

**ANEXOS.....119**

# Capítulo I

---

## Introdução Geral

### 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CTs) são classificadas como uma população de células indiferenciadas e não especializadas, com capacidade de se auto-renovar e de originar um ou mais tipos de linhagens diferenciadas (THOMSON *et al.*, 1998; ZAGO; COVAS, 2006). A auto-renovação dessas células pode se dar por divisão simétrica, onde há geração apenas de novas CTs, ou assimétrica, na qual são originadas além de CTs, células progenitoras que são parcialmente comprometidas fenotipicamente e que podem seguir uma via específica de diferenciação (SANDERS *et al.*, 2006).

Em relação aos seus potenciais de diferenciação, essas células podem ser classificadas como: totipotentes, quando são capazes de dar origem a todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários; pluripotentes, quando possuem a habilidade de originar todos os tipos celulares para formar o embrião, exceto os anexos embrionários; multipotentes, que são capazes de gerar apenas algumas linhagens celulares; e unipotentes, que originam apenas um tipo celular maduro (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Molecularmente, esta potencialidade das CTs tem sido associada à expressão de inúmeros fatores de transcrição, destacando-se o Nanog e Oct3/4. Nanog e Oct3/4 são fatores de transcrição responsáveis por regular a pluripotencialidade e auto-renovação das CTs embrionárias (GUILLOT *et al.*, 2007; ILANCHERAN *et al.*, 2007). Logo, a expressão destes fatores pode ativar ou inibir a expressão de vários genes, mantendo assim a célula em um estado indiferenciado e de auto-renovação (PAN *et al.*, 2002).

As CTs ainda podem ser classificadas quanto ao seu local de origem, como CTs embrionárias ou adultas. As CTs embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e são definidas como células totipotentes e que apresentam uma enorme habilidade de expansão, auto-renovação e de formação de progenitores celulares mais especializados (THOMSON *et al.*, 1998; SYLVESTER; LONGAKER, 2004). As CTs adultas podem ser derivadas de tecidos adultos e fetais e, portanto também são conhecidas como CTs somáticas. Inicialmente foram descritas como células tecido-específicas, pois são capazes de se diferenciar em tipos celulares mais restritos, geralmente relacionados ao tecido de onde derivam (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005; ZAGO; COVAS, 2006). Por serem consideradas CTs comprometidas com tecidos ou órgãos específicos, acredita-se que estão vinculadas, sobretudo, com a manutenção da funcionalidade e do reparo tecidual (SANDERS *et al.*, 2006). No entanto, pesquisas recentes tem evidenciado que a plasticidade dessas células é maior do que se imaginava, uma vez que elas conseguem se diferenciar em diversos tipos celulares (WAGERS; WEISSMAN, 2004; WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005; MEIRELES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

As CTs adultas e embrionárias representam fontes atraentes e promissoras para o uso em terapias clínicas e engenharia de tecidos. Entretanto, o uso das CTs embrionárias para a pesquisa e aplicações clínicas ainda apresenta muitas controvérsias, devido em grande parte aos questionamentos éticos e biológicos que suscitam em torno do isolamento dessas células (SYLVESTER; LONGAKER, 2004). Como exemplos de questionamentos biológicos estão os problemas de rejeição imunológica e o seu alto potencial carcinogênico, os quais dificultam o uso clínico dessas células (ESPINOZA; PETERSON, 2012).

Em contrapartida, as CTs adultas são menos suscetíveis a restrições de ordem ética e biológica comparativamente as CTs embrionárias e portanto, podem ser utilizadas com cautela em pesquisas e aplicações clínicas. Muitos tecidos adultos contém populações de CTs que possuem a habilidade de se renovar após uma doença, trauma ou injúria, servindo para esses tecidos como um reservatório de CTs (PITTENGER *et al.*, 1999). Diversos tipos celulares já foram descritos e isolados de tecidos adultos. Entre eles, destacam-se as CTs hematopoiéticas, as quais são o grupo de CTs adultas mais bem descritas e caracterizadas, sendo geralmente isoladas da medula óssea e do cordão umbilical (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005; NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2011). Outras populações de CTs adultas também já

são conhecidas, como as CTs epidermais, as CTs neurais e as CTs mesenquimais (BIANCO *et al.*, 2008; ALISON; ISLAM, 2009).

### 1.1.1 Células-tronco mesenquimais

O termo células-tronco mesenquimais (CTMs) foi estabelecido pela primeira vez por Arnold Caplan em 1991. Este termo foi cunhado a partir de experimentos realizados na década de 60 e 70 por Friedenstein e colaboradores (1968), os quais demonstraram que uma subpopulação de células da medula óssea era capaz de originar osteoblastos após o transplante da medula óssea para outra região (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968). Essas células eram distinguidas das demais células hematopoiéticas por sua rápida adesão na superfície plástica do cultivo e por sua aparência fibroblastóide, apontando para sua origem no compartimento estromal da medula óssea (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1968; FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970; BIANCO *et al.*, 2008).

Inicialmente estas células eram consideradas precursores de fibroblastos derivados da medula óssea, sendo então, denominadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F), as quais eram caracterizadas pela morfologia fibroblastóide, alta adesão ao plástico e expansão *in vitro* (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974; FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976; NARDI; MEIRELLES, 2006; NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2011). Estudos posteriores revelaram que as UFC-F eram capazes de se diferenciar em células com características de osteoblasto, adipócito e condrócito, passando, portanto a ser consideradas células multipotentes (LURIA *et al.*, 1987; FRIEDENSTEIN, 1989; FRIEDENSTEIN, 1990; BIANCO *et al.*, 2008). Tendo em vista o seu potencial osteogênico e a residência no estroma medular, na década de 80 Friedenstein e Owen passaram a chamar essas células de CT osteogênica ou CT estromal da medula óssea (OWEN; FRIENDESTEIN, 1988).

Entretanto, os termos CT osteogênica e CT estromal não foram bem aceitos e logo, surgiu o conceito de célula tronco mesenquimal que acabou tendo boa aceitação e ganhou popularidade no meio científico (CAPLAN, 1991; BIANCO *et al.*, 2008). Em virtude da dificuldade de nomear e de criar um conceito bem estabelecido em torno do termo CTM, foram propostos pelo Comitê de Células-Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular, critérios mínimos que caracterizassem as CTMs (DOMINICI, *et al.*, 2006).

Logo, o conceito de CTM ficou definido como uma população de células que apresentam morfologia fibroblastóide, alta aderência ao plástico, expressão de antígenos de superfície específicos e potencial

para diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito, quando mantidas em condições apropriadas *in vitro* (DOMINICI, *et al.*, 2006). Com relação à expressão de antígenos de superfície específicos, ficou estabelecido que as CTMs devem apresentar a expressão dos antígenos CD73 (ecto 5' nucleotidase), CD90 (Thy-1) e CD105 (endoglin) e para assegurar que as CTMs não sejam confundidas com outros tipos celulares, é importante que essas células sejam negativas para a presença dos antígenos endoteliais e hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI, *et al.*, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006). Estes marcadores foram definidos em consenso para o correto isolamento das CTMs, porém existem outras moléculas de superfície expressas por essas células que também podem ser levadas em consideração e estudadas para a pesquisa (Tabela 1) (MEIRELLES; NARDI, 2009).

**Tabela 1. Marcadores de superfície de CTMs**

<b>Marcadores expressos</b>	<b>Marcadores ausentes</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, Desmina, 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: MEIRELLES; NARDI, 2009

Outra característica importante das CTMs está relacionada ao seu potencial de diferenciação para os fenótipos de osso, gordura e cartilagem *in vitro*, o que demonstra a multipotencialidade presente nessas células (PHINNEY; PROCKOP, 2007). Além da capacidade de gerar os três fenótipos citados anteriormente *in vitro*, as CTMs também podem dar origem a osso e cartilagem após implante ectópico *in vivo* (ASHTON *et al.*, 1980; HAYNESWORTH *et al.*, 1992). Muitos estudos têm reportado a capacidade de diferenciação das CTMs em outros tipos

celulares de origem mesodermal e não-mesodermal incluindo células endoteliais (OSWALD *et al.*, 2004), cardiomiócitos (MAKINO *et al.*, 1999), hepatócitos (SNYKERS *et al.*, 2009) e células neurais (PHINNEY; PROCKOP, 2007; ARTHUR *et al.*, 2008). Dentro desse contexto, é válido ressaltar que alguns estudos já demonstraram que a população de CTMs isoladas da medula óssea é funcionalmente heterogênea, contendo progenitores indiferenciados e precursores que em um determinado momento podem estar restritos a um tecido específico ou com capacidade variada de diferenciação (PHINNEY *et al.*, 1999; MURAGLIA *et al.*, 2000).

Além da medula óssea, as CTMs podem ser derivadas do músculo esquelético (WILLIAMS *et al.*, 1999), tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), derme (VERSTAPPEN *et al.*, 2009), cordão umbilical (ERICES *et al.*, 2000), sistema circulatório (KUZNETSOV *et al.*, 2001), polpa dental (GRONTHOS *et al.*, 2000), fluido amniótico (INT ANKER *et al.*, 2003), sangue fetal, fígado e pulmão (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001; HERRERA *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2005). Na verdade, sugere-se que células com características de CTMs podem ser derivadas e propagadas *in vitro* a partir de todos os órgãos e tecidos pós-natais (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

As CTMs apresentam diversas características positivas que as colocam numa posição estratégica e promissora para o uso em terapia celular e na medicina regenerativa. Entre tantos pontos positivos destacam-se a vasta gama de órgãos e tecidos fornecedores de CTMs, a sua multipotencialidade e rápida expansão *in vitro*, bem como a facilidade no seu isolamento, cultivo e manutenção em cultura (NARDI; MEIRELLES, 2006; NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2011).

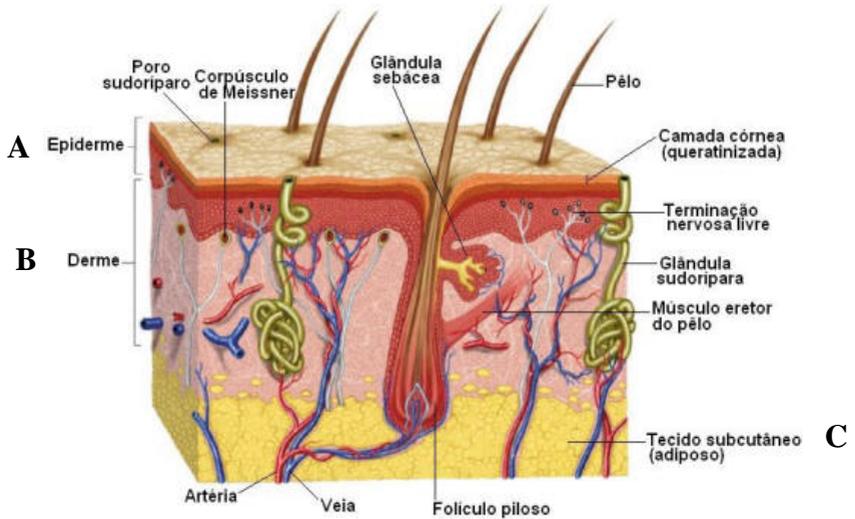
Estudos com modelos animais têm demonstrado que as CTMs apresentam eficácia como vetores terapêuticos em injúria de pulmão (ORTIZ *et al.*, 2003), doenças renais (KUNTER *et al.*, 2006), diabetes (LEE *et al.*, 2006) e desordens neurológicas (PHINNEY; ISAKOVA, 2005). Adicionalmente, estudos do grupo de PHINNEY e PROCKOP (2007) analisando o transcriptoma de CTMs de humanos e murinos, revelaram que as células expressam proteínas que regulam uma série de atividades endógenas, incluindo angiogênese, reparo de tecidos lesionados, sistema de imunidade e defesa como também atividade neural. A expressão desses fatores aliado aos processos e funções que as células desempenham como: promoção da sobrevivência e proliferação de células endógenas (MUNOZ *et al.*, 2005), indução da angiogênese (SHYU *et al.*, 2006) e inibição da resposta inflamatória e imune (ORTIZ

*et al.*, 2007), explicam como essas células conseguem afetar o reparo e regeneração tecidual.

### **1.1.2 Pele e CTMs**

A pele é considerada um dos maiores órgãos do corpo humano. Ela atua como barreira protetora contra agentes do meio ambiente como bactérias e vírus, é responsável pela regulação térmica, participa das funções sensoriais e desempenha papel na excreção de substâncias que precisam ser eliminadas do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2012).

A pele é composta por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (tecido subcutâneo) (Figura 1). A epiderme é a camada mais superficial, composta por vários tipos celulares como queratinócitos, melanócitos, células de Merkel, além de conter os anexos cutâneos; unhas, pelos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. A derme é a camada intermediária da pele e encontra-se logo abaixo da epiderme, sendo responsável por conferir resistência e elasticidade à pele. Ela é constituída por um tecido conjuntivo rico em fibras de colágeno e fibras elásticas, além de conter diversas estruturas relacionadas à epiderme. Já a hipoderme representa a camada mais profunda da pele, sendo composta por células lipídicas (adipócitos), as quais atuam como depósito de calorías e protegem contra traumas físicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).



**Figura 1. Ilustração esquemática das três camadas que compõem a pele.** (A) Epiderme; (B) Derme; (C) Hipoderme (tecido subcutâneo).

Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>

A pele vem sendo estudada e pesquisada há muitos anos por constituir uma fonte potencial de CTs e progenitores celulares com habilidade de reparo e regeneração tecidual (YAMANAKA, 2008; RAMESH *et al.*, 2009). Embora CTs adultas já tenham sido isoladas de diversos órgãos e tecidos, estudos recentes têm demonstrado que CTs derivadas da pele apresentam propriedades similares às demais CTMs (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012). De acordo com o Comitê de Células-Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTs derivadas da pele são aderentes ao plástico, apresentam expressão positiva para os marcadores de superfície característicos de CTMs (CD73, CD90, CD105) e expressão negativa para CD14, CD34 e CD45. Ademais, possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênicas e osteogênicas (DOMINICI *et al.*, 2006; LORENZ *et al.*, 2008; AL-NBAHEEN *et al.*, 2012; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012).

Com relação à nomenclatura das CTs derivadas da pele, estas podem ser chamadas de CTMs derivadas da pele, células estromais derivadas da pele ou CTs adultas multipotentes. Atualmente, não existe um consenso que defina qual a melhor nomenclatura que deve ser utilizada para nomear a população de CTs derivadas da pele, o que

frequentemente ocasiona confusão na hora de pesquisar e estudar este tipo celular (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012).

Atualmente diversos tipos de CTs podem ser encontrados no tecido epitelial adulto, seja na camada epidermal (BLANPAIN; FUCHS, 2006) ou dermal (AL-NBAHEEN *et al.*, 2012; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012). Os tipos celulares mais comumente encontrados são as CTs epidermais, CTs dermais, as *SKPs* (skin-derived precursor), a população basal de queratinócitos encontrada no epitélio interfolicular e as células residentes na região do bulge do folículo piloso (CRIGLER *et al.*, 2007; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012). Dentre os tipos celulares citados acima, as CTs epidermais e as *SKPs* destacam-se dos demais grupos celulares por apresentarem diversos estudos relacionados com a sua origem, função e caracterização (TOMA *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2006; LEVY *et al.*, 2007).

No entanto, nos últimos anos, as CTs dermais ou também como são chamadas CTMs da derme (CTMD) vem ganhando destaque no campo científico por apresentarem células capazes de atuar no desenvolvimento do folículo através das CTs presentes na papila dérmica e no bulge (BLANPAIN; FUCHS, 2006). Além disso, elas também são capazes de se auto-renovar e agir na cura, regeneração e reparo no tecido lesionado (CRIGLER *et al.*, 2007). Como a pele é um dos tecidos mais abundante do corpo humano, ela representa uma fonte ideal para obtenção de grandes quantidades de CTs. Além disso, muitos fragmentos de pele são descartados após cirurgias de estética corporal, o que torna a obtenção de CTs da pele um método não invasivo, de fácil acesso e menos suscetível a restrições de ordem ética (YAN; OWENS, 2008).

Outro campo que está em crescente ascensão é a bioengenharia de pele. Esta área visa à produção *in vitro* de pele humana para a reconstrução tissular em áreas de maior extensão e de difícil reparo por processos naturais de regeneração. Desenvolver *in vitro* um tecido artificial que auxilia a regeneração natural pode ser um bom modelo para o estudo do reparo e da regeneração tecidual. (CRIGLER *et al.*, 2007). Neste contexto, a utilização de matrizes de regeneração dérmica tais como Integra® e Pelnac® (utilizadas em clínicas), e matrizes de nanofibras e hidrogéis, pode ser uma alternativa promissora ao desenvolvimento de ambientes tridimensionais adequados ao cultivo e manutenção de CTMs. Dessa forma, o estudo da interação entre CTMs e matrizes tridimensionais contribui para o melhor entendimento do comportamento celular e das vias de sinalização envolvidas no processo de reparo e regeneração. Além disso, o uso de matrizes de regeneração

dérmica para o tratamento de traumas e lesões proporciona uma melhora na qualidade de vida, trazendo bem estar aos pacientes tratados.

### 1.1.3 CTs e ambientes tridimensionais

Sabe-se que as CTs possuem grande potencial para aplicação em terapias celulares e na medicina regenerativa. No entanto, para elucidar o completo potencial que essas células representam no tratamento de doenças e na medicina regenerativa, é necessário fornecer ambientes experimentais *in vitro* que mimetizem ao máximo a arquitetura e fisiologia do ambiente encontrado por essas células *in vivo* (GODIER *et al.*, 2008).

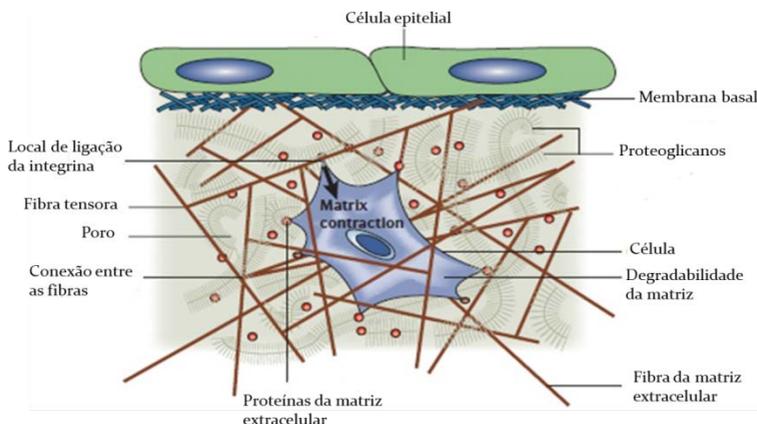
Desde os primórdios, os cultivos de CTs *in vitro* eram realizados em ambientes bidimensionais de plástico e vidro, porém essa estrutura 2D (bidimensional) não representa o real microambiente encontrado pelas células *in vivo*, o qual corresponde a uma complexa e dinâmica estrutura 3D (BURDICK; VUNJAK-NOVAKOVIC, 2008). Embora o ambiente 2D seja bastante distinto em relação ao 3D, muitos estudos *in vitro* ainda são realizados sobre esta estrutura 2D. Muito do que se conhece hoje acerca do comportamento celular *in vitro* deve-se às pesquisas realizadas em ambientes bidimensionais. No entanto, diversos estudos têm elucidado disparidades na função celular encontrados entre as culturas 2D e 3D, sugerindo que apenas o cultivo em ambiente 2D, não é suficiente para compreender os complexos comportamentos celulares (TIBBIT; ANSETH, 2009). Estudos recentes comparando ambientes 3D *versus* 2D, tem demonstrado que a célula exibe um comportamento não natural quando retirada do seu ambiente nativo e cultivada em ambiente 2D de plástico e vidro (PETERSEN *et al.*, 1992; TANAKA *et al.*, 2004). No ambiente bidimensional, a célula apresenta-se polarizada, de forma que apenas um segmento da membrana celular é capaz de interagir com a matriz extracelular e com as células vizinhas, enquanto o restante da superfície celular é exposta ao meio de cultivo (ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, nesse ambiente as células também são expostas a concentrações homogêneas de nutrientes, fatores de crescimento e citocinas, o que não corresponde a real situação encontrada pelas células *in vivo* (TIBBIT; ANSETH, 2009).

Atualmente, sabe-se que o microambiente celular contribui espacialmente e temporalmente à complexa sinalização que direciona o comportamento e as funções celulares. Este dinâmico ambiente

extracelular orquestra uma cascata de sinais intracelulares que influenciam o destino fenotípico através da alteração gênica e expressão protéica (BIRGERS-DOTTER *et al.*, 2005). Desta forma, torna-se relevante salientar que a célula não pode ser vista como uma entidade solitária definida pelo seu genoma, devendo ser avaliada no seu contexto de interação com a matriz extracelular, fatores de crescimento, hormônios e moléculas reguladoras que controlam sua diferenciação, função e crescimento (TIBBIT; ANSETH, 2009).

*In vivo*, as células são rodeadas por uma complexa e dinâmica estrutura tridimensional, a matriz extracelular, a qual corresponde aos complexos macromoleculares como proteínas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas que são produzidas, exportadas e complexadas localmente pelas células na matriz, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos (SCHWARTZ, 2001). As influências desempenhadas pela matriz extracelular são exercidas principalmente por proteínas de adesão transmembrana, que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto, atuando como receptores de matriz. Os principais receptores das células animais para a ligação da maioria das proteínas de matriz extracelular são as integrinas. Essa ligação é responsável por mediar a comunicação célula-matriz através da transmissão de informações do meio extracelular para o citoplasma e até mesmo para o núcleo celular, onde a célula pode ter o comportamento da sua atividade gênica modificada (Figura 2) (SCHWARTZ, 2001; CUKIERMAN *et al.*, 2002).

A adesão célula-matriz é capaz de intermediar respostas fisiológicas responsáveis pelo controle do crescimento celular, migração, diferenciação, sobrevivência, organização do tecido e remodelamento da matriz (BIRGERS-DOTTER *et al.*, 2005). Nesse contexto, é importante salientar que propriedades mecânicas da matriz extracelular, como rigidez e elasticidade também são capazes de influenciar o comportamento celular, sendo determinantes chaves da função e diferenciação da célula (GODIER *et al.*, 2008).



**Figura 2. Ilustração esquemática da importância do ambiente 3D para as funções celulares.** Representação da interação entre a célula e os componentes da matriz extracelular. A composição, arquitetura e o grau de conexão entre as fibras ditam as propriedades mecânicas da matriz extracelular e controlam como as forças mecânicas são transmitidas para as células. Enquanto as fibras de colágeno resistem à força tensora e compactação exercida pelas células, os proteoglicanos controlam a hidratação, a qual determina a resistência às forças compressoras. A membrana basal, a qual é secretada pelas células epiteliais e endoteliais, limita o transporte das proteínas e aumenta a rigidez mecânica. A composição da matriz também controla a adesão e migração celular e a sua sensibilidade às enzimas proteolíticas vão determinar a habilidade das células em remodelar a matriz e migrar através dela. (Adaptado de GRIFFITH; SWARTZ, 2006).

Tendo em vista a importância do ambiente tridimensional para o comportamento e função celular *in vitro*, diversos pesquisadores começaram a buscar e desenvolver materiais que fossem propícios ao cultivo celular em ambiente 3D. Como esses materiais apresentam semelhança e compatibilidade com o ambiente nativo denominam-se biomateriais. Nesse sentido, estruturas tridimensionais têm sido produzidas a partir de biomateriais sintéticos como polietilenoglicopol (PEG), ácido polilático co-glicólico (PLGA) e biomateriais naturais como o colágeno, ácido hialurônico e outros polímeros naturais (GODIER *et al.*, 2008).

Os biomateriais vêm ganhando destaque no meio científico e atualmente, modelos de cultivo celular sobre o biomaterial ou

encapsulados neste, têm sido desenvolvidos a partir de materiais de microporos (LEVENBERG *et al.*, 2003; SHEA *et al.*, 1999; YIM; LEONG, 2005), nanofibras (SEMINO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2004; VALEIRINHO *et al.*, 2013) e hidrogéis (PEPPAS *et al.*, 2006). Dentre os três materiais citados anteriormente, os hidrogéis representam a classe de biomateriais que vem sendo mais utilizada para o desenvolvimento de ambientes tridimensionais, uma vez que estes podem exibir características da mecânica, fisiologia e arquitetura do microambiente celular nativo (TIBBIT; ANSETH, 2009).

## 1.2 HIDROGÉIS PARA O CULTIVO CELULAR E ENGENHARIA DE TECIDOS

Levando-se em consideração a íntima relação entre as CTs e o seu microambiente tridimensional, arcabouços (*scaffolds*), feitos de polímeros naturais ou sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis vem sendo desenvolvidos. Estes estão sendo utilizados tanto para estudo do comportamento e mecanismos celulares *in vitro*, quanto para aplicações clínicas e na engenharia de tecidos (MANN, 2003; DONG *et al.*, 2009).

A engenharia de tecidos compreende um campo interdisciplinar que alia os conceitos da engenharia e da biologia para o desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm ou recuperam funções de um tecido lesionado (MANO *et al.*, 2007). Esse tipo de engenharia pode ser desenvolvida utilizando-se várias estratégias, porém uma técnica em especial vem ganhando atenção dos médicos e pesquisadores: a combinação de CTs provenientes do próprio paciente (autólogas) com *scaffolds* tridimensionais.

Dentro desse contexto, outro aspecto bastante relevante está associado à presença de uma adequada sinalização, a qual é requerida para manter a funcionalidade apropriada das células e inclui sinais químicos de fatores de crescimento e citocinas, como também sinais mecânicos de tensão e pressão hidrostática. A combinação entre células, *scaffold* e sinalização é uma estratégia que vem sendo utilizada na engenharia de tecidos com o intuito de manter, restaurar ou melhorar funções celulares de um tecido. (YONG-LEE; MOONEY, 2001).

*In vivo*, a célula precisa de um suporte para crescer e se desenvolver, logo, na engenharia de tecidos, o *scaffold* é requerido para fornecer suporte às células. Este age como um substrato inicial de ligação e interação para as células, devendo ser biodegradável, de modo que com o tempo, consiga se degradar dando espaço ao novo tecido que está sendo formado (YONG-LEE; MOONEY, 2001; MANN, 2003; VALEIRINHO *et al.*, 2012).

Os *scaffolds* podem ser empregados na engenharia de tecidos através de duas técnicas: (1) as células são cultivadas sobre o *scaffold* tridimensional; (2) as células são cultivadas encapsuladas no *scaffold* tridimensional (NICODEMUS; BRYANT, 2008; KHETAN; BURDICK, 2009).

A cultura de células sobre o *scaffold* tridimensional é uma prática que já vem sendo bastante utilizada para aplicações clínicas e engenharia de tecidos. Ela representa uma boa estrutura 3D que permite o crescimento, migração e proliferação celular, além de fornecer suporte

apropriado à geração de um novo tecido (NICODEMUS; BRYANT, 2008). Contudo, o encapsulamento de células em *scaffolds* tridimensionais representa uma estratégia promissora que vem sendo cada vez mais estudada para aplicação em terapias clínicas e na engenharia de tecidos. Esse sistema apresenta características peculiares que os tornam únicos comparativamente à cultura de células sobre o *scaffold* tridimensional. Como as células ficam encapsuladas em estruturas tridimensionais, esse modelo é o que melhor consegue mimetizar o que as CTs “observam” e “sentem” *in vivo*. Ademais, a técnica do encapsulamento permite o movimento livre de nutrientes e oxigênio entre as células e o ambiente que as circunda, enquanto previne a eliminação e a perda das células encapsuladas (GOREN *et al.*, 2010).

A estratégia de encapsular células oferece inúmeras vantagens incluindo, o emprego frequente como sistema de injeção, onde as células suspensas em uma solução viscosa conseguem ser entregues ao sítio de interesse *in vivo*, uma vez que o *scaffold* é colocado diretamente no local a ser tratado, não necessitando de procedimentos de cola e sutura (NICODEMUS; BRYANT, 2008). Outra vantagem que merece ser destacada relaciona-se ao fato de que as células encapsuladas poderão servir como uma fonte contínua de fatores e produtos terapêuticos a ser liberados no local do tratamento (MURUA *et al.*, 2008).

Fundamentalmente, *scaffolds* para utilização em engenharia de tecidos devem fornecer: um ambiente que favoreça a interação, proliferação e diferenciação celular; uma matriz permeável que permita a difusão de nutrientes, fatores e metabólitos e ainda suporte mecânico à reposição e regeneração tissular (SERPOOSHAN *et al.*, 2010). Recentemente, a busca por novas classes de biomateriais com propriedades apropriadas à formação de *scaffolds* e uso na engenharia de tecidos tem atraído grande interesse. Neste contexto, os hidrogéis representam a classe de biomateriais que mais vem sendo estudada à aplicação em terapias clínicas e engenharia de tecidos (SLAUGHTER *et al.*, 2009; WHEELDON *et al.*, 2010; ZHANG; KOHN, 2012).

Os hidrogéis são caracterizados pela presença de uma rede dinâmica tridimensional formada por polímeros hidrofílicos e copolímeros interligados, altamente hidratados (SLAUGHTER *et al.*, 2009). O tipo de estrutura aliado ao alto teor de água (> 99%) faz com que os hidrogéis atuem como bons veículos para o transporte de fatores solúveis, bem como facilitem o transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos (NGUYEN, WEST, 2002). Outros aspectos relevantes desse tipo de biomaterial referem-se a sua similaridade estrutural e composicional com a matriz extracelular tissular, serem biocompatíveis

e biodegradáveis (CUSHING; ANSETH, 2007). Além disso, a estrutura e composição dos hidrogéis pode ser adaptada de modo a suportar as características químicas, físicas e biológicas do microambiente nativo, o que possibilita a formação de um ambiente tridimensional mais real, com estímulos e sinais adequados às funções celulares (CONNELLY *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que não apenas as propriedades biológicas caracterizam a estrutura e função dos hidrogéis, estes por sua vez, também são dotados de diversas propriedades físicas e mecânicas, incluindo viscosidade, maleabilidade, compressão, tensão, rigidez e elasticidade. Estas propriedades, aliada à capacidade de reversão do seu estado padrão em resposta a fatores físico-químicos externos, tornam os hidrogéis estruturas versáteis, flexíveis, dinâmicas e com potencial significativo para aplicação tecnológica e biomédica (DAWSON *et al.*, 2008).

Com relação à origem dos polímeros que compõem os hidrogéis, estes podem ser classificados em hidrogéis naturais (HN) e hidrogéis sintéticos (HS). Os HN são formados a partir de polímeros oriundos de fontes naturais, incluindo proteínas e componentes da matriz extracelular e fontes biológicas como: animais, plantas, algas e bactérias (DAWSON *et al.*, 2008). Quanto às proteínas e componentes da matriz, estes compreendem o colágeno, ácido hialurônico, elastina, fibronectina e glicosaminoglicanos (HUBBELL, 2003; CALONDER *et al.*, 2005; MANO *et al.*, 2007). Os HN provenientes de fontes biológicas compreendem uma classe bastante rica e diversificada em termos de estrutura e composição dos géis (MANO *et al.*, 2007). Dentro dessa classe estão presentes os hidrogéis de quitina, alginato, ágar, agarose, carragenana e celulose (THANH *et al.*, 2002; ENTSCHEVA *et al.*, 2004; FREIER *et al.*, 2005).

Os HN apresentam inúmeras vantagens que os classificam como bons biomateriais para uso em terapias celulares e na engenharia de tecidos (SLAUGHTER *et al.*, 2009). Entre elas destaca-se o fato destes biomateriais possuírem substâncias idênticas ou muito similares àquelas encontradas no organismo humano propiciando desta forma, o fornecimento de sinais endógenos promotores da interação célula-célula e célula-matriz. Logo, estes hidrogéis não necessitam da adição de fatores exógenos, conseguindo por si só, contribuir de maneira satisfatória à sinalização e comunicação celular (MANN, 2003). Tendo em vista a similaridade com os componentes macromoleculares do organismo humano, estes hidrogéis apresentam toxicidade reduzida e pouca probabilidade de gerar reação inflamatória. Além disso, mostram-

se suscetíveis à ação de enzimas e, portanto, são biodegradáveis (YONG-LEE; MOONEY, 2001).

Como desvantagem os HN apresentam a dificuldade de manipulação e processamento, uma vez que são estruturalmente mais complexos em relação aos HS e o processo de coleta a partir do material biológico, quase sempre altera a estrutura natural. Ademais, estes biomateriais apresentam em sua composição grande variabilidade natural, a qual é decorrente das características biológicas de cada fonte, como também do processo de extração e obtenção do polímero, dificultando a obtenção da mesma composição para cada biomaterial desenvolvido (MANN, 2003).

Já os HS são formados a partir de polímeros não naturais, sendo produzidos sinteticamente em laboratório. Os exemplos de HS mais empregados em terapias clínicas e engenharia de tecidos são o polietilenoglicol (PEG), o óxido de polietileno, o ácido poliacrílico, e o álcool polivinílico (YONG-LEE; MOONEY, 2001; DAWSON *et al.*, 2008; WHEELDON *et al.*, 2010). A vantagem desse tipo de hidrogel inclui a composição química conhecida dos materiais constituintes dos géis, bem como a previsibilidade de manipulação. Isto se deve ao fato desses hidrogéis poderem ser criados a partir de reações altamente controladas e seletivas, como reações que ligam pequenas subunidades moleculares. Com esse tipo de reação, consegue-se controlar a estrutura e a química dos HS. A desvantagem destes tipos de hidrogéis está na ausência de sítios funcionais para interagir com as células e fatores solúveis do meio. Logo, este tipo de hidrogel fornece apenas a estrutura, o arcabouço para o cultivo das células, tendo relativamente, pouca influência sobre o comportamento celular (CUSHING; ANSETH, 2007).

Apesar de os hidrogéis naturais e sintéticos representarem uma vasta gama de biomateriais com diferentes características estruturais, biológicas e mecânicas, outros tipos de biomateriais e compósitos vêm sendo produzidos e caracterizados devido à necessidade de atender diversas aplicações na engenharia de tecidos (DAWSON *et al.*, 2008). Nesse contexto, hidrogéis híbridos, formados a partir de mistura de hidrogéis naturais e sintéticos ou entre hidrogéis da mesma categoria, têm sido desenvolvidos e caracterizados. Como exemplos, citam-se os hidrogéis híbridos agarose-metilcelulose (MARTIN *et al.*, 2008), quitosana-alginato (LI; ZHANG, 2005; LI *et al.*, 2005) e quitosana-carragenana (GRENHA *et al.*, 2009). Não existe um consenso sobre o melhor biomaterial a ser empregado na engenharia de tecidos, pois

dependendo do tipo de tratamento a ser realizado, um biomaterial com características específicas eventualmente será requerido.

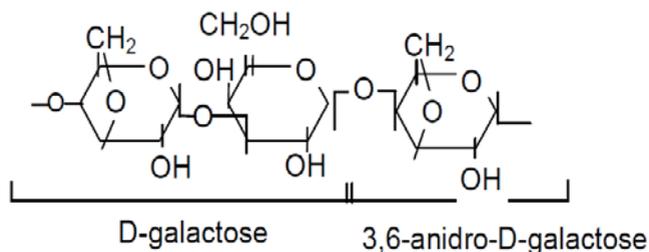
Em função deste contexto, torna-se necessário desenvolver e investigar novos biomateriais de interesse às diversas terapêuticas de saúde humana e melhoria da qualidade de vida (DAWSON *et al.*, 2008). Tendo em vista essas observações, a carragenana extraída de macroalgas vermelhas, torna-se uma atraente alternativa como biomaterial a ser usado em terapias clínicas e na engenharia de tecidos. Por ser de origem nativa, a carragenana apresenta biocompatibilidade e consegue mimetizar de forma mais natural o ambiente 3D encontrado pelas células *in vivo*.



### 1.3 CARRAGENANAS

Carragenanas são colóides hidrofílicos extraídos de espécies de algas vermelhas, principalmente aquelas pertencentes aos gêneros *Eucheuma* e *Kappaphycus* (TRONO, 1997). Juntamente com alginatos e ágaros, carragenanas constituem um grupo de substâncias complexas e biopoliméricas denominado ficocolóides. Esses polímeros naturais possuem a habilidade de formar géis termoreversíveis ou soluções viscosas e, por tal capacidade, são extensivamente usados como agentes gelificante, espessante, estabilizante e emulsificante nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, de cosmético e têxtil (PICULELL, 1995; LAHAYE, 2001; VAN DE VELDE *et al.*, 2002; PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; HILLIOU *et al.*, 2006). O setor que mais se utiliza dos benefícios e propriedades das carragenanas é a indústria alimentícia, a qual em particular, é responsável pelo uso de 90% da produção mundial de carragenana, estimada em aproximadamente 50.000 toneladas por ano (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; BIXLER; PORSE, 2011).

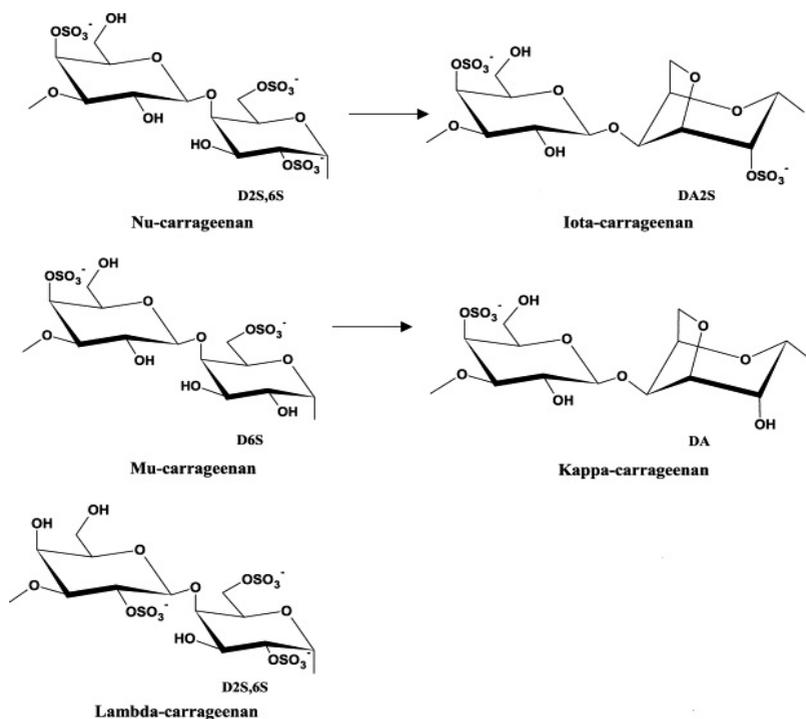
A estrutura química da carragenana é baseada em unidades repetidas de D-galactose e resíduos de 3,6-anidro-D-galactose ligados em  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3) (Figura 3) (FRANCIS *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Detalhe da estrutura dimérica básica formadora da cadeia de carragenana. Fonte: HAYASHI, 2001.

Dependendo do método de extração, da espécie e da idade da alga da qual a carragenana é obtida, vários tipos de carragenana podem ser produzidos, sendo os mais comuns a  $\kappa$ -carragenana (kappa),  $\iota$ -carragenana (iota) e  $\lambda$ -carragenana (lambda), as quais são classificadas de acordo com a presença de ligações 3,6-anidro ligadas ao resíduo de

galactose e com a posição e número de grupos sulfato (Figura 4) (PRADO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2003; HILLIOU *et al.*, 2006; VAN DE VELDE, 2008;). Outros dois tipos, carragenanas  $\mu$  (mu) e  $\nu$  (nu), precursores biológicos de  $\kappa$ - e  $\iota$ - carragenanas respectivamente, também são frequentemente encontradas em carragenanas comerciais (Figura 4). Essas carragenanas precursoras resultam do rearranjo interno pelo tratamento alcalino ou pela ação de sulfhidrolases (HILLIOU *et al.*, 2006; VAN DE VELDE, 2008).



**Figura 4. Detalhes das estruturas químicas dos dissacarídeos constituintes dos principais tipos de carragenana.** (Adaptado de CAMPO *et al.*, 2009).

O arranjo das estruturas dos constituintes estruturais básicos, i.e., dissacarídeos, e suas respectivas quantidades na macromolécula de carragenana são específicos para cada tipo de espécie de alga que a produz, e dependem do ciclo biológico da alga (LAHAYE, 2001; HILLIOU *et al.*, 2006). Alterações metabólicas e modificações no processo de extração e obtenção da carragenana podem resultar não apenas na formação de diferentes tipos de carragenanas, mas também,

no desenvolvimento de carragenanas híbridas. Estas são caracterizadas pela mistura de cadeias de polissacarídeos contendo unidades de  $\kappa$  e  $\iota$ , podendo formar produtos heterogêneos ou mais homogêneos, contendo majoritariamente as cadeias poliméricas  $\kappa$  ou  $\iota$  (CAMPO *et al.*, 2009).

Em estado puro e seco, a carragenana apresenta-se sob a forma de um pó inodoro e sem sabor. No entanto, como são polímeros lineares e solúveis em água, formam soluções tipicamente viscosas. Tais soluções viscosas são solúveis em água quente, ou seja, acima da temperatura de fusão do gel, que varia de 40°C a 70°C, mas também conseguem solidificar-se a temperatura ambiente, propiciando dessa forma, a formação de géis 3D, os quais são caracteristicamente termoreversíveis (HAYASHI, 2001, 2007). Devido à natureza iônica da carragenana, a sua gelificação é fortemente afetada pela presença de eletrólitos, e dos três tipos mais comuns, apenas a carragenana *kappa* e *iota* são capazes de formar gel. A gelificação da carragenana *iota* é aumentada pela interação com o cálcio, enquanto que a *kappa* têm sua gelificação aumentada pelo potássio. A carragenana *iota* é solúvel em uma ampla faixa térmica e o gel formado é macio e elástico. Entretanto, a carragenana *kappa* é solúvel apenas em temperaturas mais elevadas e o gel formado apresenta-se rígido e quebradiço. O resfriamento acompanhado de condições apropriadas de sal permite que as carragenanas *iota* e *kappa* sofram transições na sua conformação, possibilitando assim a formação de géis ionotrópicos e termotrópicos (SANTO *et al.*, 2009).

As carragenanas possuem propriedades peculiares que as distinguem dos demais polissacarídeos pertencentes ao grupo dos ficocolóides. São altamente hidrofílicas (grande capacidade de absorver e reter água ou líquidos orgânicos – cerca de 98% a 99% do seu volume total é composto de líquidos), insolúveis na maioria dos solventes orgânicos, incolores, biocompatíveis, não alergênicas, atóxicas, apresentam boas propriedades mecânicas (elasticidade, viscosidade, dureza e resistência ao estresse) e boa durabilidade (SAITO; OLIVEIRA, 1990; HAYASHI, 2001, 2007; CAMPO *et al.*, 2009).

As propriedades das carragenanas são fortemente dependentes da composição do meio aquoso, especialmente do seu conteúdo iônico. Desta forma, é possível modificar e refinar as suas propriedades mecânicas (e.g. elasticidade, viscosidade e resistência ao estresse), controlando a quantidade e o tipo de sais adicionados ao meio aquoso (PICULLEL, 1995). Além disso, do ponto de vista estrutural, as carragenanas assemelham-se bastante aos glicosaminoglicanos sulfatados de ocorrência natural, os quais estão presentes na matriz

extracelular como um importante componente do tecido conectivo (SANTO *et al.*, 2009). É oportuno salientar que a grande diversidade de aplicações da carragenana no campo alimentício, têxtil, farmacológico e biotecnológico se deve em grande parte à capacidade de alteração de sua estrutura química propiciando dessa forma, a produção de biopolímeros versáteis, dinâmicos e únicos em sua composição, estrutura e função.

A busca por diferentes classes de biomateriais é de suma importância para propiciar a formação de estruturas tridimensionais diversificadas, que possam atender as diferentes necessidades de aplicação em terapias celulares, medicina regenerativa e na melhoria da qualidade de vida. Levando-se em consideração a variedade de propriedades presentes nas carragenanas, bem como a sua semelhança estrutural e biológica com o ambiente natural celular, estes polissacarídeos tornam-se excelentes biomateriais a serem empregados no desenvolvimento de estruturas tridimensionais que comportem o cultivo celular *in vitro* em um ambiente que seja mais próximo do microambiente natural. Se esse sistema de cultivo for funcional e viável, futuramente, ele poderá representar um eminente modelo a ser empregado em terapias clínicas e na medicina regenerativa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver um modelo tridimensional para o cultivo de células-tronco mesenquimais da derme humana em hidrogel de carragenana extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a viabilidade e proliferação das células-tronco mesenquimais da derme humana cultivadas sobre o hidrogel de carragenana;
- Investigar a morfologia, marcadores de células pluripotentes, células mesenquimais diferenciadas e marcadores característicos de CTMs das células da derme humana cultivadas sobre o hidrogel de carragenana;
- Avaliar a capacidade de diferenciação para os fenótipos mesodermis (osteogênico e adipogênico) das CTMs da derme humana cultivadas sobre o hidrogel de carragenana;
- Padronizar e estabelecer a metodologia de encapsulamento das células-tronco da derme humana em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial (Sigma®);
- Avaliar a viabilidade do cultivo de células-tronco da derme humana encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial e comparar o desempenho entre as duas carragenanas através da análise microestrutural dos géis, morfologia e teste colorimétrico da viabilidade celular;



# Capítulo II

---

## Cultura de células-tronco da derme humana sobre hidrogel de carragenana

**Resumo:** Neste estudo investigou-se o potencial do hidrogel de carragenana como *scaffold* 3D na manutenção, crescimento, proliferação e sobrevivência das CTMDH *in vitro*. Para isso, realizou-se culturas de células da derme, as quais foram provenientes de fragmentos de cirurgias de *lifting* facial. As células cultivadas foram depositadas em placas de 96 poços contendo os hidrogéis de carragenana e ágar e em placas de plástico (condição controle) na concentração de  $2 \times 10^3$  células por poço, onde foram cultivadas com meio DMEM/F12 suplementado com 15% de SFB. As culturas foram mantidas por sete dias em incubadora à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, onde foram analisadas quanto à morfologia, adesão, proliferação e sobrevivência. Decorrido os sete dias as células cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar foram transplantadas para uma placa de plástico, onde permaneceram por mais três dias. As culturas que estavam viáveis foram fixadas com paraformaldeído 4% e analisadas quanto à capacidade de adesão, proliferação, expressão de marcadores de células pluripotentes e de CTMs diferenciadas, expressão de antígenos de superfície característicos de CTMs e potencial de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico. Os resultados revelaram que as CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar formaram dermo-esferas, as quais apresentaram-se em suspensão e num estado quiescente, com baixa taxa proliferativa. Por outro lado, as dermo-esferas transplantadas conseguiram aderir e proliferar em superfície plástica. A análise da expressão fenotípica revelou que as dermo-esferas transplantadas apresentaram uma marcação mais acentuada para os marcadores de pluripotencialidade celular comparativamente as células

cultivadas sobre o plástico. Para os marcadores de células mesenquimais diferenciadas, observou-se que as dermo-esferas foram positivas para  $\beta$ tubulina III e  $\alpha$ SMA, porém essa marcação foi mais fraca em relação às células do controle. As dermo-esferas transplantadas apresentaram marcação positiva para os antígenos de superfície CD73; CD90 e CD105 e conseguiram se diferenciar para os fenótipos osteogênico e adipogênico, demonstrando que em superfície plástica as dermo-esferas apresentam características intrínsecas de CTMs. Desta forma, concluímos que as dermo-esferas transplantadas para a placa de plástico conseguiram aderir, proliferar e mantiveram as características intrínsecas de CTMs. Em contrapartida, o cultivo das CTMDH sobre o hidrogel de carragenana não foi satisfatório para sustentar de forma adequada a adesão, proliferação e sobrevida das CTMDH *in vitro*.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA DERME HUMANA

Os fragmentos da derme humana foram obtidos através de uma colaboração com o Ilha Hospital e Maternidade de Florianópolis, onde pacientes submetidos a cirurgias de *lifting* facial doaram o excesso de fragmentos da pele, após apresentação de termo de consentimento livre e esclarecido. Este termo esclarece para as pacientes (doadoras) a linha de pesquisa, segurança e seriedade com que esta será realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o parecer de número 1982/11.

Os fragmentos de pele recuperados da cirurgia de *lifting* facial foram armazenados em recipiente estéril contendo meio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) (Gibco®) acrescido de penicilina/estreptomicina (PS) (1U/μg) (Gibco) e suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab®) até serem transportados para o Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (Lacert) da UFSC, onde foi realizado o procedimento de cultura celular.

### 2.2.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA

Os fragmentos de pele coletados foram segmentados e mantidos por aproximadamente 15 horas em meio DMEM/F12 acrescido de PS (1U/μg) e dispase (proporção de 1:4), de modo a propiciar a dissociação do tecido. Os fragmentos dissociados foram levados ao fluxo laminar e com auxílio de microscópio estereoscópico e de instrumentos cirúrgicos (pinças e tesouras) foram retirados todos os pelos inseridos no tecido, epiderme e hipoderme, recuperando-se apenas a camada da derme.

Com o intuito de permitir a dissociação e recuperação das células presentes no tecido dérmico, os fragmentos da derme foram cortados em pedaços menores e expostos à solução de tripsina-EDTA (0,25%) (Gibco®) à 37°C durante 45 minutos. A ação da tripsina foi inibida com meio DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% (v/v) de SFB, sendo a solução contendo as células recuperada por filtração (cell

straner (BD®) 70 µm. O meio recolhido foi centrifugado (300 g) por sete minutos e o *pellet* celular foi recuperado e ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% (v/v) de SFB. A suspensão celular obtida foi plaqueada em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning®) e mantida em estufa úmida, à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 dias o meio foi renovado e as células não aderentes descartadas. As células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH) foram selecionadas pela adesão ao plástico, sendo que as células não aderentes foram removidas com a troca periódica do meio (3-4 dias). As células da derme humana isoladas exatamente como descrito no protocolo acima foram caracterizadas como CTMs em trabalhos anteriores do Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT-CCB-UFSC) (JEREMIAS, 2012).

Após aproximadamente 3 semanas de cultivo, quando a monocamada de células atingiu cerca de 85 a 90% de confluência, as células foram descoladas usando solução de tripsina-EDTA (0,05%) (Gibco®) à 37°C por dois minutos. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de meio DMEM/F12 suplementado com 15% (v/v) de SFB. As células foram replaqueadas na concentração de 5x10<sup>4</sup> células/mL em DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% (v/v) de SFB (passagem 1). Cada subcultivo celular correspondeu a uma nova passagem e neste estudo foram utilizadas células entre as passagens 3 (P3) e 7 (P7).

### 2.2.3 PREPARO DO HIDROGEL DE CARRAGENANA

O preparo do hidrogel de carragenana foi realizado a partir de seu extrato em pó, o qual foi doado pelo Laboratório de Algas Marinhas da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAR), pela pesquisadora e professora Dra. Leila Hayashi, que atualmente desenvolve na praia do Sambaqui – Florianópolis - Santa Catarina, o cultivo e a extração da carragenana a partir da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. O pó de carragenana híbrida (kappa + iota) foi solubilizado em água ultra-pura (Milli-Q), seguido de agitação (vórtex) para proporcionar a completa solubilização e homogeneização dos polissacarídeos. A solução viscosa obtida permaneceu *overnight* à temperatura ambiente de modo a permitir a hidratação da carragenana e a formação do gel nas concentrações de 0,3%, 1,0% e 1,5% (m/v). Os géis de carragenana foram aquecidos em banho-maria à 60°C durante 30 minutos,

permitindo o seu retorno ao estado líquido e desta maneira facilitando sua manipulação. Os géis de carragenana foram plaqueados em placas de 96 poços (Corning®) no volume de 100 µl por poço onde ficaram solidificando durante 1 hora a temperatura ambiente. As placas contendo os géis foram levadas ao fluxo laminar, onde ficaram expostas por 20 minutos aos raios ultravioleta (UV) para permitir a esterilização do biomaterial.

### **2.2.3.1 Determinação da concentração do hidrogel de carragenana**

Inicialmente foram realizados testes para determinar qual a concentração ideal que o hidrogel de carragenana precisa ter de modo a permitir o correto plaqueamento das células sobre o gel. O hidrogel foi testado nas concentrações de 0,3%, 1,0% e 1,5% e avaliou-se a capacidade de formação do gel, bem como se a concentração do mesmo influenciou a passagem das células através do gel. Para isso, as CTMDH foram cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana em meio DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% de SBF em estufa úmida à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias. Após esse tempo, os hidrogéis de carragenana foram retirados das placas de cultura e os poços fixados com paraformaldeído 4%. Estes foram analisados com o marcador nuclear DAPI em microscópio de fluorescência a fim de se avaliar a presença de CTMDH aderidas nos poços. Após a análise dos resultados, escolheu-se qual a concentração de trabalho ideal para o hidrogel de carragenana. A escolha da concentração ideal para o hidrogel ágar também foi baseada nos resultados obtidos com o hidrogel de carragenana.

### **2.2.4 PREPARO DO HIDROGEL ÁGAR**

O emprego do hidrogel ágar serviu como condição comparativa à interpretação e compreensão dos resultados obtidos com o hidrogel de carragenana, uma vez que o ágar é um hidrogel natural bastante utilizado na literatura e que possui características bastante semelhantes a da carragenana.

O preparo do gel de ágar foi realizado a partir de amostra comercial em pó (Sigma-Aldrich® EUA), o qual foi solubilizado em água ultra-pura (Milli-Q) a 98°C, seguido de agitação (vórtex) para proporcionar a completa solubilização e homogeneização do pó. A

solução viscosa formada permaneceu *overnight* a temperatura ambiente de modo a permitir a hidratação do ágar e a formação do gel. O gel de ágar foi aquecido em banho-maria à 60°C durante 30 minutos, para permitir o seu retorno ao estado líquido e desta maneira conseguir ser manipulado. O gel de ágar foi plaqueado em placas de 96 poços (Corning®) no volume de 100 µl por poço onde ficou polimerizando durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, transferiu-se as placas contendo os géis ao fluxo laminar para exposição por 20 minutos à radiação ultravioleta (UV) para a esterilização.

### 2.2.5 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA SOBRE HIDROGEL DE CARRAGENANA E ÁGAR

Para o cultivo das CTMDH sobre o hidrogel de carragenana as células foram dissociadas das garrafas de cultura através da ação da solução tripsina-EDTA (0,05%) à 37°C por dois minutos. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 15% (v/v) de SFB. As CTMs obtidas entre as passagens 3 e 7 foram transferidas às placas de 96 poços contendo os hidrogéis de carragenana em uma densidade de  $2 \times 10^3$  células por poço. Paralelamente, foi realizado o cultivo das CTMDH sobre o hidrogel ágar e sobre placas de plástico. O motivo da utilização do hidrogel ágar já foi mencionado na seção 2.2.4. Já o cultivo sobre o plástico representou a condição controle, uma vez que o cultivo das CTMDH já está bem estabelecido e caracterizado sobre este tipo de material. Na condição controle, as CTMDH obtidas entre as passagens 3 e 7 foram transferidas às placas de 24 poços (Corning®) em uma densidade de  $13 \times 10^3$  células por poço, em função da sua maior área geométrica. Todas as condições de cultivo foram mantidas em meio DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% (v/v) de SFB em estufa úmida à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias. Ao longo do cultivo as CTMDH foram analisadas quanto as variáveis de sobrevivência, adesão e morfologia celular. Após o tempo de cultivo determinado, as células foram então fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) para análise e quantificação através da técnica de imunofluorescência.

## 2.2.6 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR INCORPORAÇÃO COM BRDU

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), o qual corresponde ao análogo da timidina, incorporando-se ao DNA das células em proliferação. Após 10 dias de cultura as células foram incubadas com BrdU (0,1 mg/ml) (Calbiochem®) durante 24 horas e fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) por 40 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com ácido clorídrico (2N) durante 30 minutos à 37°C. As culturas foram novamente lavadas com tampão fosfato salina (PBS pH 7,6) e submetidas à análise imunocitoquímica como descrito no item 2.2.7.

## 2.2.7 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA

Para realização do ensaio de imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) durante 40 minutos a temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25% v/v) durante 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% (v/v) de SFB durante 40 minutos e em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e incubadas durante 14-16 horas (*overnight*) com os anticorpos primários descritos na tabela 1. Logo após, foram realizadas três lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) seguido de incubação por 1h a temperatura ambiente, com os anticorpos secundários descritos na tabela 2. Quando utilizados anticorpos secundários conjugados a biotina, foram realizadas incubações posteriores com estreptoavidina (1:150) e tiramida (1:1000) para amplificação do sinal da fluorescência. Após três lavagens com PBS-Tween, as células foram incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (50ng/ml), durante 1 minuto à temperatura ambiente, para análise da marcação nuclear. As marcações fluorescentes foram observadas e fotografadas em microscópio epifluorescente (Olympus IX71) e fotografadas em câmara (Olympus DP71).

<i>Fenótipo</i>	<i>Marcadores</i>	
	<i>Anticorpos primários</i>	<i>Anticorpos secundários</i>
Célula Mesenquimal diferenciada	Anti- $\alpha$ SMA (anti $\alpha$ actina de músculo liso) – IgG2a	Cabra contra IgG2a de camundongo conjugado ao fluorocromo Vermelho do Texas (TXRD)
	Anti- $\beta$ -tubulina III – IgG1	Cabra contra IgG1 de camundongo ligado ao fluorocromo Vermelho do Texas (TXRD)
Célula-tronco indiferenciada	Anti-Nanog - IgG	Cabra contra IgG de coelho conjugado à biotina
	Anti-Oct3/4 - IgG	Cabra contra IgG de coelho conjugado à biotina
Célula-tronco mesenquimal	Anti-CD90 – IgG1	Já vem ligado ao anticorpo primário. Conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC).
	Anti-CD105 – IgG1	Cabra contra IgG1 de camundongo conjugado à fluoresceína AlexaFluor® 488.
Proliferação celular	Anti-BrdU – IgG1	Cabra contra IgG1 de camundongo conjugado à biotina.

**Tabela 2. Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímicas**

## 2.2.8 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CTMDH

A imunofenotipagem das CTMDH foi realizada por citometria de fluxo, com o propósito de detectar marcadores característicos de CTM (CD73, CD90, e CD105) nas células cultivadas sobre o gel de carragenana. Para tal, as células foram recuperadas das suas condições de cultivo (células cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico) através da ação da solução tripsina-EDTA (0,05% m/v) à 37°C. A reação foi neutralizada com a adição de meio de cultura suplementado com 15% (v/v) de SFB. As células obtidas foram mantidas em suspensão celular na concentração de 100.000 células por microlitro de meio de cultura. A incubação celular se deu com os anticorpos primários conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD90 (BD®); ficoeritrina (PE): CD73 (BD®) e ficoeritrina-cianina (PE-Cy5): CD105 (BD®), durante 45 minutos à 4°C protegido de luz. Como controle adicional dos nossos resultados, as células também foram incubadas com o anticorpo CD45 (FITC), o qual deve apresentar reação negativa em CTMs. A quantidade de anticorpo

usada para cada condição seguiu as recomendações do próprio fabricante do produto. Para assegurar a fidelidade dos resultados, realizamos um controle interno onde as células foram incubadas apenas com o anticorpo secundário (FITC; PE e PE-Cy5) (BD®). Logo após a incubação, procederam-se duas lavagens com PBS através da centrifugação a (300 g) por 5 minutos. Os tubos foram mantidos com 100 µl de PBS contendo a suspensão celular e em seguida, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCanto II) no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB- CBB- UFSC) para a identificação dos marcadores de CTM. A análise dos resultados foi realizada através do programa FlowJo® 7.6.5.

### 2.2.9 ANÁLISE DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CTMDH

Para a análise do potencial de diferenciação celular, as CTMDH foram recuperadas das suas condições de cultivo (células cultivadas sobre os hidrogéis carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico) através da ação da solução tripsina-EDTA (0,05%) à 37°C. A reação enzimática foi neutralizada com a adição de meio de cultura suplementado com 15% (v/v) de SFB. As células foram então plaqueadas em placas de 24 poços (Corning®) contendo meio DMEM/F12 acrescido de PS e suplementado com 15% de SFB e mantidas nessa condição até atingirem cerca de 70-80% de confluência. Em seguida, as culturas celulares foram tratadas com os coquetéis indutores específicos para cada tipo de diferenciação. Na diferenciação óssea utilizou-se ácido ascórbico (50 µg/ml), dexametasona ( $10^{-8}$ M) (Sigma®) e β-glicerolfosfato (3,15 mg/ml) (Sigma®) e na diferenciação adipogênica utilizou-se dexametasona ( $10^{-8}$  M) (Sigma®), isobutilmetilxantina (0,5 mM), insulina (2,5 µg/ml) (Sigma®) e indometacina (100 µM) (Sigma®).

Tais fatores foram diluídos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de PS (1U/µg) e suplementado com 10% de SFB. A condição controle para o tratamento foi mantida em meio de cultura padrão DMEM/F12 acrescido de PS (1U/µg) suplementado com 15% SBF. As culturas celulares foram mantidas por 22 dias com a troca de meio ocorrendo a cada 3-4 dias. Logo após, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS e coradas por 5 minutos com os corantes específicos para cada tipo de diferenciação. A diferenciação óssea foi detectada pela observação de grânulos de cálcio no meio extracelular através do corante *Alizarin Red*

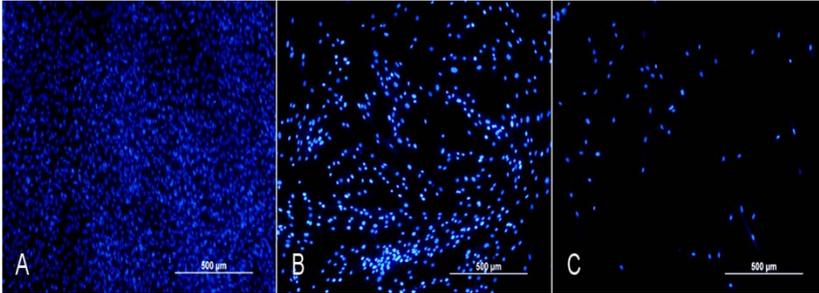
S. Já a diferenciação adipogênica foi determinada pela presença no interior das células de grânulos lipídicos através do corante *Oil Red O*. A visualização do potencial de diferenciação das CTMDH foi detectada através da observação da coloração em microscópio de contraste de fase (OLYMPUS CK40).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HIDROGEL DE CARRAGENANA

Inicialmente avaliamos a melhor concentração de hidrogéis de carragenana que permitisse o estabelecimento do cultivo de células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH) sobre estes hidrogéis. Para isso, utilizamos o hidrogel de carragenana nas concentrações de 0,3%, 1,0% e 1,5%. Observamos que na concentração de 0,3% o hidrogel forma uma solução bastante viscosa, não sendo capaz de formar um gel firme e estável. Além disso, ao analisarmos os poços de cultura, verificamos a presença de muitas células aderidas à placa (Figura 5A), demonstrando que boa parte das células conseguiu atravessar o gel, não permanecendo na superfície do mesmo. Já nas concentrações de 1,0% e 1,5% o hidrogel de carragenana foi capaz de formar um gel mais firme e resistente.

No entanto, ao analisarmos o gel na concentração de 1,0%, observamos que esta condição apresentou uma quantidade maior de células aderidas ao fundo da placa de plástico de cultivo comparativamente a condição do gel 1,5% (Figura 5B, C). Isso demonstra que o gel a 1,0% também permitiu que as células atravessassem o hidrogel, se estabelecendo no fundo da placa e pouco permanecendo sobre a superfície do mesmo. Apesar de termos detectado células aderidas no poço na condição gel 1,5%, acreditamos que a origem dessas células no fundo da placa possa ter sido em decorrência da sua infiltração lateralmente no espaço entre o gel e a parede da placa. Logo, julgamos que a concentração mais satisfatória foi a de 1,5%, pois a mesma permitiu a formação de um gel firme e estável que impediu a passagem direta das células pelo gel fazendo com que a maior parte das células permanecessem na superfície do hidrogel.



**Figura 5.** Fotografia representativa do teste realizado para determinar a melhor concentração dos hidrogéis de carragenana para sustentar o cultivo das CTMDH. Em azul os núcleos marcados com DAPI, representam as CTMDH que atravessaram os hidrogéis de carragenana em diferentes concentrações: (0,3% - A); (1,0% - B); (1,5% - C). Estas células aderiram ao fundo da placa de cultivo, onde possivelmente também proliferaram durante os sete dias de cultivo.

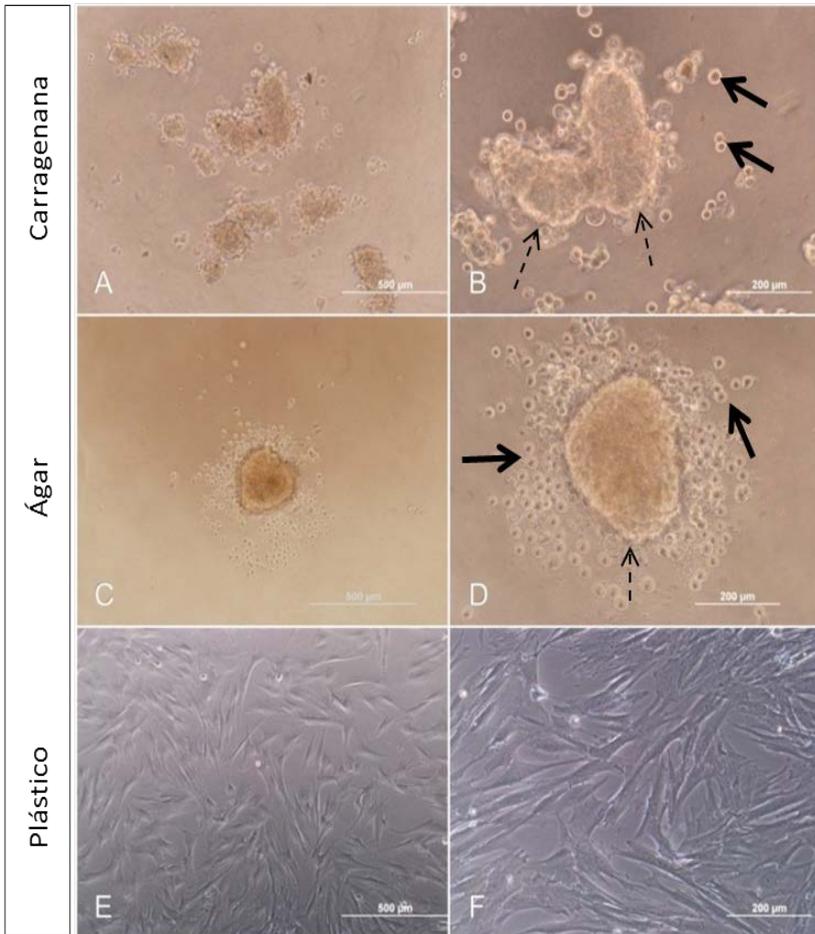
### 2.3.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA, ADEÇÃO E SOBREVIDA DAS CTMDH CULTIVADAS SOBRE HIDROGEL DE CARRAGENANA

As CTMDH são caracterizadas pela sua morfologia fibroblástica, alta taxa proliferativa e de adesão à superfície plástica, além da capacidade de diferenciação em linhagens mesodermis específicas. Analisamos inicialmente qual o comportamento (morfologia, adesão e sobrevivência) que as CTMDH exibiriam quando fossem cultivadas sobre o hidrogel de carragenana (condição teste). Além do cultivo das CTMDH sobre hidrogel de carragenana, também analisamos estes parâmetros nas células cultivadas sobre o hidrogel ágar, o qual possui uma estrutura bastante semelhante à encontrada no hidrogel de carragenana. As CTMDH também foram cultivadas sobre o plástico, o qual representou a condição controle.

Verificamos que as CTMDH cultivadas sobre os géis de carragenana e ágar se uniram e formaram esferas, as quais foram denominadas arbitrariamente de dermo-esferas (Figura 6A, B, C e D). Observou-se que em ambas as condições a maioria das células se uniu para a formação das esferas, porém algumas das células permaneceram isoladas e com morfologia arredondada (Figura 6B e D). Os resultados mostram ainda que independentemente do hidrogel utilizado, tanto as dermo-esferas formadas como as células isoladas, permaneceram em

suspensão durante todo o tempo de cultivo demonstrando pouca afinidade em aderir aos géis.

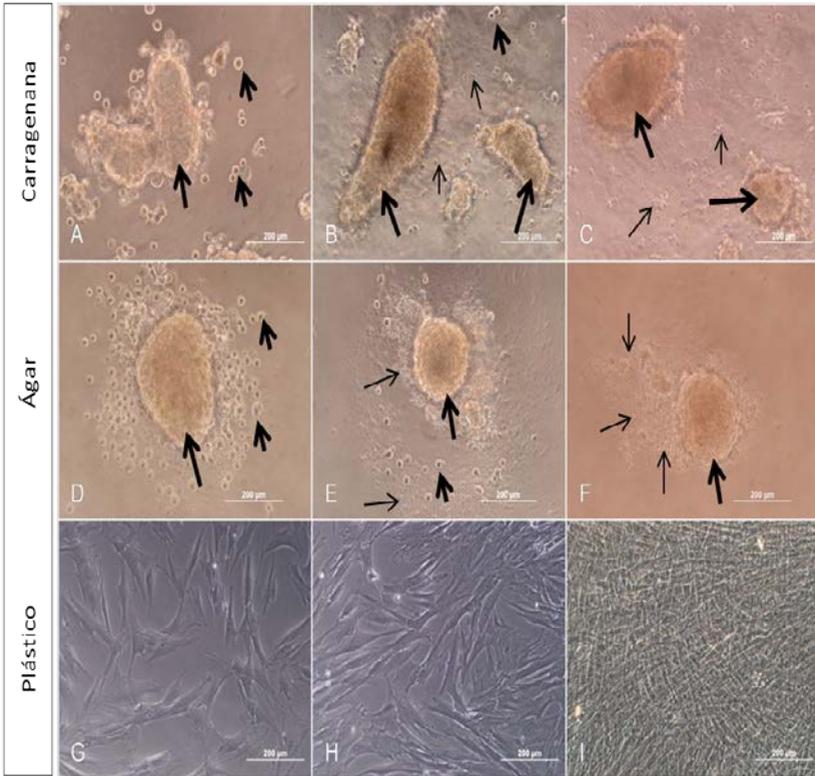
É importante ressaltar que essas mesmas células quando são cultivadas sobre a superfície plástica, apresentam morfologia fibroblastóide e alta adesão ao plástico, como demonstrado em nossos resultados (Figura 6E e F). Ao compararmos os parâmetros de morfologia e adesão das CTMDH cultivadas sobre os géis de carragenana e ágar com o cultivo dessas células sobre a superfície plástica, podemos constatar que as CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis apresentaram um comportamento bastante diferenciado e atípico do comportamento habitual que essas células apresentam quando são cultivadas em uma superfície aderente.



**Figura 6.** Detalhes da morfologia das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e superfície plástica. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase da morfologia das CTMDH cultivadas em diferentes condições de cultivo no aumento de 100 e 200x. (A – B) representam as dermo-esferas formadas sobre o hidrogel de carragenana; (C – D) representam as dermo-esferas formadas sobre o hidrogel ágar; (E – F) representam as CTMDH cultivadas sobre superfície plástica. Setas pontilhadas mostram a formação das dermo-esferas. Setas grossas indicam a presença de células isoladas.

A análise da capacidade de sobrevivência das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar mostrou que a sobrevida das células foi maior nos dois primeiros dias de cultivo, onde foi possível observar esferas e células isoladas íntegras (Figura 7A e D, setas grossas). Contudo, ao longo do tempo de cultivo, observou-se que as células isoladas alteravam seu aspecto íntegro e viável (representado por células arredondadas e brilhantes), para um aspecto amorfo e desprovido de brilho (Figura 7B, C, E e F, setas finas).

A partir do terceiro dia de cultivo verificou-se o aparecimento de fragmentos celulares, indicando o surgimento de células mortas. (Figura 7B e E, setas finas). Observou-se que o aparecimento de células degeneradas e de fragmentos celulares aumentou consideravelmente com o tempo de cultivo, sendo maior no sétimo dia da cultura comparativamente ao terceiro dia (Figura 7B, C, E e F, setas finas). Outro aspecto constatado foi um possível e provável estado de quiescência das dermo-esferas. Constatamos que ao longo do cultivo, a dimensão das dermo-esferas não se alterou e por vezes até ficou menor nos dias mais tardios da cultura (sexto e sétimo dia) comparativamente aos primeiros dias. Essas observações demonstram que a taxa de proliferação celular das dermo-esferas estava baixa ou até mesmo nula. Contudo, se analisarmos o cultivo das CTMDH sobre superfície plástica, verificamos que não foi possível visualizar células com aspecto degenerado nem o aparecimento de fragmentos celulares ao longo do tempo de cultivo (Figura 7G, H e I). Além disso, as células conseguiram expandir bastante e com sete dias de cultivo, já tinham preenchido toda a placa de cultivo, atingindo confluência superior a 80% (Figura 7I).



**Figura 7. Aspecto morfológico das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e superfície plástica.** Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase do aspecto morfológico das CTMDH cultivadas em hidrogéis de carragenana e ágar e superfície plástica em diferentes dias de cultura. (A, B e C) células cultivadas em hidrogel de carragenana nos dias 1, 3 e 7 respectivamente. (D, E e F) células cultivadas em hidrogel de ágar nos dias 1, 3 e 7 respectivamente. (G, H e I) células cultivadas em superfície plástica nos dias 1, 3 e 7 respectivamente. As setas grossas indicam a presença de células íntegras na cultura. Setas finas indicam a presença de fragmentos celulares na cultura.

### 2.3.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE DO CULTIVO DAS DERMO-ESFERAS EM SUPERFÍCIE ADERENTE (PLÁSTICO)

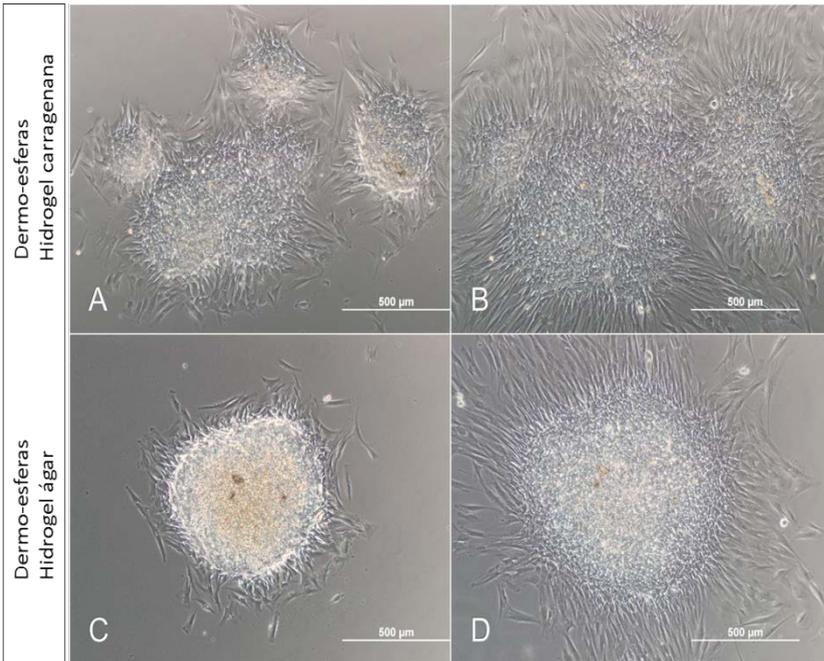
#### 2.3.3.1 Adesão e proliferação celular das dermo-esferas cultivadas em superfície aderente

A próxima etapa do estudo consistiu em avaliar e investigar a viabilidade das dermo-esferas formadas no cultivo sobre os hidrogéis de carragenana e ágar. Realizamos esta etapa, pois percebemos que apesar das células isoladas degenerarem com o tempo de cultivo, as dermo-esferas apresentaram-se aparentemente íntegras e viáveis após sete dias em cultura, exibindo apenas uma leve degeneração celular. Devido a este comportamento diferenciado nos interessamos em investigar o que estava acontecendo com as células das dermo-esferas que sobreviviam. Para isso, transplantamos após sete dias de cultura, as dermo-esferas que estavam em suspensão nos hidrogéis para placas de cultivo de plástico contendo meio DMEM/F12 suplementado com 15% de SFB. As dermo-esferas foram mantidas por três dias em cultura, fixadas e analisadas quanto a sua capacidade de adesão e proliferação.

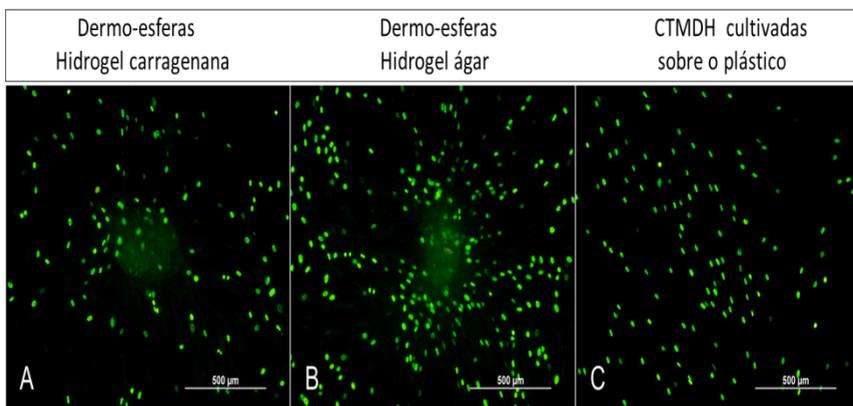
Os resultados demonstraram que as dermo-esferas formadas no cultivo sobre os hidrogéis de carragenana e ágar foram capazes de aderir e expandir após três dias de cultura em superfície plástica (Figura 8B e D). As dermo-esferas apresentaram total adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide e demonstraram um comportamento migratório, sendo capazes de expandir pela placa de cultura ao longo do tempo de cultivo (Figura 8A, B, C e D). O comportamento das dermo-esferas transplantadas para a superfície plástica foi semelhante ao comportamento habitual das CTMDH quando cultivadas diretamente sobre a superfície plástica (Figura 7G, H, I). Portanto, quando as dermo-esferas encontram-se em uma condição de cultivo não aderente (hidrogéis de carragenana e ágar) e são transplantadas para uma superfície aderente (plástico), apresentam a capacidade expressar novamente algumas das suas características intrínsecas de CTM.

Para analisar a capacidade de proliferação das células oriundas das dermo-esferas transplantadas à superfície plástica, realizou-se o ensaio de proliferação com o marcador BrdU. Os resultados mostraram que tanto as células derivadas de dermo-esferas cultivadas sobre o gel de carragenana como as células derivadas de dermo-esferas cultivadas sobre o gel de ágar apresentaram marcação positiva para BrdU (Figura 9A, B). Esses resultados indicam que as células da dermo-esfera voltaram a proliferar quando foram cultivadas sobre uma superfície

aderente, demonstrando que não se encontram mais em um estado quiescente. Estes dados corroboram com os resultados obtidos para as células que foram cultivadas apenas em superfície aderente, as quais também apresentaram marcação positiva para BrdU (Figura 9C). A análise da proliferação celular demonstrou mais uma vez que as dermo-esferas cultivadas em superfície aderente voltam a expressar suas características intrínsecas de CTMs.



**Figura 8. Capacidade de adesão e migração das dermo-esferas e células oriundas das dermo-esferas que foram transplantadas para superfície plástica.** Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase das dermo-esferas que formaram-se após sete dias de cultivo sobre hidrogéis de carragenana e ágar e foram transplantadas para superfície plástica. (A - B) Dermo-esferas oriundas do cultivo sobre o gel de carragenana. (A) Adesão das dermo-esferas após 1 dia do transplante e (B) adesão das dermo-esferas após 3 dias do transplante. (C - D) Dermo-esferas oriundas do cultivo sobre o gel de ágar. (C) Adesão da dermo-esfera após 1 dia do transplante e (D) adesão da dermo-esfera após 3 dias do transplante. As imagens das CTMDH cultivadas sobre o plástico estão representadas nas figuras 5 e 6.

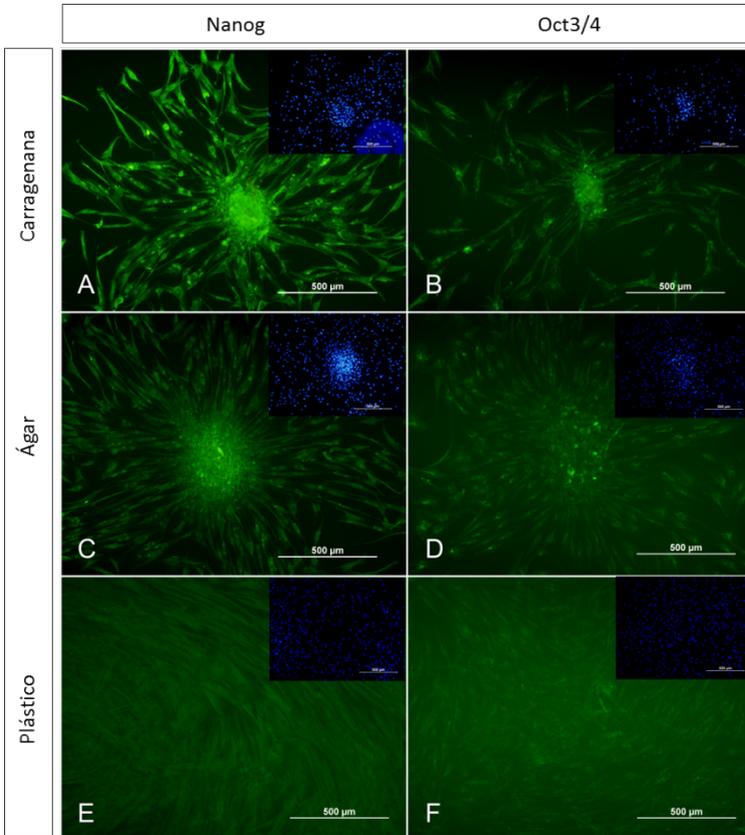


**Figura 9. Proliferação celular nas dermo-esferas e CTMDH cultivadas sobre superfície plástica.** Fotografias representativas de imunofluorescência para BrdU, marcador de proliferação celular. Em verde células BrdU positivas. (A) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel carragenana, (B) dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel ágar, (C) CTMDH cultivada apenas em superfície plástica aderente.

### 2.3.3.2 Avaliação da expressão fenotípica nas dermo-esferas cultivadas em superfície aderente

Dando continuidade à análise das dermo-esferas cultivadas em superfície plástica, avaliamos nesta etapa a expressão de marcadores de células pluripotentes indiferenciada (Nanog e Oct3/4) e a expressão de marcadores de células mesenquimais diferenciadas ( $\beta$ -tubulina III e  $\alpha$ SMA).

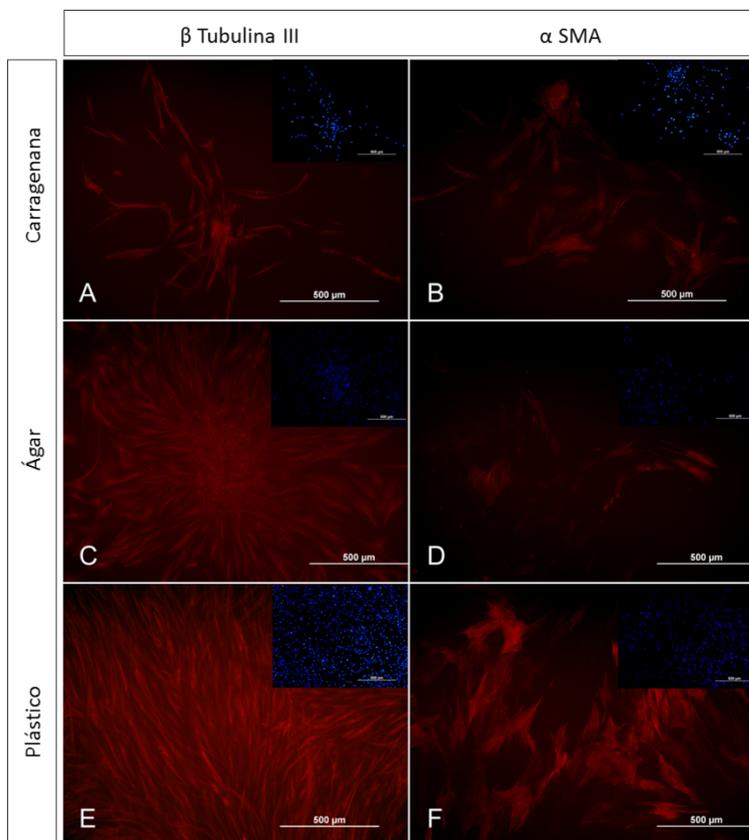
Verificamos que tanto as dermo-esferas como as CTMDH cultivadas sobre o plástico apresentaram marcação positiva para Nanog e Oct3/4 (Figura 10A, B, C, D, E, F). Entretanto, observamos que as dermo-esferas apresentaram uma marcação de Nanog e Oct3/4 proeminente, com uma intensidade de fluorescência maior comparativamente à marcação obtida nas CTMDH oriundas do cultivo sobre o plástico. Estes resultados sugerem uma expressão mais acentuada dos marcadores de células-tronco pluripotentes nas dermo-esferas e uma expressão mais baixa desses marcadores nas CTMDH cultivadas apenas sobre o plástico.



**Figura 10. Expressão de Nanog e Oct3/4 nas dermo-esferas e nas CTMDH cultivadas sobre a superfície plástica.** Fotografias representativas de imunofluorescência para Nanog e Oct3/4, marcadores de células-tronco pluripotentes. Em verde, células com marcação positiva para Nanog e Oct3/4 e em azul marcação do núcleo com DAPI. (A-B) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana, (C-D) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel ágar e (E-F) CTMDH cultivadas apenas sobre superfície plástica.

A análise da expressão dos marcadores  $\beta$ -tubulina III e  $\alpha$ SMA nas dermo-esferas transplantadas para o plástico, revelou a presença de células positivamente marcadas para ambos os marcadores (Figura 11A, B, C, D). No entanto, poucas células apresentaram marcação positiva para  $\alpha$ SMA e a intensidade dessa marcação foi bastante baixa (Figura

11B, D). Em contra partida, a análise da expressão de  $\alpha$ SMA e  $\beta$ -tubulina III nas células cultivadas apenas sobre o plástico, revelou uma grande quantidade de células marcadas e uma alta intensidade de fluorescência (Figura 11E, F).



**Figura 11. Expressão de  $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA nas dermo-esferas e nas CTMDH cultivadas sobre superfície plástica.** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA, marcadores de células mesenquimais diferenciadas. Em vermelho, células com marcação positiva para  $\beta$  tubulina III e  $\alpha$ SMA e em azul marcação do núcleo com DAPI. (A-B) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana, (C-D) dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel ágar, (E-F) CTMDH cultivadas sobre superfície plástica.

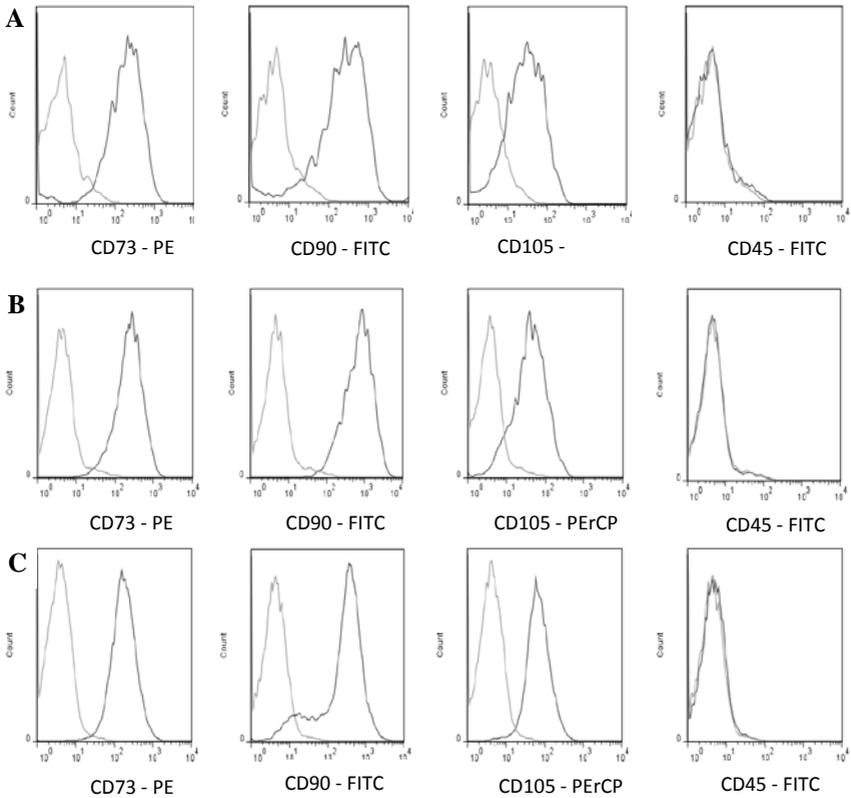
Comparando-se os resultados da expressão desses marcadores nas dermo-esferas e células cultivadas sobre o plástico, constatou-se que as dermo-esferas apresentam poucas células marcadas para  $\alpha$ SMA, sendo esta marcação bastante fraca. Além disso, observou-se que a intensidade da marcação de  $\beta$ -tubulina III e  $\alpha$ SMA foi um pouco maior nas células cultivadas sobre o plástico. Estes dados juntamente com os resultados de marcação obtidos com Nanog e Oct3/4, sugerem que as células provenientes do cultivo sobre os hidrogéis de carragenana e ágar apresentam uma expressão acentuada de marcadores típicos de células indiferenciadas e uma expressão reduzida nos marcadores de diferenciação celular, revelando a existência de um estado mais indiferenciado às células da dermo-esferas e de um estado mais diferenciado às células cultivadas sobre o plástico.

### **2.3.3.3 Identificação da expressão dos marcadores de CTMs nas dermo-esferas cultivadas em superfície aderente**

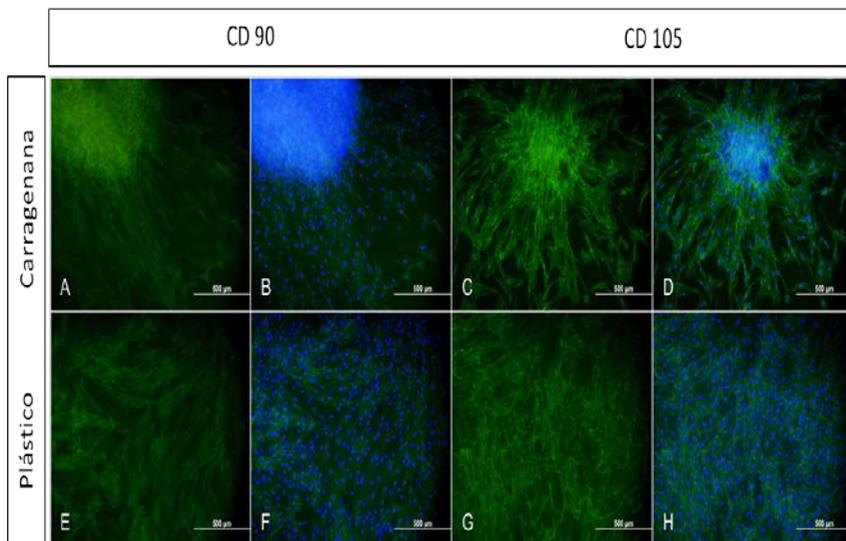
Nesta etapa buscou-se avaliar a expressão dos marcadores de superfície característicos de CTMs nas dermo-esferas cultivadas em hidrogel de carragenana e ágar e CTMDH cultivadas sobre o plástico. Para tal, utilizou-se a técnica de imunofenotipagem através de citometria de fluxo para os marcadores de superfície: CD73, CD90 e CD105. Nesse mesmo contexto foi realizada a imunofenotipagem para o marcador de superfície CD45, como controle negativo, uma vez que este é um marcador de célula hematopoiética e, portanto não é expresso nas CTMs. A fim de complementar os resultados obtidos pela imunofenotipagem, experimentos de imunocitoquímica para os marcadores CD90 e CD105 nas dermo-esferas cultivadas sobre o gel de carragenana e nas CTMDH cultivadas sobre o plástico foram realizados.

Os resultados demonstraram que as dermo-esferas e as células cultivadas sobre o plástico se mostraram positivas para os marcadores CD73, CD90 e CD105 e negativas para o marcador de linhagem hematopoiética CD45 (Figura 12). Isto pode ser observado pela interpretação dos picos gerados nos gráficos da figura 12, onde o pico em cinza claro representa as células com marcação negativa e o pico em cinza escuro representa as células positivamente marcadas para um determinado antígeno de superfície. Havendo sobreposição entre os picos como observado, indica que as células não apresentam o antígeno para o marcador CD45.

Os dados provenientes da análise por imunocitoquímica revelam que as dermo-esferas apresentaram um grande número de células positivamente marcadas para CD90 e CD105 (Figura 13A-D). Esse mesmo resultado, também foi encontrado nas células cultivadas apenas sobre o plástico (Figura 13E-H). Estes resultados corroboram com os dados encontrados pela técnica de imunofenotipagem e em seu conjunto, indicam que as dermo-esferas não perderam a sua característica de CTM, pois mesmo sendo cultivadas em uma superfície não aderente e se comportando de maneira não habitual nesta condição, mostraram-se capazes de manter a expressão dos marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, assim como as células que apenas foram cultivadas sobre o plástico.



**Figura 12. Imunofenotipagem das dermo-esferas e CTMDH.** Representação gráfica em histogramas do perfil imunofenotípico das células provenientes das dermo-esferas cultivadas em hidrogéis de carragenana e ágar transplantadas para o plástico e das CTMDH cultivadas sobre o plástico submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD105-PErCP e CD45-FITC. (A) dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana; (B) dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel ágar e (C) CTMDH cultivadas sobre o plástico.

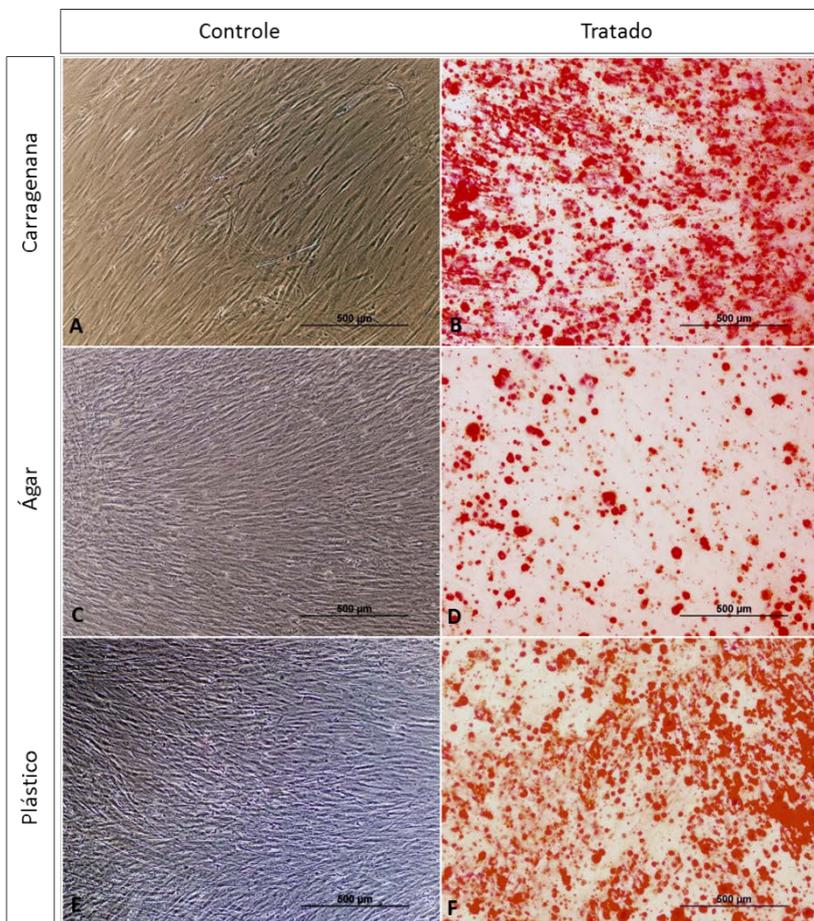


**Figura 13. Expressão dos marcadores de superfície CD90 e CD105 nas dermo-esferas cultivadas sobre hidrogel de carragenana e nas CTMDH cultivadas sobre o plástico.** Fotografias representativas de imunofluorescência para CD90 e CD105, marcadores característicos de CTMs. Em verde, células CD90 e CD105 positivas e em azul marcação do núcleo com DAPI. (A-D) Dermo-esferas obtidas a partir do cultivo das CTMDH sobre o gel de carragenana e transplantada para o plástico. (E-H) CTMDH cultivadas diretamente sobre o plástico.

#### 2.3.3.4 Avaliação do potencial de diferenciação para fenótipos mesenquimais das dermo-esferas cultivadas em superfície aderente

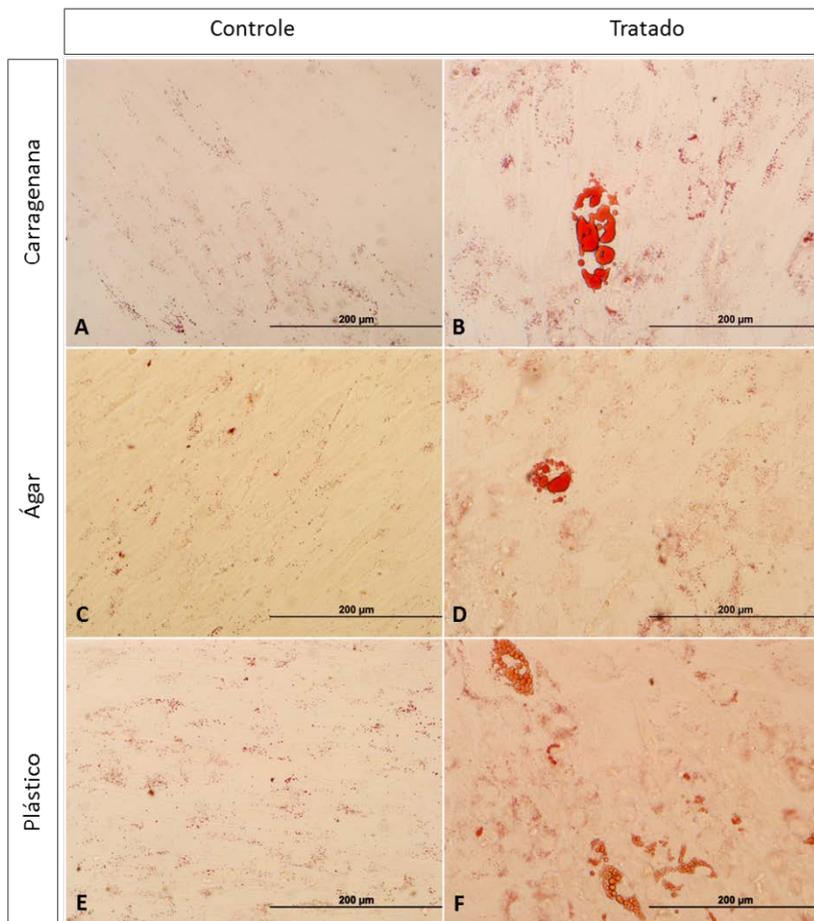
Dando continuidade a análise da habilidade das dermo-esferas em manter as características de CTMs, submeteu-se as dermo-esferas provenientes do cultivo sobre os hidrogéis de carragenana e ágar e as células cultivadas sobre o plástico ao ensaio de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico. O ensaio de diferenciação foi feito pelo cultivo das células em meio indutor específico para cada fenótipo. A diferenciação osteogênica foi evidenciada pela presença de depósitos de cálcio extracelular após coloração com *Alizarin Red S*. Já a diferenciação adipogênica foi comprovada com a presença de grânulos lipídicos no interior das células corados com *Oil Red O*.

Verificou-se que as dermo-esferas e as células cultivadas sobre o plástico apresentaram a presença de depósitos de cálcio no meio extracelular indicando, portanto a capacidade de diferenciação para o fenótipo osteogênico (Figura 14B, D, F). O mesmo não foi observado nos controles que foram cultivados com meio de cultivo convencional sem suplementos (Figura 14A, C, E). Todavia, as dermo-esferas provenientes dos cultivos sobre hidrogel carragenana e as células cultivadas sobre o plástico apresentaram maior quantidade de depósito de cálcio no meio extracelular em comparação às dermo-esferas cultivadas sobre o hidrogel ágar (Figura 14B, D, F).



**Figura 14. Diferenciação osteogênica. Imagens representativas dos ensaios de diferenciação osteogênica coradas com Alizarin Red S e fotografadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 100x. (A-C-E) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico, respectivamente mantidas em DMEMF12 + 15% de SFB (condição controle). (B-D-F) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico, respectivamente tratadas com meio indutor osteogênico (DMEM, 10% de SFB, ácido ascórbico,  $\beta$ glicerolfosfato e dexametasona) (condição tratamento).**

Os resultados também mostraram que as dermo-esferas e as células cultivadas sobre o plástico tiveram a capacidade de se diferenciar para o fenótipo adipogênico (Figura 15B, D, F). O mesmo não foi observado nos controles cultivados com meio convencional sem suplemento (Figura 15A, C, E). Na indução adipogênica, observou-se que na condição controle (superfície plástica) um maior número de células apresentou grânulos lipídicos no seu interior (Figura 15F), em comparação com as dermo-esferas. Juntos, os resultados demonstram que as dermo-esferas diferenciaram-se nas duas linhagens mesenquimais (adipogênica e osteogênica), obtendo a mesma capacidade de diferenciação comparada às células cultivadas sobre o plástico.



**Figura 15. Diferenciação adipogênica: Imagens representativas dos ensaios de diferenciação adipogênica em que as CTMs foram coradas com Oil Red O e fotografadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x.** (A-C-E) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico, respectivamente mantidas em DMEMF12 + 15% de SFB (condição controle). (B-D-F) Dermo-esferas provenientes do cultivo sobre hidrogel de carragenana e ágar e células cultivadas sobre o plástico, respectivamente tratadas com meio indutor adipogênico (DMEM, 10% de SFB, dexametasona, insulina, indometacina e isobutilmetilxantina) (condição tratamento).



## 2.4 DISCUSSÃO

Tendo em vista a íntima relação entre as células-tronco (CTs) e o seu microambiente extracelular, estruturas tridimensionais que mimetizem ao máximo a arquitetura e fisiologia do ambiente encontrado pelas CTs *in vivo* vem sendo desenvolvidas. Nesse contexto, *scaffolds* feitos de polímeros naturais ou sintéticos, biocompatíveis e biodegradáveis estão sendo produzidos e caracterizados para serem utilizados no estudo do comportamento e mecanismos celulares *in vitro*, como para aplicações clínicas e na engenharia de tecidos (MANN, 2003; DONG *et al.*, 2009).

Os hidrogéis representam uma classe de biomateriais que vem atraindo bastante interesse devido à sua natureza tridimensional, biocompatibilidade e versatilidade (SLAUGHTER *et al.*, 2009; WHEELDON *et al.*, 2010; ZHANG; KOHN, 2012). Levando em consideração essas observações, o uso do polímero carragenana, torna-se uma atraente alternativa como biomaterial para mimetizar de forma mais real o ambiente 3D encontrado pelas células *in vivo*.

Outro aspecto a ser considerado no desenvolvimento de estratégias para aplicações clínicas e de engenharia de tecidos, é a possibilidade de identificar fontes de células-tronco mesenquimais (CTMs) capazes de gerar diferentes tipos celulares (BERTANI *et al.*, 2005). A pele pode ser considerada uma boa fonte para obtenção de CTMs e dentre os diversos tipos de CTs encontrados no tecido epitelial, destacam-se as células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH), as quais vem ganhando destaque no campo científico por apresentarem células capazes de atuar no desenvolvimento do folículo, como também por terem a capacidade de agir na cura, regeneração e reparo do tecido lesionado (BLANPAIN; FUCHS, 2006).

No presente trabalho buscamos avaliar o potencial uso do hidrogel de carragenana em fornecer um microambiente tridimensional adequado para o cultivo e manutenção das células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH) *in vitro*.

Em virtude da não utilização, até o presente estudo, do hidrogel de carragenana para a cultura de células em nosso laboratório, buscamos inicialmente estabelecer a concentração de trabalho ideal para o emprego do hidrogel. Nossos resultados mostraram que a concentração do gel a 1,5% foi a condição mais satisfatória, pois ela demonstrou poucas células aderidas ao fundo da placa (Figura 5C) comparativamente as concentrações de 0,3 e 1,0% (Figura 5A, B). Esse resultado indica que a concentração de 1,5% foi suficiente para permitir

a formação de uma rede fechada e com poros pequenos, impedindo assim a passagem direta das células até o fundo da placa. Segundo Santo e colaboradores (2009) o processo de gelificação e a capacidade de interação dos polímeros e copolímeros com determinados sais presentes no meio, são aspectos fundamentais para proporcionar a formação da rede tridimensional. Dentro desse contexto, a concentração do hidrogel é considerada um ponto bastante importante para possibilitar a formação de redes com tamanhos de poros diferenciados. Um gel pouco concentrado pode resultar na formação de redes com poros muito grandes e assim formar uma malha frouxa e maleável. Da mesma forma, géis muito concentrados, podem resultar na formação de redes com poros muito pequenos, formando uma malha densa, firme e rígida. Nossos resultados corroboram com as informações citadas acima, pois mostraram que a maior concentração do gel (1,5%) possibilitou a formação de uma malha densa e firme, fazendo com que a maioria das células conseguisse ficar em contato com a superfície do gel. Entretanto, mesmo nesta condição, poucas células conseguiram aderir ao fundo da placa de plástico. Acreditamos que isto ocorreu pela passagem dessas células por um diminuto espaço (criado pela retração do gel solidificado) entre o hidrogel e a parede da placa de cultivo.

Em cultura, as CTMs são caracterizadas pela sua morfologia fibroblastóide, alta adesão ao plástico e potencial de diferenciação em linhagens mesodermas específicas (DOMINICI, *et al.*, 2006). Os resultados que obtivemos com o cultivo das CTMDH em superfície plástica (condição controle) foram consistentes com o padrão de caracterização descrito na literatura, demonstrando que em superfície bidimensional as CTMDH possuem morfologia fibroblastóide e alta adesão ao plástico.

No entanto, nossos resultados mostraram que ao serem cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar na concentração de 1,5% as CTMDH formaram esferas, as quais foram denominadas arbitrariamente de dermo-esferas. Essas dermo-esferas foram formadas a partir da união das CTMDH, porém algumas células não se uniram para a formação das dermo-esferas, permanecendo isoladas e com morfologia arredondada (Figura 6A-D). Nossos resultados mostram ainda que independentemente de terem sido cultivadas sobre a carragenana ou sobre o ágar, as dermo-esferas e células isoladas permaneceram em suspensão durante todo o tempo de cultivo. Esses resultados demonstram que quando as CTMDH são cultivadas em hidrogéis de carragenana e ágar, as células apresentam um comportamento

diferenciado em relação ao comportamento habitual encontrado por essas células em superfície bidimensional de plástico.

Na literatura encontram-se diversos estudos relacionados à utilização do hidrogel de carragenana para o encapsulamento de bactérias e fármacos (LOPEZ *et al.*, 1997; WOODWAR; 1998; GREHA *et al.*, 2009). Entretanto, pouco se conhece acerca da interação entre CTs e hidrogel de carragenana. Embora tenha sido observado um comportamento diferenciado e não habitual para o cultivo das CTMDH, nos interessamos em investigar a formação das dermo-esferas baseado nos inúmeros estudos que vem sendo realizados com a formação de neuro-esferas (BEZ *et al.*, 2003; CAMPOS, 2004; LEE *et al.*, 2011). As neuro-esferas são estruturas flutuantes que podem ser obtidas através da exposição de CTs neurais a fatores de crescimento adequados. Em condição apropriada as CTs neurais são capazes de proliferar e formar uma esfera tridimensional (CAMPOS, 2004). No nosso modelo, nós obtivemos esferas a partir da agregação das CTMDH, logo, uma hipótese para explicar a formação das dermo-esferas baseado na união das células, está ligada ao fato de ambos os géis serem colóides hidrofílicos com caráter iônico, sobretudo o gel de carragenana, o qual possui alto teor de radicais  $\text{OSO}_3^-$  (HAYASHI, 2001). O caráter iônico aliado à superfície altamente hidratada dos géis pode ter contribuído para a pouca interação observada entre as CTMDH e o gel, levando assim a união das células entre si e a consequente formação das dermo-esferas. Segundo Fang e colaboradores (2009), a afinidade das células em aderir aos biomateriais é um dos fatores que mais contribuem para sua morfologia, proliferação, função e consequente organização tecidual. Logo, a pouca afinidade das CTMDH em aderir aos hidrogéis de carragenana e ágar pode estar contribuindo para a formação de dermo-esferas e células morfologicamente arredondadas.

A análise da capacidade de sobrevivência das CTMDH cultivadas sobre os hidrogéis de carragenana e ágar mostrou que a sobrevida das células foi maior nos dois primeiros dias de cultivo, onde pode-se observar dermo-esferas e células isoladas íntegras (Figura 7A e D, setas grossas). Entretanto, com o passar do tempo de cultivo constatou-se que as células isoladas alteravam seu aspecto íntegro e viável para um aspecto degenerado e amorfo (Figura 7B, C, E e F, setas finas). Além disso, verificou-se também o aparecimento de inúmeros fragmentos celulares, os quais foram aumentando à medida que o tempo de cultivo aumentava. Apesar das células isoladas terem sobrevivido por

menos tempo em cultura, as dermo-esferas apresentaram-se íntegras e viáveis ao longo dos 7 dias de cultivo (Figura 7C, F).

Outro aspecto verificado foi um provável estado de quiescência das dermo-esferas formadas. Constatamos que durante o tempo de cultivo, o tamanho das dermo-esferas não se alterou e por vezes até ficou menor nos dias mais tardios da cultura (sexto e sétimo dia), demonstrando que a taxa de proliferação das células das dermo-esferas estava extremamente baixa. Segundo Glauche e colaboradores (2009), o estado de quiescência alcançado pelas CTs hematopoiéticas em determinados momentos do seu ciclo de vida, está associado a um mecanismo protetivo, o qual está comumente relacionado à ação do nicho celular. O estado de quiescência observado nas dermo-esferas pode estar relacionado a um mecanismo de defesa das próprias células em resposta a uma condição de estresse, que neste caso muito provavelmente refere-se ao microambiente adverso a que elas estão sendo submetidas. Esse mecanismo de defesa, também pode explicar o fato das dermo-esferas resistirem por mais tempo em cultura, enquanto as células isoladas foram morrendo mais rápido.

O estudo realizado por Kuroda e colaboradores (2010) forneceu bases concretas para sustentar as nossas ideias expostas acima, pois este grupo conseguiu demonstrar que fibroblastos de pele e células nativas da medula óssea foram capazes de formar esferas a uma taxa bastante elevada quando essas células foram expostas a fortes condições de estresse. Esses achados mostram claramente que as drásticas condições de estresse impostas foram essenciais para determinar o comportamento de esferas assumido pelas células, uma vez que em condições normais as células formavam pouquíssimas esferas. Esse estudo também verificou que as esferas formadas não apresentaram uma taxa proliferativa tão boa, o que sustenta a nossa hipótese de um provável estado de quiescência para as dermo-esferas.

Além dos achados descritos acima, o estudo de Kuroda e colaboradores (2010) também demonstrou que as esferas possuem CTs únicas e distintas das demais células. Eles denominaram essas células de MUSE (*multilineage differentiating stress enduring*), pois as mesmas foram capazes de expressar marcadores de pluripotencialidade (como Nanog, Oct3/4 e Sox2), se diferenciaram em células das linhagens ectodermal, endodermal e mesodermal e suportaram condições de estresse. Essas evidências forneceram um suporte bastante grande para nos impulsionar pela busca e investigação do comportamento diferenciado observado nas dermo-esferas que obtivemos em nosso trabalho. Em adição a isso, os hidrogéis de carragenana e ágar embora

apresentem inúmeras características adequadas e atrativas para o cultivo celular e uso na engenharia de tecidos, não apresentaram no modelo sob estudo, um microambiente 3D receptivo e favorável para sustentar de maneira apropriada a sobrevivência, adesão e proliferação das CTMDH.

Portanto, levando-se em consideração os comentários descritos acima e o fato das dermo-esferas apresentarem-se íntegras e terem sobrevivido após sete dias de cultivo, optamos por investigar o comportamento e a viabilidade dessas células diferenciadas. Para isso, transplantamos as dermo-esferas para superfícies aderentes de plástico e investigamos a capacidade de adesão, proliferação, expressão de marcadores de células indiferenciadas e marcadores de CTs diferenciada. Além disso, verificamos a presença das características de CTM através da análise de antígenos de superfície específicos e da capacidade de diferenciação para os fenótipos adipogênico e osteogênicos.

Nossos resultados demonstraram que as dermo-esferas provenientes do cultivo sobre os hidrogéis de carragenana e ágar conseguiram aderir e expandir quando transplantadas para uma superfície plástica (Figura 8A-D). As dermo-esferas apresentaram total adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide e tiveram a capacidade de expandir-se pela placa de cultura ao longo de três dias de cultivo. O comportamento das dermo-esferas foi semelhante ao encontrado na condição controle (CTMDH cultivadas apenas sobre o plástico), demonstrando que em superfície plástica as dermo-esferas apresentam um comportamento mais próximo do habitual.

As CTs para serem consideradas ideais devem exibir determinadas propriedades que as classifiquem como tal, incluindo: alto nível de proliferação *in vitro*, permitindo a produção de um grande número de células a partir de uma quantidade mínima de material celular; bom controle da sua atividade proliferativa *in vivo*, evitando a formação de tumores; e principalmente uma plasticidade fenotípica, permitindo a diferenciação em diversas linhagens celulares (WISLET-GENDEBIEN, 2003). Com relação à capacidade de proliferação celular, nossos resultados mostraram que as células das dermo-esferas foram positivas para a marcação de BrdU, demonstrando que foram capazes de proliferar quando cultivadas em superfície aderente (Figura 9A-B). O mesmo resultado também foi encontrado para as CTMDH cultivadas apenas sobre o plástico (Figura 9C). A presença de células proliferativas nas dermo-esferas transplantadas pode de fato indicar um provável estado de quiescência quando estas células estavam sendo cultivadas sobre os hidrogéis, uma vez que nesta condição as células estavam num

estado menos ativo do ponto de vista proliferativo e ao serem cultivadas sobre uma superfície aderente, conseguiram proliferar. Segundo Birgers-Dotter e colaboradores (2005) o microambiente extracelular é capaz de governar e direcionar o comportamento e as funções celulares. Os resultados de proliferação juntamente com os dados de morfologia e adesão das dermo-esferas transplantadas indicam um provável efeito do microambiente em modular as características das CTMDH, pois quando essas células foram cultivadas sobre a superfície plástica elas voltaram a expressar características intrínsecas de CTMs.

Tem sido relatado que as CTMs da medula óssea possuem a capacidade de expressar marcadores de células diferenciadas como também de células indiferenciadas (GOODWIN *et al.*, 2001). Estudos mostrando as propriedades fenotípicas e funcionais das CTMs tem indicado *in vitro*, que as culturas são compostas por populações celulares heterogêneas (RIEKSTINA *et al.*, 2009). A capacidade das CTMs em expressar marcadores de células diferenciadas e indiferenciadas sem indução prévia pode explicar sua plasticidade em se diferenciar facilmente em vários tipos celulares. Nossos resultados foram consistentes com as observações descritas acima, pois ao analisarmos a expressão dos marcadores de células indiferenciadas (Nanog e Oct3/4) e de células mesenquimais diferenciadas ( $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA), verificamos que tanto as dermo-esferas como as CTMDH cultivadas apenas sobre o plástico apresentaram marcação positiva para Nanog, Oct3/4 e  $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA (Figuras 10 e 11).

Entretanto, foi possível notar que as dermo-esferas apresentaram uma marcação de Nanog e Oct3/4 mais acentuada em comparação com as CTMDH cultivadas na condição controle (Figura 10). Por outro lado, as dermo-esferas apresentaram poucas células positivas para  $\alpha$ SMA, sendo estas fracamente marcadas (Figura 11B-D). O mesmo não foi observado para a condição controle, onde as CTMDH apresentaram forte marcação para  $\alpha$ SMA, apresentando mais células positivamente marcadas (FIGURA 11F). Para  $\beta$  Tubulina III não houve diferença na marcação entre as dermo-esferas e CTMDH cultivadas sobre o plástico (Figura 11A, C, E).

Nanog, Oct4/3, Sox2 são consideradas proteínas transcricionais responsáveis por regular a pluripotencialidade e auto-renovação das CTs embrionárias (GUILLOT *et al.*, 2007; ILANCHERAN *et al.*, 2007). Estudos tem demonstrado que alguns grupos de CTMs são capazes de expressar fatores de transcrição como Nanog e Sox2, sendo estes relacionados a um maior crescimento e plasticidade para essas células (D'IPPOLITO *et al.*, 2004; GUILLOT *et al.*, 2007; ILANCHERAN *et*

*al.*, 2007). Até pouco tempo acreditava-se que Oct3/4 era expresso exclusivamente por CTs embrionárias e células germinativas primordiais. No entanto, estudos recentes tem demonstrado que Oct3/4 pode estar envolvido na regulação da multipotencialidade de CTs adultas, sendo sua expressão detectada em uma variedade de tecidos incluindo: medula óssea, sangue periférico, cordão umbilical, epiderme e folículo piloso (JIANG *et al.*, 2002; TAI *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2006).

Na tentativa de classificar as CTs adultas, incluindo as CTMs, em populações celulares multipotentes e pluripotentes, diversos grupos de pesquisadores começaram a descrever a expressão dos marcadores de pluripotencialidade nestes tipos celulares. A expressão desses marcadores em CTs adultas sugere semelhanças entre essas células e as CTs embrionárias, além de indicar um possível aumento da potencialidade nas CTs adultas. A possibilidade de obtermos CTs adultas com potencialidades semelhantes a das CTs embrionárias, torna-se uma ideia excitante e uma atraente alternativa para o emprego das CTs adultas em terapias clínicas, pois dessa forma problemas de ordem ética seriam evitados (ZUK, 2009). Os nossos resultados da expressão fenotípica mostraram a marcação acentuada de Nanog e Oct3/4 nas dermo-esferas, sendo que esta marcação foi detectada no citosol da célula.

Tendo por base as informações descritas acima, os resultados da expressão fenotípica sugerem que as dermo-esferas possam estar num estado mais indiferenciado e menos especializado, uma vez que apresentaram a expressão mais acentuada dos marcadores de pluripotencialidade celular e expressão reduzida dos marcadores relacionados a células mesenquimais diferenciadas. No entanto, a expressão de Oct3/4, Nanog e Sox2 como parâmetro para assumir a pluripotencialidade celular deve ser cuidadosamente avaliada. Um estudo realizado por Izadpanah (2006) e colaboradores reportou a expressão nuclear dos marcadores Oct3/4 e Sox2 em células derivadas de tecido adiposo, sendo a localização desta marcação consistente com o papel destas proteínas como fatores de transcrição. Em contra partida, esse estudo além de confirmar a expressão nuclear dessas proteínas, também mostrou a expressão desses marcadores fora do núcleo. Outros estudos também tem reportado a marcação desses fatores de pluripotencialidade em diferentes locais dentro da célula (RIEKSTINA *et al.*, 2009; ZUK, 2009). Um dos fatores relacionados a expressão intracelular distinta (núcleo e citoplasma) pode ser atribuído à fonte do anticorpo comercial utilizado (ZUK, 2009). No entanto, a descoberta da existência de múltiplas isoformas para esses genes tem se tornado a

alternativa mais plausível para explicar as diferentes localizações nas marcações desses fatores (ATLASI *et al.*, 2008).

Diversos estudos tem relatado a descoberta de que alguns genes do desenvolvimento possuem múltiplos pseudogenes (PAIN *et al.*, 2005; FAIRBANKS; MAUGHAN, 2006; POLISENO, 2012). O genoma de mamíferos contém múltiplas sequências que parecem similares a genes funcionais. No entanto, essas sequências contêm defeitos que previnem a transcrição ou podem gerar transcritos não funcionais. Todavia, se o pseudogene é inserido sob a influência de um promotor ativo, ele pode conseqüentemente ser expresso, sendo que essa expressão pode gerar resultados falso positivos para a expressão de um determinado gene (REDSHAW; STRAIN, 2010). Genes como o Nanog e Oct3/4 já foram descritos por possuírem pseudogenes, sendo descritos 10 pseudogenes para o Nanog (FAIRBANKS; MAUGHAN, 2006) e 6 pseudogenes para Oct3/4 (REDSHAW; STRAIN, 2010). Tendo como base essas informações, torna-se prudente pensar que as marcações acentuadas observadas para Nanog e Oct3/4 nas dermo-esferas podem não estar diretamente relacionadas com a manutenção de um estado indiferenciado para essas células. A descoberta dos pseudogenes traz muita incerteza e insegurança acerca da interpretação dos resultados relacionados a expressão desses marcadores. Levando em consideração a ideia de que a formação das dermo-esferas foi um mecanismo de defesa encontrado pelas CTMDH para suportar o estresse do ambiente adverso, é plausível hipotetizar que a marcação acentuada das proteínas Nanog e Oct3/4 pode estar relacionada a uma proteção contra a morte celular ou até mesmo uma resistência das células a morte. Esta hipótese é fundamentada no trabalho de Kuroda (2010) e colaboradores, os quais também observaram a marcação de Oct3/4 e Sox2 nas esferas formadas sob condição de estresse. Em vista da marcação citoplasmática das proteínas Nanog e Oct3/4 observada nas nossas células e o fato da descoberta dos pseudogenes trazer muitas dúvidas e incertezas na interpretação do real significado que esses marcadores têm para as CTs adultas, nós optamos por não levar adiante a exploração desses resultados aparentemente interessantes e diferentes.

Além da presença da morfologia fibroblastóide e alta adesão ao plástico, as CTMs também são caracterizadas pela expressão de antígenos de superfície específicos e por seu potencial para diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito quando mantidas em condições apropriadas *in vitro* (DOMINICI, *et al.*, 2006). Com relação à expressão de antígenos de superfície específicos, nosso estudo comprovou através de imunofenotipagem e imunocitoquímica que as

dermo-esferas apresentaram resultados consistentes com o padrão de expressão de antígenos de superfície, sendo positivas para CD105, CD90 e CD73 e negativas para CD45 (Figuras 12 e 13). Esses resultados também foram encontrados para as CTMDH mantidas na condição controle, indicando que as dermo-esferas não perderam sua característica de CTM, pois mesmo sendo cultivadas em uma superfície não aderente e se comportando de maneira não habitual, as células foram capazes de manter a expressão dos antígenos de superfície.

Outra característica importante das CTMs está relacionada com o seu potencial de diferenciação para os fenótipos de osso, gordura e cartilagem *in vitro*, o que demonstra a multipotencialidade presente nessas células (PHINNEY; PROCKOP, 2007). Em vista disso, testamos o potencial das dermo-esferas em se diferenciar para adipócito e osteócito quando submetidas a meios indutores específicos. Nossos resultados mostraram que assim como as células do controle, as dermo-esferas foram capazes de se diferenciar para os fenótipos osteogênico e adipogênico (Figuras 14 e 15). Estes achados juntamente com os resultados obtidos e descritos para a morfologia, adesão ao plástico e expressão de antígenos de superfície, demonstram que as dermo-esferas sob estudo seguem os critérios para serem consideradas CTMs.



## 2.5 CONCLUSÕES

- Quando cultivadas em hidrogéis de carragenana e ágar as CTMDH formaram dermo-esferas (esferas formadas a partir da agregação das CTMDH);
- As dermo-esferas apresentaram pouca afinidade com os hidrogéis e demonstraram estar num estado de quiescência durante todo o tempo de cultivo;
- As células das dermo-esferas pós-cultivadas em superfície plástica conseguiram apresentar morfologia fibroblastóide, alta adesão ao plástico, expressão dos marcadores de superfície característicos de CTM e capacidade de diferenciação para os fenótipos osteogênico e adipogênico, sendo, portanto devidamente caracterizadas como CTMs;
- As dermo-esferas apresentaram marcação positiva para os marcadores de pluripotencialidade celular (Nanog e Oct3/4) e para os marcadores de célula mesenquimal diferenciada ( $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA). No entanto, a marcação de Nanog e Oct3/4 foi mais acentuada em comparação à expressão de  $\beta$  Tubulina III e  $\alpha$ SMA;
- Consideramos que para o modelo de estudo proposto o hidrogel de carragenana não apresentou desempenho satisfatório, uma vez que não conseguiu sustentar de forma adequada a adesão, proliferação e sobrevida das CTMDH *in vitro*. Em vista disso, buscamos desenvolver um segundo modelo de cultivo entre as CTMDH e o hidrogel de carragenana. Este novo modelo buscou o encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas.



## Capítulo III

---

### **Cultivo de células-tronco da derme humana encapsuladas em hidrogéis de carragenanas**

**Resumo:** Nesta etapa buscamos o desenvolvimento de um modelo de cultivo 3D baseado no encapsulamento das células-tronco mesenquimais da derme humana (CTMDH) em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial (Sigma®). Primeiramente foram realizados testes de padronização da metodologia de encapsulamento das células nos hidrogéis. Foram testadas sete variáveis, incluindo, filtração, tempo de plaqueamento das células no gel, tempo de polimerização do gel, durabilidade do gel em cultura, concentração do sal KCl, tempo de contato do KCl e durabilidade do gel com KCl. Uma vez padronizada a metodologia, as células da derme foram encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial na concentração de  $10 \times 10^5$  por gel, onde foram cultivadas em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de SFB. As culturas foram mantidas por 14 dias em incubadora à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade, onde foram analisadas quanto à morfologia, adesão e viabilidade celular. As microestruturas das carragenanas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A análise das microestruturas revelou que os hidrogéis de carragenanas nativa e comercial apresentaram uma estrutura porosa altamente interconectada e com o diâmetro dos poros bastante variados. A análise por microscopia convencional e Confocal mostrou que as células encapsuladas apresentaram morfologia tipicamente arredondada e não interagiram com os géis, pois pouquíssimas células foram observadas com uma morfologia alongada e prolongamentos citoplasmáticos. A análise da viabilidade celular por ensaio com MTS e Qtracker demonstrou um aumento no número de células viáveis no sétimo e oitavo dia em relação ao primeiro dia de cultivo. Por outro lado, a análise no décimo terceiro e décimo quarto dia mostrou um número reduzido de células viáveis,

demonstrando uma considerável queda na viabilidade celular. Concluímos que foi possível desenvolver um bom modelo 3D com a técnica de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial. O hidrogel de carragenana nativa apresentou tanto potencial quanto o hidrogel comercial para sustentar o crescimento e sobrevivência das células, demonstrando que pode ser utilizado para o cultivo *in vitro* e possivelmente em futuras aplicações clínicas.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DA DERME HUMANA**

A obtenção dos fragmentos da derme humana foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.1.

### **3.2.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA**

O isolamento e cultura das CTMDH foi realizado de acordo com a metodologia descrita no item 2.2.2.

### **3.2.3 PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME HUMANA ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA NATIVA E COMERCIAL**

A padronização da metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial avaliou o efeito de sete variáveis descritas na tabela 3.

**Tabela 3. Variáveis analisadas à padronização da metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenana nativa e comercial.**

<b>Condição</b>	<b>Descrição</b>
<b>1 Filtração*</b>	Teste realizado para identificar qual a melhor maneira de filtrar o hidrogel de carragenana nativa, uma vez que este é dotado de muitas impurezas que dificultam a observação das células e a interpretação dos resultados. Para tal, foram testados três condições: filtro de café, membrana de 0,8 $\mu\text{m}$ e membrana de 0,22 $\mu\text{m}$ .
<b>2 Tempo de plaqueamento das células no gel</b>	Para o correto encapsulamento das células é necessário que o hidrogel esteja em seu estado líquido para que as células consigam ser misturadas e incorporadas no interior do hidrogel. Para isso, testou-se o tempo máximo que o hidrogel permanece em seu estado líquido. O hidrogel líquido foi plaqueado e nos tempos de até 1 minuto, 2 minutos e >3 minutos avaliou-se com auxílio de uma pipeta e através de movimentos de subida e descida a liquidez do gel.
<b>3 Tempo de polimerização do gel</b>	Para que o sistema de encapsulamento seja formado é necessário que o hidrogel passe do estado líquido para o sólido, formando assim um gel tridimensional sólido e estável. Para isso, utilizamos uma pipeta e nos tempos de 10, 20 e 30 minutos avaliou-se a capacidade de formação do gel. A polimerização é considerada completa, quando o hidrogel não encontra-se mais em seu estado líquido e portanto não consegue mais ser pipetado, pois o gel já está sólido e formado.
<b>4 Durabilidade do gel em cultura</b>	Determinou-se qual a durabilidade máxima do hidrogel com as células em cultura. Para isso avaliou-se a integridade do hidrogel, observando-se quando este começa a

	degradar, deixando o estado sólido de gel para o aparecimento do estado líquido.
<b>5 Concentração de KCl</b>	Teste realizado para identificar a concentração ideal de KCl que deve ser utilizada para colocá-lo em contato com o hidrogel, uma vez que a presença do KCl aumenta a rigidez e força do gel. Para isso foram testados KCl nas concentrações de 1, 3 e 5%.
<b>6 Tempo de contato do KCl</b>	Avaliou-se qual o tempo ideal que o KCl precisa estar em contato com gel para propiciar uma maior força e rigidez do mesmo. Testou-se os tempos de 1, 2 e 10 minutos.
<b>7 Durabilidade do gel com KCl em cultura</b>	Determinou-se qual a durabilidade máxima do hidrogel com KCl em cultura. Para isso avaliou-se a integridade do hidrogel, observando-se quando este começa a degradar, deixando o estado sólido de gel para o aparecimento do estado líquido.

\* O hidrogel de carragenana comercial não precisou passar pelo teste da filtração, pois o seu gel não contém tantas impurezas como o gel da carragenana nativa.

\* Todos os parâmetros testados em cada uma das variáveis analisadas como os tempos de plaqueamento das células no gel, tempo de polimerização do gel, concentrações e tempo de exposição do sal KCl foram baseados em trabalhos publicados na literatura.

### 3.2.4 PREPARO DOS HIDROGÉIS DE CARRAGENANA

O preparo do gel de carragenana foi realizado a partir de seu extrato em pó, o qual foi doado pelo Laboratório de Algas Marinhas da Universidade Federal de Santa Catarina (LAMAR), através da pesquisadora, professora e Dra. Leila Hayashi, que atualmente desenvolve na praia do Sambaqui – Florianópolis - Santa Catarina o cultivo e a extração da carragenana a partir da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*. Além do gel de carragenana proveniente da produção em Santa Catarina (o qual será referido neste estudo como carragenana nativa), também foi utilizado o gel de carragenana

proveniente da empresa Sigma® (o qual será referido neste estudo como carragenana comercial) como condição controle dos experimentos.

O pó de carragenana nativa foi solubilizado em água ultra-pura (Milli-Q), seguido de agitação (vórtex) para proporcionar a completa solubilização e homogeneização dos polissacarídeos. A solução viscosa obtida permaneceu *overnight* à temperatura ambiente, garantindo a completa hidratação da carragenana e a formação do gel na concentração de 2,0% (m/v). O gel de carragenana foi aquecido em banho-maria à 60°C, durante 30 minutos, permitindo o seu retorno ao estado líquido e desta maneira, facilitando sua manipulação. Em ambiente de fluxo laminar o gel de carragenana nativa foi filtrado em membrana de 0,8 µm, a fim de se eliminar o excesso de impurezas presentes no gel. O preparo do gel de carragenana comercial também foi feito a partir do seu pó, sendo o procedimento de obtenção do gel semelhante ao citado anteriormente. A única diferença é que o gel de carragenana comercial não precisou ser filtrado, uma vez que o seu pó não possui muitas impurezas. Para esta etapa do trabalho ambos os géis de carragenanas foram produzidos na concentração de 2,0%. Optamos por esta concentração, pois o trabalho de Rocha e colaboradores (2011) apresentou melhores resultados para o encapsulamento celular com o hidrogel de carragenana na concentração de 2,0%. Após a formação do gel, estes foram esterilizados em autoclave à 121°C por 20 minutos.

#### **3.2.4.1. Avaliação da microestrutura dos hidrogéis de carragenana**

As microestruturas dos hidrogéis de carragenana nativa (HCN) e de carragenana comercial (HCC) foram caracterizadas por crio – microscopia eletrônica de varredura (Crio-MEV) através do uso do equipamento Crio-fratura (Freeze Etching System BAF 060) e do microscópio eletrônico de varredura (FESEM JEOL-6340F) do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coordenado pelo professor Kildare Rocha de Miranda. Para as observações de Crio-MEV as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e transferidas para o sistema de crio-fratura (Baltec BAF 060). As amostras foram crio-fraturadas a -120°C e mantidas a -105°C por 5 minutos para permitir a sublimação da água. Logo após, a temperatura foi mantida em -120°C para o sombreamento metálico, o qual foi realizado com 4 nm de platina e carbono por meio da rotação das amostras a 45°C. As amostras foram então transferidas para o Microscópio Eletrônico de Varredura (FESEM

JEOL-6340F) onde foram mantidas a  $-120^{\circ}\text{C}$ . As imagens foram obtidas a  $-120^{\circ}\text{C}$  utilizando 5 kV e uma distância de trabalho de 6 mm.

### 3.2.5 CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO DA DERME HUMANA ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA

Para o encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial, as células foram previamente dissociadas das garrafas de cultura através da utilização da solução tripsina-EDTA (0,05% m/v). A ação enzimática foi inibida com meio de cultura suplementado com 15% de SFB e as células recuperadas foram transferidas para placas de 8 poços (labtek®) contendo os hidrogéis de carragenana. Para o encapsulamento, os géis foram primeiramente aquecidos em banho-maria à  $60^{\circ}\text{C}$  por pelo menos 30 minutos. Logo após, foram levados para o fluxo laminar e plaqueados ( $250\ \mu\text{l}/\text{poço}$ ) em placas de 8 poços (labtek®) que já estavam previamente sob placa de aquecimento à  $37^{\circ}\text{C}$ . As CTMDH foram incorporadas ao gel enquanto este ainda estava no estado líquido e neste momento, foram gentilmente misturadas ao gel, de modo a permitir o encapsulamento das células dentro do hidrogel. Em seguida, o gel permaneceu 20 minutos dentro do fluxo laminar para permitir a sua adequada polimerização e logo após, foi adicionado solução de KCl 5% por mais 10 minutos. Posteriormente procedeu-se a lavagem dos hidrogéis por 3 vezes com PBS (pH 7,6) e os mesmos foram mantidos em meio DMEM/F12 acrescido de PS ( $1\text{U}/\mu\text{g}$ ), suplementado com 15% de SFB em estufa úmida à  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ .

As culturas foram mantidas por 14 dias com a troca do meio ocorrendo a cada 2 dias e durante este período as células foram analisadas quanto a morfologia, adesão, sobrevivência e viabilidade.

### 3.2.6 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

#### 3.2.6.1 Ensaio da viabilidade por MTS

A viabilidade celular foi analisada nas células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativo e comercial nos dias 1, 7 e 14 do cultivo através do ensaio colorimétrico utilizando o reagente MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). Tal ensaio baseia-se na mensuração dos cristais de formazan derivados da atividade das enzimas desidrogenases

encontradas em células metabolicamente ativas. Neste teste, os cristais de formazan formados são solúveis e apresentam-se na cor roxa, dando um aspecto colorido para as culturas celulares. A quantidade de formazan produzido é mensurada espectrofotometricamente em leitor de Elisa ( $\lambda = 490\text{nm}$ ), sendo esta medida diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura.

Para análise da viabilidade celular, as células foram recuperadas das garrafas de cultura por meio da ação enzimática de tripsina-EDTA (0,05%). A reação foi neutralizada com meio de cultura suplementado com 15% de SFB. As células foram encapsuladas nos hidrogéis de carragenana (nativa e comercial) em uma densidade de  $7 \times 10^4$  células por poço e mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de SBF em estufa úmida à  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Nos dias 1, 7 e 14 de cultura foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  do kit CellTiter 96® Aqueous Non-radioactive cell Proliferation Assay (Promega) à cultura de células e estas permaneceram por 4 horas em estufa à  $37^\circ\text{C}$  com o produto incubado. Logo após, a solução contida nos poços foi homogeneizada e levada para leitura em leitor de Elisa (Leitora Infinite M200) do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), no comprimento de onda de 490nm. Este experimento foi realizado em duplicata com N amostral de 3 (3 pacientes diferentes para cada experimento desenvolvido) para ambas as condições testadas.

### **3.2.6.2 Ensaio da viabilidade por Qtracker**

A viabilidade celular também foi avaliada por meio do traçador Qtracker® Cell Labeling Kits 565nm (Invitrogen®) nos dias 2, 8 e 13 da cultura. O Qtracker® baseia-se na incorporação de nanocristais Qdot® no citoplasma das células viáveis. Uma vez inseridos nas células vivas, os nanocristais conseguem ser transmitidos para as células filhas no processo de proliferação celular. Os nanocristais inseridos nas células são capazes de produzir uma alta fluorescência a qual é detectada em microscópio de fluorescência.

Para análise da viabilidade celular, as células foram recuperadas das garrafas de cultura por meio da ação enzimática de tripsina-EDTA (0,05%). A reação foi neutralizada com meio de cultura suplementado com 15% de SFB. As células foram encapsuladas nos hidrogéis de carragenana (nativa e comercial) em uma densidade de  $10 \times 10^4$  células por poço e mantidas em meio DMEM/F12 suplementado com 15% de SBF em estufa úmida à  $37^\circ\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$ . Nos dias 1, 7 e 12 da cultura, o traçador Qtracker foi incorporado nas células encapsuladas na

concentração de 10nM. Inicialmente misturou-se o componente A e o componente B presentes no kit, os quais permaneceram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado meio de cultura a mistura dos componentes e o tubo contendo a solução foi levado ao vórtex por 30 segundos. Logo após, a solução foi colocada nos poços contendo as células e a cultura foi mantida por 1 hora em estufa úmida à 37°C. Os poços foram lavados 2 vezes com meio de cultivo e as culturas foram mantidas em meio DMEM/F12 acrescido de PS (1U/μg) suplementado com 15% de SFB em estufa úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até análise posterior.

A observação da marcação do traçador foi realizada nos dias 2, 8 e 13 da cultura via Microscópio Confocal Leica DMI6000 B do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### 3.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância da diferença entre as médias dos grupos experimentais foi avaliada através da análise de variância de duas vias (ANOVA) seguido do teste de múltipla comparação de médias de Bonferroni. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico GraphPad Prism 4®.



### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ENCAPSULAMENTO DAS CTMDH EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA

Inicialmente realizamos a padronização da metodologia de incorporação das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial. Os testes realizados bem como, os seus respectivos parâmetros testados estão listados na tabela 4.

**Tabela 4. Parâmetros avaliados para a padronização da metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.**

<i>Testes realizados</i>	<i>Filtração *</i>	<i>Tempo de plaqueamento das células no gel</i>	<i>Tempo de polimerização do gel</i>	<i>Durabilidade do gel em cultura</i>	<i>[I] do KCl</i>	<i>Tempo do KCl</i>	<i>Durabilidade do gel com KCl em cultura</i>
<i>Parâmetros Testados</i>	Filtro de café	Até 1 minuto	10 minutos	5 dias	KCl 1%	1 min	8 dias
	Membrana a 0,8 µm	2 minutos	20 minutos	8 dias	KCl 3%	3 min	15 dias
	Membrana a 0,22 µm	>3 minutos	30 minutos	>8 dias	KCl 5%	10 min	>15 dias

\* A filtração foi realizada apenas com a carragenana nativa

No teste de filtração, nós observamos que a membrana de 0,8 µm proporcionou uma melhor remoção das impurezas encontradas no gel nativo se comparado com o filtro de café. Ao testarmos a filtração do gel com o filtro de 0,22 µm verificamos que, pelo fato de o gel de carragenana ser muito viscoso, ele não conseguiu passar pelo filtro, ficando retido a cima da malha. Logo, a membrana de 0,8 µm foi a opção que apresentou melhor resultado na eliminação das impurezas presentes no gel de carragenana nativo.

Em relação ao tempo de incorporação das células nos hidrogéis após o seu plaqueamento, observamos que em até 1 minuto o gel ainda está líquido o suficiente para proporcionar a mistura das células com o gel. Todavia, com 2 e 3 minutos o gel já começa a apresentar uma certa resistência ao movimento, dificultando a mistura das células com o mesmo. Além disso, realizando a mistura nesses tempos, o gel tende a polimerizar inadequadamente, dificultando, portanto a posterior visualização das células dentro do hidrogel. Logo, o melhor tempo para incorporação das células no gel é de até 1 minuto após o plaqueamento do mesmo.

Com relação ao tempo de polimerização do gel, foi constatado tempo de 10 minutos foi insuficiente para permitir a completa e adequada polimerização. Por outro lado, os tempos de 20 e 30 minutos se mostraram satisfatórios, uma vez que o gel já encontrava-se uniformemente polimerizado. Porém, julgamos 20 minutos o tempo de polimerização mais adequado, pois nesta condição as células acabam ficando por menos tempo fora da incubadora de CO<sub>2</sub>.

Quanto ao quesito durabilidade do hidrogel em cultura, verificamos que o tempo máximo que o mesmo dura em cultura são 8 dias, pois a partir do nono dia o gel começa a se degradar até perder totalmente a estrutura gelificada.

Tendo em vista a pouca durabilidade do hidrogel em cultura, testou-se o emprego do sal KCl nos hidrogéis de carragenana em diferentes concentrações e tempos. Os resultados mostraram que o KCl na concentração de 1% não foi efetivo em aumentar a durabilidade do gel em nenhum dos três tempos testados (1, 3 e 10 min). Verificamos também, que o KCl na concentração de 3% foi pouco efetivo, independentemente do tempo em que ficou em contato com o gel, uma vez que aumentou somente em 2 dias a durabilidade do mesmo, quando comparado a condição gel sem KCl. O KCl na concentração de 5% também foi pouco efetivo quando ficou em contato com o gel por 1 e 3 minutos, contudo, quando ficou em contato por 10 minutos proporcionou um aumento de 7 dias na durabilidade do hidrogel. Desta forma, esta última condição permitiu estender a durabilidade do hidrogel de carragenana por 15 dias em cultura. Levando em conta esses resultados e a baixa durabilidade do hidrogel em cultura, nós optamos por usar o KCl na concentração de 5% por 10 minutos na metodologia de encapsulamento das células no gel.

Após a realização dos testes citados acima, definiu-se uma nova metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial. Os testes realizados e os respectivos

resultados selecionados para compor a metodologia de encapsulamento estão expostos na tabela 5.

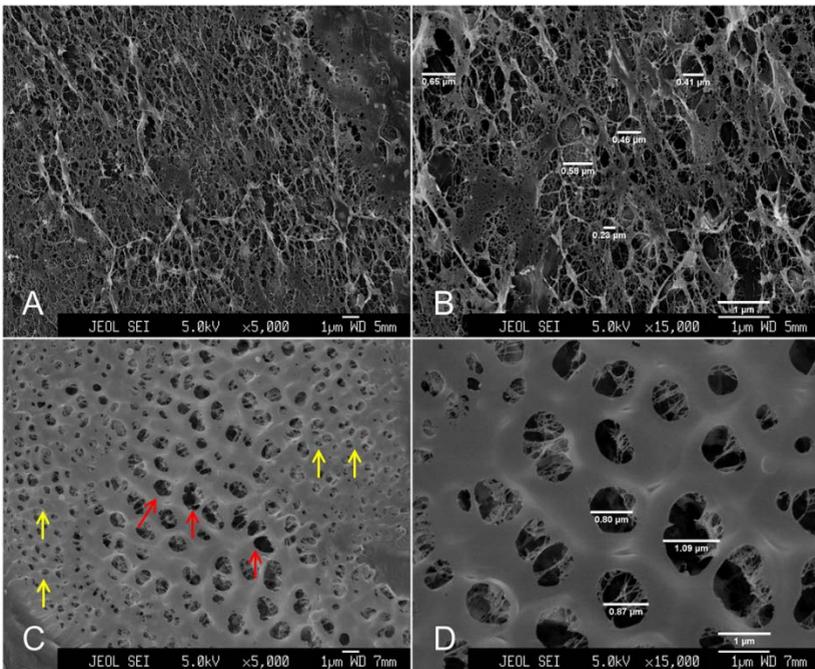
**Tabela 5. Parâmetros selecionados a partir dos testes de padronização para compor a metodologia de encapsulamento das CTMDH em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.**

<i>Testes realizados</i>	<i>Filtração</i>	<i>Tempo de plaqueamento das células no gel</i>	<i>Tempo de polimerização do gel</i>	<i>Durabilidade do gel em cultura</i>	<i>[ ] do KCl</i>	<i>Tempo do KCl</i>	<i>Durabilidade do gel com KCl em cultura</i>
<i>Parâmetro selecionado</i>	Filtro 0,8 µm	Até 1 minuto	20 minutos	8 dias	5%	10 min	15 dias

### 3.3.2 MICROESTRUTURA DOS HIDROGÉIS DE CARRAGENANA

Para investigar a microestrutura dos hidrogéis de carragenanas nativa e comercial, submetemos os hidrogéis à análise pelo Crio-MEV (Figura 16). Observamos que o hidrogel de carragenana nativa apresentou uma rede fibrosa bastante porosa (Figura 16A). Verificou-se também que o tamanho dos poros é heterogêneo, compreendendo poros com diâmetro de 0,23 µm a poros com diâmetro de 0,65 µm (Figura 16B). É importante salientar que os poros dos hidrogéis de carragenanas nativa e comercial possuem tamanhos geralmente não maiores do que 1 µm.

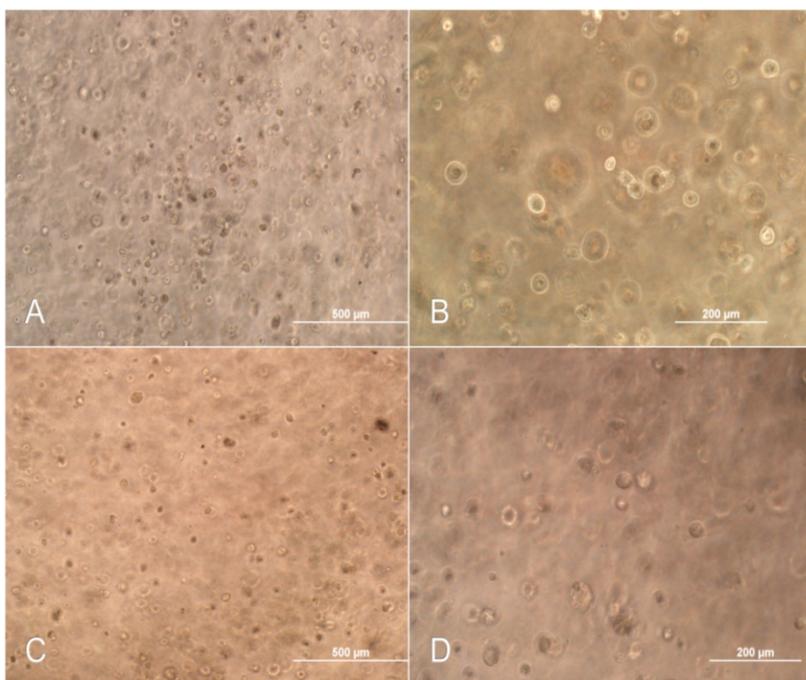
A análise da microestrutura do hidrogel de carragenana comercial mostrou a presença de diversos poros, como também de uma extensa matriz homogênea. Os poros também apresentaram tamanhos variados, sendo possível notar que os poros com tamanhos menores encontram-se mais na lateral da superfície do gel, ao passo que poros com tamanhos maiores encontram-se mais no centro da superfície (Figura 16C). Assim como o hidrogel de carragenana nativa, os poros do hidrogel de carragenana comercial também possuem tamanhos relativamente pequenos, de até  $1\mu\text{m}$  aproximadamente (Figura 16D).



**Figura 16. Detalhes da microestrutura dos hidrogéis da carragenanas nativa e comercial.** Micrografia de Crio-MEV da superfície dos hidrogéis de carragenanas, mostrando a estrutura porosa que os compõem. (A, B) Rede fibrosa e porosa que compõe o gel de carragenana nativa; (C-D) matriz porosa que compõe o gel de carragenana comercial. (B, D) Micrografia em aumento de 15.000x evidenciando o tamanho dos poros. As flechas em amarelo mostram os poros menores encontrados mais na lateral da superfície do gel de carragenana comercial, e as setas em vermelho mostram os poros maiores encontrados no centro da superfície.

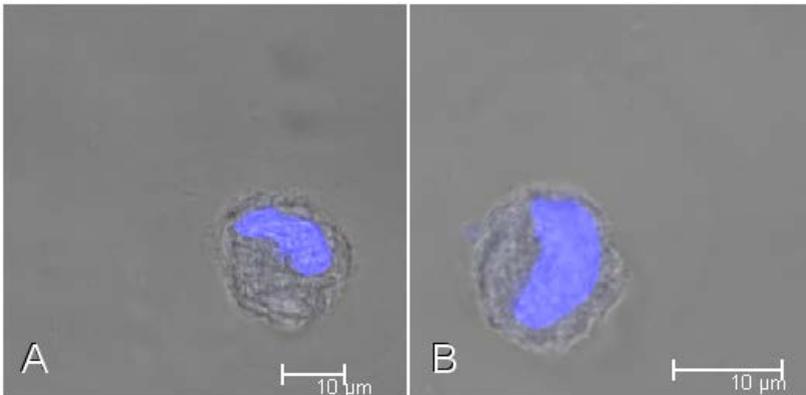
### 3.3.3 MORFOLOGIA E ADESÃO DAS CTMDH ENCAPSULADAS EM HIDROGEL DE CARRAGENANA

Verificamos que as CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial apresentaram distribuição homogênea pelo gel, indicando que a técnica empregada no encapsulamento foi eficiente à incorporação celular (Figura 17A, C). As imagens de microscopia de luz convencional mostram ainda que as células encapsuladas em ambos os tipos de carragenanas, apresentaram morfologia arredondada (Figura 17B, D).



**Figura 17. Detalhes da distribuição e morfologia das CMTDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.** Micrografias de contraste de fase representativas da distribuição e morfologia das CMTDH encapsuladas nos hidrogéis de carragenana nativa e comercial. (A-B) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa nos aumentos de 100 e 200x respectivamente. (C-D) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana comercial nos aumentos de 100 e 200x respectivamente.

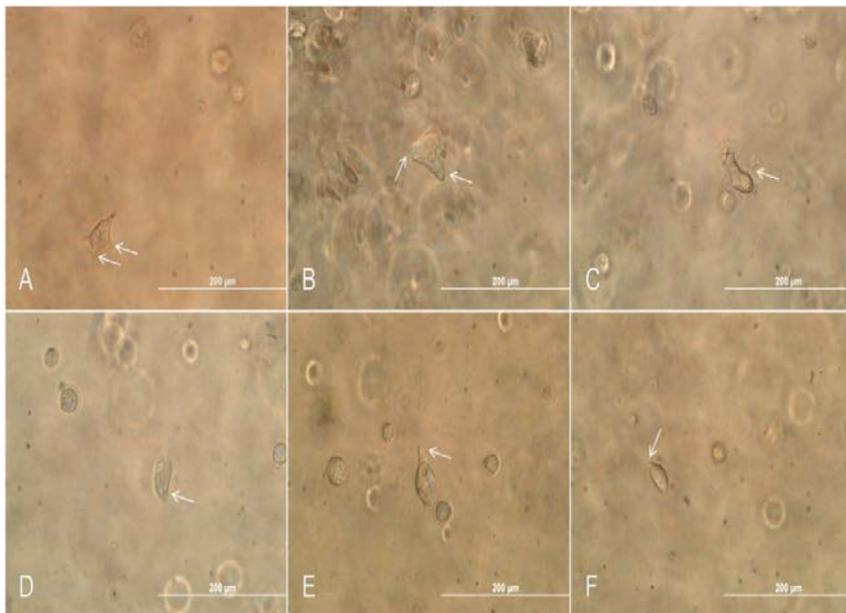
A tridimensionalidade do sistema dificultou a observação e análise das células encapsuladas nos hidrogéis através da microscopia de luz convencional. Desta forma, devido ao baixo poder de resolução das imagens obtidas, nós optamos por analisar a morfologia das CTMDH encapsuladas nos géis de carragenanas através de microscopia confocal (Figura 18). A análise das imagens confirmou os resultados encontrados na microscopia convencional, demonstrando que as CTMDH encapsuladas nos hidrogéis de carragenana apresentam morfologia tipicamente arredondada, não exibindo em sua grande maioria extensões e prolongamentos citoplasmáticos característicos de células em processo de adesão e/ou migração. A coloração nuclear com DAPI também mostrou a presença de núcleos íntegros nas células encapsuladas (Figura 18A, B).



**Figura 18. Detalhes da morfologia das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.** Fotografias de microscopia confocal evidenciando a morfologia arredondada das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial. (A) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa no aumento de 600x. (B) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana comercial no aumento de 600x.

Através da microscopia confocal e convencional de luz observamos também que as CTMDH apresentaram pouca afinidade com os hidrogéis de carragenana, não apresentando muita interação com os mesmos. Isto pode ser facilmente observado pela morfologia arredondada e ausência em sua grande maioria de pontos de adesão

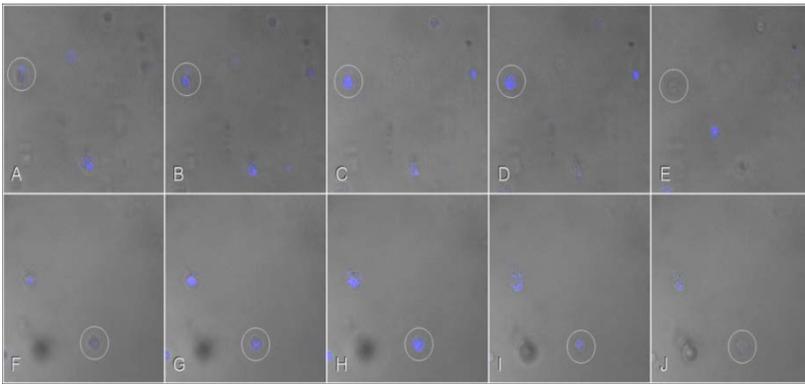
focal (Figuras 17B, D e 18). Por outro lado, observou-se que algumas células encapsuladas em ambos os hidrogéis apresentaram uma morfologia diferenciada, com o corpo celular mais alongado e a presença de extensões e prolongamentos citoplasmáticos, sugerindo evidenciando o início de um processo de contato com o hidrogel (Figura 19).



**Figura 19. Morfologia diferenciada das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial.** Micrografias de contraste de fase da morfologia diferenciada das CTMDH encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa e comercial. As setas em branco indicam a presença de prolongamentos citoplasmáticos. (A-B-C) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa (D-E-F) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana comercial.

Como mencionado anteriormente, é importante salientar que poucas células foram vistas com essa morfologia diferenciada e que a grande maioria das células encapsuladas nos hidrogéis de carragenana apresentaram de fato morfologia tipicamente arredondada.

Através de microscopia confocal também foi possível verificar a que profundidade as CTMDH estavam encapsuladas dentro dos hidrogéis. A análise do eixo Z, o qual permite medições de dimensões celulares na vertical, mostrou a presença de células numa distância de 63  $\mu\text{m}$  de espessura da superfície do gel, demonstrando que estas estão em diferentes níveis de organização dentro do gel (Figura 20).



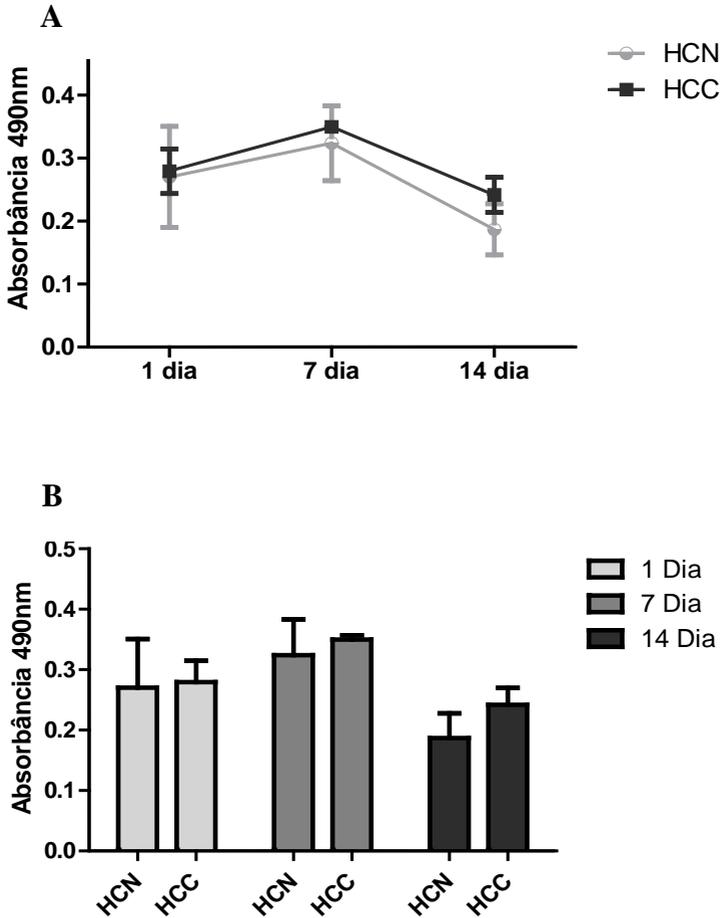
**Figura 20. Microscopia Confocal representativa das CTMDH encapsuladas em diferentes profundidades nos hidrogéis de carragenanas.** Série tirada em microscópio confocal no campo claro/ultravioleta das CTMDH em diferentes níveis dentro dos hidrogéis de carragenana e comercial. A série representa os cortes que foram tirados do eixo Z (vertical) a cada 3 $\mu\text{m}$  de espessura, totalizando uma série fotografada com 63  $\mu\text{m}$  de espessura. Esta série representa 5 fotos consecutivas que foram retiradas da série total, totalizando 15  $\mu\text{m}$  de espessura de área fotografada. O círculo em branco ao redor da célula indica o aparecimento e desaparecimento da célula a medida que os cortes foram feitos. Em azul, marcação do núcleo com DAPI. (A-B-C-D-E) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa. (F-G-H-I-J) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana comercial.

### 3.3.4 VIABILIDADE DO CULTIVO DE CTMDH ENCAPSULADAS EM HIDROGÉIS DE CARRAGENANA

#### 3.3.4.1 Ensaio da viabilidade por MTS

Para verificar a viabilidade das CTMDH encapsuladas nos hidrogéis de carragenana nativa e hidrogel de carragenana comercial, realizamos o ensaio do MTS nos dias 1, 7 e 14 do cultivo celular. Nossos resultados mostram que em ambos os hidrogéis houve um aumento acentuado da viabilidade celular no sétimo dia em comparação ao primeiro dia de cultivo (Figura 21A). Contudo a análise do décimo quarto dia mostrou uma queda acentuada na viabilidade celular para ambos os hidrogéis avaliados (Figura 21A). Esses resultados demonstram que tanto o hidrogel de carragenana nativa como o comercial apresentam uma tendência no aumento do número de células viáveis até o sétimo dia de cultivo. Entretanto, em ambas as condições verifica-se no décimo quarto dia uma tendência à queda no número de células viáveis no cultivo.

Além de analisarmos a viabilidade das CTMDH encapsuladas nos géis de carragenana, também realizamos uma análise comparativa entre os hidrogéis de carragenana nativa e comercial. Essa análise foi realizada para verificarmos se existe diferença estatística entre a viabilidade celular encontrada nos dois géis de carragenana. Dessa maneira podemos avaliar qual hidrogel apresenta melhor desempenho para sustentar a viabilidade celular ao longo dos quatorze dias de cultivo. Constatamos que a viabilidade celular foi similar entre o hidrogel de carragenana nativa e o hidrogel de carragenana comercial nos três dias de cultivo analisados (Figura 21B).

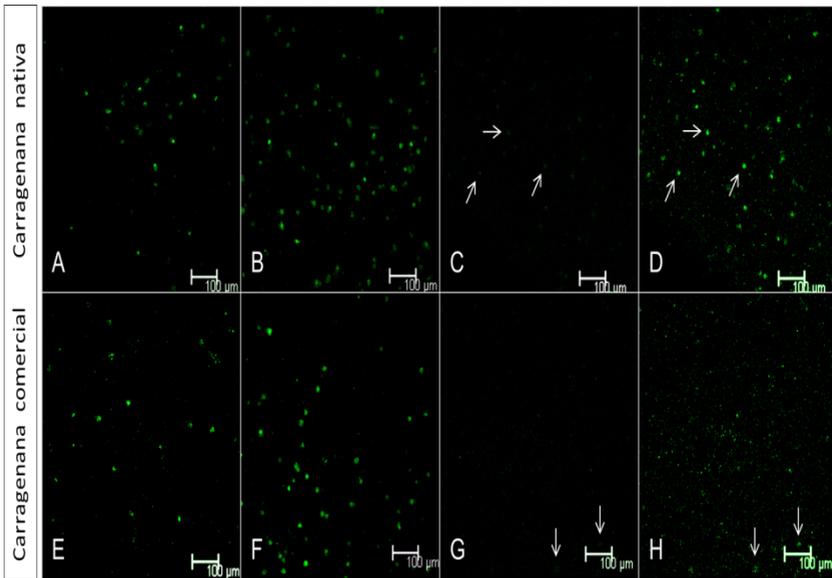


**Figura 21. Gráficos representativos da análise estatística da viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogéis de carragenanas nativa e comercial através do ensaio por MTS. (A) Representação gráfica do comportamento da viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa (HCN) e hidrogel de carragenana comercial (HCC) nos dias 1, 7 e 14 da cultura. (B) Representação gráfica da comparação da viabilidade celular nos dias 1, 7 e 14 de cultivo entre os hidrogéis de carragenanas nativa e comercial (HCN e HCC, respectivamente).**

### 3.3.4.2 Ensaio da viabilidade por Qtracker

Visando complementar o ensaio da viabilidade por MTS, realizamos também a análise da viabilidade das células encapsuladas nos géis de carragenana nativo e comercial através do uso do traçador celular Qtracker®. A análise da viabilidade celular mostrou a presença de células viáveis no segundo dia de cultivo em ambos os hidrogéis avaliados (Figura 22A, E). Constatamos também que em ambas as condições, a quantidade de células viáveis aumentou consideravelmente no oitavo dia de cultivo, indicando um provável aumento da proliferação celular (Figura 22B, F).

Por outro lado, no décimo terceiro dia de cultivo observamos poucas células marcadas com o traçador celular, sendo esta marcação extremamente fraca e de difícil visualização (Figura 22C, G). Os resultados obtidos com a análise da viabilidade pelo traçador Qtracker corroboram com os resultados encontrados pelo ensaio de viabilidade por MTS, pois ambos os testes indicam um aumento acentuado da viabilidade no sétimo e oitavo dia de cultivo seguido por uma queda na viabilidade observada entre o décimo terceiro e décimo quarto dia de cultivo.



**Figura 22. Análise da viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa e comercial através do ensaio pelo marcador Qtracker®.** Fotografia representativa de microscopia confocal da máxima projeção (sobreposição) do eixo Z, mostrando a viabilidade das CTMDH encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa e comercial. (A, B e C) Células encapsuladas em hidrogel de carragenana nativa, marcadas positivamente para o traçador Qtracker nos dias 2, 8 e 13 da cultura. (E, F e G) células encapsuladas em hidrogel de carragenana comercial, marcadas positivamente para o traçador Qtracker nos dias 2, 8 e 13 da cultura. (D, H) Representa a mesma situação da figura (C e G), porém com a coloração do décimo terceiro dia acentuada artificialmente para evidenciar a marcação positiva das células. Setas em branco destacam células fracamente marcadas (C, G) e artificialmente acentuadas (D, H) pelo traçador no décimo terceiro dia de cultivo.

### 3.4 DISCUSSÃO

O encapsulamento de células em *scaffolds* tridimensionais representa uma estratégia promissora que vem sendo cada vez mais estudada para aplicação em terapias clínicas e na engenharia de tecidos. Esse sistema tridimensional caracteriza-se por ser o modelo que melhor consegue mimetizar o comportamento das células *in vivo* (GOREN *et al.*, 2010). Além disso, ele pode servir como uma fonte contínua de fatores e produtos terapêuticos a serem liberados no local do tratamento, uma vez que as células são capazes de produzir e secretar fatores (MURUA *et al.*, 2008).

A estratégia de encapsular células oferece inúmeras vantagens incluindo, o emprego frequente como sistema de injeção, onde as células suspensas em uma solução viscosa conseguem ser entregues ao sítio de interesse *in vivo* não necessitando de procedimentos de cola e sutura. Outra vantagem que merece ser destacada está relacionada à capacidade do sistema em proteger as células encapsuladas dos componentes do sistema imune, evitando assim reações de rejeição no local do tratamento (NICODEMUS; BRYANT, 2008). Nesse sentido, a tecnologia de encapsular células tem sido utilizada como tratamento terapêutico de doenças que estão intimamente relacionadas a deficiências metabólicas ou de função secretora das células (MURUA *et al.*, 2008). O transplante das ilhotas pancreáticas encapsuladas para o tratamento de *Diabetes mellitus* têm sido uma das aplicações mais comuns dentro desta tecnologia, sendo reportado diversos estudos que apresentam resultados animadores (CALAFIORE *et al.*, 2006a; CALAFIORE *et al.*, 2006b). Esta tecnologia também tem sido bastante estudada para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson's (EMERICH *et al.*, 2006; SAJADI *et al.*, 2006; YASUHARA; DATE, 2007).

A utilização de hidrogéis para o encapsulamento de células tem se tornado uma prática comum dentro dessa tecnologia, uma vez que estes biomateriais possuem a habilidade de formar redes tridimensionais altamente hidratadas, propiciando assim, um ambiente favorável para o crescimento, proliferação e sobrevivência das células (PEREIRA *et al.*, 2011). Embora estudos iniciais tenham demonstrado resultados promissores e atrativos para o crescimento e manutenção das células em hidrogéis, é importante ter em mente que apenas o tipo de biomaterial não é suficiente para proporcionar um adequado sistema de cultivo. Parâmetros como: processo de gelificação, propriedades mecânicas e taxa de degradação devem ser cuidadosamente monitorados a fim de se

obter um sistema funcional para o crescimento de células e tecidos (NICODEMUS; BRYANT, 2008).

A biocompatibilidade do material é um aspecto bastante relevante para o desenvolvimento de modelos que visem aplicações terapêuticas e utilização na engenharia de tecidos. Estudos têm demonstrado que a aquisição de materiais com biocompatibilidade adequada requer um mínimo de etapas de purificação, uma vez que por este processo, contaminantes residuais conseguem ser eliminados (ZIMMERMANN *et al.*, 1992; KLOCK *et al.*, 1997; ORIVE *et al.*, 2002). Em vista disso realizou-se o teste de filtração do hidrogel de carragenana nativa como uma etapa adicional no seu processo de purificação. Verificou-se que a membrana de 0,8 µm apresentou o melhor resultado, pois proporcionou a eliminação de boa parte das impurezas encontradas no gel. Estudos têm demonstrado que a presença de contaminantes residuais pode afetar a biocompatibilidade dos materiais (OTTERLEI *et al.*, 1991; COLE *et al.*, 1992; DE VOS *et al.*, 1999). O hidrogel de alginato é um exemplo de biomaterial que vem apresentando biocompatibilidade inadequada e inconsistente entre os seus estudos, devido à presença de impurezas e contaminantes (TAM *et al.*, 2006). Para o hidrogel de carragenana nativa este aspecto pode ser considerado um ponto preocupante, pois a produção do seu pó é realizada de forma artesanal o que contribui para a presença de resíduos e impurezas no produto final. Logo, a eliminação das impurezas contidas no gel de carragenana foi de suma importância para evitar problemas futuros com a biocompatibilidade do material.

Segundo Ling (2007), para o correto encapsulamento das células no gel, estas devem ser embebidas no hidrogel através da sua suspensão em um hidrogel precursor líquido, seguido pela ligação das cadeias poliméricas e polimerização da rede formada. O tempo de incorporação das células no hidrogel ainda em seu estado líquido é um aspecto crucial para permitir a adequada mistura e homogeneização destas no interior do mesmo (NICODEMUS; BRYANT, 2008). Nossos resultados mostraram que o tempo de até um minuto após a deposição do gel foi considerado o tempo ideal para permitir a correta incorporação e mistura das células. Segundo Nicodemus & Bryant (2008) a necessidade de controlar as etapas do encapsulamento é fundamental para criar ambientes estruturalmente e bioquimicamente mais semelhantes com o microambiente natural. Nossos resultados vão ao encontro dos achados citados acima, pois eles demonstraram que no tempo de até 1 minuto, as células conseguiram interagir com os hidrogéis, apresentando-se uniformemente distribuídas pela rede tridimensional, criando assim, um microambiente mais próximo do natural.

A gelificação refere-se ao processo de ligação das cadeias poliméricas para a formação de redes de polímeros ramificadas e interligadas durante o resfriamento da solução. A continuação da ligação das cadeias poliméricas resulta na formação de uma extensa rede altamente interconectada e interligada que apresenta baixa solubilidade e boa estabilidade (GURLEZ *et al.*, 2011). O processo de formação do gel é uma etapa crucial para o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional adequada e a consequente formação de um gel estável e íntegro (NICODEMUS; BRYANT, 2008; SELIMOVIC *et al.*, 2012). A análise dos resultados mostrou que o tempo de 20 minutos foi satisfatório para permitir a completa e adequada polimerização dos géis de carragenana. Isso indica que os hidrogéis de carragenana conseguiram em um tempo hábil formar géis estáveis e íntegros que podem ser utilizados para a tecnologia de encapsular células.

A biodegradabilidade é uma característica marcante dos hidrogéis, pois refere-se à capacidade que o biomaterial tem de se degradar com o tempo (CUSHING; ANSETH, 2007). Esta característica reflete na durabilidade do hidrogel, seja em um cultivo *in vitro* ou em uma aplicação *in vivo*. A durabilidade do biomaterial é um aspecto bastante crítico, pois ao mesmo tempo em que este precisa ser durável a ponto de permitir o crescimento, proliferação e expansão das células, ele também deve possibilitar a sua degradação para dar origem ao novo tecido que está sendo formado (MANN, 2003). Considerando este aspecto, avaliamos a durabilidade máxima que os hidrogéis de carragenanas teriam em cultura.

Constatou-se que o tempo de duração máxima foi de 8 dias para ambos os géis, pois a partir do nono dia os mesmos começaram a se degradar, tornando-se cada vez mais líquidos. Segundo Nicodemus & Bryant (2008) hidrogéis biodegradáveis formados via ligações iônicas ou físicas podem sofrer quebras na sua estrutura em função do mecanismo de reversão do processo de gelificação. Diversos fatores influenciam a degradação do hidrogel, incluindo, o número de ligações degradáveis, as propriedades químicas, a presença de células e o microambiente externo. Martes e colaboradores (2003) demonstraram que a taxa de degradação de hidrogéis formados a partir do ácido polilático (PLLA) aumentou significativamente quando estes foram cultivados em meio de cultura celular comparativamente ao cultivo em tampão fosfato salina (PBS). Este estudo prévio demonstrou que a complexa mistura de proteínas presente no soro, incluindo a albumina, foi responsável por aumentar a taxa de degradação do hidrogel. Em vista disso, é plausível sugerir que a presença das células e do meio de cultura

tenham sido os fatores responsáveis pela curta durabilidade dos hidrogéis de carragenanas em cultura.

Tendo em vista a baixa durabilidade dos hidrogéis em cultura, testou-se o emprego do sal KCl em diferentes tempos e concentrações, a fim de se avaliar a interferência do sal na formação de géis mais estáveis e resistentes. Nossos resultados mostraram que o KCl na concentração de 5% e com 10 minutos de exposição demonstrou ser a condição que mais aumentou a durabilidade dos géis em cultura. Segundo Collén e colaboradores (2009), as propriedades conformacionais e de associação das cadeias poliméricas durante o processo de gelificação, são fortemente dependentes da natureza dos sais e da força iônica do meio. Sais de potássio são considerados essenciais para que o hidrogel de carragenana forme géis estáveis e rígidos. Além disso, à medida que o nível de potássio aumenta a estrutura do gel torna-se altamente agregada e firme (POPA; GOMES; REIS, 2011). Dentro desse contexto, o trabalho de Santo e colaboradores (2009) demonstrou que a concentração do KCl, bem como, o tempo de contato, foram cruciais para aumentar a durabilidade dos hidrogéis de carragenana em cultura. Nossos resultados foram consistentes com o trabalho citado acima, pois conseguimos demonstrar que a concentração do sal e o tempo de contato foram capazes de aumentar a durabilidade dos géis para 15 dias em cultura. A longa duração e estabilidade dos biomateriais sob condições de cultivo, é um requerimento importante para possibilitar a sua utilização *in vivo* e conseqüente aplicação para tratamentos terapêuticos e engenharia de tecidos (SHOICHET *et al.*, 1995).

Os hidrogéis são caracterizados pela presença de uma rede dinâmica tridimensional formada pela ligação de cadeias de polímeros. Essa estrutura tridimensional reflete a presença de uma rede fibrosa com diversos poros interconectados (NGUYEN, WEST, 2002; SLAUGHTER *et al.*, 2009). O trabalho de Rocha e colaboradores (2011) mostrou que o hidrogel de carragenana era formado por uma extensa rede porosa altamente interconectada. Em nossos resultados, esta estrutura foi ilustrada através de micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 16), demonstrando que os nossos dados corroboram os achados de Rocha e colaboradores (2011). As micrografias revelaram a presença de uma estrutura bastante porosa para ambos os hidrogéis de carragenana. No entanto, na carragenana nativa observou-se a presença de uma estrutura em forma de rede fibrosa, enquanto que na carragenana comercial a estrutura se assemelhou a uma matriz porosa. É válido ressaltar que essas diferenças observadas entre a microestrutura das carragenanas nativa e comercial são devidas as

diferenças na origem e protocolo de processo e purificação. Além disso, artefatos oriundos da técnica de MEV também podem ter contribuído para gerar as diferenças e portanto, novas análises precisam ser realizadas. Segundo Nguyen & West (2002), a presença de uma rede fibrosa com poros interconectados é crucial para um bom transporte de fatores solúveis, oxigênio, nutrientes e resíduos, proporcionando condições favoráveis para o crescimento e sobrevivência das células. Sendo assim, a estrutura encontrada em nossos biomateriais de carragenanas reflete um comportamento intrínseco dos hidrogéis, apresentando boa estrutura 3D para a manutenção e sobrevivência das células.

Quando se trata de engenharia de tecidos e cultivo tridimensional, um dos aspectos mais importantes a ser considerado é a técnica de cultivo a ser utilizada. Uma técnica bem sucedida permite com que as células fiquem uniformemente distribuídas por todo o biomaterial, mimetizando assim características do microambiente nativo (ANDERSSON *et al.*, 2010). Uma das características e vantagens da técnica do encapsulamento reside no fato de as células apresentarem-se homogeneamente distribuídas pelo gel e por conseguirem ficar próximas umas das outras, facilitando o contato célula-célula (LING, 2007). Nossos resultados mostraram que em ambos os hidrogéis as células distribuíram-se de maneira uniforme e homogênea (Figura 17). Estudos prévios utilizando a técnica do encapsulamento com hidrogel de carragenana ou mesmo com outros tipos de hidrogéis, também demonstraram que as células apresentam-se uniformemente distribuídas por todo o biomaterial (BARUCH; MACHLUF, 2006; POPA; GOMES; REIS, 2011; ROCHA *et al.*, 2011; POPA; REIS; GOMES, 2012).

Com relação à análise morfológica, constatou-se que em ambos os hidrogéis as células apresentaram morfologia arredondada (Figura 17 e 18). Verificamos também que as células não conseguiram interagir com os hidrogéis de carragenana. Este aspecto pode ser facilmente observado pela morfologia tipicamente arredondada e pela ausência de extensões e prolongamentos citoplasmáticos. É válido ressaltar que em algumas células foi possível observar a presença de extensões citoplasmáticas, evidenciando o início de estabelecimento de contato com o hidrogel (Figura 19). De acordo com Birgers-Dotter e colaboradores (2005) o ambiente extracelular é capaz de orquestrar uma cascata de sinais intracelulares que governam o destino fenotípico e o comportamento celular, incluindo morfologia, migração, adesão e proliferação. As células são capazes de sentir o ambiente que as circunda através de sinais mecânicos, os quais conseguem ser traduzidos

em alterações intracelulares bioquímicas e de expressão gênica (WANG; TYTELL; INGBER, 2009). Além dos sinais mecânicos sentidos pelas células, estas também são capazes de gerar uma força tensora sobre o substrato a que estão sendo cultivadas. Essa força consegue governar a adesão e morfologia das células, e dependendo do tipo de substrato (maleável ou rígido), o comportamento celular será distinto. A morfologia arredondada observada em nossos resultados pode ser explicada através da comunicação entre as células e o microambiente, onde os sinais mecânicos e a força tensora exercida pelas células podem estar contribuindo para o direcionamento da morfologia celular. Além deste aspecto, é importante considerar que o hidrogel de carragenana é caracterizado por ser um colóide hidrofílico, altamente hidratado e com caráter iônico, possuindo alto teor de radicais  $\text{OSO}_3^-$  (HAYASHI, 2001). Portanto, o caráter francamente iônico aliado à estrutura hidratada, podem prejudicar a interação das células com o gel, contribuindo assim à morfologia arredondada.

É de suma importância ressaltar que a presença da morfologia arredondada é considerada um requerimento essencial e bastante importante para permitir o desenvolvimento e formação de determinados fenótipos, como o cartilaginoso. Atualmente, diversos estudos têm reportado a utilização de hidrogéis (carragenana, quitosana e alginato) associados à CTs adultas para o desenvolvimento de modelos 3D que visem estimular a formação de condrócitos e o posterior desenvolvimento de cartilagem (LI; ZHANG, 2005; ROCHA *et al.*, 2011; POPA; REIS; GOMES, 2012).

Fundamentalmente, biomateriais a serem utilizados para cultivar células *in vitro*, devem ser biocompatíveis; capazes de fornecer um ambiente que favoreça a interação, proliferação e diferenciação e uma matriz permeável que permita a difusão de nutrientes, fatores e metabólitos (SERPOOSHAN *et al.*, 2010). Uma técnica bem sucedida permite que as células sejam plaqueadas adequadamente no biomaterial, fazendo com que elas fiquem bem acomodadas no ambiente em que estão sendo cultivadas (ANDERSSON *et al.*, 2010). Tanto o tipo de biomaterial como a técnica empregada apresentam influência direta no comportamento e nas funções celulares. A avaliação desses parâmetros é de suma importância para predizer a funcionalidade do sistema, sendo indicativo da qualidade do biomaterial e da técnica empregada (GOREN *et al.*, 2010). Nesse contexto, diversos trabalhos utilizando a técnica de encapsular CTs em hidrogéis de carragenana têm demonstrado resultados bastante satisfatórios para o emprego deste modelo em terapias clínicas e na engenharia de tecidos (SANTO *et al.*, 2009;

ROCHA *et al.*, 2011; POPA; GOMES; REIS, 2011; POPA; REIS; GOMES, 2012).

O ensaio de viabilidade por MTS e Qtracker mostrou que para ambos os hidrogéis a viabilidade celular foi maior no sétimo e oitavo dia em comparação ao primeiro dia, demonstrando que houve um aumento na viabilidade nos oito primeiros dias de cultivo. No entanto, uma redução nos valores da variável em estudo foi detectada no décimo terceiro e décimo quarto dia de cultivo (Figuras 21 e 22). Estes resultados corroboram os trabalhos de Rocha e colaboradores (2011) e de Popas e colaboradores (2011 e 2012), os quais também demonstraram que a viabilidade das células encapsuladas em hidrogéis de carragenana decai ao longo do tempo de cultivo. Esta queda na viabilidade poder ser explicada devido à degradação do hidrogel em cultura, a qual de fato é mais propícia à acontecer nos dias mais tardios da cultura celular (POPA; REIS; GOMES, 2012).

Além disso, estudos têm reportado que os íons necessários para a formação do hidrogel podem influenciar a viabilidade e proliferação celular e que baixas concentrações dos íons resultam em aumento da viabilidade celular (ADAMS *et al.*, 2001; POPA; GOMES; REIS, 2012). O emprego de fatores de crescimento incluindo, EGF, FGF, IGF-I, PDGF e TGF- $\beta$ 1 no sistema de encapsulamento, pode auxiliar no aumento da viabilidade e sobrevida das células. O estudo de Rocha e colaboradores (2011) demonstrou que quando o fator TGF- $\beta$ 1 foi adicionado ao sistema de encapsulamento de CTs derivadas de tecido adiposo em hidrogel de carragenana, a viabilidade celular aumentou consideravelmente em comparação com a condição controle (sem TGF- $\beta$ 1). Estes resultados sugerem que a presença do fator TGF- $\beta$ 1 foi capaz de contribuir para o aumento do número de células viáveis, indicando que o emprego deste e de outros fatores possa auxiliar na capacidade de sobrevivência das células.

No contexto de engenharia de tecidos e aplicações clínicas, uma característica bastante importante está relacionada ao custo de produção do biomaterial a ser utilizado. Fundamentalmente os biomateriais empregados nesta área, devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, mas também devem apresentar baixo custo de produção e venda de modo a viabilizar o seu emprego. Nesse sentido, neste trabalho foram comparados o desempenho da carragenana nativa e comercial com relação ao potencial do hidrogel em sustentar um ambiente 3D favorável e propício ao cultivo das CTMDH. A carragenana nativa é obtida a partir da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii*, a qual está sendo cultivada na região de Sambaqui em Florianópolis. Esta está sendo

isolada no laboratório de Algas Marinhas em projeto coordenado pela Professora Dra. Leila Hayashi, sendo, portanto, um produto de fácil acesso, disponibilizado por pesquisadores da UFSC. O estabelecimento de um modelo 3D para o cultivo de CTs em hidrogel de carragenana nativa poderá significar uma importante inovação tecnológica para o Estado de Santa Catarina, podendo trazer importantes repercussões a nível nacional e internacional. Ademais, este sistema 3D funcional poderá ser utilizado para ensaios pré-clínicos em animais e se for bem sucedido, poderá representar um potencial biomaterial para aplicações terapêuticas e na engenharia de tecidos. Já a carragenana comercial, a qual é amplamente utilizada nas pesquisas, é produzida pela empresa Sigma-Aldrich EUA, possuindo, portanto, um custo de produção e venda bastante elevado, o que provavelmente inviabilizaria o seu emprego para aplicações terapêuticas e na engenharia de tecidos. Nossos resultados mostraram que em todos os parâmetros avaliados não houve diferença significativa entre a carragenana nativa e a comercial, indicando que o hidrogel de carragenana nativa possui tanto potencial quanto o comercial para sustentar a manutenção e crescimento das CTMDH *in vitro*.

### 3.5 CONCLUSÕES

- A técnica de encapsulamento das CTMDH foi devidamente padronizada, permitindo assim o desenvolvimento de um modelo 3D para o cultivo de CTMDH em hidrogéis de carragenanas;
- Os hidrogéis de carragenanas nativa e comercial apresentaram uma microestrutura altamente interconectada e porosa, capaz de formar um ambiente tridimensional para o cultivo de células;
- As CTMDH encapsuladas apresentaram morfologia arredondada e pouca capacidade de interação e adesão com os hidrogéis de carragenanas;
- Para ambos os hidrogéis, a viabilidade celular se mostrou maior nos oito primeiros dias de cultivo, diminuindo consideravelmente no décimo quarto dia do cultivo;
- Os hidrogéis de carragenana nativa e comercial apresentaram comportamento bastante semelhante em todos os parâmetros avaliados, demonstrando que o hidrogel de carragenana nativa tem tanto potencial quanto o hidrogel comercial para ser empregado no cultivo de células e na engenharia de tecidos;
- O desenvolvimento de novos estudos envolvendo a cultura de células em hidrogel de carragenana será de suma importância para compreender melhor a interação deste biomaterial com as células, bem como o comportamento e as funções celulares desempenhadas *in vitro*.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. S; MANSFIELD, K; PERLOT, R. L; SHAPIRO, I. M. J. **Biol. Chem**, v. 276, p. 20316–20322, 2001.

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

ALTIOK, D; ALTIOK, E; TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications". **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, p. 2227–36, 2010.

AL-NBAHEEN, M; VISHNUBALAJI, R; ALI, D; BOUSLIMI, A; AL-JASSIR, F; MEGGES, M; PRIGIONE, A; ADJAYE, J; KASSEM, M; ALDAHMAH, A. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. **Stem Cell Rev Rep**, 2012.

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.

ANDRADE, J.M.; Quantitation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -carrageenans by midinfrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v.480, p.23-37, 2003.

ANKER, P.S; SCHERION, S.A; KLEIJBURG-VAN, K.C. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v.102, p. 1548 –1549, 2000.

ARTHUR, A; RYCHKOV, G; SHI, S; KOBLAR, S. A; GRONTHOS, S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. **Stem Cells**, v. 26, p. 1787–1795, 2008.

ASHTON, B. A. *et al.* Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers *in vivo*. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 151, p. 294–307, 1980.

ATLASI, Y; MOWLA, S.J; ZIAEE, S.A; GOKHALE, P.J; ANDREWS, P.W. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and non-pluripotent cells. **Stem Cells**, v. 12, p. 3068–3074, 2008.

BARUCH, L; MACHLUF, M. Alginate–Chitosan Complex Coacervation for Cell Encapsulation: Effect on Mechanical Properties and on Long-Term Viability. **Biopolymers**, v. 82, p. 570–579, 2006.

BERTANI N. *et al.* Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. **Journal of cell Science**, v. 118, p. 3925–3936, 2005.

BEZ, A; CORSINI, E; CURTI, D; BIGGIOGERA, M; COLOMBO, A; NICOSIA, R. F; PAGANO, S. F; PARATI, E. A. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. **Brain Research**, v. 993, p. 18–29, 2003.

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.

BIRGERSDOTTER, A; SANDBERG, R; ERNBERG, I. Gene expression perturbation in vitro—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. **Semin Cancer Biol**, v. 15, p. 405–412, 2005.

BIXLER, H.L; PORSE, H. A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. **J. Appl. Phycol**, v. 23, p. 321–335, 2011.

BLANPAIN, C; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 339–373, 2006.

BURDICK, J; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Review: Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. **Tissue Eng A**. [Epub ahead of print]

CALAFIORE, R; BASTA, G; LUCA, G; LEMMI, A; RACANICCHI, L; MANCUSO, F; MONTANUCCI, M. P; BRUNETTI, P; Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with Type 1 diabetes mellitus. **Transplant. Proc.**, v. 38, p. 1156–1157, 2006a.

CALAFIORE, R; BASTA, G; LUCA, G; LEMMI, A; MONTANUCCI, M. P; CALABRESE, G; RACANICCHI, L; MANCUSO, F; BRUNETTI, P. Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases. **Diabetes Care**, v. 29, p. 137–138, 2006b.

CALONDER, C; MATTHEW, H. W. T; VAN TASSEL, P. R. Adsorbed layers of oriented fibronectin: a strategy to control cell–surface interactions. **J. Biomed. Mater. Res. A**, v. 75, p. 316–323, 2005.

CAMPAGNOLI, C; ROBERTS, I.A; KUMAR, S. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, p. 2396–3402, 2001.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D.F.; SILVA, D.B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.167-180, 2009.

CAMPOS, L. S. Neurospheres: Insights Into Neural Stem Cell Biology. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, p. 761–769, 2004.

CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, p. 641-650, 1991.

COLE, D. R; WATERFALL, M; MCINTYRE, M; BAIRD, J. D. Microencapsulated islet grafts in the BB/E rat: a possible role for cytokines in graft failure. **Diabetologia**, v. 35, p. 231–7, 1992.

COLE, M.F; JOHNSTONE, S.E; NEWMAN, J.J; KAGEY, M.H; YOUNG, R.A. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. **Genes dev**, v. 22, p. 746–755, 2008.

COLLE'N, P.N; LEMOINE, M; DANIELLOU, R; GUE'GAN, J.P; PAOLETTI, S; HELBERT, W. Enzymatic Degradation of K-

Carrageenan in Aqueous Solution. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1757-1767, 2009.

CONNELLY, J.T; GARCÍA, A.J; LEVENSTON, M.E. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels. **Biomaterials**, v. 28, p. 1071-1083, 2007.

CRIGLER, L; KAZHANIEI, A; YOON, T; ZAKHARI, J; ANDERS, J; TAYLOR, B; VICTORIA, M. Virador Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **FASEB. J**, v. 21, p. 2050–2063, 2007.

CUKIERMAN, E; PANKOV, R; YAMADA, K, M. Cell interactions with three-dimensional matrices. **Cell Biology**, v. 14, p. 633-639, 2002.

CUSHING, M.C; ANSETH, K.S. Hydrogel cell cultures. **Materials Science**, v. 316, p. 1133-1134, 2007.

DAWSON, E; MAPILI, G; ERICKSON, K; TAQVI, S; ROY, K. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 215–228, 2008.

DE VOS, P; VAN STRAATEN, J. F; NIEUWENHUIZEN, A. G; DE GROOT, M; PLOEG, R. J; DE HAAN, B. J; VAN SCHILFGAARDE, R. Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth? **Diabetes**, v. 48, p. 1381–8, 1999.

D'IPPOLITO, G; DIABIRA, S; HOWARD, G.A; MENEI, P; ROOS, B.A; SCHILLER, P.C. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential, **J. Cell Sci**, v. 117, p. 2971–2981, 2004.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, 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.

EMERICH, D. F; THANOS, C. G; GODDARD, M; SKINNER, S. J. M; GEANY, M. S; BELL, W. J; BINTZ, B; SCHNEIDER, P; CHU, Y; BABU, R. S; BORLONGAN, C. V; BOEKELHEIDE, K; HALL, S; BRYANT, B; KORDOWER, J. H; Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. **Neurobiol. Dis**, v. 23, p. 471–480, 2006.

ENTCHEVA, E; BIEN, H; YIN, L. H; CHUNG, C. Y; FARRELL, M; KOSTOV, Y. Functional cardiac cell constructs on cellulose-based scaffolding. **Biomaterials**, v. 25, p. 5753–5762, 2004.

ERICES, A; CONGET, P; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v. 109, p. 235–242, 2000.

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.

FAIRBANKS, D. J; MAUGHAN, P. J. Evolution of the *NANOG* pseudogene family in the human and chimpanzee genomes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 6, p. 1-9, 2006.

FAN, C.G; TANG, F.W; ZHANG, Q.J. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. **Cell Transplant**, v. 14, p. 311–321, 2005.

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.

FRANCIS, S; KUMAR, M; VARSHNEY, L. Radiation synthesis of superabsorbent poly(acrylic acid)-carrageenan hydrogels, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 69, p. 481- 486, 2004.

FREIER, T; KOH, H.S; KAZAZIAN, K; SHOICHET, M. S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation. **Biomaterials**, v. 26, p. 5872–5878, 2005.

FRIEDENSTEIN, A. J; PETRAKOVA, K. V; KUROLESOVA, A. I; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p. 230-247, 1968.

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

FRIEDENSTEIN, A. J; DERIGLASOVA, U. F; KULAGINA, N. N; PANASUK, A. F; RUDAKOWA, S. F; LURIA, E. A; RUDAKOW, I. A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol**, v. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J; GORSKAJA, J. F; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, p. 267-674, 1976.

FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal-hematopoietic interrelationships: Maximov's ideas and modern models. *Haematol. Blood Transfus*, v. 32, p. 159-167, 1989.

FRIEDENSTEIN, A.J. Osteogenic stem cells in bone marrow. In *Bone and Mineral Research*, J.N.M. Heersche and J.A. Kanis, eds. **Elsevier**, p. 243-272, 1990.

GLAUCHE, I; MOORE, K; THIELECKE, L; HORN, K; LOEFFLER, M; ROEDER, I. Stem Cell Proliferation and Quiescence—Two Sides of the Same Coin. *PLOS Computational Biology*, n. 5, v. 7, p. 1-10, 2009.

GODIER, A.F.G; MAROLT, D; GERECHT, S; TAJNSEK, U; MARTENS, T.P; VUNJAK-NOVAKOVIC; G. Engineered microenvironments for human stem cells. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 84, p. 335-347, 2008.

GOODWIN, H.S. *et al.* Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. **Biol Blood Marrow Transplant.**, 7(11):581-8, 2001.

GOREN, A; DAHAN, N; GOREN, E; BARUCH, L; MACHLUF, M. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoinmunogenic platform for long-term cellular therapy. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 22-31, 2010.

GRENHA, A; GOMES, M.E; RODRIGUES, M; SANTO, V.E; MANO J.F; NEVES, N.M; REIS, R.L. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. **J. Biomedical Materials Research**, p. 1265-1272, 2009.

GRENHA, A; GOMES, M.E; RODRIGUES, M; SANTO, V.E; MANO, J.F; NEVES, N.M; REIS, R.L. Development of New Chitosan/Carrageenan Nanoparticles for drug delivery applications. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 92, p. 1265-1272, 2010.

GRONTHOS, S; MANKANI, M; BRAHIM, J. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, p. 13625–13630, 2000.

GUILLOT, P.V; GOTHERSTROM, C; CHAN, J; KURATA, H; FISK, N.M, Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC, **Stem Cells**, v. 25, p. 646–654, 2007.

GULREZ, S.K.H; AL-ASSAF, S; PHILLIPS, G.O. **Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications**. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications Edited by Prof. Angelo Carpi, 2011.

HAYASHI, L. Extração, teor e propriedades da carragenana de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva, em cultivo experimental em Ubatuba, SP. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

HAYASHI, L. Contribuição à maricultura da alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) para produção de carragenana. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

HAYNESWORTH, S.E; GOSHIMA, J; GOLBER, V.M; CAPLAN, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. **Bone**, v. 13, p. 81–88, 1992.

HERRERA, M.B; BRUNO, S; BUTTIGLIERI, S; TETTA, C; GATTI, S; DEREGIBUS, M.C; BUSSOLATI, B; CAMUSSI, G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. **Stem Cells**, v. 24, p. 2840-2850, 2006.

HILLIOU, L.; LAROTONDA, F.D.S.; ABREU, P.; RAMOS, A.M.; SERENO, A.M.; GONÇALVES, M.P. Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. **Biomolecular Engineering**, v.23, p.201-208, 2006.

HUBBELL, J. A. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. **Curr. Opin. Biotechnol**, v. 14, p. 551–558, 2003.

ILANCHERAN, S; MICHALSKA, A; PEH, G; WALLACE, E.M; PERA, M; MANUELPILLAI, U. Stem cells derived from human fetal membranes display multi-lineage differentiation potential, **Biol. Reprod**, v. 77, p. 577–588, 2007.

INT ANKER, P. S. SHERJON, S. A; KLEIJBURG-VAN, D. C; NOORT, W. A; CLASS, F. H; WILLEMZE, R; FIBBE, W. E. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v. 102, p. 1548-1549, 2003.

IZADPANAH, R; TRYGG, C; PATEL, B; KRIEDT, C; DUFOUR, J; GIMBLE, J. M; BUNNELL, B. A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J Cell Biochem**, v. 99, p. 1285–1297, 2006.

JIANG, Y; JAHAGIRDAR, B.N; REINHARDT, R.L; SCHWARTZ, R.E; KEENE, C.D; ORTIZGONZALEZ, X.R, REYES, M; LENVIK, T; LUND, T; BLACKSTAD, M; DU, J; ALDRICH, S; LISBERG, A; LOW, W.C; LARGAESPADA, D.A; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11<sup>a</sup>ed, 2012.

KHETAN, S; BURDICK, J. Cellular encapsulation in 3D hydrogels for tissue engineering. **J. Vis. Exp.**, v. 32, p. 1-5, 2009.

KLOCK, G; PFEFFERMANN, A; RYSER, C; GROHN, P; KUTTLER, B; HAHN, H. J; ZIMMERMANN, U. Biocompatibility of mannuronic acid-rich alginates. **Biomaterials**, v. 18, p. 707–13, 1997.

KOTLARCHYK, M.A; BOTVINICK, E.L; PUTNAM, A.J. Characterization of hydrogel microstructure using laser tweezers particle tracking and confocal reflection imaging. **J. Phys**, v. 22, p. 1-11, 2010.

KUNTER, U; RONG, S; DJURIC, Z. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol**, v.17, p. 2202–2212, 2006.

KURODAA, Y; KITADAA, M; WAKAOA, S; NISHIKAWAB, K; TANIMURAA, Y; MAKINOSHIMAA, H; GODAC, M; AKASHIA, H; INUTSUKAB, A; NIWAD, A; SHIGEMOTOA, T; NABESHIMAE, Y; NAKAHATAD, T; NABESHIMAE, Y; FUJIYOSHIB, Y; DEZAWAA, M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **PNAS**, v. 107, p. 8639-8643, 2010.

KUZNETSOV, S.A; MANKANI, M.H; GRONTHOS, S. Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol**, v. 153, p.1133–1140, 2001.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.173-184, 2001.

LEE, R. H; SEO, M.J; REGER, R.L. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 103, p. 17438 –17443, 2006.

LEE, S; CHU, K; JUNG, K; SONG, Y; JEON, D; KIM, S. D; KIM, M; LEE, S. K; ROH, J. Direct Generation of Neurosphere-Like Cells from Human Dermal Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 6, p. 1-8, 2011.

LEVENBERG, S; HUANG, N. F; LAVIK, E; ROGERS, A. B; ITSKOVITZ-ELDOR, J; LANGER, R. Differentiation of human

embryonic stem cells on threedimensional polymer scaffolds. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 12741–12746, 2003.

LEVY, V; LINDON, C; ZHENG, Y; HARFE, B.D; MORGAN, B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. **Fate conversion in keratinocytes**, v. 21, p. 1358-1366, 2007.

LI, Z; RAMAY, H.R; HAUCH, K.D; XIAO, D; ZHANG, M. Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, p. 3919-3928, 2005.

LI, Z; ZHANG, M. Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. **Wiley Interscience**, p. 485-493, 2005.

LING, Y. Hydrogel cell encapsulation for tissue engineering. **Dissertação (Master of Science in Electrical Engineering and Computer Science)** - Massachusetts Institute of Technology, USA, 2007.

LORENZ, K; SICKER, M; SCHMELZER, E; RUPF, T; SALVETTER, J; SCHULZ-SIEGMUND, M; BADER, A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. **Exp Dermatol**, v. 17, p. 925–932, 2008.

LURIA, E. A; OWEN, M. E; FRIEDENSTEIN, A. J; MORRIS, J. F; KUZNETSOW, S. A. Bone formation in organ cultures of bone marrow. **Cell Tissue Res**, v. 248, p. 449-454, 1987.

MAKINO, S. *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. **J. Clin. Invest**, v. 103, p. 697–705, 1999.

MANN, B.K. Biologic gels in tissue engineering. **Clin. Plastic. Surg**, v. 30, p. 601-609, 2003.

MANO, J.F; SILVA, G.A; AZEVEDO, H.S; MALAFAYA, P.B; NEVES, N.M; REIS, R.L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. **J.R. Soc. Interface**, v. 4, p. 999-1030, 2007.

MARTIN, B.C; MINNER, E.J; WISEMAN, S.L; KLANK, R.L; GILBERT, R.J. Agarose and methylcellulose hydrogel blends for nerve regeneration applications. **J. Neural. Eng.**, v. 5, p. 221-231, 2008.

MEIRELLES, L.S; CHAGASTELLES, P.C; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 199, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELLES, L. S; 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.

MUNOZ, J.R; STOUTENGER, B.R; ROBINSON, A.P. Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, p. 18171–18176, 2005.

MURAGLIA A; CANCEDDA R; QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **J Cell Sci**, v. 113, p.1161–1166, 2000.

MURUA A; PORTERO A; ORIVE G; HERNÁNDEZ, R.M, DE CASTRO, M; PEDRAZ, J.L. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. **J Control Release**, v. 132, p. 76–83, 2008.

NARDI, N.B; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Springer**, v. 174, p. 249-282, 2006.

NICODEMUS, G.D; BRYANT, S.J. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. **Tissue Engineering**, v. 14, p. 149-165, 2008.

NOMBELA-ARRIETA, C; RITZ, J; SILBERSTEIN, L.E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature**, v. 12, p. 126-131, 2011.

NGUYEN, K. T; WEST, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. **Biomaterials**, v. 23, p. 4307-14, 2002.

ORTIZ, L.A; GAMBELLI, F; MCBRIDE, C. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, p. 8407–8411, 2003.

ORTIZ, L.A; DUTREIL, M; FATTMAN, C. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and anti-fibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, p. 11002–11007, 2007.

ORIVE, G; PONCE, S; HERNANDEZ, R. M; GASCON, A. R; IGARTUA, M; PEDRAZ, J. L. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. **Biomaterials**, v. 23, p. 3825–31, 2002.

OSWALD, J. *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells *in vitro*. **Stem Cells**, v. 22, p.377–384, 2004.

OTTERLEI, M; OSTGAARD, K; SKJAK-BRAEK, G; SMIDSRØD, O; SOON-SHIONG, P; ESPEVIK, T. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. **J Immunother**, v. 10, p. 286–91, 1991.

OWEN, M; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp**, v. 136, p. 42-60, 1988.

PAIN, D; CHIRN, G.W; STRASSEL, C; KEMP, D.M. Multiple retroviral genes from pluripotent cell-specific gene expression indicates a potential signature for novel gene identification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6265-6268, 2005.

PAN, G.J. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. **Cell Research**, v. 12, p. 321-329, 2002.

PEPPAS, N.A; HILT, J.Z; KHADEMHOSEINI, A; LANGER, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. **Adv Mater**, v. 18, p. 1345–1360, 2006.

PEREIRA, R.C; GENTILI, C; CANCEDDA, R; AZEVEDO, H.S; REIS, R.L. Encapsulation of human articular Chondrocytes into 3D

hydrogel: Phenotype and Genotype characterization. *3D Cell Culture: Met and Prot, Met in Mol Biology*, v. 695, p. 167-181, 2011.

PETERSEN, O.W; RONNOVJESSEN, L; HOWLETT, A.R; BISSELL, M.J. Interaction with basement-membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, v. 89, p. 9064–9068, 1992.

PHINNEY D.G; KOPEN G; RIGHTER W. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem*, v.75, p.424–436, 1999.

PHINNEY, D.G; ISAKOVA, I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des*, v. 11, p. 1255–1265, 2005.

PHINNEY, D. G; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair — current views. *Stem Cells*, v.25, p.2896–2902, 2007.

PICULLEL L. Gelling carrageenans. **In: STEPHEN A.M (ed) Food polysaccharides and their applications**, p. 205-244, 1995.

PITTENGER, M.F; MACKAY, A.M; BECK, S.C; JAISWAL, R.K; DOUGLAS, R; MOSCA, J.D; MOORMAN, M.A; SIMONETI, D.W; CRAIG, S; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-146, 1999.

POLISENO, L. Pseudogenes: Newly Discovered Players in Human Cancer. *Sci Signal*, v. 5, 2012.

POPA, E. G; GOMES, M. E; REIS, R. L Cell Delivery Systems Using Alginate–Carrageenan Hydrogel Beads and Fibers for Regenerative Medicine Applications. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 3952-3961, 2011.

POPA, E; REIS, R; GOMES, M.. Chondrogenic phenotype of different cells encapsulated in  $\kappa$ -carrageenan hydrogels for cartilage regeneration strategies. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 59, p. 132-141, 2012.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J.A.; TOJO, E; ANDRADE, J.M.; Quantitation of  $\kappa$ -,  $\lambda$ -, and  $\nu$ -carrageenans by midinfrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v.480, p.23-37, 2003.

RABANEL,M; BERTRAND, N; SANT, S; LOUATI, S; HILDGEN, P. Polysaccharide Hydrogels for the Preparation of Immunoisolated Cell Delivery Systems. **ACS Symposium Series American Chemical Society**, v. 934, p. 305–309, 2006.

RAMESH T, LEE, S.H, LEE, C.S, KWON, Y.W, HYUN-JAI CHO, H.J. Somatic cell dedifferentiation/reprogramming for regenerative medicine. **Int J Stem Cells**, v. 2, p. 18–27, 2009.

REDSHAW, Z; STRAIN, A.J. Human haematopoietic stem cells express Oct4 pseudogenes and lack the ability to initiate Oct4 promoter-driven gene expression. **Journal of Negative Results in Biomedicine**, v. 9, p. 1-8, 2010.

RIEKSTINA, U; CAKSTINA, I; PARFEJEVS, V; HOOGDUIJN, M; JANKOVSKIS, G; MUIZNIEKS, I; MUCENIECE, R; ANCANS, J. Embryonic Stem Cell Marker Expression Pattern in Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose Tissue, Heart and Dermis. **Stem Cell Rev and Rep**, v. 5, p. 378-386, 2009.

ROCHA, P. M; SANTO, V. E; GOMES, M. E, REIS, R.L; MANO, J. F. Encapsulation of adiposederived stem cells and transforming growth factor-b1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**,v. 26, p. 493–507, 2011.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiologia**, v.204/205, p.585-588, 1990.

SAJADI, A; BENSADOUN, J. C; SCHNEIDER, B. L; LO BIANCO, C; AEBISCHER, P. Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease, **Neurobiol. Dis**, v. 22, p. 119–129, 2006.

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

SANTO, V. E; FRIAS, A. M ; CARIDA, M; CANCEDDA, R; GOMES, M. E; MANO, J. F; REIS, R. L. Carrageenan-Based Hydrogels for the Controlled Delivery of PDGF-BB in Bone Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 1392–1401, 2009.

SCWARTZ, M.A. Integrin signaling revisited. **Trends Cell Biol**, v.11, p. 466-470, 2001.

SELIMOVIĆ, S; OH, J; BAE, H; DOKMEC, M; KHADEMHOSEINI, A. Microscale Strategies for Generating Cell-Encapsulating Hydrogels. **Polymers**, v. 4, p. 1554-1579, 2012.

SEMINO, C.E; MEROK, J.R; CRANE, G.G; PANAGIOTAKOS, G; ZHANG, S.G. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. **Differentiation**, v. 71, p. 262–270, 2003.

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.

SHEA, L.D; SMILEY, E; BONADIO, J; MOONEY, D.J. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. **Nat Biotechnol**, v. 17, p. 551–554, 1999.

SHOICHET, M.S; LI, R.H; WHITE, M.L; WINN, S.R. Stability of Hydrogels Used in Cell Encapsulation: An In Vitro Comparison of Alginate and Agarose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 374-381, 1995.

SHYU, K.G; WANG, B;W; HUNG, H.F. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. **J Biomed Sci**, v. 13, p. 47–58, 2006.

SILVA, G.A; CZEISLER, C; NIECE, K.L; BENIASH, E; HARRINGTON, D.A; KESSLER, J.A; STUPP, S.I. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-pitope density nanofibers. **Science**, v. 303, p. 1352–1355, 2004.

SLAUGHTER, B.V; KHURSHID, S.S; FISHER, O.Z; PEPPAS, N.A. Hydrogels in Regenerative Medicine. **Advanced Materials**, v. 21, p. 3307-3329, 2009.

SNYKERS, S; DE KOCK, J; ROGIERS, V; VANHAECKE, T. *In vitro* differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. **Stem Cells**, v.27, p. 577–605, 2009.

SYLVESTER, K.G; LONGAKER, M.T. Stem cell: Review and Update. **Arch. Surg**, v. 139, p. 93-99, 2004.

TAI, M.H; CHANG, C.C; KIUPEL, M; WEBSTER, J.D; OLSON, L.K, TROSKO, J.E. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 262, p. 495-502, 2005.

TAM, S. K; DUSSEAULT, J; POLIZU, S; MERNARD, M; HALLE, J; YAHIA, L. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation. **Biomaterials**, v. 27, p. 1296–1305, 2006.

TANAKA, H; MURPHY, C.L; MURPHY, C; KIMURA, M; KAWAI, S; POLAK, J.M. Chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells: Effects of culture conditions and dexamethasone. **J Cell Biochem**, v. 93, p. 3454–462, 2004.

THANH, T. T. T; YUGUCHI, Y; MIMURA, M; YASUNAGA, H; TAKANO, R; URAKAWA, H; KAJIWARA, K. Molecular characteristics and gelling properties of the carrageenan family, 1—preparation of novel carrageenans and their dilute solution properties. **Macromol. Chem. Phys**, v. 203, p. 15–23, 2002.

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

TIBBIT, M.W; ANSETH, K.S. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 655-663, 2009.

TOMA, J.G; MCKENZIE, I.A; BAGLI, D; MILLER, F.D. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. **Stem Cells**, v. 23, p. 727–737, 2005.

TRONO, G.C. Eucheuma and Kappaphycus: taxonomy and cultivation. **In: Ohno M; Critchley A.T. (ed)**. Seaweed cultivation and marine ranching, p. 75-88, 1997.

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.

VELEIRINHO, B; COELHO, D. S; DIAS, P. F, MARASCHIN, M; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M, LOPES-DA-SILVA, J. A. Nanofibrous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan scaffolds for skin regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 343– 350, 2012.

VELEIRINHO, B; BERTI, F. V; DIAS, P. F; MARASCHIN, M; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M; LOPES-DA-SILVA, J. A. Manipulation of chemical composition and architecture of non-biodegradable poly(ethylene terephthalate)/chitosan fibrous scaffolds and their effects on L929 cell behavior. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 37-46, 2013.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN , S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.727-734, 2008.

VISHNUBALAJI, R; AL-NBAHEEN, M; KADALMANI, B; ALDAHMAH, A; RAMESH, T. Skin-derived multipotent stromal cells – an archival for mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res**, v. 350, p. 1-12, 2012.

ZAGO, M.A; COVAS, D.T. **Células-tronco. A nova fronteira da medicina**. 1<sup>a</sup>ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

ZHANG, S; ZHAO, X; SPIRIO, L. PuraMatrix: Self-assembling peptide nanofiber scaffolds. In: Ma PX, Elisseeff J, editors. Scaffolding in tissue engineering. Boca Raton, FL: **CRC Press**. p 217–238, 2005.

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.

ZIMMERMANN, U; KLOCK, G; FEDERLIN, K; HANNIG, K; KOWALSKI, M; BRETZEL, R. G; HORCHER, A; ENTENMANN, H; SIEBER, U; ZEKOR, T. Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 13, p. 269–74, 1992.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, p. 211–228, 2001.

ZUK, P. A. The Intracellular Distribution of the ES Cell Totipotent Markers OCT4 and Sox2 in Adult Stem Cells Differs Dramatically According to Commercial Antibody Used. **J. Cellular Biochemistry**, v. 106, p. 867-877, 2009.

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

WANG, J; RAO, S; CHU, J; SHEN, X; LEVASSEUR, D.N; THEUNISSEN, T.W; ORKIN, S.H. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v. 444, p. 364–368, 2006.

WATT, F.M; LO CELSO, C; SILVA-VARGAS, V. Epidermal stem cells: an update. **Elsevier**, v. 16, p. 518-524, 2006.

WHEELDON, I; AHARI, A.F; KHADEMHOSEINI, A. Microengineering Hydrogels for Stem cell Bioengineering and Tissue Regeneration. **J. ALA**, p. 1-9, 2010.

WILLIAMS, J.T; SOUTHERLAND, S.S; SOUZA, J. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **Am Surg**, v.65, p.22–26, 1999.

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.

YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. **Cell Prolif**, v. 41, p. 51–56, 2008.

YAN, X; OWENS, D.M. The skin: A home to multiple classes of epithelial progenitor cells. **Stem Cell Rev**, v. 4, p. 113-118, 2008.

YASUHARA, T; DATE, I. Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application. **Cell Transplant**, v. 16, p. 125–132, 2007.

YIM, E.K.F; LEONG, K.W. Proliferation and differentiation of human embryonic germ cell derivatives in bioactive polymeric fibrous scaffold. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 16, p. 1193–1217, 2005.

YONG-LEE, K; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 1869-1879, 2001.

YU, H; FANG, D; KUMAR, S.M; LI, L; NGUYEN, T.K; ACS, G; HERLYN, M; XU, X. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. **American Journal of Pathology**, v. 168, p. 1879-1888, 2006.



## ANEXOS



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:** Desenvolvimento de um modelo de cultivo de células-tronco da derme humana em hidrogel de carragenana extraído da alga vermelha *Kappaphycus alvarezzi*

**Pesquisador Responsável:** Prof Dr Giordano Wosgrau Calloni.

**Pesquisador participante:** Addeli Bez Batti Angulski. RG: 4952628-6

**Telefones para contato:** (48) 37216905/ (48) 99843596

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário(a), do trabalho de pesquisa “Análise da viabilidade do cultivo de células-tronco da derme humana sobre carragenana extraída da alga vermelha *Kappaphycus alvarezzi*”, de responsabilidade do pesquisador Prof Dr Giordano Wosgrau Calloni. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr(a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone 37216905.

## INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo analisar o potencial terapêutico de células-tronco derivadas da pele. Atualmente as células-tronco vêm sendo amplamente estudadas em vários países, e sua aplicação terapêutica representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças.

Para a realização desta pesquisa serão utilizados fragmentos de pele retirados durante as cirurgias plásticas, que normalmente são descartados em lixos hospitalares após o procedimento cirúrgico. A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células-tronco da pele para compreendermos melhor o comportamento destas células. Estudos como estes são necessários, uma vez que nos proporcionarão conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias, como por exemplo, no tratamento de pacientes com lesões neurológicas. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos laboratoriais.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, 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, entre em contato através dos telefones citados acima.

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

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

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG \_\_\_\_\_, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa  
**“Desenvolvimento de um modelo de cultivo de células-tronco da  
derme humana em hidrogel de carragenana extraído da alga  
vermelha *Kappaphycus alvarezzi*”** e concordo em participar do estudo.

**Assinatura do paciente ou responsável:**

\_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012 .