

Bibiane Lago de Castro

**AVALIAÇÃO DO USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS
SOBRE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME
ASSOCIADAS À MATRIZ DE REGENERAÇÃO DÉRMICA**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular e do
Desenvolvimento da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Biologia
Celular e do Desenvolvimento.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Andréa
Gonçalves Trentin.

Florianópolis

2013

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

Castro, Bibiane

AVALIAÇÃO DO USO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS SOBRE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA DERME ASSOCIADAS À MATRIZ DE
REGENERAÇÃO DÉRMICA / Bibiane Castro ; orientadora, Andréa
Gonçalves Trentin - Florianópolis, SC, 2013.

88 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, . Programa de Pós-Graduação em .

Inclui referências

1. . 2. Células Tronco Mesenquimais. 3. Plasma Rico em
Plaquetas. 4. Matriz de Regeneração Dérmica. 5. Integra®.
I. , Andréa Gonçalves Trentin. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em . III. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais Umberto e Maira,
meus grandes exemplos de vida, amor, carinho e dedicação,
por estarem sempre ao meu lado, incentivando
a busca dos meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Gonçalves Trentin, por ter confiado em mim e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desse caminho. Cada dia no laboratório foi muito importante na minha formação e eu agradeço a você por ter me incluído neste maravilhoso grupo de pesquisa.

Aos demais professores do LACERT, Dr. Ricardo Castilho Garcez, Dr. Giordano Wosgrau Calloni e Dr. Marcio Alvarez da Silva, pelo incentivo, confiança e apoio à minha formação científica.

Aos queridos amigos integrantes e ex-integrantes do LACERT, obrigada pelas inúmeras ajudas e dúvidas respondidas, pelas conversas amigas, pelas jantãs deliciosas (ainda mais quando era sushi!) e, principalmente, por tornarem o meu dia-a-dia mais leve e divertido, vocês foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui!

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

Ao Prof. Dr. Rodrigo Baily Leal, por abrir as portas do seu laboratório e me apresentar a sua querida aluna Ana Paula Costa, agradeço pela colaboração nos experimentos de *Western blot*.

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

À minha orientadora de graduação e amiga, Magali Ferrari Grando, por ser essa pessoa maravilhosa e apaixonada pela ciência. Obrigada por me apresentar ao mundo da pesquisa e por toda a ajuda que sempre me destes.

Às minhas irmãzinhas de Floripa, Aline Hardt, Mirela Artner e Vanessa Borges. Não tenho palavras pra expressar o quanto vocês foram importantes ao longo desses anos, agradeço a Deus por ter colocado vocês na minha vida.

Às minhas amigas de sempre e para sempre, Ariane Pandolfo, Camila Alves, Daniana Schneider e Vanessa Raiter. Com vocês aprendi o significado da palavra amizade e juntas dividimos nossos sonhos desde a infância, obrigada pela força e incentivo que vocês sempre me deram!

Ao Guilherme Mendonça, por todo carinho, apoio e incentivo. Obrigada por estar ao meu lado, até mesmo nos momentos de dúvidas e nervosismo, e por sempre acreditar no meu potencial.

Durante esse ano perdi uma pessoa muito especial e não posso deixar de fazer uma homenagem a ela, minha amada Vó Maria. Muito obrigada pelas orações, pelo desejo de felicidade e sucesso, pela união da família e por ter me mostrado a face de uma verdadeira guerreira. Saudades eternas!

À minha amada vó, Nilde, por todas as orações (sei que o Sto. Antônio ouviu muito meu nome ultimamente), pelo amor e carinho que a gente só recebe de uma avó dedicada e querida como a senhora. Obrigada por me esperar sempre com um abraço carregado de amor e saudades e com uma deliciosa “nega maluça”!

Ao meu irmão Humberto, que é o meu exemplo de dedicação e profissionalismo, por todo amor, preocupação e incentivo. Obrigada por seu meu mano e por me dar a certeza de que sempre poderemos contar um com o outro.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus amados pais, Umberto e Maira. Obrigada por estarem sempre buscando o melhor para mim, muitas vezes abdicado dos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus e por sempre incentivarem o meu crescimento pessoal e profissional, acompanhando com orgulho e entusiasmo todos os passos dados ao longo da minha vida. Amo muito vocês!

Finalmente, agradeço a Deus pela vida que Ele me deu, pela família maravilhosa que eu tenho, por todas as pessoas especiais que sigo encontrando no meu caminho e por guiar a minha vida na direção da felicidade.

RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTM) exibem ampla plasticidade e rápida expansão *in vitro*, podendo ser isoladas e manipuladas de modo reprodutível e com poucos problemas éticos. Dentre os diversos tipos de CTM encontram-se as CTM da derme (CTMd), as quais demonstram capacidade para agir na regeneração de tecidos lesionados. Atualmente, estudos visando o desenvolvimento de estratégias para o reparo de grandes lesões de pele vêm sendo realizados. Nesse sentido a Engenharia de Tecidos apresenta matrizes de regeneração dérmica (MRD), utilizadas na clínica cirúrgica, como a MRD Integra®. Além disto, estudos envolvendo fatores de crescimento (FC) vêm apresentando resultados satisfatórios na manutenção e diferenciação celular, neste contexto, o plasma rico em plaquetas (PRP) se mostra uma interessante fonte de FC a ser aplicada com biomateriais. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso do PRP sobre as CTMd humana em ambientes de cultivo bidimensional e tridimensional, associados à MRD Integra®. Para isto, as CTMd foram cultivadas sob dois modelos: (1) bidimensional: CTMd associado ao PRP sobre o plástico; (2) CTMd associado ao PRP sobre o Integra®. Em cultivo bidimensional, os resultados mostraram que o PRP promove diminuição da viabilidade e número de células. Este resultado é coerente com o estímulo do PRP na diferenciação celular, aumentando a proporção de células com o fenótipo muscular liso/miofibroblástico (positiva para α -SMA). Concomitantemente a estes resultados, observou-se que as culturas tratadas com PRP apresentaram células grandes com morfologia alongada, diferentemente das culturas controle, que apresentavam células menores com morfologia arredondada. Além disso, as CTMd tratadas com PRP apresentaram maior depósito de colágeno tipo I. Em modelo tridimensional, o PRP promoveu diminuição da viabilidade celular, assim como estimulou a diferenciação para células positivas para α -SMA. As análises de MEV demonstraram que as células cultivadas com PRP apresentam maior adesão e adquiriram características fenotípicas semelhantes ao muscular liso/miofibroblástico. Em conclusão, estes resultados demonstram que a associação da MRD Integra® com as CTMd e o PRP constituem um microambiente efetivo para o crescimento, a viabilidade, a migração, a adesão e a diferenciação das CTMd, apresentando grande potencial para a Engenharia de Tecidos.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas, Integra®, biomateriais, Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) exhibit broad differentiation potential and high expansion capacity *in vitro*. They can be isolated and manipulated in a reproducible fashion and their use raises no ethical issues. The dermis is a remarkable source of MSCs (namely dermis derived MSC or dMSC), which are able to act in the regeneration of injured tissues. Currently, several efforts to develop strategies for the repair of large skin lesions have been made. In this scenario, the Tissue Engineering area aims to develop biomaterials that can be used in surgical procedures as dermal regeneration templates (DRT), such as Integra®. Furthermore, studies involving growth factors (GF) have shown satisfactory results in cell differentiation and maintenance. The platelet-rich plasma (PRP) comprises an interesting source of GF to be applied in association with biomaterials. This study aimed to evaluate the use of PRP on human dMSC cultured on dimensional and three-dimensional environments. Human dMSC were grown under two models: (1) two-dimensional: cells grown on plastic in association with PRP and (2) associated with PRP on the DRT Integra®. Under the two-dimensional culture system, there was PRP promoted a decrease in cell viability and the total cell number. This result is consistent with the stimulation of PRP on cell differentiation, increasing the proportion of cells with the phenotype smooth muscle / myofibroblastic (α -SMA-positive). Concurrently to these results, cells treated with PRP showed elongated morphology with large size. Contrariwise, cells in the control condition were smaller and with rounded morphology. Moreover, dMSC treated with PRP showed greater deposition of collagen type I. In the three-dimensional model, PRP caused a decrease in cell viability, and also stimulated the differentiation of dMSC into α -SMA positive. Scanning electronic microscopy analyzes demonstrated that cells cultured with PRP acquired greater adhesion and phenotypic characteristics similar to smooth muscle / myofibroblastic. In conclusion, these results demonstrate that the association of DRT Integra® with dMSC and PRP provides an effective microenvironment that supports growth, viability, migration, adhesion and differentiation of dMSC. This shows, therefore, show great potential for fure application in Tissue Engineering.

Keywords: mesenchymal stem cells, platelet rich plasma, Integra®, biomaterials, regenerative medicine

LISTA DE ABREVIATURAS

- α SMA: alfa actina de músculo liso
BSA: albumina bovina
CD31: cluster de diferenciação molecular 31
CTs: células tronco
CTM: célula tronco mesenquimal
CTMd: célula tronco mesenquimal da derme humana
DAPI: 4'-6-diamino-2fenilindol
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
FGF: fator de crescimento de fibroblasto
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina
KCl: cloreto de potássio
MEC: matriz extracelular
MEV: microscopia eletrônica de varredura
MRD: Matriz de Regeneração Dérmica
MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium
PBS: tampão fosfato salino
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PRP: plasma rico em plaquetas
PPP: plasma pobre em plaquetas
PS: penicilina/streptomicina
SBF: soro bovino fetal
SDS: dodecil sulfato de sódio
TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β 1: fator de crescimento transformante β 1
TGF- β 2: fator de crescimento transformante β 2
TxRd: vermelho do texas
UFC-F: unidade formadora de colônias fibroblastóide
UV: ultravioleta
VEGF: fator de crescimento de endotélio vascular
2D: bidimensional
3D: tridimensional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos estágios de diferenciação de queratinócitos.....	20
Figura 2 - Ilustração esquemática da estrutura da pele.....	21
Figura 3 - Tríade em que a Engenharia de Tecidos se baseia para a reconstrução de tecidos ou órgãos.....	22
Figura 4 - Detalhe da microestrutura da Matriz de Regeneração Dérmica Integra®.....	24
Figura 5 - Tríade baseada na Engenharia de Tecidos para a possível aplicação no reparo de grandes lesões de pele.....	31
Figura 6 - Análise morfológica das CTMd.....	46
Figura 7 - Efeito do PRP na sobrevivência das CTMd pelo ensaio de MTT.....	47
Figura 8 - Efeito do tratamento com PRP no número de CTMd, analisadas por DAPI.....	48
Figura 9 - Efeito do PRP na mortalidade por necrose de CTM.....	50
Figura 10 - Efeito do tratamento com PRP na síntese de colágeno tipo I pelas CTMd, analisadas por Imunofluorescência.....	52
Figura 11 - Efeito do tratamento com PRP na expressão de CD31 nas CTMd, analisadas por RT-PCR.....	54
Figura 12 - Efeito do tratamento com PRP na expressão α -SMA em CTMd, analisadas por Imunofluorescência.....	56
Figura 13- Efeito do tratamento com PRP na morfologia de CTMd positivas para α -SMA, analisadas por Imunofluorescência.....	57

Figura 14 - . Efeito do PRP na viabilidade das CTMd cultivadas na MRD integra®, pelo ensaio de MTT.....	59
Figura 15 - Morfologia de CTMd cultivadas em MRD Integra® e analisadas por MEV.....	61
Figura 16 - Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo Controle, analisadas por MEV.....	62
Figura 17 - Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo de tratamento 1:50, analisadas por MEV.....	63
Figura 18 - Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo de tratamento 1:100, analisadas por MEV.....	64
Figura 19 - Efeito do PRP sobre CTMd associadas à MRD Integra avaliado pela expressão de mRNA para CD31 por RT-PCR.....	65
Figura 20 - Análise da expressão proteica de α -SMA em CTMd tratadas com PRP e cultivadas na MRD integra® por Western blot.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores de superfície de CTMs.....	27
Tabela 2 - Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímicas	39
Tabela 3 - Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Pele.....	19
1.2 Engenharia de Tecidos.....	22
1.3 Células Tronco	25
1.4 Células Tronco Mesenquimais (CTMs).....	26
1.5 Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	28
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivo Específico.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Isolamento e Cultivo de Células Tronco Mesenquimais derivadas da derme (CTMd) humana.....	35
3.2. Preparo do PRP.....	36
3.2.1. Obtenção da trombina autóloga e ativação do PRP.....	36
3.3 Associação das CTMd humana com PRP em cultivo bidimensional.....	37
3.4. Cultura das CTMs com PRP em associação com a MRD em cultivo tridimensional.....	37
3.5. Avaliação da sobrevivência celular.....	37
3.6. Análise imunocitoquímica.....	38
3.7. Ensaio de Quantificação Celular	39
3.8. Análise de morte celular	39
3.9. Análise da MRD por Microscopia de Varredura (MEV).....	40
3.10. Análise de diferenciação celular por Western blot.....	40
3.10.1. Preparação das amostras.....	40
3.10.2. Eletroforese e Eletrotransferência.....	41

3.10.3. Imudeteccão.....	41
3.11. Análise de diferenciação celular por RT-PCR.....	41
3.12. Análise estatística.....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Análise dos efeitos do PRP sobre as CTMd em cultivo celular bidimensional.....	45
4.1.1. Efeito do PRP na Morfologia, Adesão e Crescimen	45
Celular por Microscopia de Contraste de Fase.....	45
4.1.2. Efeitos do PRP na Viabilidade, Morte e Proliferação	47
Celular.....	47
4.1.3. Efeito de PRP na Produção de colágeno I.....	51
4.1.4. Efeito de PRP na diferenciação das CTMd.....	53
4.2. Avaliação dos efeitos do PRP sobre as CTMd em cultivo tridimensional com a matriz de regeneração dérmica Integra®.....	58
4.2.1. Efeito do PRP na viabilidade das CTMd cultivadas na	58
MRD Integra®.....	58
4.2.2. Efeito do PRP na Morfologia e Adesão das CTMd	59
associadas à MRD integra®.....	59
4.2.3. Efeito do PRP na Diferenciação das CTMd cultivadas	59
na MRD Integra®.....	59
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÕES.....	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
ANEXOS.....	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele

A pele é um órgão complexo, que regula interações celulares e moleculares, efetuando respostas cruciais ao meio ambiente, representando 16% do peso corporal e podendo chegar a uma superfície de até 2m² no adulto (DRÉNO, 2008). Anatomicamente e funcionalmente, a pele apresenta duas camadas distintas: a epiderme, mais externa, e a derme, mais profunda, sendo constituída por células derivadas de duas camadas germinativas, ectoderma (epiderme) e mesoderma (derme), além de conter células derivadas da crista neural (melanócitos) (PASSERON *et al.*, 2005; POWELL, 2006).

A epiderme é a camada superficial, composta por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, possuindo quatro tipos diferentes de células: queratinócitos (80% a 90%), melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. A epiderme não apresenta vascularização própria e, desta maneira, sua nutrição ocorre através da derme (DRÉNO, 2008).

Esse órgão possui função de barreira a infecções e à perda de líquidos e, devido a uma resposta fisiológica às inúmeras agressões que sofre no dia-a-dia, se encontra em estado de constante renovação (BARTHEL e ABERDAM, 2005). Na epiderme toda atividade proliferativa está restrita à camada basal, onde residem as células tronco ou progenitoras dos queratinócitos. Os queratinócitos estão distribuídos linearmente em quatro camadas morfológicamente distintas, cujas alterações são decorrentes de sua transformação de célula jovem, não queratinizada, em célula adulta queratinizada, em um ciclo que leva aproximadamente 30 dias (BARTHEL e ABERDAM, 2005; STRONG *et al.*, 2006) (Figura 1).

A segunda camada da pele, a derme, situa-se logo abaixo da epiderme e é responsável pela elasticidade e pela integridade mecânica da pele. Nesse tecido encontram-se vasos sanguíneos e nutrientes, os quais são responsáveis pela nutrição e manutenção da epiderme. A derme é uma camada espessa, sendo constituída de tecido conjuntivo contendo fibroblastos, que sintetizam colágeno, fibras elásticas e proteoglicanos (DRÉNO, 2008; KUMAR *et al.*, 2005). Entre suas funções encontra-se a retenção de água e de minerais, fornecendo turgor aos tecidos moles e rigidez aos tecidos esqueléticos, respectivamente. A derme atua também como reservatório de fatores do crescimento, controlando a proliferação celular (KUMAR *et al.*, 2005).

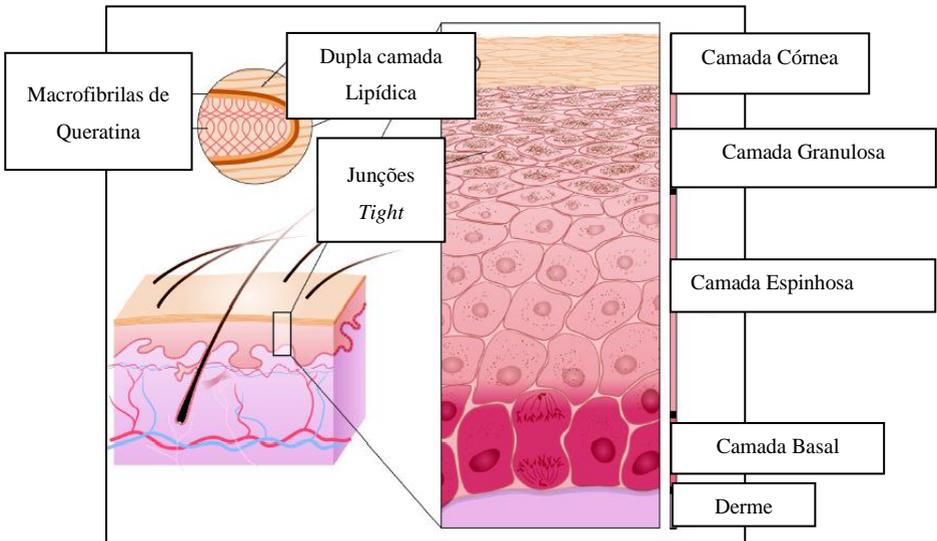


Figura 1: Estágios da diferenciação de queratinócitos. A partir da camada basal, mitoticamente ativa, os queratinócitos entram em um programa linear de diferenciação celular. Os mesmos irão passar pela camada espinhosa, camada granulosa até a camada córnea, anucleada. Esta é formada por queratina, associada a envelopes revestidos por dupla camada lipídica (esquema circular). As junções tipo *Tight*, que estão na camada granular, exercem papel essencial na retenção de água (Adaptado de SEGRE, 2006)

Na derme estão presentes diversas estruturas epidérmicas, como os anexos cutâneos, compostos pelo folículo piloso, glândula sebácea e epiderme interfolicular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Em muitos casos, esses são responsáveis pela reepitelização da pele lesada, que ocorrerá a partir dos bordos da lesão, quando não ultrapassar poucos centímetros. Nessa condição, a reepitelização irá ocorrer pelas células tronco de queratinócitos, presentes no folículo piloso, formando, desta maneira, a epiderme e o próprio pêlo em sua estrutura completa (ABBAS e MAHALINGAM, 2009) (Figura 2).

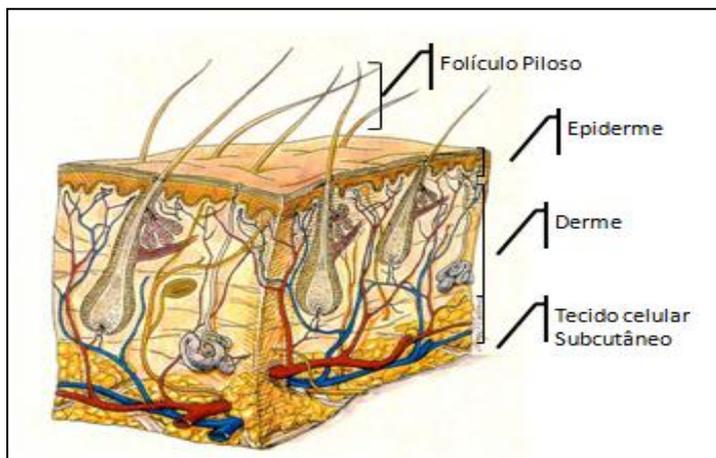


Figura 2: Estrutura da pele humana (Adaptado de MITCHELL e LYNCH, 1996).

Devido à interação dinâmica existente entre as duas camadas da pele, que modulam respostas de vários tipos celulares presentes nesses tecidos e que mantém suas devidas atividades e funções, qualquer desequilíbrio nessa relação pode determinar inúmeros processos patológicos (DRÉNO, 2008). Desta forma, é importante que a reconstrução da pele após ferimentos, sejam eles leves ou graves, ocorra rapidamente para evitar sequelas à pele atingida. Para tanto, a regeneração da pele é automaticamente iniciada pelo organismo pelo processo de cicatrização (WICKETT ; VISSCHER, 2006).

A cicatrização envolve uma série de etapas, tipos celulares específicos, mediadores e fatores de crescimento (CHOUCAIR ; PHILLIPS, 1997; HANNA ; GIACOPELLI, 1997). Esse processo tem como objetivo o restabelecimento morfológico e fisiológico da derme e da epiderme, em toda a sua magnitude e integridade (WICKETT ; VISSCHER, 2006). Porém, em lesões onde há perda total de tecido dérmico e epidérmico, o processo natural de cicatrização fica comprometido devido à grande perda de tecido e a sua equivalente área que deve ser regenerada. Para esses casos, existe a possibilidade de tratamentos, como a engenharia de tecidos, que oferece um análogo ao tecido perdido e que estimula a regeneração e a cicatrização do mesmo.

1.2. Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar que envolve princípios de Engenharia e Ciências da Vida. Possui como objetivo principal o crescimento, a restauração e a manutenção de sistemas biológicos existentes (KNIGHT ; EVANS, 2004).

Os elementos necessários para a aplicação dos princípios da Engenharia de Tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células tronco, entre outras); (2) matrizes (confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos) e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento (UEDA et al., 2000) (Figura 3).

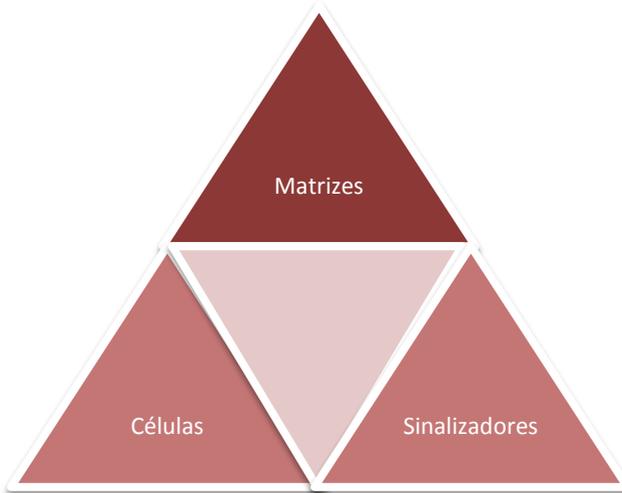


Figura3: Tríade em que a Engenharia de Tecidos se baseia para a reconstrução de tecidos ou órgãos.

Nas duas últimas décadas pesquisadores têm se dedicado a estudos visando desenvolver substitutos cutâneos para cobrir grandes lesões da pele, sendo que, uma vez exauridas as fontes doadoras autóloga e homóloga da pele, é de extrema importância a existência de substitutos cutâneos para a cobertura imediata de lesões (BALASUBRAMANI *et al.*, 2001). Desta maneira, evita-se que a região afetada fique exposta a perdas hídricas e a agentes externos, como bactérias, aumentando a comorbidade e agravando o prognóstico do paciente (MENDES JR. *et al.*, 2007; SCHURR *et al.*, 2009).

Estes estudos possibilitaram que substitutos cutâneos de compósitos biodegradáveis e bioabsorvíveis fossem desenvolvidos. Tais materiais tem o objetivo de atuar como suportes estruturais temporários para as células (TUZLAKOGLU, 2009; WEIR, 2009). Para serem considerados efetivos, além de mimetizar, total ou parcialmente, a anatomia e a função da pele, estes substitutos devem possuir estabilidade mecânica, não serem tóxicos ou carcinogênico, serem esterilizáveis, absorvíveis, e permeáveis a nutrientes e seus produtos do catabolismo. Adicionalmente, se forem absorvíveis, sua taxa de degradação necessita ser equivalente ao crescimento do novo tecido no local do implante (SAFFLE, 2009; SCHURR *et al.*, 2009).

Entre os substitutos de pele mais utilizados em todo o mundo e em uso na prática clínica diária, encontra-se a matriz de regeneração dérmica (MRD) Integra®, (Integra Life- Sciences Inc. USA) (JONES *et al.*, 2002). Essa matriz possui uma estrutura bilaminar constituída de colágeno bovino e condroitina-6-sulfato (componente dérmico) em sua região interna, possuindo a função de auxiliar na reestruturação da neoderme. Sua superfície externa é coberta por uma lâmina sintética de silicone (polímero de polisiloxane), com a espessura de 100 µm (componente epidérmico), cuja função é impedir a perda de líquidos (0,5 ml/cm²/h), agindo como uma pseudo-epiderme temporária (Figura 4) (ANTHONY *et al.*, 2006; WOOD *et al.*, 2007).

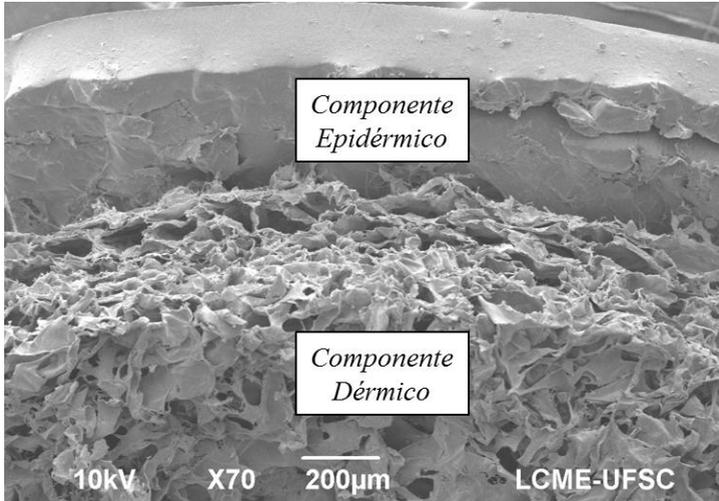


Figura 4: Estrutura da MRD Integra®. A área denominada como Componente Dérmico, representa a estrutura tridimensional da MRD, sendo constituída de colágeno bovino e de condroitina-6-sulfato. Sua superfície externa, denominada como Componente Epidérmico, é constituída por uma lâmina sintética de silicone (polímero de polisiloxane).

A MRD Integra® é utilizada após o desbridamento inicial da lesão, sendo colocada sobre a ferida limpa e aberta. Devido à sua característica porosa, essa matriz confere uma estrutura para a infiltração de fibroblastos. Inicialmente, não há possibilidade de enxertia devido à falta ou precariedade da vascularização local. A neoformação vascular ocorre num período de três a seis semanas após a lesão, quando então, um enxerto autólogo pode ser realizado, necessitando assim de um segundo procedimento cirúrgico. Contudo, pode ocorrer uma vascularização insuficiente no local, inviabilizando tal procedimento. Este evento atrasa o processo de cicatrização, levando a sequelas graves como retrações, cicatrizes hipertróficas e perda de função (SHERIDAN *et al.*, 2001). É, portanto, necessário um aprimoramento no processo de utilização dessa matriz dérmica, objetivando aumentar a taxa de integração celular e, principalmente, a melhora da vascularização do tecido lesado. Para isso, buscam-se associações com outros fatores importantes para a cicatrização, como por exemplo, o uso de células tronco e de fatores de crescimento.

1.3. Células Tronco

Simultaneamente à progressiva experiência clínica com os produtos da engenharia de tecido, houve maior compreensão biológica do uso das células tronco (CT). Estudos realizados com estas células vêm demonstrando seu grande potencial terapêutico e são considerados promissores no desenvolvimento de estratégias efetivas para a regeneração de diversos tipos de tecidos, incluindo tecidos da pele (BLANPAIN; FUCHS, 2006; VISHNUBALAJI *et al.*, 2012).

As CT são definidas como células indiferenciadas, clonogênicas, possuindo capacidade de autorrenovação e de originar linhagens celulares diferenciadas (THOMSON *et al.*, 1998). A autorrenovação dessas células pode se dar por divisão simétrica ou assimétrica. Pela divisão simétrica, as CT geram células com as mesmas características, sem alterar seu estado indiferenciado. Já pela divisão assimétrica, são geradas tanto CT indiferenciadas quanto células progenitoras, consideradas comprometidas fenotipicamente e seguindo uma via de diferenciação celular (SANDERS *et al.*, 2006). As células progenitoras apresentam divisões celulares limitadas e, uma vez exaurido este potencial, se diferenciam em um tipo celular específico (SO ; EPSTEIN, 2004).

As CT podem ser isoladas a partir de tecidos embrionários, fetais e adultos (THOMSON *et al.*, 1998). As CT embrionárias, derivadas da massa celular interna do blastocisto, são pluripotentes, podendo originar todos os tipos celulares do embrião. Diferentemente, as CT adultas e fetais possuem potencial de diferenciação mais restrito, sendo denominadas de multipotentes, e contribuem para a produção de apenas algumas linhagens celulares (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Apesar da menor potencialidade, as CT adultas mantêm as características de autorrenovação, vida longa e alto potencial proliferativo (WISLET ; GENDEBIEN *et al.*, 2005), podendo ser estimuladas *in vitro* e *in vivo*, em resposta a fatores de crescimento e a lesões (COTSARELIS *et al.*, 1999).

Devido às controvérsias éticas e políticas, além de problemas de rejeição imunológica e do alto potencial para o desenvolvimento de tumores (ESPINOZA; PETERSON, 2012), estudos e aplicações clínicas com as CT embrionárias têm se mostrado inviáveis. Conseqüentemente, muitos estudos são realizados para a identificação de CT em tecidos adultos, como modo de desenvolver estratégias para a regeneração e reparo tecidual (RABIE *et al.*, 2007). Essas células podem ser isoladas de tecidos autólogos, descartando a possível rejeição pelo imune, bem

como os questionamentos éticos, além disto, não têm sido relacionadas com a formação de teratomas (CHAGASTELLES; NARDI, 2011).

Diversos tipos de CT de tecidos adultos foram isoladas e caracterizadas. Inicialmente, foram identificadas no sistema hematopoiético, sendo até hoje as mais estudadas. Na clínica, as CT do sistema hematopoiético podem ser rotineiramente isoladas do sangue periférico, do cordão umbilical e da medula óssea, as quais já são utilizadas no tratamento de algumas doenças, como a leucemia (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Outras populações de CT adultas conhecidas incluem: as CT epidermais, as CT neurais e as CT mesenquimais (ALISON; ISLAM, 2009; BIANCO *et al.*, 2008).

1.4. Células Tronco Mesenquimais (CTM)

As CTM, que foram assim denominadas por Caplan em 1991, têm seus estudos remontando aos anos 1960 e 1970, quando Friedenstein e colaboradores iniciaram as pesquisas com células fibroblastóides da medula óssea de roedores e coelhos.

Inicialmente, estas células eram consideradas precursores de fibroblastos, derivados da medula óssea e denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F). Mais tarde, descobriu-se que as colônias de células fibroblastóides derivadas da medula óssea eram capazes de se diferenciar em células com características de osteócitos, condrócitos ou adipócitos. A partir da constatação de que as UFC-F derivavam de uma porção estromal da medula óssea, as células aderentes ao plástico passaram a ser denominadas *células estromais da medula óssea* (BIANCO *et al.*, 2008).

Atualmente, o termo *células estromais da medula óssea* compreende todas as células que compõem o estroma medular, como fibroblastos, adipócitos e também macrófagos. Já o termo *CTM*, refere-se apenas à população celular com morfologia fibroblastóide, aderente ao plástico em condições de cultivo padrão, capaz de proliferar *in vitro* e com potencial de diferenciação celular para osteoblastos, adipócitos e condrócitos, em condições indutivas (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009; DOMINICI *et al.*, 2006; CAPLAN, 2005).

Estas células apresentam uma distribuição quase onipresente em indivíduos adultos, sendo encontradas não só na medula óssea, mas também em diferentes tecidos, incluindo a pele, o músculo esquelético, o tecido adiposo, a polpa dental, os ossos e o fígado (ZUK *et al.*, 2002; MIURA *et al.*, 2003; DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008; NINCHERI *et al.*, 2009).

A diversidade de fontes de obtenção das CTM, juntamente com a variedade de métodos de isolamento e expansão descritos na literatura, dificultou a comparação e progresso dos estudos neste campo. Para tanto, foram propostos pelo Comitê de Células Tronco e Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular critérios de caracterização das CTM humanas. Além das características acima descritas de morfologia, proliferação, adesão e diferenciação, as CTM devem ainda expressar os marcadores de superfície celular CD105, CD90 e CD73, e, para assegurar uma população homogênea, não expressar os marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). Este painel foi sugerido em consenso, porém existem outras moléculas de superfície expressas por estas células que podem ser úteis na pesquisa (Tabela 1) (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009).

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

Fonte: SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009.

As CTM são consideradas uma das principais candidatas na Medicina Regenerativa com base em suas características únicas, que podem ser extremamente úteis para aplicações clínicas (BIANCO; ROBEY, 2001). Com o estímulo apropriado, as CTM são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais, adipócitos, condrócitos, células neurais, fibroblastos e osteoblastos. Além disso, as CTM têm grande capacidade de expansão, representam baixo risco imunogênico e tumorigênico (WEIR, 2009) e possuem alta capacidade de migrar para locais de lesão (SATIJA *et al.*, 2007).

A aplicabilidade das CTM em protocolos de terapias celular tem sido expandida com o uso de matrizes sintéticas ou naturais, que mimetizam seu microambiente, e assim melhoram de maneira significativa a sobrevivência e funções teciduais (HAMDI *et al.*, 2009).

Portanto, as CTM são fortes candidatas para uso em processos de cicatrização de feridas dérmicas em associação com MRDs.

O trabalho em andamento no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual - UFSC (Tese de Doutorado Talita Jeremias PG-BCD/UFSC), estabeleceu as condições de obtenção e cultivo das CTM de derme humana (CTMd). A caracterização foi realizada por imunofenotipagem (marcação positiva para CD90, CD105 e CD73 e negativa para CD14, CD34 e CD45), morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico e a diferenciação para os fenótipos adipogênico e osteogênico. A caracterização das CTM derivadas da derme viabilizou o seu uso em experimentos *in vitro* associando-as à MRD Integra®, ressaltando a importância da associação com um ambiente tridimensional. O próximo passo deste trabalho é o ensaio pré-clínico em camundongos utilizando as CTM em associação com a MRD Integra® (JEREMIAS, *et al.*, em redação).

1.5. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

Embora a possibilidade de regeneração de tecidos lesados gere grandes expectativas e aplicações em Engenharia de Tecidos, existe um atual desafio na identificação de um substrato adequado que atenda às necessidades das CTM, bem como os fatores de crescimento apropriados que promovam desempenho celular, vascularização e cicatrização do tecido. Portanto, ao se criar um sistema de engenharia de tecido, ou aprimorá-lo com tecnologias atuais, deve-se considerar o tipo celular, a matriz escolhida e ainda os sinais biológicos que devem ser fornecidos (ELISSEEFF, 2005).

Nesta linha, o plasma rico em plaquetas (PRP), surge como um veículo de armazenamento de fatores de crescimento, podendo representar uma nova fonte para aplicações clínicas. O PRP possui várias vantagens sobre o uso do soro de animais ou fatores de crescimento recombinantes, essencialmente devido à sua disponibilidade autóloga imediata, potencialmente segura e eficaz em aplicações clínicas (PRINS *et al.*, 2009).

O PRP é definido como a porção do plasma sanguíneo, obtida através de protocolos de centrifugação, que apresenta concentração plaquetária superior aos níveis de referência (DUAN *et al.*, 2011; MARX, 2004). O PRP é um produto orgânico, atóxico e não imunorreativo, que tem sido utilizado para acelerar o reparo das feridas cirúrgicas pela ação dos fatores de crescimento que contém (ANITUA, 1999; MARX, 2004). Os fatores de crescimento presentes no PRP estão

estocados nos grânulos α das plaquetas. A secreção destes fatores se inicia com o processo de formação do coágulo e, conseqüente à ativação plaquetária. Os grânulos se fundem com a membrana das plaquetas e os fatores são secretados. Cerca de 95% dos fatores de crescimento são secretados na primeira hora de sua ativação. Após a liberação inicial, as plaquetas sintetizam e secretam fatores adicionais pelos sete dias restantes do seu ciclo de vida. Estudos demonstrando que as CTM, os osteoblastos, os fibroblastos, as células endoteliais e as células epidermais, expressam receptores de membrana para os fatores de crescimento presentes no PRP. A ativação destes receptores resulta na expressão de seqüências gênicas que controlam a proliferação celular, a síntese de colágeno e a formação de matriz extracelular, estimulando o processo natural de cicatrização (GASSLING *et al.*, 2009; MARX, 2004).

Entre os fatores presentes no PRP, encontram-se o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento endotelial (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e prostaglandina E2 (PGE2) (CENNI *et al.*, 2010; KASTEN *et al.*, 2008). Os fatores de crescimento derivados do PRP não entram na célula ou em seu núcleo, não são mutagênicos e agem estimulando o processo de cicatrização normal da célula, de maneira a apenas, torna-lo mais rápido, não sendo capaz de induzir tumores (MARX, 2004).

O PRP tem sido utilizado, isoladamente ou em combinação com CT, em diversos modelos experimentais e testes clínicos, para promover cicatrização em tecidos de diferentes densidades (CROVETTI *et al.*, 2004; ANITUA *et al.*, 2008, KASTEN *et al.*, 2008, CHEN *et al.*, 2009). Estes estudos demonstraram que o PRP é efetivo na proliferação celular, quimiotaxia, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular. Conseqüentemente, o PRP facilita o reparo tecidual, já que estimula a angiogênese, melhora a integração de enxertos, sejam eles ósseos, cutâneos, cartilaginosos ou adiposos, bem como estimula a cicatrização de feridas (OKUDA *et al.*, 2003; VENDRAMIN *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro* comprovaram a eficácia do PRP em culturas de CTM provenientes da medula óssea humana, podendo corresponder a um subsídio ideal ao soro bovino fetal, bem como a uma fonte de múltiplos fatores de crescimento capaz de suportar satisfatoriamente a viabilidade e a proliferação celular e sua expressão gênica. Além disso, ao ser testado em associação com a MRD Integra®, as células cultivadas em presença de PRP exibiram uma maior aptidão para colonizar a

MRD, demonstrando uma melhora na adesão e uniformidade celular em comparação com as células cultivadas apenas com a MRD Integra® (FORMIGLI *et al.*, 2011).

Todavia, embora resultados demonstrem melhora na otimização da cultura de CTM de medula óssea, em associação com biomateriais e o PRP (FORMIGLI *et al.*, 2011), ainda não existem relatos de estudos envolvendo a sua associação com CTMd humana, tampouco se sabe da capacidade de diferenciação destas células, quando expostas aos fatores de crescimento presentes no PRP.

Nos últimos anos, as CTMd vêm 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 abundantes 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).

Portanto, considerando a plasticidade das CTMd e a importância da interação celular em um ambiente tridimensional, como a MRD, pode-se considerar que estes dois componentes combinados se aproximam do modelo ideal do substituto cutâneo. Adicionalmente, os fatores de crescimento presentes no PRP associados às CTMd podem auxiliar de maneira eficiente na formação da “neoderme” vascularizada em um menor espaço de tempo. Desta forma, baseando-se nos recentes avanços da Engenharia de Tecidos, o presente trabalho propõe o uso da tríade: células (CTMd), matrizes (MRD Integra®) e sinalizadores celulares (PRP) (Figura 5), visando a utilização destes componentes biológicos para otimizar o tratamento de grandes lesões de pele.

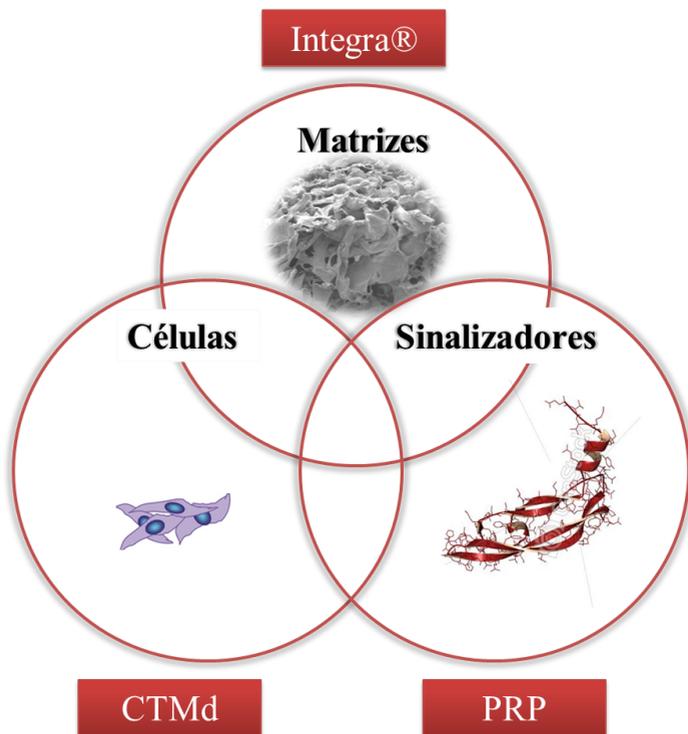


Figura 5: Tríade baseada na Engenharia de Tecidos para a possível aplicação no reparo de grandes lesões de pele.

2.OBJETIVOS

2.1. *Objetivo Geral:*

Avaliar o uso associado das Células Tronco Mesenquimais derivadas da derme humana com Plasma Rico em Plaquetas, em diferentes condições de cultivo celular, bidimensional e tridimensional, associado à Matriz de Regeneração Dérmica Integra®, visando o uso em terapias de regeneração de pele.

2.2. *Objetivos específicos:*

1 - Avaliar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas sobre as Células Tronco Mesenquimais de derme, quando cultivadas em modelo bidimensional, analisando:

- a morfologia das CTMd, por microscopia de contraste de fase.
- a toxicidade das diluições do PRP, por SYTOX Green®.
- a viabilidade celular, por MTT.
- a diferenciação celular, por Imunofluorescência e RT-PCR.

2 - Avaliar o efeito do Plasma Rico em Plaquetas na cultura tridimensional de Células Tronco Mesenquimais de derme, com Matriz de Regeneração Dérmica Integra®, analisando:

- a viabilidade celular, por MTT.
- a morfologia e a integração celular com a MRD, por Microscopia Eletrônica de Varredura.
- a diferenciação celular, por *Western blotting*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Isolamento e Cultivo de Células Tronco Mesenquimais derivadas da derme (CTMd) humana*

As amostras de pele foram obtidas em colaboração com o Ilha Hospital Maternidade. As amostras foram coletadas de pacientes submetidos à cirurgia plástica de “*lifting*” facial, com assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo 1). 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. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular (LACERT-UFSC) em um tubo contendo meio de cultivo *dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12* (DMEM-F12), suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF), a temperatura ambiente, onde foram processadas em ambiente estéril.

Para o isolamento das CTMd, os fragmentos de pele foram cortados em pequenos pedaços e incubados com 12,5 U/mL de dispase (BD) durante 15 horas, a 4°C. Após este período, a epiderme e a hipoderme foram removidas do tecido, com o auxílio de pinça e tesoura, e a derme foi incubada com solução de tripsina a 0,25% e ácido etileno-dinitrilo-tetracélico (EDTA) a 0,02% (Invitrogen) durante 45 minutos a 37°C. Após o bloqueio da reação enzimática com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, a suspensão de células foi filtrada em malha de 70µm (Cell Strainer, BD) e centrifugada durante 7 minutos a 1.200 RPM. As células foram então ressuspensas em DMEM-F12 (Vitrocell) suplementado com penicilina/estreptomicina (PS, 1U/µg, Gibco) e 15% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), plaqueadas em garrafas de cultura de 25cm² e mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade.

As CTMd foram selecionadas pela adesão ao plástico. O meio de cultivo era renovado a cada 4 dias e as células não aderentes ao plástico eram descartadas. Assim que as células atingiam uma confluência de aproximadamente 80%, eram descoladas da placa de cultivo com solução de tripsina/EDTA e replaqueadas para expansão numa proporção de 1:3 (passagem 1). Este processo era repetido até a passagem 10, sendo que as passagens utilizadas para os experimentos foram de passagem 5 até a passagem 10.

3.2. Preparo do PRP

O PRP foi preparado de acordo com Vendramin *et al.*, (2009) com algumas modificações. Brevemente, o sangue periférico de doadores foi coletado mediante apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE2 – Anexo 2). De cada doador foram coletados 10mL de sangue e distribuídos em três tubos de coleta contendo EDTA. Para compensar as diferenças individuais nos níveis de fatores de crescimento, o PRP foi preparado com sangue de quatro doadores.

O sangue coletado foi centrifugado a 400 X g por 5 minutos, formando três fases: uma inferior, vermelha, contendo as hemácias, outra superior, amarelada, contendo o plasma e as plaquetas, e entre elas uma terceira fase estreita e esbranquiçada, chamada de zona de névoa (*buffy coat*), contendo plaquetas maiores e células brancas (neutrófilos e basófilos). A fase superior foi coletada até a borda da zona da névoa, sendo reservado 200 µL para preparo da trombina autóloga. O restante foi colocado em tubo estéril e centrifugado a 800 X g por 10 minutos, com a formação do precipitado (*pellet*) de plaquetas. Foram separados 2/3 do sobrenadante, denominado de plasma pobre em plaquetas (PPP). O precipitado foi ressuspenso no restante do PPP. As plaquetas foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas com PPP para uma densidade de 10^9 plaquetas/mL.

3.2.1. Obtenção da trombina autóloga e ativação do PRP

Para obter a trombina autóloga foi adicionado 250µL de Gluconato de Cálcio (Sigma) a 10% para cada 1mL de plasma (retirado após a primeira centrifugação do PRP) e mantido a 37°C por 15 minutos, ocorrendo a gelificação do plasma. O gel formado foi centrifugado a 800 X g por 10 minutos, resultando na separação de um líquido claro, contendo a trombina. A ativação do PRP foi realizada pela adição da trombina autóloga ao PRP em uma proporção de 1:5. O gel resultante da adição da trombina no PRP foi submetido à centrifugação a 800 X g por 10 minutos, resultando em um precipitado de coágulo e de um líquido contendo os fatores de crescimento, denominado PRP ativado. Após a obtenção do PRP ativado, o mesmo foi estocado a -80°C até a utilização.

3.3 Associação das CTMd humana com PRP em cultivo bidimensional

Para avaliar os efeitos do PRP sobre a viabilidade, morte, proliferação e diferenciação celular em cultivo bidimensional, as CTMd foram cultivadas com diferentes concentrações de PRP.

Para tanto, as CTMd foram cultivadas em placas de 96 poços com 1×10^4 células/poço em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF durante 24 horas, para permitir a adesão das células. Após este período o meio de cultivo foi removido e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Os tratamentos foram realizados com o PRP diluído em DMEM-F12 nas proporções de 1:50 e 1:100 (FORMIGLI et al., 2011). O meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF foi utilizado como controle do experimento. As placas de cultura foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade durante 4 dias e utilizadas nos ensaios de viabilidade, proliferação, morte e diferenciação celular, como descrito nos itens 3.5, 3.6, 3.7, 3.10 e 3.11.

3.4. Cultura das CTMd com PRP em associação com a MRD em cultivo tridimensional

Para o cultivo das CTMd em associação com a MRD Integra® foram utilizadas placas de cultivo de 96 poços. A MRD foi cortada em fragmentos de aproximadamente 6mm, os quais foram lavados por três vezes em PBS e imersos por 30 minutos nos meios usados para os tratamentos: meio controle (DMEM F12 suplementado com 15% de SBF), e meios controle contendo PRP nas proporções de 1:50 e 1:100. Após este período, a MRD foi acomodada nos poços, com a cobertura de silicone voltada para a base da placa e a porção porosa voltada para a superfície. A seguir, uma suspensão de 10µL contendo 1×10^4 /mL células foi colocada sobre a MRD, com o auxílio de uma micropipeta e mantidas por 2 horas, para adesão das células à MRD, em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade. Após este período, foi adicionado 150 µL do meio utilizado no tratamento. As placas de cultura foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade durante 5 dias e utilizadas nos ensaios de viabilidade, proliferação, morte e diferenciação celular como descrito nos itens 3.5, 3.6, 3.7, 3.10 e 3.11

3.5. Avaliação da sobrevida celular

A sobrevida foi avaliada por incorporação de brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium (MTT). O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, convertido em formazana púrpura após a clivagem do anel de tetrazólio, pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, ativas nas células vivas. Desta maneira, pode-se

considerar que o precipitado púrpura reflete a atividade celular, obtendo-se, assim, uma estimativa de células viáveis da amostra. Em nossos experimentos, o MTT (2,5mg/ml) foi acrescentado ao meio de cultura e incubado durante 4 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. A seguir, o composto foi solubilizado com 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) e a intensidade da coloração quantificada por absorbância a 570nm em leitora de microplacas (Tecan Infinite M200). Nos experimentos realizados com associação da MRD as matrizes foram transferidas para novos poços antes da incubação com MTT, para evitar interferências de células que possivelmente tenham aderido ao plástico da placa de cultura. Esse ensaio foi realizado em triplicatas em 4 experimentos independentes.

3.6. Análise imunocitoquímica

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF em PBS durante uma hora e, após nova lavagem com PBS, as amostras foram incubadas com os anticorpos primários específicos segundo a tabela 2, por 14 horas a 4°C. Após este período, procederam-se três lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) e em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos durante 1 hora. Após nova lavagem com PBS-Tween, as células foram incubadas com 4'-6-diamino-2fenilindol (DAPI) (50ng/mL) durante 15 segundos, à temperatura ambiente, para marcação dos núcleos. As marcações foram analisadas em microscópio epifluorescente (Olympus IX71) e fotografadas em câmara Olympus DP71. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas.

Tabela 2 Marcadores utilizados nas reações imunocitoquímicas

<i>Fenótipo</i>	<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Diluição</i>	<i>Anticorpo Secundário</i>	<i>Diluição</i>
Célula de Músculo Liso	Anti- α SMA (anti α actina de músculo liso) – IgG2a de camundongo	1:800	Cabra contra IgG2a de camundongo conjugado a Alexa 594	1:400
Colágeno tipo I	Anti-Colágeno I – IgG de coelho	1:100	Cabra contra IgG de coelho conjugado a Alexa 488	1:400
Célula Endotelial	Anti - CD31 – IgG1 de camundongo	1:100	Cabra contra IgG1 de camundongo conjugado a Alexa 59	1:500
Queratinócito	Anti-citoqueratina 19 – IgG de coelho	1:200	Cabra contra IgG de coelho conjugado a Alexa 488	1:500

A proporção de células positivas para α -SMA foi calculada em relação ao número total de células pela contagem dos núcleos corados com DAPI. O programa ImageJ® foi utilizado para quantificar a marcação de colágeno tipo I presente, bem como para quantificar os núcleos corados com DAPI. Após, foi calculada a relação percentual entre valores de pixels da marcação de colágeno tipo I e de DAPI.

3.7. Ensaio de Quantificação Celular

A quantidade de células foi avaliada nas culturas bidimensionais pela quantificação do número total de células durante o período de cultivo, avaliando-se os núcleos corados com DAPI. Para tanto, placas de cultura de 96 poços foram plaqueadas com 1.10^4 células/poço. Após quatro dias, as células foram lavadas com PBS e fixadas como descrito acima para a imunofluorescência (no item 3.6). Após nova lavagem com PBS, as culturas foram analisadas em microscópio epifluorescente. Foram contados os núcleos de 15 campos (visualizados em objetiva de 10X) em cada condição experimental, em nove experimentos independentes.

3.8. Análise de morte celular

A morte celular por necrose foi avaliada pela marcação com SYTOX® Green. Esse é um corante de alta afinidade por ácidos nucleicos sendo incorporado apenas por células com a membrana plasmática comprometida, sem marcar células viáveis. Para tanto, as células foram incubadas com SYTOX® Green na concentração de 10mM, adicionado ao meio de cultura, por 10 minutos, de acordo com

as instruções do fabricante. A seguir, as células foram lavadas com PBS, fixadas e os núcleos corados com DAPI como descrito acima, no item 4.6. Após nova lavagem com PBS, as culturas foram examinadas em microscópio epifluorescente.

Para esta análise, foram realizados três experimentos independentes, em triplicatas. A proporção de células positivas para SYTOX® Green foi calculada em relação ao número total de células.

3.9. Análise da MRD por Microscopia de Varredura (MEV)

A técnica de MEV foi empregada para verificar a adesão e a morfologia das CTMd cultivadas em ambiente tridimensional com a MRD Integra®. Após o cultivo descrito no item 4.4, as amostras foram fixadas em solução de Cacodilato de sódio 0,1M, por 14 horas a 4°C e, após, submetidas a 3 lavagens de 15 minutos na mesma solução. Posteriormente, foi realizado o processo de desidratação por incubações de 20 minutos em soluções de álcool de concentrações crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A última etapa (álcool 100%) foi repetida três vezes. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no equipamento de ponto crítico de CO₂ (Leica EM CPD 030). Neste processo as partículas de álcool são substituídas por CO₂. Ao final, as amostras foram metalizadas com uma cobertura de ouro de 30nm (metalizador Sputter Leica EM SCD 500) e então analisadas no microscópio eletrônico de varredura por captura de elétrons secundários em 15kV (Jeol JSM-6390LV).

3.10. Análise de diferenciação celular por Western blot

3.10.1. Preparação das amostras

As culturas de células foram lisadas em dodecil sulfato de sódio (SDS) *stopping solution* (4% SDS, 2 mM EDTA, 8% β-mercaptoetanol, e 50 mM Tris, pH 6,8). Resumidamente, as culturas de células foram homogeneizadas mecanicamente em 100 µL de *SDS stopping solution*, os lisados foram aquecidos a 100° C por 5 min, e centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4° C) para eliminar os restos celulares. Os sobrenadantes foram utilizados para preparar as amostras e dosagem de proteínas. A dosagem de proteínas foi determinada com o método descrito em Peterson (1977). A seguir foram adicionados nas amostras “tampão de diluição” (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%).

3.10.2. Eletroforese e Eletrotransferência

As proteínas (30 µg) foram isoladas através de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS) utilizando gel de separação de acrilamida com concentração de 10% e gel de entrada 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de 150 mV durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência e transferidos para membrana de nitrocelulose usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm²; 1,5 h) como descrito por Bjerrum e Heegaard (1988). Para verificar a eficiência do processo de transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S.

3.10.3. Imunodeteção

As membranas foram bloqueadas com 5% de albumina bovina (BSA) em Tris 10 mM, NaCl 150 mM (TBS) pH 7,5 por 1 hora e após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) incubadas “overnight” (4° C) com os anticorpos específicos para das seguintes proteínas: α-SMA e β-actina. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo BSA 2% nas diluições: 1:1000 (α-SMA) e 1:2000 (β-actina). Para a detecção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-rabbit ou mouse (ligado à peroxidase) e reveladas em filme autoradiográfico após a emissão de quimioluminescência induzida por reagentes adicionados a membrana de nitrocelulose, de acordo com as recomendações do fabricante. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti-β-actina (1:2000) para verificar se a mesma quantidade de proteínas teriam sido aplicadas no gel. O imunoc conteúdo da proteína foi determinado pela razão entre a D.O da banda e a D.O. da β-actina (Posser *et al.*, 2007). As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image ®.

3.11. Análise de diferenciação celular por RT-PCR

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg do RNA total tratado com DNase, a fita de cDNA foi sintetizada através do *Kit* para transcrição reversa *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). Conforme especificações do fabricante, primeiramente foi realizada uma reação com o RNA, 0,5 µL de oligo(dT) e água para completar um volume final de 5 µL. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 70°C. Esta primeira reação serve para que o oligo(dT), que são utilizados como oligonucleotídeos iniciadores pela transcriptase reversa, reconheçam e se liguem nas caudas poli-A dos

mRNAs. Em seguida, as amostras foram transferidas para o gelo e incubadas por 5 minutos. Logo após, foram preparadas as reações com 4 μL de tampão (*ImProm-II™ 5X Reaction Buffer*), 5 mM de MgCl_2 , dNTP Mix a 0,5 mM de cada dNTP, 20 unidades da enzima inibidora de ribonuclease (Rnasin), 1 unidade da enzima transcriptase e água para completar o volume de 15 μL . Os reagentes foram misturados com a primeira reação e incubados por 5 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C e 15 minutos a 70°C. Todos os reagentes fazem parte do *kit* para transcrição reversa da Promega.

Foram utilizados 2 controles para cada amostra na reação de RT, onde 1 continha todos os reagentes, exceto o RNA, para verificar se havia alguma contaminação na reação; o outro controle continha todos os reagentes, exceto a transcriptase reversa, para verificar se havia contaminação por DNA genômico nas amostras. Após a síntese de cDNA, as amostras foram submetidas à PCR.

Na técnica de PCR para amplificação do gene CD31, a partir do cDNA sintetizado, foram utilizados 0,4 μM de oligonucleotídeos iniciadores específicos (tabela 2), sendo um senso e outro anti-senso, 12,5 μL do reagente *GoTaq Master Mix* (Promega) e 1 μL de cDNA, em um volume final de 25 μL . As amostras foram desnaturadas inicialmente a 94°C por 4 minutos, em seguida, foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para dissociação, 56,2°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto para extensão, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) e em triplicata para cada amostra. Nestes experimentos, a expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizada como controle positivo das reações. Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos que consistiram em adicionar todos os reagentes, exceto o cDNA, para averiguar se havia alguma contaminação nas reações. Após a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 3 Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento amplificado
CD31	<u>Senso:</u> GAGTCCTGCTGACCCTTCTG <u>Anti-Senso:</u> ATTTTGCACCGTCCAGTCC	56.2°C	107 pb
GAPDH	<u>Senso:</u> GAAGGTGAAGGTCGGAGTC <u>Anti-Senso:</u> GAAGATGGTGATGGGATTTC	56.2°C	226 pb

3.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com a utilização do software GraphPad Prism 5®. Foi empregada a análise de variância de uma via (ANOVA), comparando-se as médias de cada grupo tratado em relação às médias de um grupo controle, seguida pelo teste de Tukey a 5%. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos efeitos do PRP sobre as CTMd em cultivo celular bidimensional

Inicialmente, foram analisados os efeitos do PRP sobre as CTMd em cultivo bidimensional, avaliando a morfologia, crescimento celular, viabilidade, morte e diferenciação celular. Foi avaliada também produção de MEC (colágeno tipo I). Para estas análises, as CTMd foram cultivadas diretamente sobre o plástico de placas de cultivo celular, conforme descrito no item 3.3 da metodologia.

4.1.1. Efeito do PRP na Morfologia, Adesão e Crescimento Celular por Microscopia de Contraste de Fase

As culturas foram analisadas por microscopia de contraste de fase quanto às suas características morfológicas, adesão ao plástico e confluência celular. A análise das células foi realizada rotineiramente em todas as amostras durante o período experimental de 4 dias. Em todas as condições experimentais, as células apresentaram as características de adesão ao plástico formando monocamadas confluentes, com morfologia fibroblastóide, que são características das CTM (figura 4). É importante ressaltar que as células utilizadas neste estudo foram caracterizadas previamente como CTM em estudos realizados durante a Tese de Doutorado de Talita Jeremias (em andamento, no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual - UFSC, pelo PG-BCD) (JEREMIAS, *et al.*, em preparo).

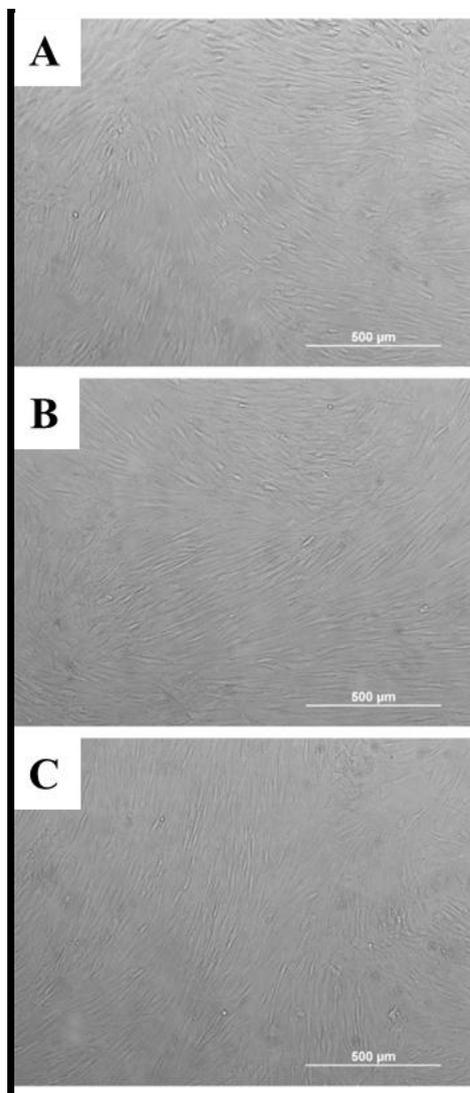


Figura 6 Análise morfológica das CTMd: Fotografia representativa das monocamadas de CTMd visualizadas em microscópio de contraste de fase. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle (A), e em meio DMEM-F12 contendo PRP nas diluições de 1:50 (B) e 1:100 (C).

4.1.2. Efeitos do PRP na Viabilidade, Morte e Proliferação Celular

O efeito do PRP na viabilidade celular foi realizado pelo ensaio colorimétrico de MTT, conforme o item 3.5. O tratamento com PRP, após 4 dias de cultivo, reduziu significativamente os valores do MTT (absorbância em 540nm) em ambas as diluições avaliadas (1:50 e 1:100), representando uma diminuição de 52,7% e 46,9% em relação às células cultivadas em meio controle (figura 5).

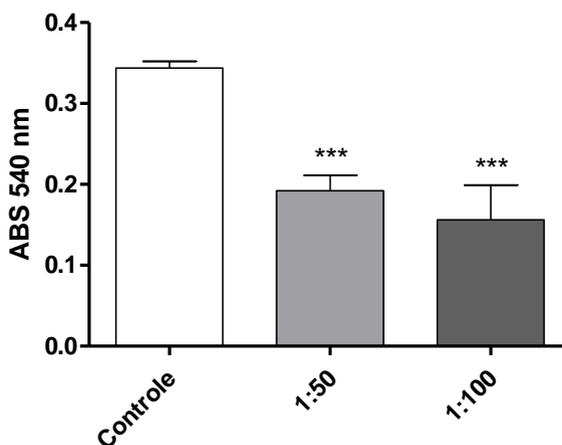


Figura 7. Efeito do PRP na sobrevivência das CTMd pelo ensaio de MTT: As células foram cultivadas por 4 dias em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF (controle), ou com PRP (1:50) (1:100) em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço). Os resultados são expressos em absorbância a 540nm e representam as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicatas. ***p <0.05 vs. controle por ANOVA de uma via seguido por Tukey.

A seguir, foi avaliado o possível efeito do PRP no crescimento celular, pela quantificação do número total de células. Para isso os núcleos totais foram corados por DAPI e quantificados após 4 dias de cultivo, segundo o item 3.7. Assim como no ensaio do MTT, o controle do experimento apresentou número maior de células do que os grupos tratados, porém, apenas na concentração 1:100 de PRP foi observada diferença estatisticamente significativa com uma redução de 16,6% em relação ao controle (Figura6).

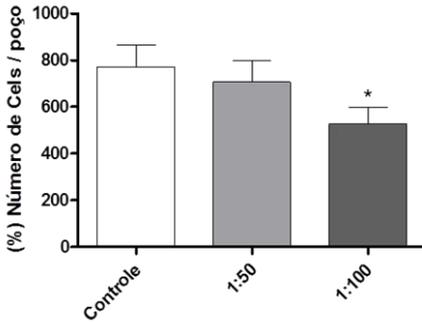
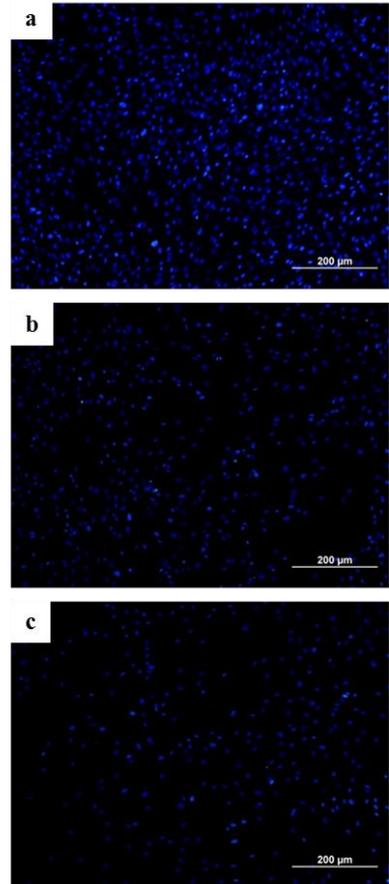
A**B**

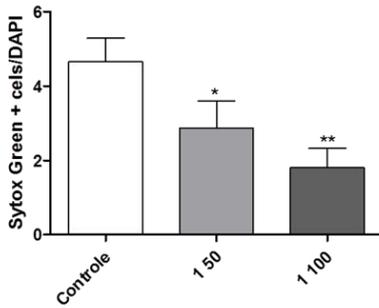
Figura 8. Efeito do tratamento com PRP no número de CTMd, analisadas por DAPI: (A) Representação Gráfica do número de células por poço, expressas pelas médias \pm desvio padrão de seis experimentos independentes realizados em triplicatas, por ANOVA de uma via seguido por Tukey. *** $p < 0.05$ vs. controle. (B) Imagem representativa observada por microscopia de fluorescência em objetiva de 10X, em azul marcação de DAPI. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço), com meio DMDM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle (a) e nas diluições de PRP de 1:50 (b) e 1:100 (c).

Para avaliar se os resultados da análise da viabilidade e do crescimento celular estavam relacionados a um possível efeito tóxico do PRP sobre as CTMd, foi analisada a seguir a morte celular por necrose.

Para este ensaio, as culturas foram incubadas com SYTOX® Green, conforme item 3.8. O SYTOX® Green é um corante fluorescente com afinidade por DNA que penetra apenas em células com membranas plasmáticas comprometidas, quando incubado em culturas de células vivas.

O tratamento com PRP, em ambas as diluições, reduziu de modo significativo a morte celular por necrose, em relação ao controle. O PRP, na diluição de 1:50, promoveu uma redução de 38,9%, enquanto que a diluição de 1:100 de PRP, reduziu 63,4% da morte celular em relação ao controle (figura 7). Esse resultado, em conjunto com os anteriores, sugere que as reduções dos valores do ensaio do MTT não significam redução na viabilidade celular e sim na taxa de crescimento celular.

A



B

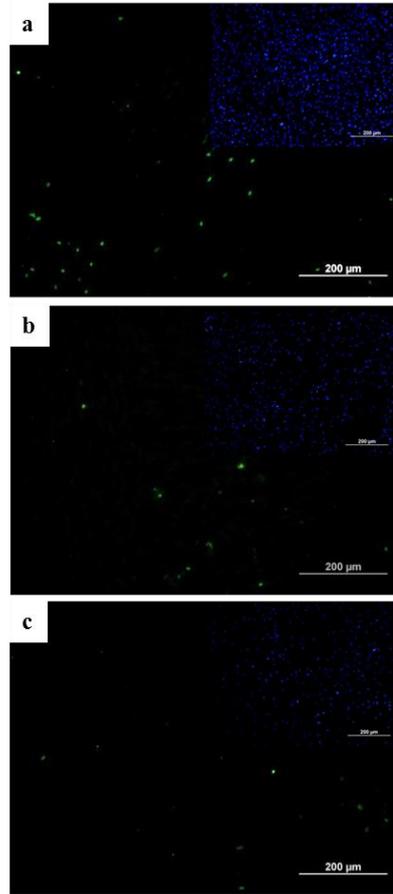


Figura 9. Efeito do PRP na mortalidade por necrose de CTMd: (A) Representação gráfica da morte celular das CTMd cultivadas com PRP. As células positivas para SYTOX® Green foram contadas em nove campos microscópicos aleatórios por condição de cultura, em três experimentos independentes, realizados em triplicatas. A morte celular foi avaliada por incorporação de SYTOX® Green em relação ao número total de células coradas com DAPI. *** $p < 0,05$ vs controle por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. (B) Fotografia representativa de microscopia de fluorescência em objetiva de 10X, mostrando, em azul, marcação de DAPI, e em verde, marcação de SYTOX® Green. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço), com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle (a) e nas diluições de PRP de 1:50 (b) e 1:100 (c).

4.1.3. Efeito de PRP na Produção de colágeno I

No PRP encontram-se diversos fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante $\beta 1$ e $\beta 2$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento endotelial (EGF), capazes de estimular as células a sintetizarem matriz extracelular, em especial o colágeno, e de se diferenciarem para determinados tipos celulares, como células precursoras de vasos, como citado no item 1.5. Devido a esta capacidade de estímulo celular do PRP, foi analisada a seguir a produção de colágeno tipo I.

A produção de colágeno tipo I foi avaliada por imunocitoquímica, como descrito no item 3.6. Os resultados demonstraram aumento de 34,3% e de 14,65% na quantidade de colágeno tipo I nas monocamada de CTMd tratadas com diluições de PRP 1:50 e 1:100, respectivamente, em relação às células cultivadas sob condição controle (Figura 8). Estes dados sugerem que os fatores presentes do PRP estimulam a síntese de colágeno tipo I nas CTMd.

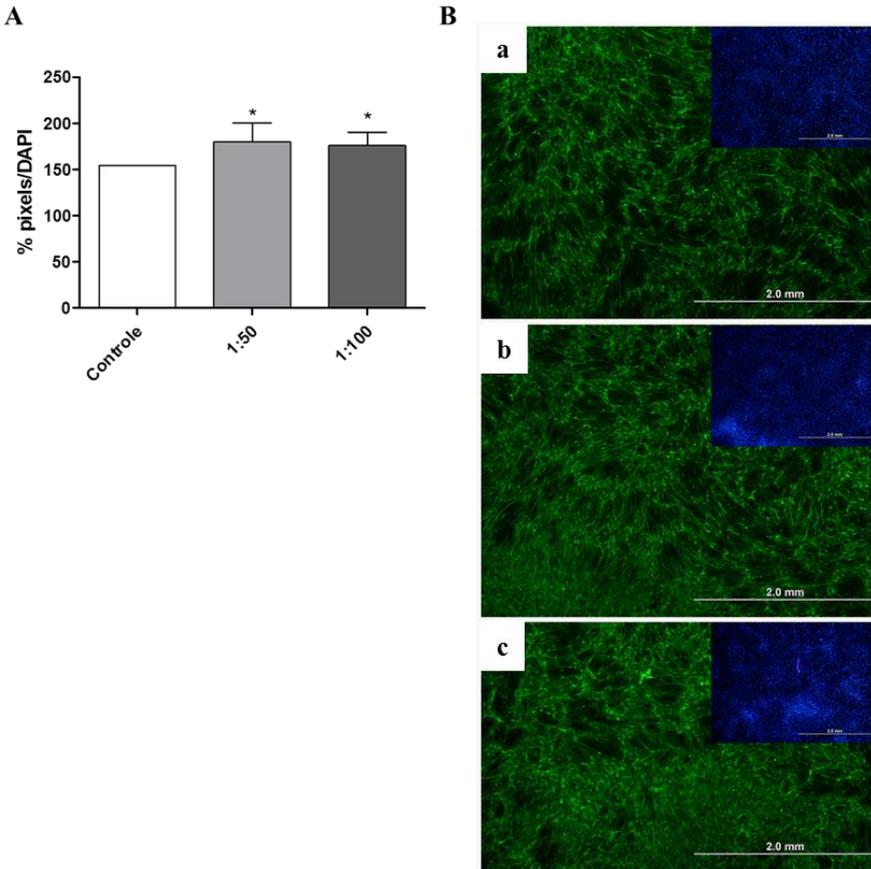


Figura 10. Efeito do tratamento com PRP na síntese de colágeno tipo I pelas CTMd, analisadas por Imunofluorescência: (A) Representação Gráfica do percentual de pixels captados pelo programa ImageJ® de colágeno tipo I vs. DAPI. Foram realizadas análises de dois experimentos independentes em triplicatas, por ANOVA de uma via seguido por Tukey. *** $p < 0.05$ vs. controle. (B) Imagem representativa observada por microscopia de fluorescência em objetiva de 4X, em verde marcação de colágeno tipo I e em azul marcação de DAPI. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço), com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF controle (a) e nas concentrações de 1:50 (b) e 1:100 (c).

4.1.4. Efeito do PRP na diferenciação das CTMd

Para verificar possíveis efeitos do tratamento com PRP na diferenciação das CTMd foram realizadas análises de imunocitoquímica avaliando os fenótipos queratinocítico (marcação de citoqueratina 19); endotelial (marcação de CD 31) e miofibroblasto (marcação de α -SMA), além do ensaio de RT-PCR, para o mRNA de CD 31, conforme os itens 3.6 e 3.11, respectivamente.

Não foram observadas células marcadas para citoqueratina 19 em nenhum dos tratamentos e controle, sugerindo que PRP não promove a diferenciação das CTMd para queratinócitos nas condições avaliadas (dados não mostrados).

Com o objetivo de verificar se o PRP induz CTMd a se diferenciarem para células endoteliais, foram realizadas análises de imunocitoquímica e de RT-PCR para a expressão da proteína CD31. Nas análises de imunocitoquímica, foi observada uma leve marcação após ambos tratamentos com PRP, ausente na condição controle (Figura 9). Para confirmar esse resultado, foram realizadas análises de RT-PCR. Porém, não foi detectada a presença do mRNA de CD31 nas CTMd em nenhum dos tratamentos realizados. Este resultado demonstra que o PRP, nas condições experimentais do presente trabalho, não promove a diferenciação das CTMd em células endoteliais (Figura 9).

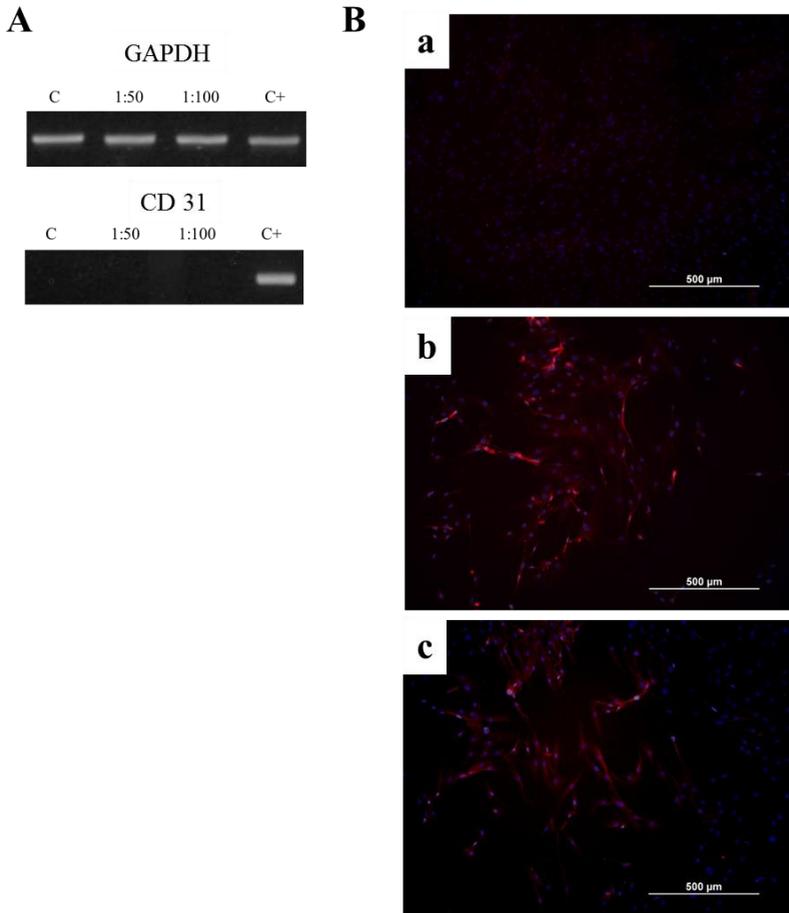


Figura 11. Efeito do tratamento com PRP na expressão de CD31 nas CTMd, analisadas por RT-PCR: (A) Fotografias representativas de produtos de mRNA em gel de agarose, demonstrando que as células tratadas com PRP a 1:50 e a 1:100, bem como as células cultivadas em meio controle. Em todas as condições experimentais há a marcação para GAPDH, que foi usado como controle positivo da RT-PCR Como positivo (C+) para a expressão de CD31 forma utilizados leucócitos humanos de sangue periférico. C: controle, 1:50 e 1:100, concentrações de PRP, C+: leucócitos. (B) Imagem representativa registrada por microscopia de fluorescência em objetiva de 10X, em vermelho, suposta marcação de CD31, em azul, marcação de DAPI. As células foram cultivadas com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle (a) e nas diluições de PRP de 1:50 (b) e 1:100 (c).

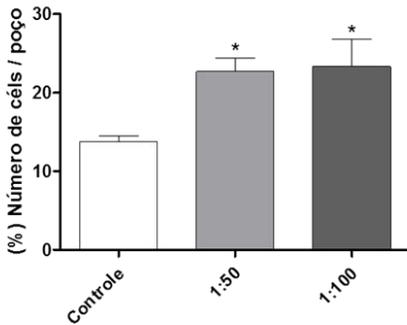
Resultados em andamento da tese de doutorado de Talita Jeremias demonstram que as CTMd, quando cultivadas *in vitro*, expressam a proteína α -SMA em proporções baixas (JEREMIAS, *et al.*, em andamento). Visando analisar o efeito do PRP na diferenciação das CTMd em células de músculo liso/ miofibroblasto, foi realizada a análise de imunocitoquímica para a proteína α -SMA, segundo o item 3.6.

Os resultados obtidos demonstraram que as diluições 1:50 e 1:100 de PRP promoveram um aumento de 22,69% e de 23,34% na proporção das células positivas para α -SMA, quando comparadas com as células cultivadas em condições controle (Figura 10).

Adicionalmente, constatou-se que as CTMd positivas para aSMA apresentavam diversas morfologias, conforme descrito na literatura: morfologia triangular (Figura 12-A/a), rombus (Figura 12-A/b), filopodia-filopodia (Figura 12-A/c) e lamelipodia-filopodia (Figura 12-A/d) (MONTESINOS, *et al.*, 2009).

Na situação controle, 22,5% das células apresentaram morfologia triangular, sendo que, no grupo de tratamento com PRP nas diluições 1:50 e 1:100, apenas 5% das células apresentaram esta morfologia (Figura 12-B/a). A morfologia rombus foi observada em 18% das células na situação controle, porém, apenas 3% e 9% das células tratadas com PRP, diluições 1:50 e 1:100, respectivamente, apresentavam essa morfologia (Figura 12-B/b). Concomitantemente, houve aumento na proporção de células com morfologia filopodia-filopodia e lamelipodia-filopodia. A morfologia filopodia-filopodia foi observada em 11,5% das células controle, passando para 57% e 46% das células após tratamento com PRP nas diluições de 1:50 e 1:100, respectivamente. Já a morfologia lamelipodia-filopodia, presente em 49,5% das células controle, passou para 36% e 40 % das células após os respectivos tratamentos.

A



B

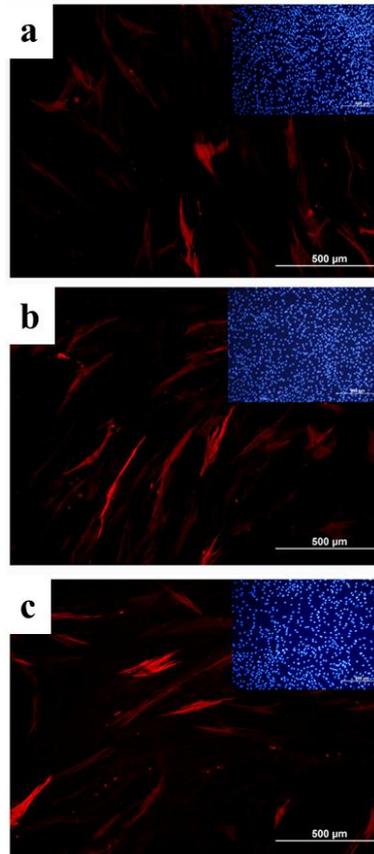
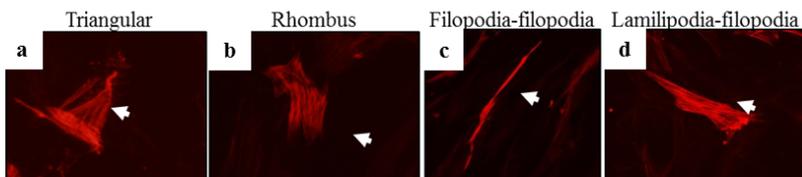


Figura 12. Efeito do tratamento com PRP na expressão α -SMA em CTMd, analisadas por Imunofluorescência: (A) Representação Gráfica do percentual do número de células positivas para α -SMA, as células foram contadas em nove campos randômicos por condição de cultura em três experimentos independentes realizados em triplicatas, ** $p < 0,05$ versus controle por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. (B) Imagem representativa observada por microscopia de fluorescência em objetiva de 10X, em vermelho, marcação por α -SMA, em azul marcação de DAPI. As células foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço), com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle (a) e nas concentrações de 1:50 (b) e 1:100 (c).

A



B

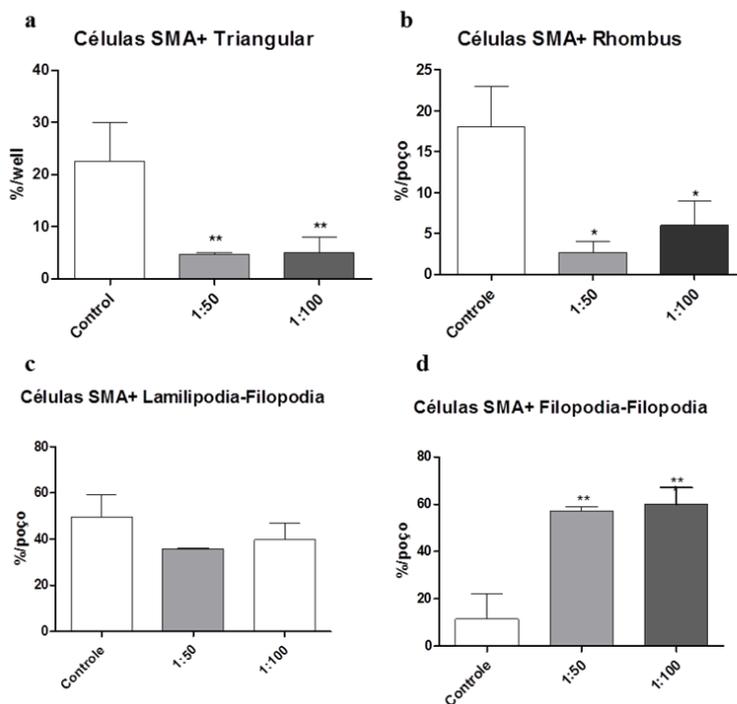


Figura 13. Efeito do tratamento com PRP na morfologia de CTMd positivas para α -SMA, analisadas por Imunofluorescência: (A) Imagens representativas das CTMd, observadas por microscopia de fluorescência em objetiva de 10X. Em vermelho, marcação por α -SMA, apresentando as morfologias: triangular (a), rombus (b), lamilipodia-filopodia (c) e filopodia-filopodia (d). (B) Representação Gráfica do número de células positivas para α -SMA observadas em suas diferentes morfologias: triangular(a) , rhombus (b), lamilipodia-filopodia (c) e filopodia-filopodia (d). As células foram analisadas, em nove campos microscópicos de 10X randômicos por condição de cultura de três experimentos independentes realizados em triplicatas,. ** $p < 0,05$ versus controle por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey. As células foram cultivadas com meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle e nas concentrações de 1:50 e 1:100.

4.2. Avaliação dos efeitos do PRP sobre as CTMd em cultivo tridimensional com a matriz de regeneração dérmica Integra®

A interação célula-matriz extracelular é capaz de intermediar respostas fisiológicas responsáveis pelo controle do crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência celular além da organização do tecido e remodelamento da matriz (BIRGERS-DOTTER *et al.*, 2005). Tendo em vista a importância do ambiente tridimensional para o comportamento celular, e, buscando novas alternativas para tratamentos de lesões de pele, foram realizados ensaios *in vitro* associando as CTMd e o PRP à MRD Integra®

Para tanto, as CTMd foram cultivadas na MRD Integra®, conforme descrito no item 3.4. As células foram cultivadas no meio controle (DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF) ou na presença de PRP (diluições 1:50 e 1:100). Após cinco dias de cultivo, as células foram avaliadas quanto à morfologia, viabilidade e diferenciação celular. Para tal, foram realizadas análises de MEV, MTT, RT-PCR e *Western blot*.

4.2.1. Efeito do PRP na viabilidade das CTMd cultivadas na MRD Integra®

Para analisar o efeito do PRP na viabilidade das CTMd cultivadas em MRD, foi realizado o ensaio colorimétrico de MTT, após 24h e 5 dias de cultivo celular.

Os testes realizados após 24h de tratamento foram utilizados para avaliar a viabilidade celular no momento inicial do cultivo. Nestas condições, não houveram diferenças significativas entre os grupos controle e tratados com PRP. No entanto, no quinto dia de cultivo, notou-se que o tratamento com PRP reduziu significativamente a viabilidade das CTMd, em relação às células cultivadas em meio controle (Figura 12), de modo semelhante ao observado no cultivo bidimensional. Estes resultados sugerem que, no momento inicial da cultura, as CTMd mantém a sua viabilidade quando cultivadas sobre a MRD Integra®. Contudo, após um período maior de tratamento, há um declínio na quantidade de células quando tratadas com PRP.

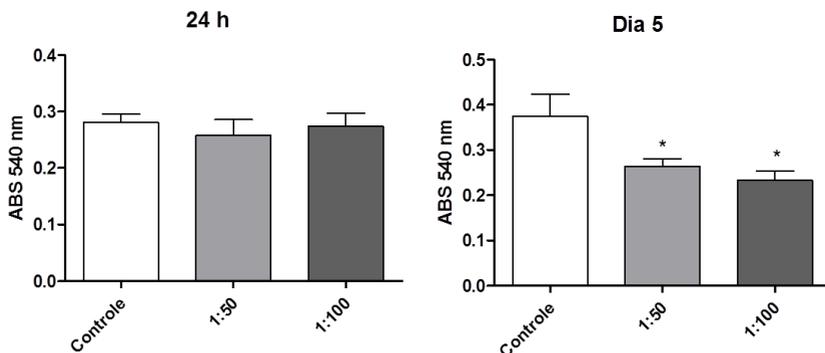


Figura 14. Efeito do PRP na viabilidade das CTMd cultivadas na MRD integra®, pelo ensaio de MTT: As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF (controle), e em PRP (1:50) (1:100). Os resultados são expressos pelos valores obtidos da absorbância das amostras/poço de 96 poços e representam as médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em quadruplicatas. *** $p < 0.05$ vs. controle por ANOVA de uma via seguido por Tukey.

4.2.1. Efeito do PRP na Morfologia e Adesão das CTMd associadas à MRD integra®

A interação entre as células cultivadas sobre a MRD integra® foi analisada através da técnica de MEV. As micrografias de MEV revelaram que as CTMd mantêm a capacidade de aderir à MRD quando tratadas com PRP em ambas as diluições de 1:50 e 1:100, bem como quando mantidas em meio controle (DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF) (Figuras 13).

No entanto, foram constatadas alterações na morfologia e na interação com a matriz quando as células eram mantidas na presença do PRP, comparativamente com a situação controle (figura 13). Nas células mantidas em meio controle, foram observadas morfologias semelhantes aos resultados de marcação para α -SMA no cultivo bidimensional (Figura 11). A maioria das células nestas condições apresentavam tamanho reduzido, com morfologia triangular (setas na figura 14/A) ou romboide (setas na figura 14/B). Porém, uma proporção de células apresentavam a morfologia lamelipodia-filopodia (setas na figura 14/D) ou com prolongamentos celulares (setas na figura 14/C)

Após o tratamento com PRP, pôde-se observar que as CTMd eram mais alongadas (Figura 13/C/E), assumindo, em sua maioria, morfologias filopodia-filopodia (Figuras 15/A;B;E;F e 16/A;B;C;E;F) e lamelipodia-filopodia (Figuras 15/C;D;E;F e 16/A;B;D;E), concordando com os resultados de cultivo bidimensional. Adicionalmente, foi possível visualizar interações entre as células, emissão de pseudópodes e presença de múltiplos pontos de adesão à matriz (Figuras 15 e 16, indicado por setas), sugerindo que as células, após o tratamento com PRP, assumiram característica migratória (EVEN-RAM ; YAMADA, 2005).

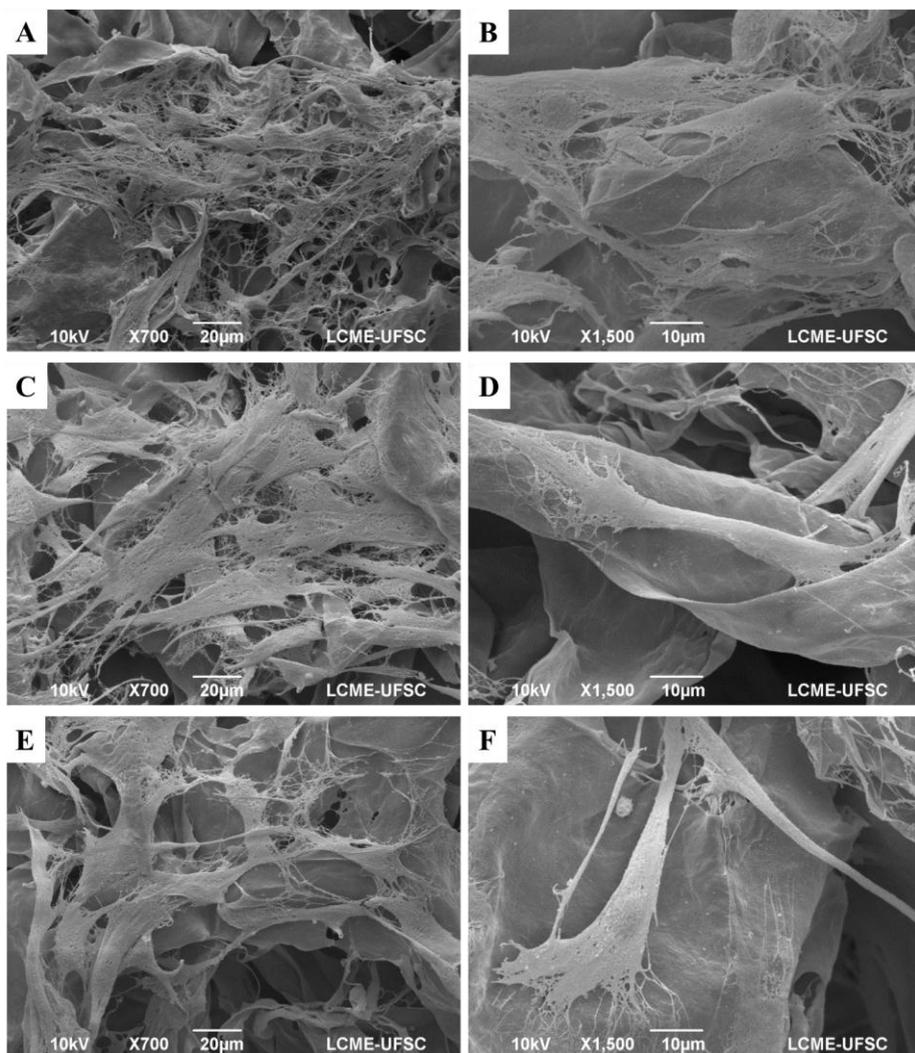


Figura 15. Morfologia de CTMd cultivadas em MRD Integra® e analisadas por MEV: (A;B) controle, células pequenas (C;D) CTMd tratada com 1:50 de PRP, células maiores, com prolongamentos. (E;F) CTMd tratadas com 1:100 de PRP, células maiores, com prolongamentos. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, controle, e em meio DMEM-F12 com as diluições de PRP 1:150 e 1:100, sobre a MRD integra®.

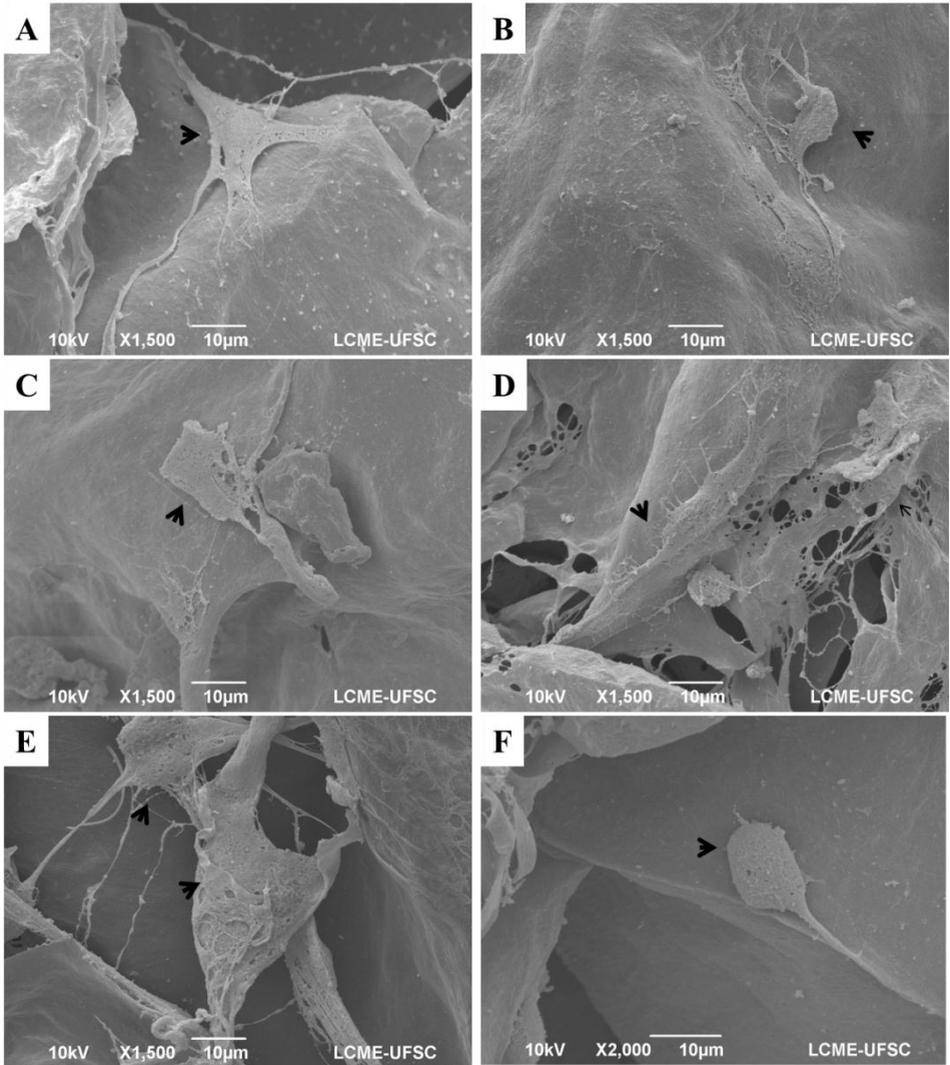


Figura 16. Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo Controle, analisadas por MEV: A: morfologia triangular. (B) célula se aderindo à MRD integra®. (C) morfologia romboide, com poucos prolongamentos e interações com a MRD. (D) célula com morfologia lamilipodia-filopodia, com prolongamentos e pontos de adesão à matriz. (E) morfologia romboide e triangular, contato célula-célula por prolongamentos citoplasmáticos (F) célula aderindo a matriz, com poucos pontos de adesão. As células foram cultivadas em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF, sobre a MRD Integra®.

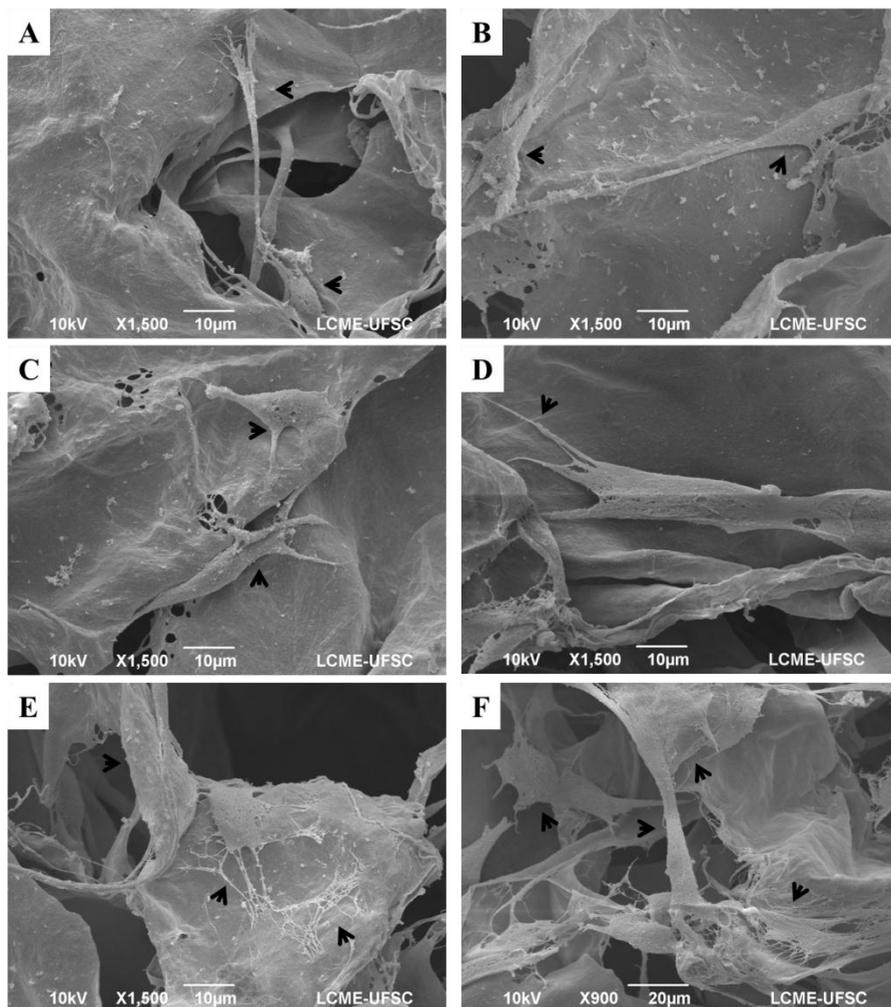


Figura 17. Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo de tratamento 1:50, analisadas por MEV: (A) morfologia filopodia-filopodia com emissões de prolongamentos e interação célula-célula. (B) morfologia filopodia-filopodia com interação célula-célula. (C) morfologia rhombus e lamelipodia-filopodia, com interação entre as células e emissões de filopódios. (D) detalhe da emissão de filopódios em célula com morfologia lamelipodia-filopodia, (E) célula com morfologia romboide, possuindo muitos pontos de adesão à matriz e prolongamentos. (F) Múltiplos pontos de interação entre célula-célula e à matriz, além de emissões de pseudópodos. As células foram cultivadas com 1:50 de PRP sobre a MRD Integra®.

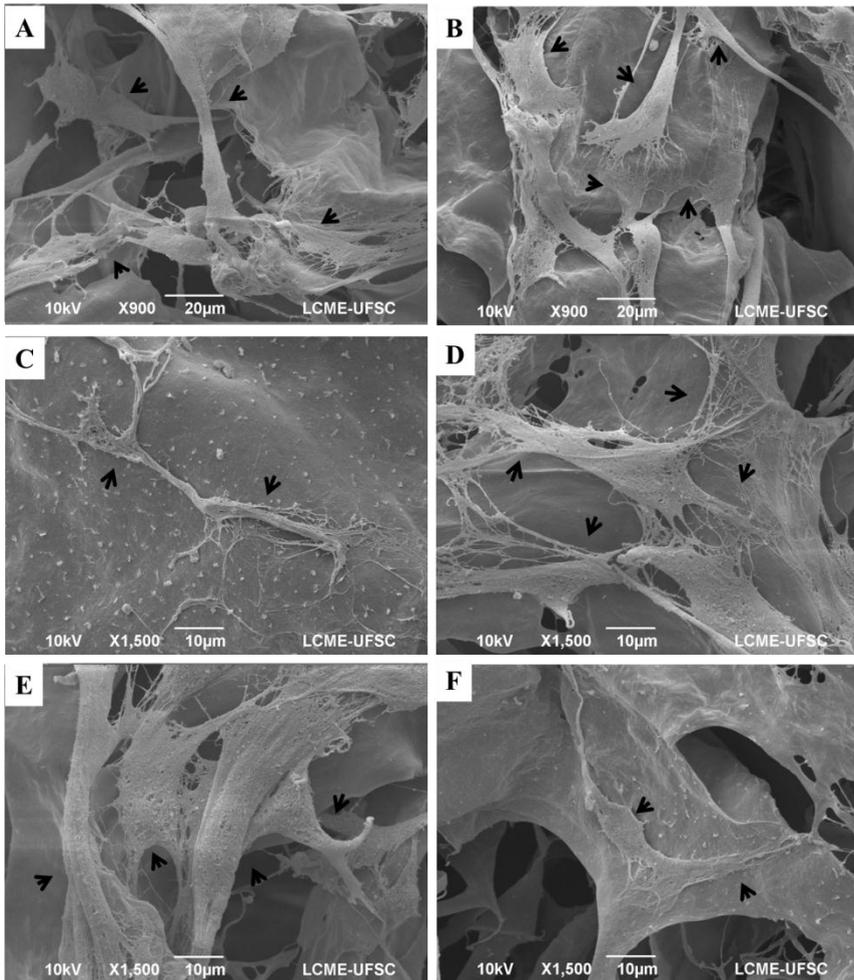


Figura 18. Morfologia de CTMd cultivadas em MRD no grupo de tratamento 1:100, analisadas por MEV: (A) células com morfologias lamelipodia-filopodia e triangular com interação célula-célula, (B) células apresentando morfologia lamelipodia-filopodia, filopodia-filopodia e rombus, com pontos de interação com a matriz e interação celular, (C) morfologia filopodia-filopodia, com pontos de adesão à matriz e emissões de prolongamentos, (D) células lamelipodia-filopodia, interagindo entre si e com a MRD (E) células apresentando morfologia filipodia-filopodia, rombus, filopodio-lamelipodio e triangular, interagindo entre si e com a matriz (F) célula com morfologia filopodia-filopodia, com emissão de prolongamentos. As células foram cultivadas com 1:100 de PRP sobre a MRD Integra®.

4.1.3. Efeito do PRP na Diferenciação das CTMd cultivadas na MRD Integra®

Tendo em vista os resultados obtidos pelo cultivo bidimensional, foram realizadas análises quanto à diferenciação celular para os fenótipos endotelial e miofibroblástico.

A expressão do fenótipo endotelial foi realizada por RT-PCR, para CD31. Não foi detectada expressão do mRNA de CD31 em nenhuma das condições experimentais (Figura 17). Este resultado coincide com os resultados observados em ambiente bidimensional (Figura 9) e sugerem que PRP, associado ao ambiente tridimensional oferecido pela MRD, não influencia a diferenciação das CTMd em células endoteliais.

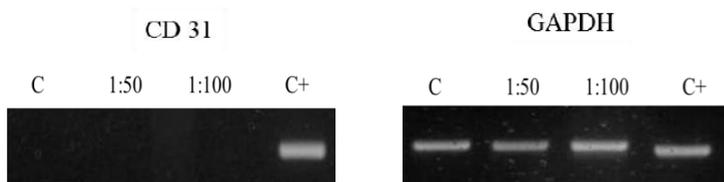


Figura 19. Efeito do PRP sobre CTMd associadas à MRD Integra avaliado pela expressão de mRNA para CD31 por RT-PCR: Fotografias representativas de produtos de mRNA em gel de agarose, demonstrando que as células tratadas com PRP (1:50 e 1:100), bem como as células cultivadas em meio controle (DMEM/F12 acrescido de 15% de SBF), expressam GAPDH, o qual foi utilizado como controle positivo da RT-PCR, e não expressam o mRNA de CD 31. C: controle, 1:50 e 1:100, concentrações de PRP, C+: leucócitos como controle positivo para a expressão do mRNA de CD31.

Para analisar se o PRP possui influência sobre as CTMd cultivadas em ambiente tridimensional na expressão de α -SMA, foram realizadas análises de *Western blot*. Os resultados obtidos demonstraram que as diluições 1:50 e 1:100 de PRP promoveram um aumento de $9,00\% \pm 6,91$ e $5,55\% \pm 2,84$, respectivamente, na síntese α -SMA, quando comparadas com as células cultivadas em condições controle. No entanto, estes resultados não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 18).

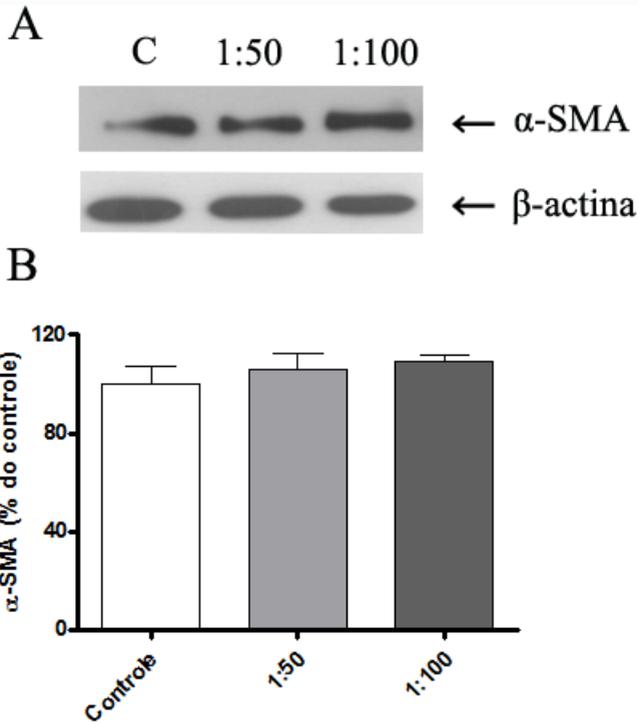


Figura 20: Análise da expressão proteica de α -SMA em CTMd tratadas com PRP e cultivadas na MRD integra® por Western blot. (A) Fotografia representativa de *Western blot* para α -SMA e β -actina em CTMd na situação controle e após tratamento com PRP. (B) Representação gráfica dos valores obtidos pela razão da densitometria de bandas imunorreativas de α -SMA pela β -actina. Os valores obtidos na situação controle foram considerados 100 %, enquanto os valores obtidos nas diluições de PRP foram calculados como porcentagem do controle. Os resultados são expressos como médias + erro padrão de cinco experimentos independentes, em triplicata. $p = 0,56$ versus controle.

5. DISCUSSÃO

As CTM, por suas características de obtenção reprodutível por métodos padronizados e alta plasticidade *in vitro*, vêm atraindo a atenção de pesquisadores que visam a sua utilização como agente terapêutico para o tratamento de várias doenças (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009). As CTM estão sendo visadas ainda como componente biológico para reposição tecidual em lesões, como abordado em trabalho recente que associa CTM de medula óssea humana, a MRD Integra® e o PRP (FORMIGLI *et al.*, 2011). Neste sentido, estudos que abordam a tríade da Engenharia Tecidual (célula, fatores de crescimento e substrato) são fundamentais para o desenvolvimento de aplicações terapêuticas.

Outro aspecto a ser considerado no desenvolvimento de estratégias da Engenharia de Tecidos é a identificação de fontes de CTM capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares (BERTANI *et al.*, 2005). A pele pode ser considerada uma boa fonte de obtenção e, dentre os diversos tipos de CTs na pele, destacam-se as CTMd, que vêm ganhando destaque na regeneração e reparo de tecidos lesionados (BLANPAIN; FUCHS, 2006).

No presente trabalho buscou-se avaliar o uso do PRP, como fonte de fatores de crescimento, sobre diferentes aspectos morfofuncionais das CTMd humana em ambientes de cultivo bidimensional e tridimensional, associados à MRD integra®.

As CTM são caracterizadas pela morfologia fibroblastóide e alta adesão ao plástico em cultura (DOMINICI, *et al.*, 2006). Os resultados obtidos com o cultivo bidimensional das CTMd foram consistentes com o padrão de caracterização descritos na literatura, demonstrando que o tratamento com PRP nesse ambiente as células mantem a morfologia fibroblastóide e alta adesão ao plástico (Figura 6).

Para avaliar os efeitos do PRP na viabilidade celular, inicialmente foi realizado o ensaio de MTT. É importante salientar que o ensaio de MTT reflete alterações da viabilidade celular, taxa de crescimento celular ou atividade mitocondrial, uma vez que se baseia na redução de um sal de tetrazólio realizada pelas enzimas desidrogenases mitocondriais, presentes em células vivas (GERLIER; THOMASSET, 1984). Os resultados demonstraram redução nos valores do MTT em CTMd tratadas com PRP, o que sugere diminuição do número de células promovida por menor taxa de proliferação ou elevada morte celular. Para avaliar a possível redução no número de células nas culturas tratadas com PRP, foi realizada a contagem de núcleos totais. O

resultado revelou diminuição no número total de CTMd após tratamento com PRP (Figura 8), coerente com os resultados do MTT. Esse efeito foi acompanhado na redução de células necróticas, demonstrando que o PRP diminui as taxas de mortalidade celular por necrose (Figura 9), sugerindo, dessa forma, que o PRP, nessas diluições (1:50 e 1:100), não é tóxico para as CTMd, corroborando com os resultados de Formigli e colaboradores (2011).

A diminuição no número de CTMd, promovida por PRP, pode ser explicada pela diminuição na taxa de proliferação celular, o que é coerente com um estímulo à diferenciação celular. Essa possibilidade foi avaliada pela expressão de marcadores proteicos e moleculares, relacionados à diferenciação de queratinócitos (citoqueratina 19), células endoteliais (CD31) e células de músculo liso/miofibroblastos (α -SMA). Não foram observadas marcações para citoqueratina 19, nem para CD31 (Figura 11), no controle e após tratamento com PRP, sugerindo que as CTMd não diferenciam para queratinócitos e nem células endoteliais nas condições experimentais analisadas. Estes resultados estão de acordo com obtidos por Formigli e colaboradores (2011).

No entanto, os resultados demonstram aumento significativo no número de células positivas para α -SMA, sugerindo que PRP possa estar estimulando a diferenciação das CTMd para o fenótipo muscular liso ou de miofibroblastos (Figura 12), uma vez que estes são caracterizados pela expressão da isoforma alfa da actina (α -SMA) (TOMASEK, *et al.*, 2002). Estes resultados corroboram com trabalhos recentes, que demonstraram que, na presença de PRP, CTs de tendão e fibroblastos provenientes de gengiva se diferenciaram de maneira significativa para células positivas para α -SMA, semelhantes à miofibroblastos (ZHANG, *et al.*, 2010 ; CÁCERES, *et al.*, 2008). O efeito do PRP em estimular a diferenciação das CTMd para células semelhantes à músculo liso ou miofibroblastos, pode estar relacionada à presença de altas concentrações de TGF- β 1 e PDGF. Estes fatores de crescimento foram descritos como importantes indutores da diferenciação celular de fibroblastos e de CTM para o fenótipo de miofibroblasto (HINZ, *et al.*, 2001 ; CHRISTGAU, *et al.*, 2006 ; LIU, *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* demonstram que os miofibroblastos se originam de células negativas para α -SMA, e estão associados à maior capacidade de contração do citoesqueleto (ARORA; MCCULLOCH, 1994).

Os efeitos do PRP na diferenciação das CTMd para o fenótipo de músculo liso ou de miofibroblasto, pode ser evidenciado também pelos resultados de alterações morfológicas. Foram observados 4 tipos de

morfologias celulares, sendo elas: romboide, triangular, lamelipodia-filopodia e filopodia-filopodia (MONTESINOS, *et al.*, 2009) (Figura 13). Alguns autores sugerem que estas diferentes morfologias estão relacionadas à auto-renovação e/ou estado de maturação celular (COLTER, *et al.*, 2001). Na condição controle, havia predomínio de células de pequeno tamanho com morfologia romboide e triangular, o que pode estar relacionado a uma maior proliferação celular e estado mais indiferenciado (MONTESINOS, *et al.*, 2009), estando de acordo com os resultados de viabilidade e de quantificação celular. Nesta condição, foi observada grande quantidade de células lamelipodia-filopodia com morfologia fibroblastóide, a qual é considerada a principal morfologia existente em populações de CTM (DOMINICI, *et al.*, 2006). Após o tratamento com PRP, no entanto, foi constatada presença predominante de células de tamanho maior, em sua maioria com morfologia lamelipodia-filopodia ou filopodia-filopodia, com muitos prolongamentos citoplasmáticos. Esses resultados de alteração morfológica, em conjunto com os de diferenciação, viabilidade e quantificação celular, podem sugerir efeito do PRP na diferenciação celular, em que as células deixam de expressar características morfológicas de células indiferenciadas e com grande potencial de divisão celular, e passam a assumir características mais diferenciadas e com menor taxa de crescimento celular (JUNQUEIRA ; CARNEIRO, 2012).

Além disso, é possível que as células positivas para α -SMA estejam assumindo um caráter migratório. As CTM, ao entrarem em processo de migração celular, adotam morfologia fusiforme, com prolongamentos celulares, semelhante à fibroblastos, mioblastos e de células endoteliais individuais ou células de sarcoma (FRIELD, 2004). As morfologias observadas nas monocamadas de CTMd tratadas com PRP com prolongamentos citoplasmáticos foram consistentes com o padrão descrito por Field (2004).

Durante a cicatrização de feridas, a síntese de colágeno, modulada por fatores de crescimento, é considerada essencial para a reconstituição do tecido perdido (SCHAFFER, *et al.*, 1996). Logo após o ferimento, uma matriz provisória de fibronectina, fibrinogenio, fibrina, e vitronectina é formada na área da ferida. Após este processo, os fibroblastos devem sintetizar uma nova matriz de colágeno para que a reconstituição do tecido seja efetivada (SCHAFFER, *et al.*, 1996). Neste trabalho, foi observado maior marcação de colágeno tipo I após o tratamento com PRP em relação às células mantidas em meio controle (Figura 10). Este resultado pode estar relacionado à presença de TGF- β

no PRP, importante para a síntese de colágeno tipo I (SHU-JEN, *et al.*, 1999). Estudos realizados por Kakudo e colaboradores (2011), demonstraram reepitelização mais rápida com PRP em lesões de pele humana, apresentando melhor organização e maior número de fibras de colágeno em relação às feridas não tratadas. Desse modo, em conjunto com resultados apresentados neste trabalho, pode-se sugerir que uso de PRP em lesões de pele possa estimular os fibroblastos das bordas da lesão a sintetizar colágeno tipo I, contribuindo para reconstituição da matriz em menor período de tempo.

Em conjunto, os resultados dos experimentos de tratamento com PRP das CTMd em cultivo bidimensional sugerem um grande potencial para aplicação em terapias celulares e na reconstituição tecidual. No entanto, para elucidar o completo potencial na Medicina Regenerativa, é necessário avaliar, *in vitro*, ambientes experimentais que mimetizem ao máximo a arquitetura e a fisiologia do ambiente encontrado por essas células *in vivo* (GODIER *et al.*, 2008). Além das CT e dos fatores de crescimento, a Engenharia de Tecidos também dispõe de um terceiro elemento, que é o substrato. Tendo em vista a íntima relação entre as CT e o seu microambiente extracelular, estruturas tridimensionais que mimetizem ao máximo a arquitetura e fisiologia do ambiente encontrado pelas CT *in vivo*, vêm sendo desenvolvidas. No contexto de bioengenharia de tecidos dérmicos, MRDs feitas de polímeros naturais, biocompatíveis e biodegradáveis estão sendo produzidas e caracterizadas para utilização em estudos de comportamento e mecanismos celulares bem como para aplicações clínicas (MANN, 2003; DONG *et al.*, 2009). Nesse sentido, uma das principais MRD testadas e utilizadas na clínica atual é o Integra®.

No presente trabalho, as CTMd foram cultivadas sobre a MRD Integra® e tratadas com PRP. Inicialmente, foi avaliada a viabilidade celular pelo ensaio do MTT. Com 24 horas de cultivo os valores foram similares entre as condições analisadas, sugerindo que, inicialmente, a associação do PRP com a MRD não produz toxicidade e nem altera a adesão celular (Figura 14/A). No 5º dia de cultivo, no entanto, constatou-se diminuição nos valores do MTT com o tratamento com PRP de modo similar ao observado nos experimentos bidimensionais (Figura 14/B).

Em ambiente tridimensional, 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 extracelular (BIRGERS-DOTTER, *et al.*, 2005; MARTIN, 1997). Neste estudo, os

efeitos do PRP sobre a adesão e morfologia das CTMd no Integra® foi avaliado por MEV. Os resultados sugerem aumento na capacidade de adesão à MRD após tratamento com PRP, demonstrada pela maior quantidade de pontos de adesão celular ao Integra® em relação ao controle (Figuras 15, 16, 17 e 18). Nesta condição, poucas células apresentavam a morfologia rombus ou triangular, e, em maior parte, apresentavam células alongadas e fibroblastoides, apresentando muitas emissões citoplasmáticas e prolongamentos semelhantes à pseudópodos, corroborando com os resultados obtidos nos experimentos em condições bidimensional e sugerindo possível característica migratória (FRIELD, 2004) (Figuras 15, 16, 17 e 18).

A morfologia alongada e a adesão celular são mediadas pela presença de forças de tração altas em ambos os polos celulares, promovidas, em grande parte, pelas integrinas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). O fator de crescimento TGF- β 1 modula a regulação das integrinas β 1 e β 3, responsáveis pela adesão e morfologia celular alongada (HEINO; MASSAGUE, 1989 ; HEINO, *et al.*, 1989). Segundo Xu e Clark (1996), o fator de crescimento EGF também demonstrou estimular a expressão da integrina β 1 em células de fibroblasto embrionário de camundongo 3T3. Adicionalmente, Bellas e colaboradores (1991) demonstraram que o fator PDGF-BB induziu a expressão de integrinas- α 5 em fibroblastos de pele. Esses três fatores de crescimento (TGF- β 1, EGF e PDGF-BB) estão presentes no PRP (CENNI *et al.*, 2010; KASTEN *et al.*, 2008), desta forma, podem estar relacionados com os resultados de adesão e morfologia observados no presente trabalho.

Neste trabalho, foi analisado ainda, o efeito do PRP em estimular a diferenciação das CTMd quando cultivadas em associação à MRD Integra®. Assim como nos resultados obtidos no cultivo bidimensional, não foi detectado o marcador endotelial CD31 (Figura 19). Porém, se encontrou aumento na expressão do marcador de musculo liso/miofibroblasto, α -SMA (Figura 20), após tratamento com PRP, corroborando com os resultados bidimensionais, e de acordo com os resultados de Cáceres e colaboradores (2008).

Os resultados de alterações morfológicas, juntamente com a expressão elevada de α -SMA, apresentados neste trabalho, sugerem que, no ambiente tridimensional apresentado pela MRD Integra®, o PRP estimula a diferenciação das CTMd para fenótipo similar ao muscular liso ou miofibroblástico. Este resultado é relevante para a regeneração de tecidos, já que a migração celular e a diferenciação miofibroblástica são essenciais para a cicatrização de feridas. Estudos relatam que as

células miofibroblásticas são responsáveis por mediações celulares envolvendo a contração da matriz extracelular. Através da contração do citoesqueleto de actina, os miofibroblastos são capazes de reduzir o tamanho inicial da ferida e, assim, contribuir para a reparação dos tecidos. (TOMASEK, *et al.*, 2002). Além disto, os miofibroblastos também desempenham um papel significativo durante a contração do tecido na fase granulação da cicatrização (DARBY ; GABBIANI, 1990 ; ARORA; MCCULLOCH, 1994).

Contudo, na regeneração de grandes lesões de pele, é importante que o tecido lesado seja reconstituído em curto período de tempo (SCHURR *et al.*, 2009). Nesse sentido, a MRD Integra® oferece um fechamento imediato à lesão, evitando que a área afetada fique exposta a perdas hídricas e a agentes externos, como bactérias, e um análogo à matriz extracelular, fornecendo um molde para o crescimento organizado de células no local lesado e orientando fatores do crescimento na sua apresentação às células (ROBEY; BIANCO, 2004). Na clínica, após a aplicação do Integra®, a neoformação vascular necessita de um longo período (de três a seis semanas) após a lesão para a realização da enxertia autóloga. Entretanto, em alguns casos, pela falta ou precariedade de vascularização no local da lesão, há necessidade de uma espera maior para este procedimento, o que atrasa o processo de cicatrização e pode levar a sequelas graves, como retrações, cicatrizes hipertróficas e perda de função do tecido (SHERIDAN *et al.*, 2001).

Visando diminuir o tempo de espera do paciente para uma nova enxertia e evitar possíveis sequelas, a interação apresentada pelos bio-componentes utilizados no presente trabalho pode representar um avanço neste tratamento. Uma vez que os componentes moleculares do PRP podem estimular a diferenciação das CTMd para miofibroblastos, assim como a sua adesão e migração sobre o Integra®, pode-se sugerir uma melhor taxa de vascularização e de integração da matriz no local lesionado. Dessa forma o intervalo de espera da neoderme vascularizada e o tempo de internação do paciente poderão ser reduzidos.

Fundamentalmente, a tríade: PRP, CTMd e Integra®, constituem um microambiente efetivo para o crescimento, a viabilidade, a migração, a adesão e a diferenciação das CTMd, possibilitando que esse sistema tridimensional seja utilizado em ensaios pré-clínicos com animais e, se for bem sucedido, poderá representar um potencial tratamento para aplicações terapêuticas na Engenharia de Tecidos.

6. CONCLUSÕES:

- Em cultivo bidimensional, as CTMd tratadas com PRP não apresentaram morte por necrose e demonstraram maior sobrevida em cultura, porém, houve redução na atividade celular, o que foi coerente com a diminuição da quantidade de células observadas nas culturas submetidas à este tratamento.

- Em cultivo bidimensional, o PRP promoveu maior expressão de α -SMA pelas CTMd, além disso, as células que expressaram este marcador apresentaram, em sua maioria, morfologias alongadas e fibroblastóides, coerentes com caráter migratório e com a diferenciação celular para fenótipo similar ao muscular liso ou miofibroblástico. No entanto, não estimulou a diferenciação destas células para os fenótipos endotelial e queratinocítico.

- O tratamento com o PRP, em cultivo bidimensional, promove uma maior deposição de colágeno tipo I pelas CTMd.

- Em cultivo tridimensional associado à MRD Integra®, o PRP demonstrou não ser tóxico e nem alterar a adesão celular das CTMd, mantendo a viabilidade das mesmas nas primeiras 24h de cultivo.

- Em cultivo tridimensional associado à MRD Integra®, o PRP promoveu mudanças morfológicas nas CTMd, que apresentaram células fibroblastóides alongadas. Além disso, o tratamento promoveu maior expressão de α -SMA, demonstrando diferenciação em fenótipo similar ao muscular liso ou miofibroblástico. Porém, não promoveu a diferenciação endotelial.

- As CTMd tratadas com ambas as diluições de PRP apresentaram maior aptidão para se aderir e colonizar a MRD Integra®, demonstrando morfologias

similares às de CTMs migratórias, com muitos pontos de adesão à MRD Integra® e estruturas citoplasmáticas semelhantes à pseudópodos.

- A associação das CTMd com o PRP e a MRD Integra® formam *in vitro* um microambiente efetivo para o crescimento, a viabilidade, a migração, a adesão e a diferenciação das CTMd, representando um potencial tratamento para aplicações terapêuticas na Engenharia de Tecidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBAS O. AND MAHALINGAM M. Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. **British Journal of Dermatology**, v. 161, p. 228–236, 2009

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

ANITUA, E.; Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of sites for implants, **Int. J. Oral Maxillofac.** V.14, p.529–535, 1999.

ANITUA E, AGUIRRE JJ, ALGORTA J, *et al.* Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater** , v. 84, p. 415–421, 2008.

ANTHONY, E. T. et al. The development of novel dermal matrices for cutaneous wound healing. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v.3, n.1, p.81-87, 2006.

ARORA, P.D.; MCCULLOCH, C.A.G. Dependence of collagen remodelling on α -smooth muscle actin expression in fibroblasts. **J Cell Physiol**, v.159, p.161-175, 1994.

BARTHEL, R.; ABERDAM, D. Epidermal stem cell. **JEADV**, v.19, p.1-9, 2005

BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns**, v. 27, n.5, p.534-544, 2001.

BELLAS, R.E.; BENDORI, R.; FARMER, S.R. Epidermal growth factor activation of vinculin and b1-integrin gene expression in quiescent Swiss 3T3 cells: Regulation through a protein kinase C-independent pathway. **J Biol Chem**, v.266, p.12008-12014, 1991.

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.

BJERRUM, O.J.H. CRC handbook of immunoblotting of proteins. **CRC press**, vol. 1, 1988.

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.

BIANCO P, ROBEY PG. Stem cell in tissueengineering. **Nature** , v414, p.118–121, 2001.

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.

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

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

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

CÁCERES, M.; HIDALGO, R.; SANZ, A.; MARTÍNEZ, J.; RIERA, P.; SMITH, P. C. Effect of Platelet-Rich Plasma on Cell Adhesion, Cell Migration, and Myofibroblastic Differentiation in Human Gingival Fibroblasts. **J Periodontol**, v. 79, n. 1, p. 714-720, 2008.

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

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

CHEN W. H.; LIU H. Y.; LO WC. Intervertebral disc regeneration in an *ex vivo* culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. **Biomaterials**, v. 30, p.5523–5533, 2009.

CHEN, S. J. *et al.* Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. **The Journal of investigative dermatology**, v. 112, n. 1, p. 49-57, jan. 1999.

CHOUCAIR, M. M.; PHILLIPS, T. J. What is new in clinical research in wound healing. **Dermatologic Clinics**, v.15, p.1-14, 1997.

CHRISTGAU, M.; MODER. D.; HILLER, K-A.; DADA, A,S,G.; Schmalz, G. Growth factors and cytokines in autologous platelet concentrate and their correlation to periodontal regeneration outcomes. **J Clin Periodontol**, v.33, p.837-845. 2006.

COLTER, D.C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 5, p. 79-98, 2001.

COTSARELIS et al. Epithelial stem cells in the skin: definition, markers localization and functions. **Exp Dermatol**, 8:80-89, 1999.

CROVETTI G, MARTINELLI G, ISSI M, *et al.* Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. **Transfus Apher Sci**, v. 30, p.145–151, 2004.

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.

DA SILVA MEIRELLES L, CAPLAN AI, NARDI NB. In search of the *in vivo* identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v26, p.2287–2299, 2008.

DARBY, I; SKALLI, O.; GABBIANI, G. α -Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab Invest**, v.63, p.21-29, 1990.

DRÉNO, B. Anatomie, immunologie de la peau et de ses annexes. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, v. 135, n.3, p.149-152, 2008.

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

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

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

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

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

EVEN-RAM, S.; YAMADA, K. M. Cell migration in 3D matrix. **Current opinion in cell biology**, v. 17, n. 5, p. 524-32, out. 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.

FRIEDL, P. Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 1, p. 14-23, fev. 2004.

FORMIGLI, L.; BENVENUTI, S.; MERCATELLI, F.; QUERCIOLI, F.; TANI, A.; MIRABELLA, C.; DAMA, A.; SACCARDI, R.; MAZZANTI, B.; CELLAI, I.; ZECCHI-ORLANDINI, S. Dermal matrix scaffold engineered with adult mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma as a potential tool for tissue repair and regeneration. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 10, p 1-10, 2011.

LIU, Z.-J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 106, n. 6, p. 984-91, 15 abr. 2009.

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

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J Immunol Methods**, v. 1, p. 57-63, 1986.

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.

GUZMAN STRONG, C. DE *et al.* Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 4, p. 661-70, 20 nov. 2006.

HAMDI, H.; FURUTA, A.; BELLAMY, V. Cell delivery: intramyocardial injections or epicardial deposition A head-to-head comparison. **Ann Thorac Surg**, v.87 p. 1196–1203, 2009.

HANNA, J. R.; GIACOPELLI, J. A. A review of wound healing and wound dressing products. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v.36, n.1, p.2-14, 1997.

HEINOS, J. *et al.* Regulation of Cell Adhesion Receptors by Transforming Growth. **The journal of biological chemistry**, v.264, n1. p. 380-388, 1989.

HEINO, J.; MASSAGUE, J. Transforming growth factor- β switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. **J The journal of biological chemistry**, v, 264, n1. p. 21806-21811, 1989.

HINZ, B. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 9, p. 2730-41, set. 2001.

JONES I, CURRIE, L and MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **Br J Plast Surg**, v. 55, p. 185-193, 2002.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11a ed, 2012.

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

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

KAKUDO, N.; KUSHIDA, S.; MINAKATA T.; SUZUKI, K.; KUSUMOTO, K. Platelet-rich plasma promotes epithelialization and angiogenesis in a splitthickness skin graft donor site. **Med Mol Morphol**, v. 17, p. 233, Dez, 2011.

KNIGHT, M.A.F.; EVANS, G.R.D. Tissue Engineering: Progress and Challenges, **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 2 p.26e-37e, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing and Fibrosis. In Robbins and Cotran. **Pathologic Basis of Diseases**, 7th edition, Elsevier Saunders, London; Chapter 3: p. 87-118, 2005.

LYNCH, S.E.; NIWON, J.C.; COLVIN, R.B.; ANTONAIDES, H.N. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 84, p.7696–7700, 1987.

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

MARTIN, P. Wound healing – Aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v.276, p.75-81, 1997.

MARX, R.E., Platelet-rich plasma: evidence to support its use, **J. Oral Maxillofac. Surg.** V. 62 p. 489–496, 2004.

MENDES JR., E. C. S.; VITERBO, F.; ROSA, C. S. Análise histológica e morfométrica da área cruenta tratada com membrana de silicone: estudo em ratos. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 53, n. 5, p. 395-400, 2007.

MITCHELL, W.; LYNCH, P. J. Principles and Practice of Dermatology. 2° Edition **Churchill Livingstone Inc.** 1: 1-51, 1996.

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

MONTESINOS, J. J. *et al.* Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. **Cytotherapy**, v. 11, n. 2, p. 163-76, jan. 2009.

NINCHERI, P.; LUCIANI, P.; SQUECCO, R. SPHINGOSINE 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, p.1741–1754, 2009.

OKUDA, L.F.T.; KAWASE, K.; WOLFF, H. YOSHIE, Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro, **J. Periodontol.** v. 74, p; 858–864, 2003.

PASSERON, T.; BALLOTTI, R.; ORTONNE, J. P. Mélanogenèse. **EMC - Dermatologie-Cosmétologie**, v.2, n.4, p.204-216, 2005.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem**, v. 83 p. 346-356, 1977.

POSSER, T.; DE AGUIAR, C.B.; GARCEZ, R.C.; ROSSI, F.M.; OLIVEIRA, C.S.; TRENTIN, A.G.; NETO, V.M.; LEAL, R.B. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. **Arch Toxicol**, vol.6, p.407-414, 2007.

POWELL, J. Skin physiology. **Women's Health Medicine**, v.3, n.3, p.130-133, 2006.

PRINS, H.J., ROZEMULLER, H.; VONK-GRIFFIOEN S. Bone-forming capacity of mesenchymal stromal cells when cultured in the presence of human platelet lysate as substrate for fetal bovine serum. **Tissue Eng A**, v. 15, p. 3741–3752, 2009.

RABIE, M.; SHANTI, W. L.; NESTI L.; WANG X.; TUAN R. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n.8, p.1640-1647, 2007.

ROBEY, PG, BIANCO, P. Stem cells in tissue engineering. *In Lanza R. Handbook of Stem Cells*, Elsevier Academic Press. London, 2004, vol, 2; chapter 71.pag 785-792.

SATIJA, N.K.; GURUDUTTA, G.U.; SHARMA, S. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. **Stem Cell**, v. 16, p.7–23, 2007

SAFFLE, J. R. Closure of the excised burn wound: temporary skin substitutes. **Clin. Plastic Surg.**, v.36, p.627-641, 2009.

SANDERS, R.C. Stem cell research. **Paediatr Respir Rev**, v.7, n.2, p.135-140, 2006.

SCHAFFER, C.J.; NANNEY, L.B. Cell biology of wound healing. **Int Rev Cytol**, v.169, p.151-181, 1996.

SCHURR, M. J. Phase I/II Clinical evaluation of stratagraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. **J. Trauma**, v.66, n.3, p.866-874, 2009.

SEGRE, J. A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. **J. Clin. Invest.**, v. 116, n.5, p.1150-1158, 2006.

SHERIDAN, R.L.; MORGAN, J.R.; CUSICK, J.L.; PETRAS, L.M.; LYDON, M.M.; TOMPKINS, R.G. Initial experience with a composite autologous skin substitute. **Burns**, v.27, n.5, p.421-424, 2001.

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

SO, P. L.; EPSTEIN, E. H. Adult stem cells: capturing youth from a bulge? **Trends Biotechnol**, 22(10):493-496, 2004.

STRONG, C. G. et al. Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. **The Journal of Cell Biology**, v.175, n.4, p. 661-670, 2006.

THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, 282:1145, 1998.

TOMASEK, J.J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, p.349-363, 2002.

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

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

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; ROMERO F. T. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Rev. Bras. Cir. Plást.** v.24, p.212-8, 2009.

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

WALGENBACH, K.J, VOIGTH, M.; RIABIKHIN, A. W; ANDREE, C.; SCHAEFER, D. J.; GALLA, T. J.; STARK, G. B: Tissue engineering in plastic reconstructive surgery., **Anat Rec**, v.263, p. 372-378, 2001.

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

WEIR, M.D; XU, H.H.K. Culture human mesenchymal stem cell with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 93B:93-105, 2009.

WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **AJIC**, p.98-111, 2006.

WISLET-GENDEBIEN, S. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem cells**, 23(3):392-402, 2005.

WOOD, F. M. The use of a non-cultured autologous cell suspension and Integra® dermal regeneration template to repair full-thickness skin wounds in a porcine model: a one-step process. **Burns**, v.33, n.6, p.693-700, 2007.

XU, J.; CLARK, R.A.F. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **J Cell Biol**, v.132, p.239-249, 1996.

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.

ZHANG, J.; WANG, J. H.-C. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. **The American journal of sports medicine**, v. 38, n. 12, p. 2477-86, dez. 2010.

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

ANEXOS

ANEXO1 – TCLE1: Coleta de fragmentos de pele, para isolamento das CTMd



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme humana associadas a matriz de regeneração dérmica”

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Pesquisador(es) participante(s): Bibiane Lago de Castro

Telefones para contato: (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de: “Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme humana associadas a matriz de regeneração dérmica”, de responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin. 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 Célula-tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo avaliar o uso do PRP sobre as CTMd humana em ambientes de cultivo bidimensional e tridimensional, associados à MRD Integra®, visando o uso destes bio-materiais na Medicina Regenerativa.

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 de pele. 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.

Assinatura do pesquisador :

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____,

RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa
“Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas sobre células tronco
mesenquimais da derme humana associadas a matriz de regeneração
dérmica” e concordo em participar do estudo.

Assinatura do paciente ou responsável:

Florianópolis, ____ de _____ de 2013.

ANEXO2 – TCLE2: Coleta da placenta para isolamento das
CTMPs



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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

Título do Projeto: “Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme humana associadas a matriz de regeneração dérmica”

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin

Pesquisador(es) participante(s): Bibiane Lago de Castro

Telefones para contato: (48) 37216905

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de: “Avaliação do efeito do plasma rico em plaquetas sobre células tronco mesenquimais da derme humana associadas a matriz de regeneração dérmica”, de responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin. 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 Célula-tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 37216905.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo avaliar o uso do PRP sobre as CTM_d humana em ambientes de cultivo bidimensional e tridimensional, associados à MRD Integra®, visando o uso destes bio-materiais na Medicina Regenerativa.

Para a obtenção do PRP, utilizaremos sangue periférico. A coleta de sangue será realizada no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual-UFSC, por um profissional treinado e um assistente. O doador estará na posição sentado, com apoio para o braço. Será utilizada a técnica de assepsia adequada com álcool 70% e para a estase venosa será utilizado torniquete do tipo cinta com velcro, para melhor conforto. Será coletado 10 ml de

sangue por punção venosa na região da fossa anti-cubital, utilizando-se agulha e seringa descartáveis, as quais serão descartadas de forma segura em caixas próprias para descartes de perfuro-cortantes infectantes.

As amostras serão levadas para o laboratório para serem processadas. O PRP será adicionado à uma matriz de regeneração dérmica comercial e a cultura de CTMs, esses materiais serão utilizados em lesões de pele realizadas em camundongos e o seu efeito será avaliado com auxílio de técnicas histológicas.

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

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a coleta de seu sangue e aceitando responder as perguntas do Questionário de Seleção de Doadores, 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, bem como não haverá benefícios ou ressarcimentos. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

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

Assinatura do pesquisador:

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____,

RG _____, fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Ensaio pré-clínico do uso de células tronco mesenquimais derivadas da derme e plasma rico em plaquetas associados a uma matriz de regeneração dérmica”, e concordo em participar do estudo, como voluntário.

Assinatura do paciente ou responsável:

RG: _____ Florianópolis, ____ de
_____ de 2013.