UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

INGRID IARA DAMAS

COMPARAÇÃO DA CONDROGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO EM *SCAFFOLD* DE QUITOSANA E XANTANA

CAMPINAS – SP

2019

INGRID IARA DAMAS

COMPARAÇÃO DA CONDROGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO EM *SCAFFOLD* DE QUITOSANA E XANTANA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências na área de Clínica Médica.

ORIENTADOR PROFESSOR DOUTOR IBSEN BELLINI COIMBRA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA INGRID IARA DAMAS
E ORIENTADA PELO PROF. DR. IBSEN BELLINI COIMBRA.

CAMPINAS – SP

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Damas, Ingrid Iara, 1995-
D18c Comparação da condrogênese de células-tronco de líquido amniótico humano e tecido adiposo em *scaffold* de quitosana e xantana / Ingrid Iara Damas. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ibsen Bellini Coimbra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Medicina regenerativa. 2. Células-tronco. 3. Líquido amniótico. 4. Tecido adiposo. 5. Condrogênese. I. Coimbra, Ibsen Bellini, 1959-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Comparision between human amniotic fluid and adipose tissue mesenchymal stem cells induced-chondrogenesis cultured in chitosan-xanthan scaffold
Palavras-chave em inglês:
Regenerative medicine
Stem cells
Amniotic fluid
Adipose tissue
Chondrogenesis
Área de concentração: Clínica Médica
Titulação: Mestra em Ciências
Banca examinadora:
Ibsen Bellini Coimbra [Orientador]
Ângela Maria Moraes
Márcia Uchoa de Rezende
Data de defesa: 30-08-2019
Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: https://orcid.org/0000-0002-6950-9150
- Currículo Lattes do autor: http://lattes.cnpq.br/2538543516339100

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

INGRID IARA DAMAS

ORIENTADOR: PROF. DR. IBSEN BELLINI COIMBRA

MEMBROS:

1. **PROF. DR. Ibsen Bellini Coimbra**
2. **PROFª. DRª. Ângela Maria Moraes**
3. **PROFª. DRª. Márcia Uchoa De Rezende**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Data: 30/08/2019

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho, assim como todas as conquistas da minha vida, as que já aconteceram e as que virão, ao meu pai, meu melhor amigo e maior saudade.

EPÍGRAFE

“Deus é o nosso refúgio e fortaleza, socorro bem presente nas tribulações.”

Salmos 46:1.

AGRADECIMENTOS

Primeiraramente a Deus, por ter me guardado e abençoado em bons caminhos, colocando em mim grandes sonhos, assim como potencial e oportunidades para realizá-los, me mantendo firme e esperançosa até aqui.

À minha família, em especial meus pais, Paulo e Silvana, que sempre acreditaram em mim, me incentivando com todo amor e apoio em todas as minhas decisões.

Aos meus queridos tios, Joselito e Sandra, sempre presentes e dispostos a ajudar, ouvir e aconselhar.

Aos amigos, que tornam a vida mais leve e feliz.

Ao Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra, pela orientação dedicada, pelo imenso conhecimento diário concedido, não só sendo exemplo de um profissional íntegro, mas também um ser humano de bom coração, sempre com muita sabedoria e lições de vida que enriqueceram nossas tardes durante esses anos de trabalho.

À equipe LABIMOCA, Carol e Kaike, meus companheiros e grandes amigos.

Em especial à Carol, amiga maravilhosa, que em tudo me acompanhou, me ensinando, auxiliando e apoiando.

Ao Laboratório de Imunologia, em especial aos meus queridos Dennis e Lívia, sempre dispostos a me auxiliar em técnicas e esclarecer minhas dúvidas.

Ao CAISM e Hospital das Clínicas da UNICAMP pelo fornecimento das amostras utilizadas no estudo.

Ao LEBC – FEQ/UNICAMP, em especial à Prof. Dra. Ângela Maria Moraes pela parceria, ensinamentos e participação na banca de qualificação, e à Cecília, responsável pela confecção dos *scaffolds* utilizados no estudo, grande amiga e companheira.

Ao LNBio - CNPEM, pela utilização dos equipamentos de microscopia confocal.

À todos que direta e indiretamente tornaram possível a elaboração desse trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro (Processo número 2015/08050-2) as quais contribuíram diretamente para o desenvolvimento desse trabalho, bem como para a participação em eventos científicos, que foram de grande importância para minha formação acadêmica, científica e profissional.

RESUMO

A Cartilagem articular tem baixa capacidade de regeneração e quando acometida por lesões pode sofrer danos permanentes, podendo progredir para doenças como a osteoartrite (OA). Tratamentos atuais para essas lesões são paliativos. O uso de células-tronco (CTs) com suas características de proliferação e diferenciação, aliadas ou não aos *scaffolds* para indução de condrogênese e recuperação das lesões vem sendo estudado. Neste estudo comparou-se a condrogênese promovida por CTs de líquido amniótico humano (LAh) com a condrogênese promovida por CTs de tecido adiposo humano (TAh) cultivadas em *scaffolds* de quitosana/xantana (QX) estimuladas por TGF-β3. As amostras de LAh foram cedidas por mulheres no segundo semestre de gestação, que por razões obstétricas, foram submetidas à amniocentese. As amostras de TAh foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração pela cirurgia plástica. Para as CTs de LAh houve a seleção de células positivas para CD117 (ckits) e as CTs de ambas as fontes seguiram as mesmas etapas de expansão celular, com caracterização celular seguindo os critérios de adesão, marcadores específicos na citometria de fluxo e diferenciação celular em três linhagens mesenquimais: adipogênese, condrogênse e osteogênese. As CTs foram colocadas nos *scaffolds* QX e cultivadas sob estímulo de TGF-β3 por 21 dias. Para comprovar e avaliar a condrogênese, foram realizadas microscopia eletrônica de varredura (MEV), histologia, imunohistoquímica e imunofluorescência. As CTs de ambas as fontes apresentaram rápida e alta capacidade de expansão e cultura aderente com morfologia fibroblastóide, positividade para marcadores de linhagem mesenquimal, pluripotência, potencial condrogênico e negatividade para marcadores hematopoiéticos. Verificou-se ainda diferenciação nas linhagens mesenquimais adipogênica, condrogênica e osteogênica. A condrogênese foi confirmada pelas colorações histológicas pela Hematoxilina e Eosina, *Alcian Blue*, *Picrossirius Red* e *Tricrômio* de Masson indicando produção de matriz, presença de colágenos e proteoglicanos. Na análise imunohistoquímica observou-se marcação positiva para colágeno II e para agrecano, assim como na imunofluorescência. Na MEV verificou-se- intensa rede de fibras de colágeno no *scaffold*. As células de ambas as fontes se mostraram eficazes na indução de condrogênese.

Palavras-chave: Medicina Regenerativa, Células-tronco, Líquido Amniótico, Tecido Adiposo, Condrogênese.

ABSTRACT

Joint cartilage has low regeneration capacity and when affected by injuries can suffer permanent damage, and can progress to diseases such as osteoarthritis (OA). Current treatments for these lesions are palliative. Use of stem cells (SC), allied or not to scaffolds for chondrogenesis induction and recovery of the lesions has been studied. In this study we compared human amniotic fluid stem cells (hAFSC) induced chondrogenesis with human adipose tissue stem cells (hATSC) induced chondrogenesis in chitosan/xanthan (CX) scaffolds stimulated by TGF-β3. Human amniotic fluid (hAF) samples were obtained by women in the second trimester of gestation who, for obstetric reasons, underwent amniocentesis. Samples of human adipose tissue (hAT) were obtained from liposuction by plastic surgery. For hAFSC $CD117^{+}$ cells (c-kits) were isolated and SC from both sources followed the same steps of cell expansion and cell characterization. SC were seeded on the CX scaffolds and cultured under TGF-β3 stimulation for 21 days. Chondrogenesis was confirmed by scanning electron microscopy (SEM), histology and immunohistochemistry. SC from both sources showed high expansion capacity, adherent culture, fibroblasts-like forming colonies, positivity markers of mesenchymal lineage, pluripotency, chondrogenic potential and negativity for hematopoietic markers and there was differentiation in the mesenchymal lines. The chondrogenesis was confirmed by histological stains with matrix production, presence of collagens and proteoglycans. Immunohistochemistry showed positive marking for collagen II, such as immunofluorescence, and aggrecan. In the SEM it was observed an intense fiber network in the scaffold. Cells from both sources proved to be effective in inducing chondrogenesis.

Keywords: Regenerative Medicine, Stem Cells, Amniotic Fluid, Adipose Tissue, Chondrogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 (A) Sistema utilizado para separação imunmagnética, MidiMACS™ Starting Kit (LS), Miltenyi Biotec; (B) solução de CT de LAh passando pela coluna de separação.....29
Figura 2 Recepção da amostra no laboratório em seringa estéril (A); amostra distribuída em tubos submetida a seguidas lavagens (B) até que a solução de lavagem, na parte inferior do tubo, se tornasse incolor e transparente, garantindo que o excesso de sangue foi descartado (C). 30
Figura 3 Recepção e processamento das amostras para obtenção das CT do LAh (A); Indicadas pelas setas, CT de LAh aderidas na superfície plástica da garrafa de cultura após seis dias de cultivo e ao redor, outros tipos celulares não aderentes e artefatos presentes no LAh (B).....38
Figura 4 CT de LAh em confluência antes da separação imunomagnética (A) e após separação imunomagnética, CTs CD117+ aderidas ao frasco de cultura (B).....39
Figura 5 Indicado pelas setas, células-tronco de tecido adiposo humano aderidas em cultura após dois dias de cultivo em meio a outros tipos celulares não aderentes e artefatos do lipoaspirado. 40
Figura 6 CT de LAh (A) e TAh (B) em cultura, aderidas ao plástico apresentando morfologia fibroblastóide. 40
Figura 7 Positividade para CD90 (A),CD73 (B) e CD 105 (C) de linhagem mesenquimal, negatividade para CD34 (D), HLA-DR (E), CD19 (F) e CD45 (G) de linhagem hematopoiética, positividade para CD49c (H) e CD151 (I) de potencial condrogênico, bem como para os marcadores de pluripotência CD166 (J), SSEA-4 (K) e CD117(L). 42
Figura 8 Positividade para CD90 (A), CD73 (B) e CD105 (C) de linhagem mesnquimal, negatividade para CD34 (D), CD45 (E), CD19 (F) e HLA-DR (G) de linhagem hematopoiética, bem como positividade para CD151(H) e CD49c (I), marcadores que demonstram potencial condrogênico.. Não foram testados marcadores de pluripotência (SSEA4, CD166 e CD117) por tratarem-se de CT adultas.....43
Figura 9 Verticalmente, LAh e TAh, respectivamente, em A e B diferenciação em linhagem adipogênica, com formação de vesículas de gordura coradas em tons alaranjados pela coloração de *Oil Red O*; em C e D diferenciação condrogênica, com

a matriz de glicosaminogicanos e proteoglicanos corada em azul pela coloração de *Alcian Blue*; em E e F diferenciação osteogênica, com matriz de cálcio formada corada em tons de vermelho e/ou laranja intenso pela coloração de Vermelho de Alizarina.....44
Figura 10 Microscopia óptica do scaffold, evidenciando sua estrutura porosa (A); superfície do scaffold vista pela técnica de miscroscopia eletrônica de varredura em aumento de 100x (B); vista transversal do scaffold por microscopia eletrônica de varredura em aumento de 100x, podendo-se observar estrutura lamelar com poros interligados (C). 45
Figura 11 Citotoxicidade do scaffold em relação as células-tronco de LAh (A) e TAh (B). 46
Figura 12 Células-tronco aplicadas no scaffold e indicado pelas setas aglomerado celular formado após 21 dias de cultura em meio condrogênico.....47
Figura 13 Microscopia de varredura em um aumento de 400x da condrogênese de CT de LAh (A, B e) e de CT de TAh (D, E e F). Em A e D, respectivamente observa-se diferenciação condrogênica após 7 dias sob estímulo de TGF-β3; em B e E , após 21 dias sob estímulo de TGF- β3; em C e F refere-se ao achado após 21 dias de diferenciação sem estímulo de TGF-β3. 48
Figura 14 Condrogênese de CT de LAh e TAh após 21 dias sem estímulo de TGF-β3, em aumento de 100x. Observa-se nas imagens o início de uma condensação celular rente ao scaffold e uma discreta produção de matriz, comprovada por HE em A e E que cora em roxo p núcleo celular e rosa a mztriz; AB em B e F com pouca produção de GAGs corados em azul e em rosa o núcleo celular, PR e TM de LAh (C e D) mostram uma pequena produção de colágeno em vermelho e azul, respectivamente, enquanto PR e TM de TAh (G e H) mostram apenas o início da condensação celular, sem produção de matriz. 50
Figura 15 Condrogênese de CT de LAh e TAh após 21 dias de cultura sob estímulo de TGF-β3, em aumento de 100x. Em HE (A e E) observa-se uma condensação celular bem estruturada com núcleos corados de roxo e intensa produção de matriz corada em rosa; AB (B e F) matriz rica em GAGs corada em azul e núcleo celular em rosa; PR (C e e G) e TM (D e H) indicando a presença de colágeno variando a cor da matriz entre amarelo pálido e vermelho intenso e azul, respectivamente. 51
Figura 16 Cortes histológicos do scaffold em aumento de 20x, corados com HE (A), AB (B), PR (C) e TM (D).....52

Figura 17 Imunohistoquímica da condrogênese de CTs de LAh em matriz de QX sob estímulo de TGF-β3, com marcação positiva para colágeno II (A) e agrecano (B), evidenciadas pela coloração acastanhada do DAPI por toda matriz extracelular formada. 53
Figura 18 Imunuhistoquímica da diferenciação condrogênica das CTs de TAh em scaffold QX, sob estímulo de TGF-β3, com marcação positiva para colágeno II (A) e agrecano (II) pela coloração acastanhada do DAPI na pouca matriz extracelular formada. 53
Figura 19 Controle negativo da reação sem anticorpo, contracorados com hematoxilina. 54
Figura 20 Imunofluorescência de CTs de LAh (A-D) e TAh (E-H) diferenciadas em condrócitos, visualizadas em microscopia confocal, com marcação positiva para colágeno II presente na matriz extra-celular formada evidenciada em vermelho.....55
.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB Alcian blue

BSA Bovine Serum Albumin

CAAE Certificado de apresentação para apresentação ética

CAISM Centro de Atenção à Saúde da Mulher

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD11b Cluster de diferenciação

c-Kit ou CD117 Receptor tyrosine kinase protein

CT Célula-tronco

DAPI 4',6'-diamino2-fenil-indol

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO dimetil sulfóxido

EDTA *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ETO Óxido de etileno

FAPESP Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FBS Fetal Bovine Serum

FCM Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

FcR Blocking Reagent

FITC Fluorescein isothiocyanate

GAGs Glicosaminoglicanos

HE Hematoxilina e eosina

HLA Human leucocyte antigen

HLA-DR Human leucocyte antigen – DR isotype

iPS ou **iPSCs** *Induced pluripotent stem cells*

ITS *Insulin-transferrin-selenium*

LAB Líquido amniótico bovino

LABIMOCA Laboratório de Biologia Molecular de Cartilagem

LAh Líquido amniótico humano

LEBC Laboratório de Engenharia de Biorremediações e Colóides

LNBio Laboratório Nacional de Biociências

MEM *Minimum essential media*

MEV Microscopia eletrônica de varredura

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

OA Osteoartrite

PerCP Peridinin Chlorophyll Protein Complex

P/S *Penicillin-Streptomycin-Glutamine*

PBS Phosphate Buffered Saline

PR Picrossírius Red

PVPI Iodopovidona

QX Quitosana e xantana

SDS Dodecilsulfato de sódio

SSEA-4 S*tage-specific embryonic antigen-4*

SOX9 SRY-box transcription factor 9

TAh Tecido adiposo humano

TCLE Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF-β3 *Transforming Growth Factor Beta-3*

TM Tricrômio de Masson

UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

2. OBJETIVO 26

2.1. OBJETIVO GERAL 26

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 26

3. MATERIAL E MÉTODOS 27

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E EXPANSÃO. 27

3.1.1. Isolamento das células-tronco de LAH positivas para CD117 28

3.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO E EXPANSÃO CELULAR 29

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO 31

3.3.1. Aderência celular 31

3.3.2. Citometria de fluxo 31

3.3.3. Diferenciação nas três linhagens mesenquimais: adipogênese, condrogênese e osteogênese 32

3.4. CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD DE QUITOSANA E XANTANA 32

3.4.1. Características físico-químicas, estruturais e toxicidade 32

3.5. CONDROGÊNESE DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO 34

3.5.1. Aplicação das CT de LAh e TAh no *scaffold* de quitosana e xantana 34

3.5.2. Microscopia de varredura (MEV) 35

3.5.3. Histologia 36

3.5.4. Imunohistoquímica 36

3.5.5. Imunofluorescência 37

4. RESULTADOS 38

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E EXPANSÃO. 38

4.1.1. Isolamento das células-tronco de LAH positivas para CD117 39

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO E EXPANSÃO CELULAR 39

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO 40

4.3.1. Aderência ao plástico 40

4.3.2. Citometria de Fluxo ... 41
4.3.3. Diferenciação em linhagens mesenquimais ... 44
4.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TOXICIDADE DO SCAFFOLD ... 45
4.5. CONDROGÊNESE DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO ... 47
4.5.1. Aplicação das CT de LAh e TAh no *scaffold* de quitosana e xantana ... 47
4.5.2. Microscopia de varredura (MEV) ... 48
4.5.3. Histologia ... 49
4.5.4. Imunohistoquímica ... 52
4.5.5. Imunofluorescência ... 54
5. DISCUSSÃO ... 56
6. CONCLUSÃO ... 62
7. PLANEJAMENTOS FUTUROS ... 63
8. REFERÊNCIAS ... 64
9. ANEXO ... 69
... 72

1. INTRODUÇÃO

As lesões condrais se tornaram alvo de preocupação nos últimos tempos por afetar grande parcela da população mundial. Segundo dados da Previdência Social do Brasil, essas lesões representam de 30 a 40% das consultas nos ambulatórios de reumatologia, 7,5% dos afastamentos no trabalho, são responsáveis por 10,5% dos auxílios doença e ocupa o 4º lugar no ranking de doenças que determinam a aposentadoria, com 6,2%.

As lesões condrais predominam em mulheres, afetando áreas específicas, preferencialmente mãos e joelhos, e em homens, afetando a articulação coxofemoral (1).

Ocorrem com maior frequência após o 60 anos, com 30 a 60% dos pacientes apresentando dores crônica, mas também acometem de forma aguda pacientes jovens, como atletas (2, 3). Essas lesões podem ser decorrentes de muitos fatores, sendo os principais deles: fatores genéticos, alterações metabólicas, elevada produção de enzimas proteolíticas deteriorando o tecido cartilaginoso (4, 5) e defeitos nas articulações, com apresentações clínicas importantes e específicas como o aparecimento de nódulos nos dedos das mãos, chamados nódulos de Heberden, na articulação da ponta dos dedos (6), ou Bouchard, na articulação do meio dos dedos; fatores traumáticos, comumente associados à exercícios físicos de alta intensidade e excesso de carga, o que pode ocasionar a lesão condral e articular de forma aguda, em um único episódio, e movimentos de pequena magnitude, porém repetitivos, ocasionando as lesões de forma crônica (7).

Essas lesões despertam interesse não apenas pela incidência com que acomete a população e os danos socio-econômicos (8, 9), mas também por comprometer um tecido com baixo potencial de autorreparação, a cartilagem hialina ou cartilagem articular, presente em todo o corpo humano nas articulações com a principal função de promover amortecimento, absorvendo o impacto desde movimentos sutis à movimentos bruscos, impedindo o atrito entre os ossos longos, permitindo a mobilidade.

A cartilagem hialina é formada durante a embriogênese *in vivo,* no processo da condrogênese, ou na indução *in vitro*, sendo necessário que ocorra a condensação de células-tronco mesenquimais de linhagem mesodermal. Dessa condensação inicial ocorre a produção de glicoproteínas específicas denominadas

N-caderinas, que atuam como moléculas de adesão (10). A partir dessa condensação, há a expressão do fator de transcrição SOX9 que é o principal regulador para expressão de agrecano e colágenos II, IX e XI, fatores que determinam a diferenciação dessas células-tronco em condrócitos, formando a cartilagem hialina (7). Esses condrócitos se distribuem organizadamente em lacunas e de acordo com o nível de maturação celular migram para a superfície, sofrendo uma atrofia com diminuição de tamanho, aumentando a quantidade de matriz extracelular entre eles. Esse tecido formado caracteriza-se por sua hipocelularidade, ausência de vascularização e nervos, o que dificulta a chegada de nutrientes e outras células até o local; tais características diminuem sua capacidade de regeneração, tornando-o susceptível a danos irreversíveis, os quais podem evoluir para lesões maiores, com surgimento de doenças articulares como a osteoartrite (OA).

Para as lesões condrais de origem secundárias, como as advindas de traumas e desgaste natural, não existem tratamentos efetivos. Sugere-se a prática de exercícios moderados, perda de peso e medicamentos para alívio da dor. Em casos avançados das lesões articulares ocasionadas principalmente quando essas evoluem para a OA é a artroplastia (3), que consiste na completa remoção do tecido articular lesionado, substituindo-se parte da articulação por próteses compostas por metal (aço inoxidável ou liga de cromo-cobalto), polietileno ou cêramica, por exemplo. Embora sejam eficazes, estas próteses também podem gerar complicações musculoesqueléticas e biomecânicas, com limitação progressiva dos movimentos, além de outros riscos menos frequentes como: trombose venosa, luxação do componente femoral, infecção, lesão neurológica e desgaste pelo uso. As próteses têm como principal objetivo o alívio da dor e em 90% dos casos os resultados são bons, mesmo quando há perda de mobilidade, os pacientes optam por não fazer uma segunda cirurgia (11).

Tratamentos alternativos para pequenas lesões na cartilagem articular vêm sendo estudados, no entanto , todos eles apresentam complicações em suas aplicações. Entre as técnicas adotadas, em razão da sua facilidade e simplicidade, está a microfratura, onde o osso do local lesionado é penetrado até atingir a medula óssea, cujas células condroprogenitoras ali presentes migram para a superfície articular lesionada a fim de promover a regeneração (12). Acredita-se ainda que isto

também contribuiria para estimular a expressão de citocinas necessárias à reparação dessa cartilagem. Contudo, os resultados mostraram o surgimento de tecido fibroso ou fibrocartilagem, o que ocorreria em razão da quantidade insuficiente de condroprogenitores no local, resultando por fim na degeneração do tecido reparado .

Outra técnica utilizada é a mosaicoplastia que consiste em retirar fragmentos de cartilagem saudável do próprio paciente de locais que não sofram com impacto, e implantar em locais lesionados, a fim de induzir a regeneração tecidual (13).

O transplante autólogo de condrócitos também tem sido utilizado. São obtidos através de biópsia do próprio paciente, mantidos em cultura celular até a expansão e depois re-injetados na cartilagem defeituosa (14). Esta técnica está descrita na literatura dividida em gerações. A primeira geração consistia em recobrir o local da lesão com uma camada de periósteo retirada da tíbia do paciente anteriormente, suturar para delimitar a lesão e injetar os condrócitos autólogos. O maior problema dessa técnica foi a hipertrofia no local, com deformações e extravasamento de líquidos, além da perda do fenótipo condrogênico das células cultivadas *in vitro*, dano do tecido saudável e indução e desenvolvimento da osteoartrite. Com o intuito de solucionar esses aspectos negativos da técnica, surgiu a segunda geração de transplante autólogo, substituindo a camada de periósteo por uma membrana de colágeno, comercializado como *Chondro-guide* (15), resolvendo a hipertrofia, mas ainda havia o extravasamento de líquido. Na terceira geração da técnica, surgiu a MACI, aprovada e comercializada, sendo uma membrana de colágeno na qual os condrócitos autólogos eram cultivados e assim implantados juntamente sob a lesão seguido de fixação com cola de fibrina, sendo esse o padrão ouro até o momento.

Todas as técnicas descritas até aqui não são capazes de regenerar o tecido cartilaginoso, o que ocorre é uma cicatrização acelerada, dando origem a um tecido denominado fibrocartilagem. Partindo desse princípio, atualmente com a medicina regenerativa unindo as diversas áreas de conhecimento como terapia celular, biotecnologia e engenharia de tecidos, surge uma possível “quarta geração” de transplantes autólogos, ainda não oficialmente reconhecida pela literatura, com a intenção de regenerar efetivamente o tecido lesionado, por meio da aplicação de um tecido especializado produzido *in vitro*, com células indiferenciadas (células-tronco de medula óssea, células-tronco mesenquimais, células-tronco induzidas) ou

condrócitos autólogos, diferentes condições de cultivos e fatores de crescimento (plasma rico em plaquetas, famílias dos TGFs, IGFs e BMPs), além dos suportes de diferentes composições (naturais ou sintéticos).

Neste cenário é que o uso de células-tronco (CTs) desponta como promissor. As características das células-tronco mesenquimais destacam-se e despertam interesse para possíveis aplicações na medicina regenerativa focadas no tratamento de lesões condrais e articulares.

As CTs podem ser pluripotentes, provenientes de embrião, com alto potencial de diferenciação, capazes de se diferenciar em todo e qualquer tipo celular que compõe o organismo humano, além da alta capacidade de expansão e proliferação sem a perda de suas características. A manipulação do embrião e o uso dessas células ainda gera controvérsias que envolvem questionamentos éticos (16) e, portanto, o mais comum é o uso de células-tronco adultas. As células-tronco adultas, somáticas, multi e unipotentes têm capacidade de diferenciação limitada, são provenientes de diferentes tecidos e também são capazes de dar origem a outros tipos celulares, mas com um menor potencial de diferenciação e proliferação. Entre as fontes de obtenção de CTs adultas, a medula óssea destaca-se em aplicações de terapia celular e medicina regenerativa. Presente principalmente no interior de ossos longos, é um órgão hematopoiético que contém células-tronco adultas hematopoiéticas que dão origem as células sanguíneas, além de conter em sua minoria células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em miócitos, osteócitos, hepatócitos, condrócitos, adipócitos, entre outros (17).

Outra fonte de obtenção de CTs adultas é o tecido adiposo humano (TAh), no passado visto apenas como um tecido de depósito, atualmente sabe-se que é um tecido conjuntivo de conexão, formado principalmente por adipócitos, mas que contém certa complexibilidade, com presença de inervação, vascularização, células regenerativas como as células endoteliais responsáveis pela reparação dos vasos sanguíneos, células-tronco mesenquimais, além da participação na resposta imune por meio de macrófagos e leucócitos locais (18). As CTs presentes no TAh são capazes de ser isoladas e diferenciadas em outras linhagens celulares, mas com potencial de diferenciação reduzido quando comparado as CTs embrionárias.

Ainda se tratando de células-tronco adultas, existem as células-tronco induzidas, denominadas *induced pluripotent stem cells* (iPS ou iPSCs), que são células somáticas epitelial reprogramadas em laboratório com material viral para que retornem ao estágio embrionário (19).

Em estudos de condrogênese observou-se que as CTs provenientes de líquido amniótico humano (LAh) apresentam características ideais pela facilidade de obtenção, expansão, isolamento, manutenção e diferenciação (20, 21) . Sabe-se que o líquido amniótico humano, presente durante a gravidez suportando o desenvolvimento do feto, é rico em diferentes tipos celulares e que alguns desses podem se diferenciar em outras linhagens. Estudos recentes demonstraram a proximidade dessas células-tronco de LAh, provindas do desenvolvimento embrionário, com o perfil das células-tronco embrionárias, especificamente pela presença de uma população que contém em sua membrana o antígeno c-Kit (CD117), indicando pluripotência, o que permite a realização de separação imunomagnética para a exclusão de células sem este antígeno, resultando em culturas homogêneas, aderentes e com características morfológicas estáveis. Como já descrito, células $CD117^{+}$ podem ser diferenciadas em adipócitos, osteócitos, miócitos, células epiteliais, neurais e hepatócitos, possibilitando classificar o LAh como fonte confiável de obtenção das CTs para fins terapêuticos (22, 23), tratando-se de células-tronco mais jovens, semelhantemente às embrionárias, com baixa capacidade de indução tumoral e resposta imunológica .

A medicina regenerativa busca empregar esses tipos celulares em cultura para dar origem aos tecidos que compõem o organismo humano, possibilitando tratamento a muitas doenças sem perspectiva de cura. Entretanto ainda persistem restrições técnicas, éticas e legais quanto ao uso dessas células e polêmicas que perpetuam a manipulação laboratorial, a origem e obtenção, clonagem e dediferenciação celular (24).

Para minimizar alguns dos questionamentos levantados sobre a manipulação dessas células e tornar o seu uso confiável e viável, se tratando de células tronco mesenquimais, foram estabelecidos alguns critérios mínimos para caracterizá-las e classificá-las, descritos pelo consenso proposto pela *International Society for Cellular Therapy*. O primeiro critério de identificação é a propriedade dessas células de aderência aos frascos de cultura (poliestireno) quando mantidas em condições

padrão de cultura. O segundo critério é a forte expressão dos marcadores CD105, CD73, CD90 e CD177 e expressão baixa ou ausente de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e HLA classe II, podendo ser observado pela citometria de fluxo. Por último, as células devem apresentar a capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, detectada por meio de colorações específicas, o Vermelho de Alizarina, *Oil Red* O e Azul de Alcian, respectivamente (25).

Em estudos já realizados por esse grupo, os quais compararam a influência e eficácia de estímulos para diferenciação celular especialmente em condrócitos, o *Transforming Growth Factor-β3* (TGF-β3) mostrou efeito na compactação e condensação celular, proporcionano condições essenciais para dar início a condrogênese (7), além da expressão de marcadores específicos de cartilagem articular, como SOX9, colágeno tipo II e agrecano, características que tornaram o TGF- β3 a melhor escolha para estimular e potencializar a diferenciação condrogênica esperada (21, 26).

Além do interesse por diferentes fontes de CTs e condições de cultivo celular, também vem crescendo a busca por matrizes, denominadas *scaffolfds* que serviriam como suporte para as CTs num eventual uso clínico, o que impediria ou diminuiria a dispersão das células ao longo dos tecidos e assim o número de células que alcançaria a região lesionada seria muito maior (27). Em relação à aplicação de células inoculadas em *scaffolds* na regeneração especificamente da cartilagem, para manter os condrócitos diferenciados fixos na lesão, a fim de que regenerem o tecido gradualmente e recuperem as funções do tecido original ao serem implantados (28), é necessário que o *scaffold* tenha uma composição que permita ser reabsorvido pelo organismo (biodegradabilidade) sem causar reações imunológicas (biocompatíveis) e não interfira na viabilidade e diferenciação das células, sendo portanto ideal que apresente a capacidade de mimetizar o ambiente do tecido. Já existem suportes de diferentes materiais no mercado, como aqueles compostos por cerâmica, metais e material biológico (29). No entanto, diversos outros biomateriais têm sido estudados com vistas ao seu uso como *scaffolds*, principalmente aqueles com polissacarídeos naturais como a agarose, o alginato, quitosana e xantana, os quais apresentam características adequadas à diferenciação celular, em particular a condrogênese. Especificamente, a quitosana e

xantana apresentam as características de biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de baixa toxicidade. A quitosana é um polissacarídeo de origem natural, presente nas paredes celulares de fungos e também em carapaça de crustáceos como camarão, caranguejos e lagostas. Possui propriedade antimicrobiana, além de ação analgésica tópica, o que consolidou seu uso na composição de biomateriais (30). A goma xantana, também um polissacarídeo natural, proveniente da bactéria *Xanthomonas campestris* sp, é utilizada pela indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras, não apenas por sua baixa toxicidade, mas também devido sua estabilidade e facilidade de manipulação, sendo aprovado pela FDA em quantidades ilimitadas, principalmente na indústria alimentícia como agente espessante (31). Sua aplicação em pesquisa clínica em lesões articulares demonstrou redução da evolução dessas lesões, além da inibição significativa da apoptose de condrócitos em casos de osteoartrite, além de diminuição da dor (32, 33).

Um dos resultados promissores da combinação da quitosana e xantana foi a capacidade de liberação controlada de fármacos destinados à terapia de lesões de pele (31, 34). A combinação desses dois polissacarídeos demonstrou grande potencial para utilização da membrana formada como *scaffolds (35)*.

Especialmente para aplicação em estudos de lesões da cartilagem articular e diferenciação condrogênica, os scaffolds de quitosana e xantana desenvolvidos pelo Laboratório de Engenharia de Biorreações e Colóides da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, apresentaram características promissoras para a aplicação e indução da condrogênese. Apresentaram em sua superfície fissuras, indicando interconectividade entre os poros, mostrou-se ideal para utilização em lesões cartilaginosas parciais, baixa citotoxicidade, capaz de permitir adesão, proliferação e diferenciação celular (36).

Diante das informações obtidas por meio da literatura, obtém-se algumas respostas para os questionamentos levantados até o momento, mas ainda não existem tratamentos efetivos para as lesões condrais e doenças articulares, fazendo-se necessário uma busca e aplicação de diferentes modelos para a regeneração desse tecido. A medicina regenerativa e seus pilares, terapia celular, biotecnologia e engenharia de tecidos, não só prometem, mas possibilitam o desenvolvimento

desses tratamentos. Não há até o momento na literatura nenhum estudo que tenha comparado a condrogênese a partir de CTs do LAh com aquela de CTs obtidas do tecido adiposo humano, levando em consideração o nível de maturação celular encontrado em ambas as fontes, além da aplicação em scaffolds de quitosana e xantana sob estímulo de TGF-β3, visando a aplicação *in vivo* em estudos futuros a fim de promover a regeneração tecidual e redução dos sintomas decorrentes das lesões, razão pela qual decidiu-se realizar o corrente estudo.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar a condrogênese de células-tronco (CT) do líquido amniótico humano (LAh) com as de tecido adiposo humano (TAh) em *scaffold* de quitosana e xantana (QX) para classificar qual a melhor fonte de obtenção de CTs para aplicação em tratamentos de lesões na cartilagem.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Avaliar o potencial do TGF-β3 como estímulo para a condrogênese das CT de LAh e TAh;

2.2.2. Analisar a influência do s*caffold* de quitosana e xantana no processo de diferenciação das células-tronco (CTs) obtidas de ambas as fontes, na presença de TGF- β3.

3. MATERIAL E MÉTODOS

(CAAE:41685315.5.0000.5404)

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E EXPANSÃO

As amostras de LAh foram obtidas por meio de pacientes mulheres no 2º trimestre de gestação submetidas ao exame de amniocentese sob indicação médica formal, segundo o protocolo do serviço de Medicina Fetal do CAISM/UNICAMP. Essas pacientes após serem orientadas sobre o presente estudo, sendo esse aprovado pelo comitê de ética com registro Nº CAAE: 31984414.6.0000.5404 desta faculdade, concordaram e assinaram o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O exame de amniocentese foi realizado sob visão ecográfica conforme a seguinte técnica: antissepsia com PVPI alcoólico, colocação de campo fenestrado, botão anestésico em pele e subcutâneo com lidocaína 2% sem vasoconstritor, punção abdominal até cavidade amniótica com agulha de punção raquídea 20G. De cada paciente que participou desse estudo foram coletados 10 ml de líquido amniótico, encaminhados imediatamente em seringa estéril para o Laboratório de Biologia Molecular de Cartilagem (LABIMOCA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP para processamento. As amostras foram centrifugadas a 300G por 10 minutos à 4ºC, descartou-se o sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 5ml de meio de expansão celular *alpha-mem* (GIBCO), suplementado com 20% de FBS (Fetal Bovine Serum, GIBCO) e 1% de P/S (*Penicillin-Streptomycin-Glutamine*, GIBCO) e transferido para frasco de cultura de 25cm² mantido em incubadora à 37ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2. Foram estabelecidos seis dias para a primeira troca do meio de cultura, descartando as células e resíduos sobrenadantes e mantendo em cultura as células aderentes. O meio de cultura foi trocado de 3 a 4 dias e as células foram observadas diariamente em microscópio óptico para visualizar a formação de colônias celulares com morfologia alongada e fibroblastóide, características específicas de células tronco. Outro critério analisado atentamente foi em relação à confluência celular, que não deveria passar de aproximadamente 70% da superfície do frasco de cultura, atentando-se para que as células não ocupassem todo o espaço do mesmo, uma vez que a condensação celular é o primeiro e importante fator para diferenciação e a confluência total

poderia simular esse processo, levando às células a se diferenciarem em outra linhagem celular indesejada, como por exemplo os fibroblastos. Então antes de atingir esse limite as células foram retiradas do frasco utilizando solução de Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO) e transferidas para um frasco maior, mantidas sob as mesmas condições de cultivo. A transferência das células de um frasco menor para um frasco maior ou mais frascos denominou-se “passagem”.

3.1.1. Isolamento das células-tronco de LAH positivas para CD117

Seguindo protocolo de De Coppi (22), após as células de primeira passagem atingirem 70% de confluência realizou-se a técnica de imunoseparação com partículas magnéticas das células positivas para CD117 (c-kit) utilizando o kit CD117 *Microbead kit – human* (*MACS-Miltenyi Biotec®*), de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram retiradas do frasco com solução de Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO), neutralizadas com FBS (GIBCO), lavadas com PBS (Phosphate Buffered Saline, pH7,4) 1x e centrifugadas a 300 G por 10 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com PBS e centrifugado novamente a 300 G por 10 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e o *pellet* ressuspendido em 300uL de tampão de separação (PBS 1x pH7,2, BSA 0,5% e EDTA 2mM) à 4ºC . Foram adicionados os reagentes contidos no kit, 100uL de *FcR Blocking Reagent* e 100uL de CD117 *Microbeads.* Essa suspensão foi gentilmente homogeneizada e incubada durante 15 minutos em refrigerador (2-8ºC) para a marcação do anticorpo específico. Após incubação, foram acrescentados 2mL de tampão de separação seguido de centrifugação a 300G por 10 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi gentilmente aspirado, completamente descartado e o pellet contendo as células foi ressuspendido em 500uL de tampão de separação e transferido para uma coluna LS MidiMACS acoplada a um aparato magnético **(Figura 1)**. A suspensão que passou pela coluna magnetizada foi coletada em um tubo identificado como negativo e descartada posteriormente. Após, a coluna foi desacoplada do aparato magnético e encaixada em um novo tubo identificado como positivo, foram feitas três lavagens de 3mL com o tampão de separação com o intuito de desprender as células positivas para CD117 até então retidas na coluna por magnetismo. A suspensão de células positivas foi centrifugada a 300G por 10 minutos à 4ºC, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspendido

em 5mL de meio de expansão alpha-mem (GIBCO), suplementado com 20% de FBS (GIBCO) e 1% de P/S (GIBCO), transferido para um frasco de cultura de 25cm² e mantido em incubadora à 37ºC com atmosfera úmida e 5% de CO_2. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias e quando a confluência das células atingiu 70% foram realizadas novas passagens em uma proporção de 1:3 (o *pellet* celular resultante de um frasco de cultura com 70% de confluência era ressuspendido e transferido de modo que formasse 3 frascos novos, por exemplo: ressuspendido em 3ml, transferindo 1ml para cada frasco, completando o volume para 20ml), para expansão celular até a 4ª passagem e aplicação nos experimentos de condrogênese.

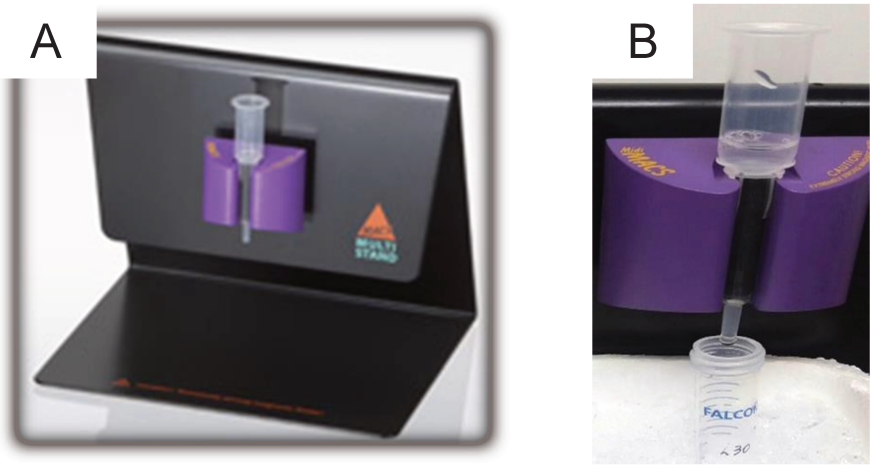

Figura 1 *(A) Sistema utilizado para separação imunmagnética, MidiMACS™ Starting Kit (LS), Miltenyi Biotec; (B) solução de CT de LAH passando pela coluna de separação.*

3.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO E EXPANSÃO CELULAR

As amostras de tecido adiposo humano foram obtidas por meio de pacientes submetidos ao procedimento de lipoaspiração realizados no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Após devida explicação e orientação sobre o presente estudo, os pacientes concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após o procedimento cirúrgico as amostras de lipoaspirado foram encaminhadas ao LABIMOCA e processadas segundo protocolo de Zuk (37), que

consistiu em transferir a amostra para um recipiente estéril e submetê-la à lavagens com PBS 1x resultando em duas fases, a fase superior contendo gordura e a fase inferior contendo o PBS, excesso de sangue e outros resíduos a serem descartados **(Figura 2)**.

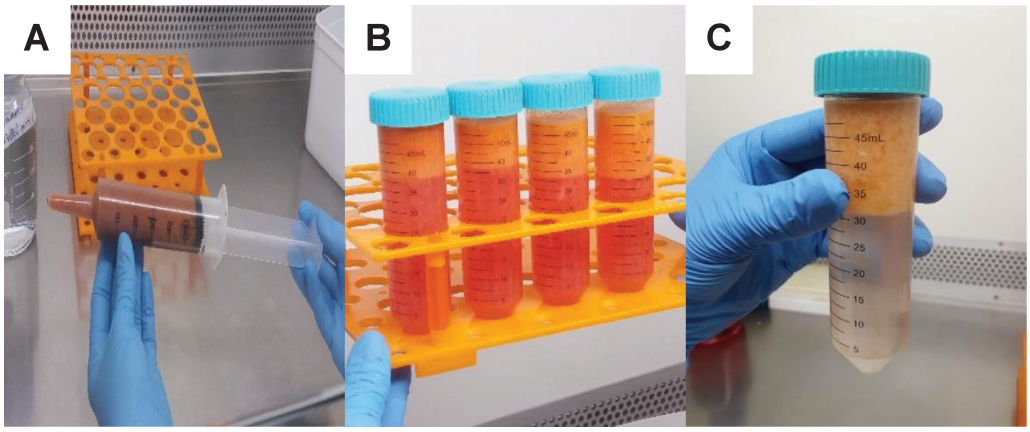

Figura 2 Recepção da amostra no laboratório em seringa estéril (A); amostra distribuída em tubos submetida a seguidas lavagens (B) até que a solução de lavagem, na parte inferior do tubo, se tornasse incolor e transparente, garantindo que o excesso de sangue foi descartado (C).

Após repetidas lavagens a fase gordurosa foi submetida à etapa de digestão enzimática sob ação de uma solução 0,075% de colagenase tipo II (*Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO*) em PBS 1X e mantida em banho-maria à 37ºC por 30 minutos sob agitação suave a cada 5 minutos. Após essa etapa duas fases se formaram, sendo a fase inferior aspirada gentilmente e transferida, dividindo seu volume em dois tubos falcon. O volume dos tubos foi completado com meio DMEM de baixa glicose (GiBCO, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de FBS (GIBCO) para a inativação da colagenase e 1% de P/S (GIBCO). Após 5 minutos de descanso em temperatura ambiente e 10 minutos de centrifugação à 300G, descartou-se o sobrenadante ressuspendendo-se o *pellet* em meio DMEM de baixa glicose (GIBCO), suplementado com 10% de FBS (GIBCO) e 1% P/S (GIBCO) e transferindo-o para um frasco de cultura de 75cm², completando o volume do meio até 20ml. O frasco de cultura foi mantido em incubadora à 37ºC com 5% de CO2 e atmosfera úmida durante dois dias para que as primeiras células aderissem, descartando-se as células não aderentes na troca do meio de cultura. As células

foram expandidas até atingirem 70% de confluência, momento em que foram retiradas dos frascos pela ação da solução 0,25% de tripsina-EDTA (GIBCO), neutralizadas com FBS (GIBCO), lavadas com PBS 1X, centrifugadas a 300G por 10 minutos, recolocadas em novos frascos sob as mesmas condições de cultura. Seguiu-se com a expansão celular em uma proporção de 1:3, sendo realizadas três passagens para atingir o número ideal de células para a aplicação nos experimentos.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO

3.3.1. Aderência celular

As culturas celulares de ambas as fontes foram observadas diariamente em microscópio óptico para analisar os aspectos morfológicos das células, atentando-se para formação de colônias de células de formato alongado, fibroblastóides, característica de células-tronco em cultura.

3.3.2. Citometria de fluxo

Uma parte das células de LAh e de TAh, ao atingir a quarta passagem de expansão celular, antes da aplicação nos experimentos de condrogênese, foi submetida à análise imunofenotípica por meio da técnica de citometria de fluxo, com marcação de anticorpos específicos, sendo CD90-FITC, CD105-FITC, CD73-PERCP Cy 5.5, HLA-DR-PERCP Cy5.5, CD45-PE Cy7, CD34- PERCP Cy5.5, CD19-PE Cy7, CD166-PE, CD151-PE, CD49c-PE, CD117-PE Cy7 e SSEA4-FITC (*Biolegend*, *San Diego*, *CA*),cuja positividade ou negatividade caracterizariam as células como células tronco mesenquimais. As células de ambas as fontes foram retiradas dos frascos sob ação de Tripsina-EDTA (GIBCO), submetidas a lavagens com *Wash B*, solução de lavagem, distribuídas em tubos eppendorf de 1,5ml contendo aproximadamente 10^5 células por tubo e incubadas com os anticorpos durante 20 minutos sob refrigeração e ausência de luz.

Após a incubação, adicionou-se 120uL de *Wash B* e as células foram centrifugadas a 300G por 10 minutos à 4ºC. O sobrenadante foi descartado, o *pellet*

ressuspendido em 150ul de Formaldeído 2% e em seguida a leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo (BD FACSCanto™) e os resultados analisados em software (*BD FACSDiva software*™).

3.3.3. Diferenciação nas três linhagens mesenquimais: adipogênese, condrogênese e osteogênese

A diferenciação das CT de ambas as fontes em células das três linhagens mesenquimais foi realizada por meio dos kits comerciais *StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit* (Gibco™), *StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit* (Gibco™) e *StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit* (Gibco™). Os experimentos foram realizados de acordo com as indicações do fabricante. Quando as células atingiram a quarta passagem foram retiradas dos frascos de cultura sob ação de Tripsina-EDTA e ressemeadas em placas de cultura de 6 poços, sendo 2 poços para cada linhagem a ser diferenciada. Foram utilizadas $14x10^5$ células por poço para os experimentos de diferenciação adipogênica, da mesma forma para os experimentos de diferenciação condrogênica e $8x10^5$ células por poço para os experimentos de diferenciação osteogênica. Inicialmente as células foram mantidas com meio de crescimento celular *alpha-mem* (GIBCO) em incubadora à 37ºC com 5% de CO_2 e atmosfera úmida. Após aderência e 70% de confluência celular o meio de crescimento era substituído pelos meios contidos nos kits de diferenciação e suplementados com os estímulos específicos para cada linhagem, sob as mesmas condições de cultivo. A troca de meio ocorreu a cada quatro dias e após 21 dias as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído a 4% por 30 minutos e coradas com colorações específicas para análise da diferenciação nas três linhagens, *Oil Red O* para diferenciação adipogênica, *Alcian Blue* para diferenciação condrogência e Vermelho de Alizarina para diferenciação osteogênica.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DO SCAFFOLD DE QUITOSANA E XANTANA

3.4.1. Características físico-químicas, estruturais e toxicidade

Os suportes utilizados neste trabalho foram produzidos e caracterizados físico-químicamente pela equipe da Profª Dra. Angela Maria Moraes, da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, conforme procedimento descrito por Westin (36). As amostras produzidas de suportes poliméricos de quitosana, xantana

complexados na presença de pluronic (F-68) (QXP) foram medidas quanto a sua espessura com micrômetro digital (Mitutoyo, modelo MDC-25S, Japão), sendo realizadas 10 replicatas em amostras com dimensões de 6cm x 1cm de diferentes lotes. A estrutura e morfologia foram analisadas macroscopicamente (câmera fotográfica) e microscopicamente (microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 440 da marca Leica operando a 10 kV e 50 pA). Para as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), os suportes foram recortados em amostras de dimensões 1x1cm e colocados em dessecador por 24 horas. As amostras foram recobertas com uma camada ultrafina de ouro (92 Å) em um *mini sputter coater* (SC 7620, *VG Microtech*).

A citotoxicidade indireta do suporte de QX em relação às CT de LAh e TAh foi baseada nos resultados obtidos por Zuliani (38) através do ensaio colorimétrico de MTT realizado. Foram preparados extratos dos suportes a uma proporção de 0,05g/ml imersos em meio de cultura em diferentes tempos: durante 1 dia, 2 dias e 7 dias com trocas diárias do meio de cultura em incubadora a 37ºC e 5% de CO_2. Para controle do ensaio foi utilizado meio de cultura como controle negativo e extrato de fragmentos de látex como controle positivo de morte celular. Para o experimento foram preparadas alíquotas de 100µl de uma suspensão contendo 10^5células/ml de meio α-MEM suplementado com 20% de FBS e 1% de P/S que foram inoculadas em placas de 96 poços com fundo chato e mantidas em incubadora a 37 ºC e 5% de CO_2 para que as células pudessem aderir ao plástico e formar uma monocamada celular. Após 24 horas o meio sobrenadante foi totalmente removido e substituído por 100 µl dos extratos preparados, bem como os respectivos meios dos grupos de controle positivo e negativo. A placa foi incubada sob a mesma condição por mais 24 horas então, os extratos foram removidos e após lavagem com solução tampão PBS foram adicionados 100µl de meio α-MEM sem vermelho de fenol, 10µl de MTT a 5mg/mL em PBS. Após quatro horas de incubação a 37°C foram adicionados a cada poço 100µL de solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 100g/L dissolvido em uma solução de dimetil sulfóxido (DMSO) contendo 0,6% de ácido acético. A placa foi gentilmente homogeneizada e incubada a 37ºC por mais uma hora. Decorrido este período, as amostras foram levadas para medida de absorbância a 550nm em espectrofotômetro ELISA (*Thermo Scientific*, Multiskan FC, Finlândia) e os dados

analisados em planilha Excel para avaliação do grau de citotoxicidade do material sobre as células.

3.5. CONDROGÊNESE DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO

3.5.1. Aplicação das CT de LAh e TAh no *scaffold* de quitosana e xantana

Para utilização do *scaffold* em cultura, o material foi recortado em circunferências de 1,5cm, as quais foram encaixadas em placas de 24 poços, embaladas e encaminhadas a uma empresa especializada em esterilização por óxido de etileno. Antes da aplicação das células no suporte, o mesmo foi submetido a lavagens com meio de cultura DMEM de alta glicose, as quais eram realizadas de acordo com mudança de cor do meio de cultura, devido presença do vermelho de fenol, indicando a mudança de pH de neutro para ácido. Nos três primeiros dias as trocas ocorreram sempre que a cor do meio mudava de vermelho intenso para amarelo rapidamente, após os três primeiros dias, a cor do meio variava de vermelho para laranja, sendo necessário apenas três trocas diárias, até que a cor do meio se mantivesse estável, indicando pH estável. Sendo sete dias o tempo estabelecido como suficiente para neutralizar o pH e impedir que a acidez interferisse no cultivo celular. A cada troca de meio, o pH foi medido com pHmetro. Essa acidez encontrada no *scaffold* foi devido ao ácido acético utilizado para dissolução da quitosana, solúvel apenas em meios ácidos, em etapa inicial do processo de desenvolvimento do material. Após expansão celular, as CT de LAh e TAh em quarta passagem foram inoculadas nos suportes em uma concentração estabelecida entre 1 a 2 x 10^6 células em 0,5ml de meio através de perfurações feitas com o auxílio de uma seringa estéril de 1ml. O meio utilizado para diferenciação foi constituído de DMEM de alta glicose (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, *life sciences*), suplementado com ácido ascórbico (50µg/ml – *Sigma Aldrich*), Prolina (40µg/ml - *Sigma Alderich*); *insulin-transferrin-selenium* (ITS+1 - 1% - *Sigma Aldrich*), dexametasona (0,1µM- *Sigma Aldrich*) e 10 ng/ml TGF-β3 (R&D Systems). As placas foram mantidas em incubadora de CO_2 5%, 37ºC e atmosfera

úmida. A diferenciação das CT de ambas as fontes foi realizada da mesma maneira. As células foram estimuladas durante 21 dias com trocas de meio a cada 3 ou 4 dias. Durante este período os meios de cultura foram armazenados a -80°C para posterior precipitação de proteínas.

Após os 21 dias de cultivo das CT de LAh e TAh nos *scaffolds*, as amostras foram retiradas da incubadora para análise e confirmação da diferenciação condrogênica por diferentes técnicas

3.5.2. Microscopia de varredura (MEV)

Decorrido o período de inoculação de 7 e 21 dias, as células aderidas nos suportes de QX foram fixadas para análise por MEV segundo protocolo descrito por Bellini (2012). O processo de fixação consistiu da imersão das amostras em análise em duas diferentes soluções fixadoras, seguida pela desidratação das mesmas. Primeiramente foi adicionado 1mL da primeira solução fixadora constituída de paraformaldeído a 4% (v/v) e glutaraldeído a 2% (m/v) em tampão cacodilato a 0,2mol/L armazenado em geladeira e a pH 7,2, em cada poço. Após o período de incubação de uma hora à 4,0°C, as amostras foram lavadas com 1mL de tampão cacodilato a 0,2mol/L gelado por 15 minutos por três vezes a cada lavagem. A segunda fixação ocorreu adicionando-se, em cada amostra, 1mL de solução de tetróxido de ósmio a 1% (m/v) em tampão cacodilato a 0,2mol/L. As amostras permaneceram imersas neste fixador por cerca de 15 minutos à 4,0°C, sendo posteriormente lavadas por 3 vezes com tampão cacodilato a 0,2 M a cerca de 4,0°C por 10 minutos a cada lavagem. Para a desidratação, as amostras foram imersas em 1 mL de soluções de etanol em água (v/v) a 50 e 70%, durante 15 minutos e por uma noite, respectivamente. Em seguida, deu-se continuidade ao processo de desidratação com as soluções de etanol em água (v/v) a 90, 100, 100 e 100%, por 15 minutos em cada solução. Após a desidratação em solução alcoólica, o etanol contido nos materiais foi substituído por CO_2 líquido e posteriormente as amostras foram secas em ponto crítico (*critical point dryer CPD 030*, Balzers). Após secas, as amostras foram metalizadas (*sputter SCD 050,* Balzers) através da deposição de uma fina camada de ouro (92A) e as morfologias das superfícies das membranas foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (*modelo JSM 5800*

LV, JEOL) no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia – UNICAMP.

3.5.3. Histologia

Após 21 dias de cultivo, as amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% em PBS durante pelo menos 24h a temperatura ambiente. Após este período foi feito seu processamento através de uma sequência de banhos em álcool, xilol e parafina para que então o material pudesse ser colocado em moldes para confecção dos blocos em parafina. O material foi seccionado em micrótomo (Leica DM2500) com espessura do corte padronizada em 5µm e colocado sobre lâminas de vidro. Posteriormente os cortes foram fixados em estufa a 60ºC, desparafinados e hidratados. Foram realizadas diferentes técnicas histológicas (39)com os seguintes objetivos: para a análise da morfologia do tecido formado foi realizada a coloração por Hematoxilina (Sigma) e Eosina (Sigma) (HE), enquanto para a visualização da formação das fibras colágenas foram realizadas colorações específicas para tecido cartilaginoso como o Tricrômio de Masson (TM) e o Picrossirius Red (PR), e para a visualização de proteoglicanos seguimos o protocolo de coloração com Alcian Blue (AB), visto que são ambos principais constituintes da matriz cartilaginosa. Os cortes foram visualizados e fotografados em microscópio óptico (Leica DM2500) com câmera digital acoplada e analisados em software específico (Leica Application Suite LAS Version 4.6.2).

3.5.4. Imunohistoquímica

A análise de Imunohistoquímica foi realizada no material obtido dos experimentos com a utilização de anticorpo específicos para colágeno tipo II, o componente protéico mais abundante na cartilagem hialina e para agrecano, seu principal componente não colagênico . Os cortes seccionados em micrótomo (Leica) com espessura padronizada de 5µm foram colocados em lâminas de vidro silanizadas e foram pré-tratados conforme protocolo do produto Trilogy (Cell Marque®) para desparafinização, reidratação e recuperação antigênica. Em seguida, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena e a incubação *overnight* em câmara úmida na geladeira com anticorpo policlonal, feito em coelho, anti-Colágeno tipo II (bs-0709R -BIOSS®), ou com anticorpo para agrecano (bs-11655R-BIOSS®).

Posteriormente, os cortes foram tratados com suportes para detecção e amplificação de antígenos com o kit *HiDef Detection™ HRP Polymer System* (Cell Marque®), revelados com DAB , contra corados com Hematoxilina de Harris, desidratados e montados para análise microscópica. Foi feita uma lâmina de controle negativo da reação sem a utilização do anticorpo.

3.5.5. Imunofluorescência

Para análise de imunofluorescência o material parafinizado foi seccionado e fixado da mesma maneira descrita anteriormente, e utilizado marcação para colágeno II. As lâminas foram desparafinizadas por banhos de xilol e álcoois, lavadas com PBS (6x pH 6,8) para exposição máxima dos epítopos, seguido por 20 minutos de agitação em Glicina 0,1M, lavagens com PBS Tween, 40 minutos em BSA (10g/L) e incubação com anticorpo para colágeno II (bs-0709R -BIOSS®) overnight em câmara úmida.

Para o segundo dia, foi realizada a incubação com anticorpo secundário conjugado Alexa 647 por 1 hora em temperatura ambiente, câmara escura e úmida. Após lavagens, foi realizado bloqueio com BSA por 20 minutos, seguido de incubação com marcador DAPI e montagem das lâminas, sendo essas armazenas à 4ºC, sem exposição à luz, até a leitura em microscópio confocal.

4. RESULTADOS

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E EXPANSÃO

Foram coletadas 25 amostras de LAh, sendo19 efetivamente utilizadas, utilizando alteração de cariótipo, cuja análise foi realizada pelo departamento de genética do CAISM, e contaminação microbiológica como critérios de exclusão. Após a amniocentese, imediatamente o LAh foi encaminhado ao laboratório para processamento (Figura 3. A) e cultivo. Após seis dias em cultura foi possível observar as primeiras células aderidas aos frascos de cultura, outros tipos celulares não aderentes e artefatos (Figura 3. B).

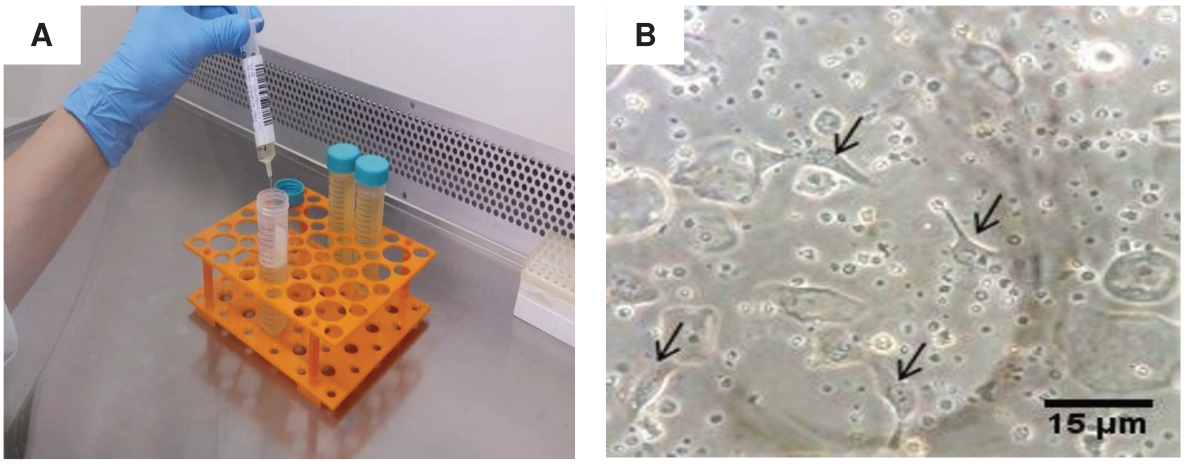

Figura 3 Recepção e processamento das amostras para obtenção das CT do LAh (A); Indicadas pelas setas, CT de LAh aderidas na superfície plástica da garrafa de cultura após seis dias de cultivo e ao redor, outros tipos celulares não aderentes e artefatos presentes no LAh (B).

4.1.1. Isolamento das células-tronco de LAH positivas para CD117

Na primeira passagem, apenas as CT provenientes do LAh foram submetidas à separação imunomagnética selecionando especificamente as células CD117 (c-kit) positivas. Os achados podem ser observados na **Figura 4**. Em **A** as CT de LAh antes da separação e em **B** as CT CD117+ separadas aderidas ao plástico.

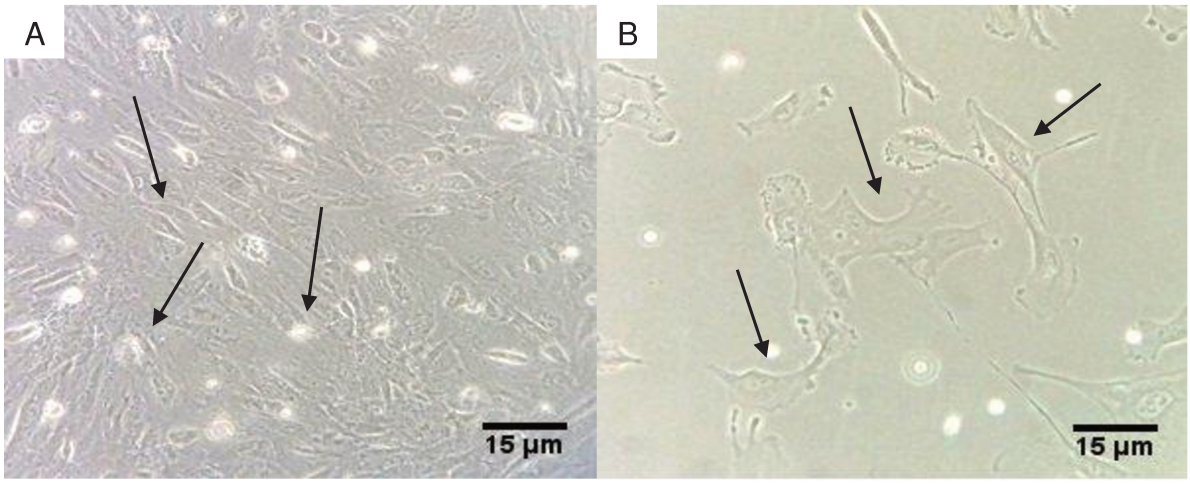

Figura 4 CT de LAh em confluência antes da separação imunomagnética (A) e após separação imunomagnética, CTs CD117+ aderidas ao frasco de cultura (B).

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSO HUMANO E EXPANSÃO CELULAR

Foram coletadas 15 amostras e 9 efetivamente utilizadas, utilizando como critério de exclusão contaminação microbiológica. Após a coleta, o lipoaspirado foi encaminhado imediatamente ao laboratório para processamento e com dois dias em cultura foi possível observar não só a adesão, mas também o crescimento e aglomeração celular, indicados por setas na **Figura 5**.

Figura 5 Indicado pelas setas, células-tronco de tecido adiposo humano aderidas em cultura após dois dias de cultivo em meio a outros tipos celulares não aderentes e artefatos do lipoaspirado.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO

4.3.1. Aderência ao plástico

Em relação ao critério de aderência ao plástico, observa-se na **Figura 6** as células-tronco de LAh **(A)** e de TAh **(B)**, ambas em quarta passagem em cultura, aderidas ao plástico, apresentando morfologia fibroblastóide.

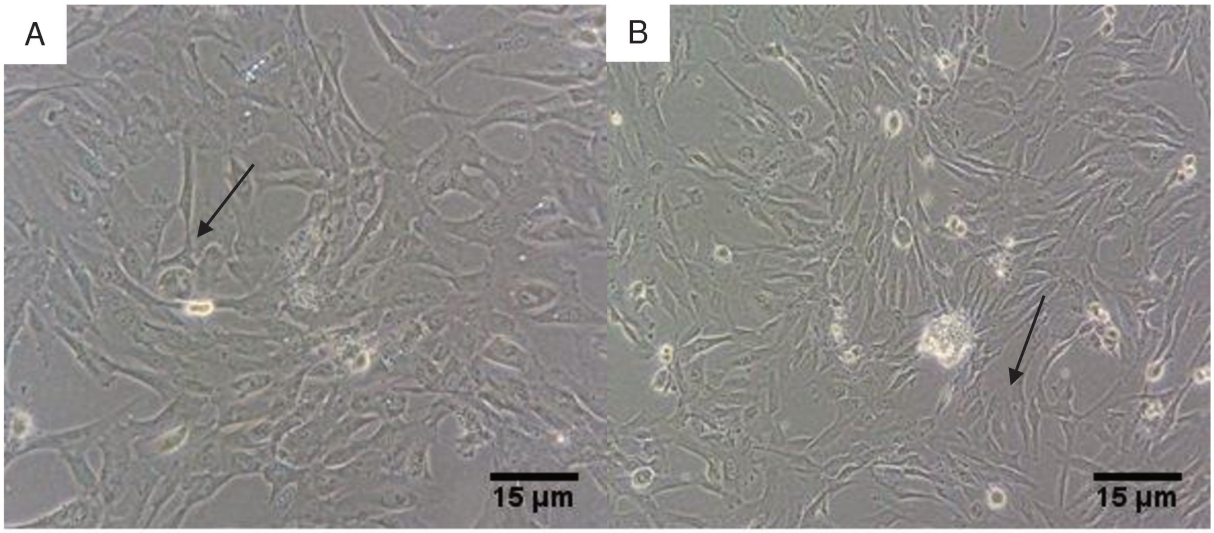

Figura 6 *CT de LAh (A) e TAh (B) em cultura, aderidas ao plástico apresentando morfologia fibroblastóide.*

4.3.2. Citometria de Fluxo

Nas CTs de ambas as fontes houve a expressão de marcadores que expressam positividade para CD73, CD90, CD105, marcadores de CT mesenquimais, positividade para CD49c e CD151, indicando potencial condrogênico, negatividade para CD19, CD34, CD45 e HLA-DR, que indicam linhagem hematopoiética e apenas nas CTs de LAh, positividade para CD117, SSEA-4 e CD166, marcadores que indicam pluripotência, que podem ser observados pelos histogramas abaixo.

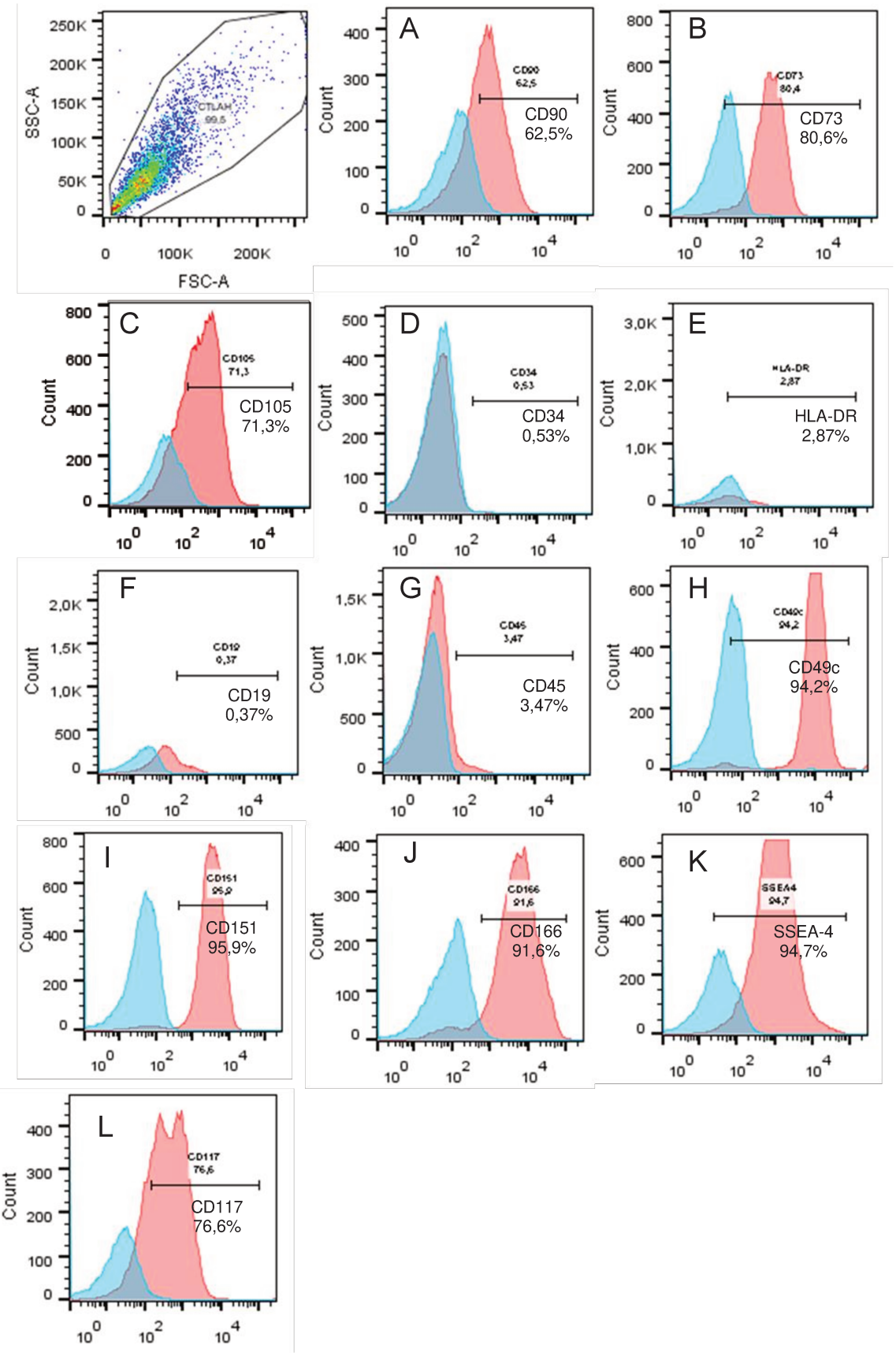

Figura 7 Positividade para CD90 (A),CD73 (B) e CD 105 (C) de linhagem mesenquimal, negatividade para CD34 (D), HLA-DR (E), CD19 (F) e CD45 (G) de linhagem hematopoiética, positividade para CD49c (H) e CD151 (I) de potencial condrogênico, bem como para os marcadores de pluripotência CD166 (J), SSEA-4 (K) e CD117(L).

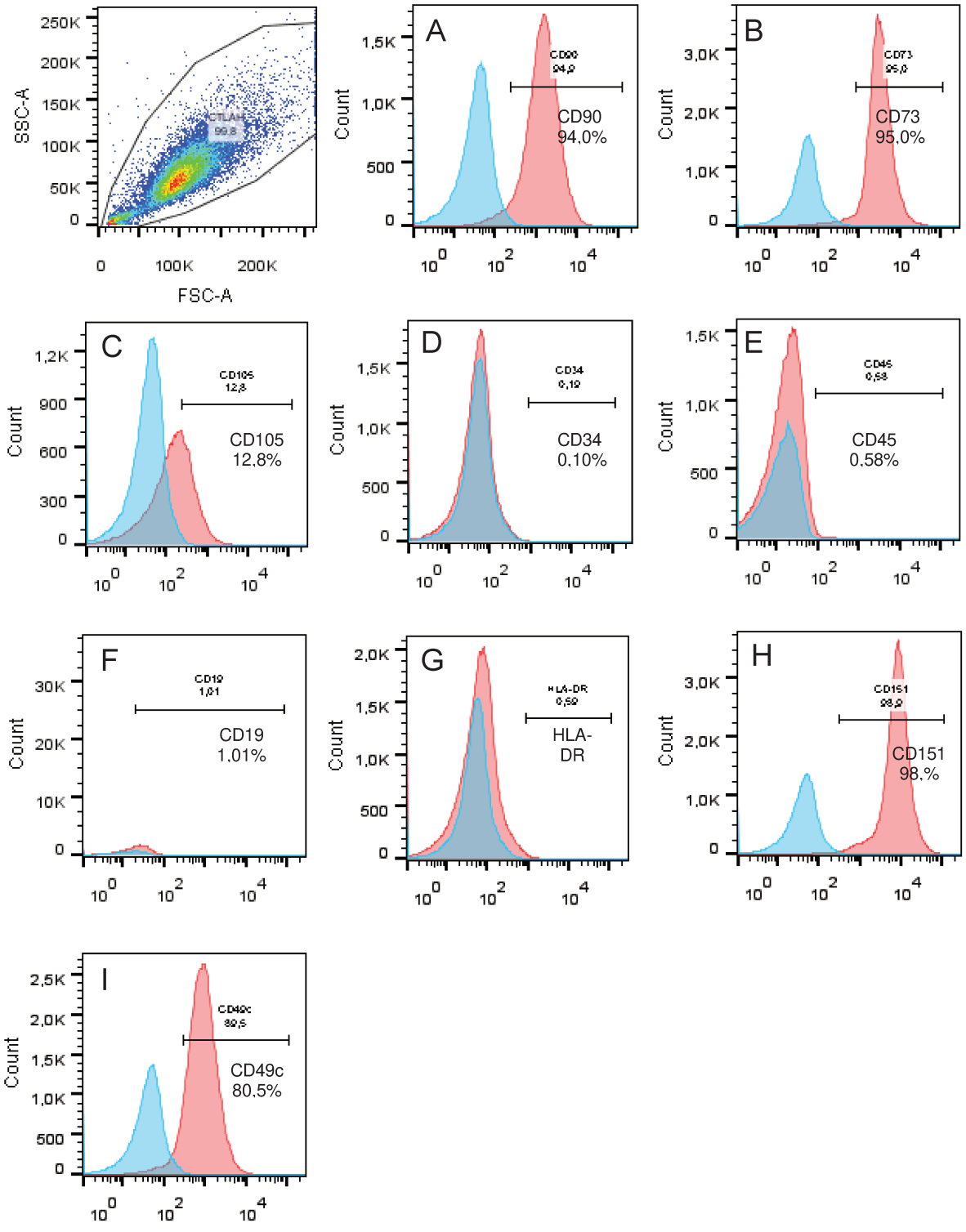

Figura 8 Positividade para CD90 (A), CD73 (B) e CD105 (C) de linhagem mesnquimal, negatividade para CD34 (D), CD45 (E), CD19 (F) e HLA-DR (G) de linhagem hematopoiética, bem como positividade para CD151(H) e CD49c (I), marcadores que demonstram potencial condrogênico.. Não foram testados marcadores de pluripotência (SSEA4, CD166 e CD117) por tratarem-se de CT adultas.

4.3.3. Diferenciação em linhagens mesenquimais

As CT de ambas as fontes foram capazes de se diferenciar em células das três linhagens mesenquimais. Observa-se na **Figura 9**, respectivamente, em **A** e **B** a adipogênese das CT de LAh e TAh, observando-se formação de vesículas de gordura em tons alaranjados, corados por *Oil Red O;* em **C** e **D**, condrogênese, corada com *Alcian Blue* evidenciando em azul a presença de glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos que compõem a matriz formada; em **E** e **F**, osteogênese em vermelho e/ou laranja intenso devido a coloração do Vermelho de Alizarina.

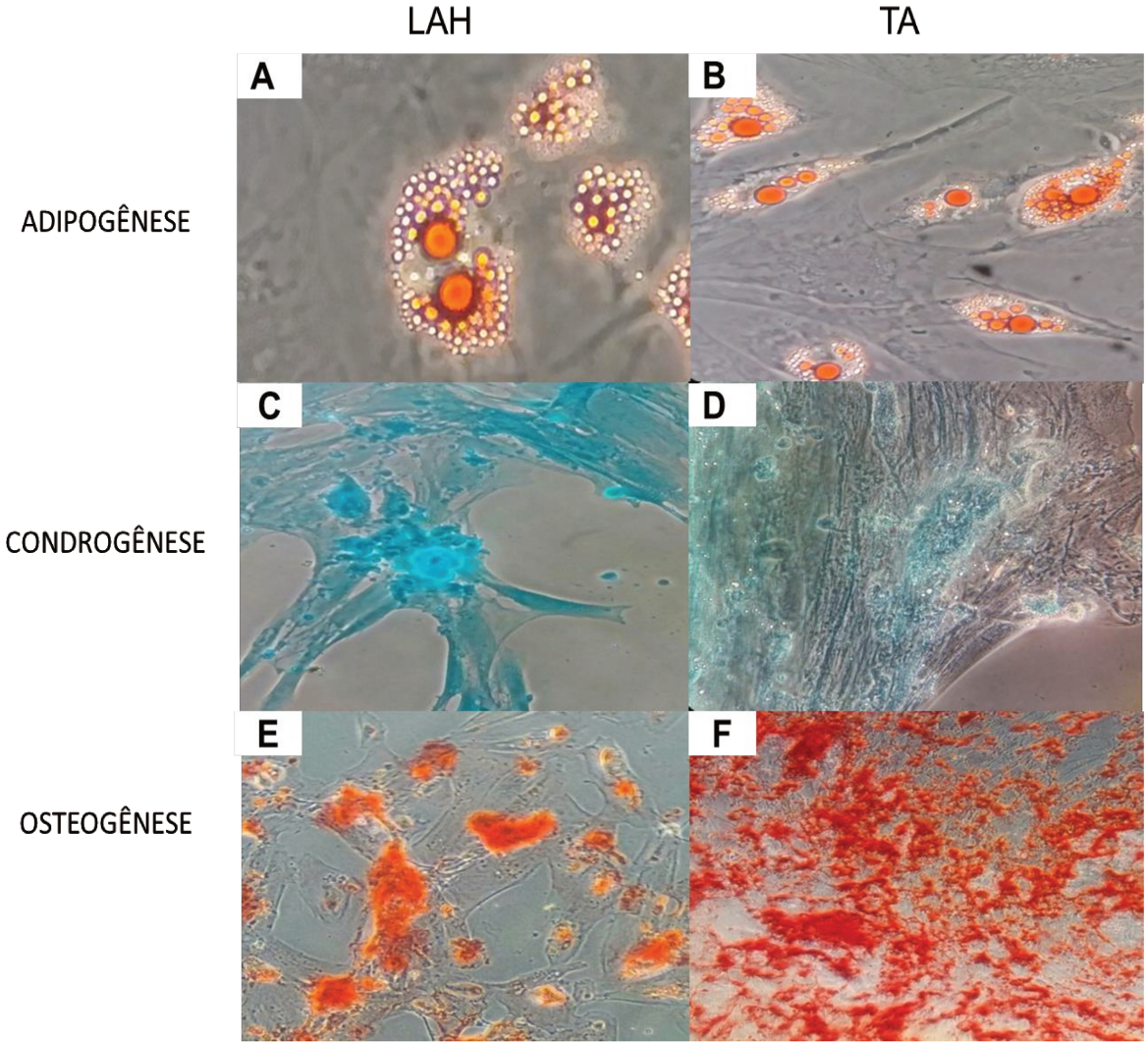

Figura 9 Verticalmente, LAh e TAh, respectivamente, em A e B diferenciação em linhagem adipogênica, com formação de vesículas de gordura coradas em tons alaranjados pela coloração de *Oil Red O*; em C e D diferenciação condrogênica, com a matriz de glicosaminogicanos e proteoglicanos corada em azul pela coloração de *Alcian Blue*; em E e F diferenciação osteogênica, com matriz de cálcio formada corada em tons de vermelho e/ou laranja intenso pela coloração de Vermelho de Alizarina.

4.4. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E TOXICIDADE DO SCAFFOLD

Os suportes utilizados apresentaram as seguintes características físicas: flexíveis, opacos, com a superfície ondulada, porosos e de espessura entre de 887 a 969µm. Nas imagens de MEV foi possível visualizar o suporte em corte transversal para observação detalhada dos poros, da sua estrutura porosa e da sua superfície (**Figura 10**).

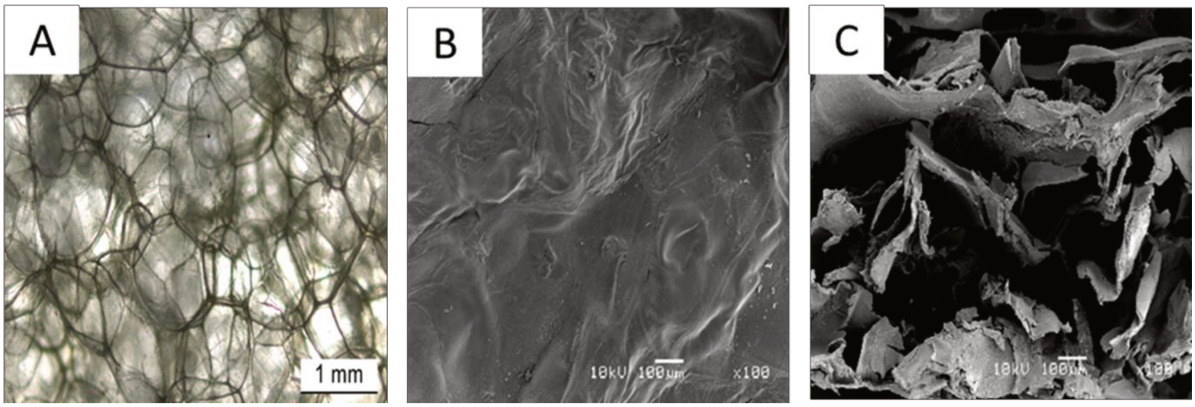

Figura 10 Microscopia óptica do scaffold, evidenciando sua estrutura porosa (A); superfície do scaffold vista pela técnica de miscroscopia eletrônica de varredura em aumento de 100x (B); vista transversal do scaffold por microscopia eletrônica de varredura em aumento de 100x, podendo-se observar estrutura lamelar com poros interligados (C).

Com os resultados de MTT observou-se inicialmente elevado indíce de morte celular. Com apenas um dia de lavagem dos *scaffolds* a porcentagem de morte celular foi de aproximadamente 27% das células do LAh (**Figura 11A**) e 43 % daquelas do TAh (**Figura 11B**). Com dois dias de lavagem esta porcentagem reduziu para ambas as fontes. Em relação às células do LAh, notou-se que após sete dias de lavagem, já não ocorriam mais perdas. Já em relação ao observado com as células do TAh, mesmo após o sétimo dia de lavagens, embora tenha apresentado menor perda de células, ainda havia cerca de 31% de morte celular.

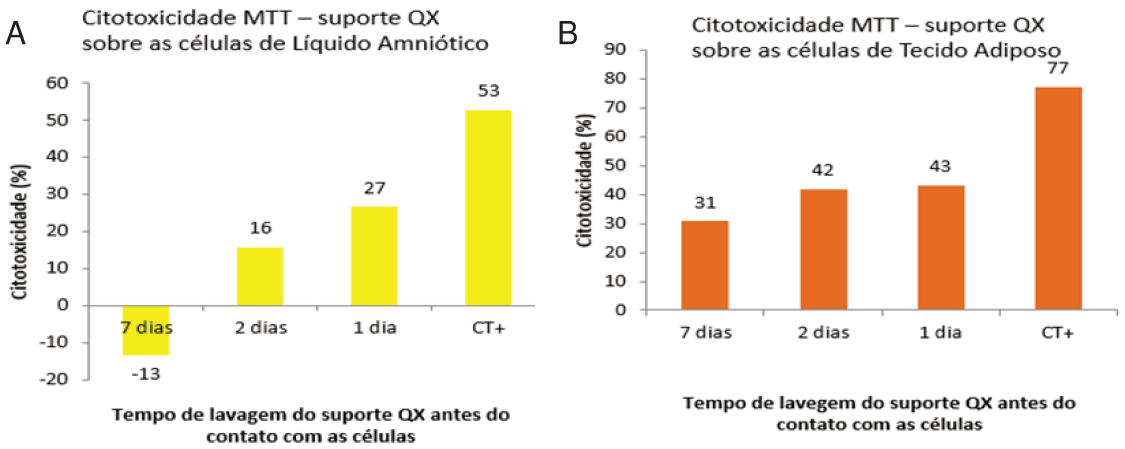

Figura 11 Citotoxicidade do scaffold em relação as células-tronco de LAh (A) e TAh (B).

(Figura retirada do trabalho de Zuliani" (38) "Micromass cultures are effective for differentiation of human amniotic fluid stem cells into chondrocytes.)

4.5. CONDROGÊNESE DAS CÉLULAS TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E TECIDO ADIPOSO HUMANO

4.5.1. Aplicação das CT de LAh e TAh no *scaffold* de quitosana e xantana

Após 21 dias da implantação das CT nos *scaffolds* observou-se macroscopicamente a formação de agregado celular por todo *scaffold* (**Figura 12**).

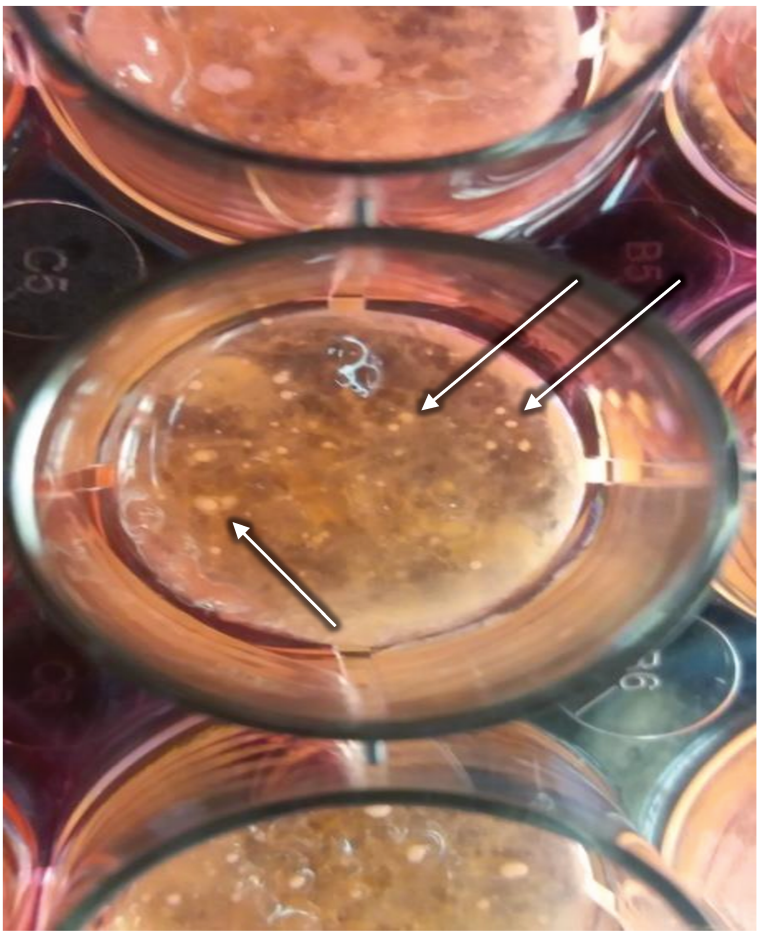

Figura 12 Células-tronco aplicadas no scaffold e indicado pelas setas aglomerado celular formado após 21 dias de cultura em meio condrogênico.

4.5.2. Microscopia de varredura (MEV)

Nos resultados de MEV observou-se a interação das CTs de ambas as fontes com o *scaffold* de QX (**Figura 13**). Além da viabilidade, houve crescimento celular e produção de matriz, que foi comprovada pelas colorações histológicas conforme mostradas adiante.

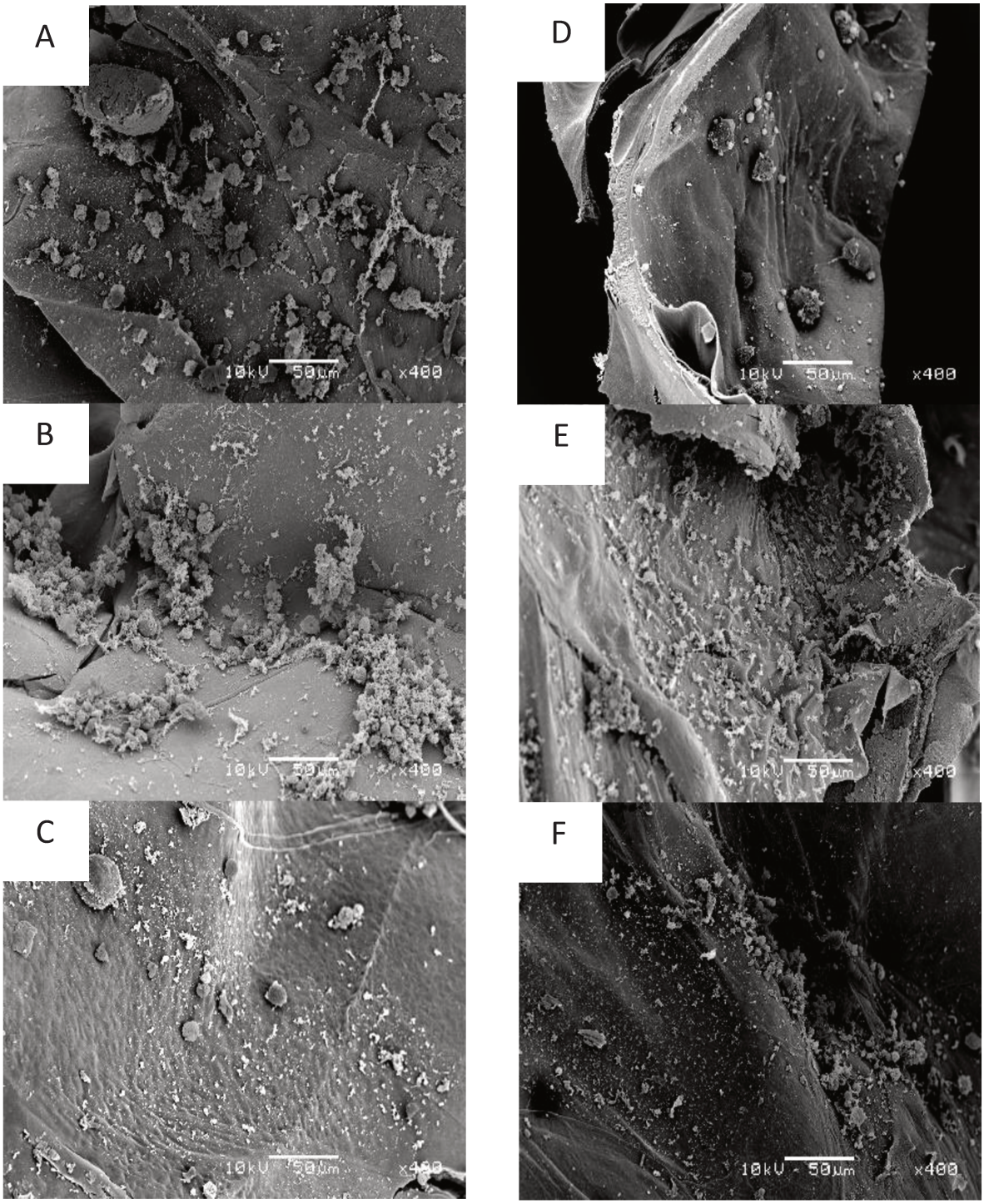

Figura 13 Microscopia de varredura em um aumento de 400x da condrogênese de CT de LAh (A, B e) e de CT de TAh (D, E e F). Em A e D, respectivamente observa-se diferenciação condrogênica após 7 dias sob estímulo de TGF-β3; em B e E , após 21 dias sob estímulo de TGF- β3; em C e F refere-se ao achado após 21 dias de diferenciação sem estímulo de TGF-β3.

4.5.3. Histologia

Os resultados de histologia para confirmação da condrogênese baseiam-se na afinidade das colorações utilizadas com os principais constituintes da matriz cartilaginosa: A **Figura 14**, refere-se aos grupos sem estímulo e a **Figura 15**, refere-se aos grupos sob estímulo de TGF-β3. Na **Figura 16** são apresentados os cortes histológicos do *scaffold* cultivado sem células, sob as mesmas condições de cultura para um controle das colorações. Nas figuras 14,15 e 16 pela Hematoxilina e Eosina (HE) observou-se estruturalmente, os núcleos celulares íntegros corados em roxo e a matriz formada em rosa (**A** e **E**); O *Alcian Blue* (AB) que tem afinidade com os glicosaminoglicanos, corou em azul as estruturas que os contém, ou seja a matriz formada e em rosa os núcleos celulares; *Picrossirius Red* (PR) e Tricrômio de Masson (TM), com afinidade especificamente pelo colágeno, coraram a matriz formada respectivamente em tons de amarelo pálido a vermelho intenso e azul.

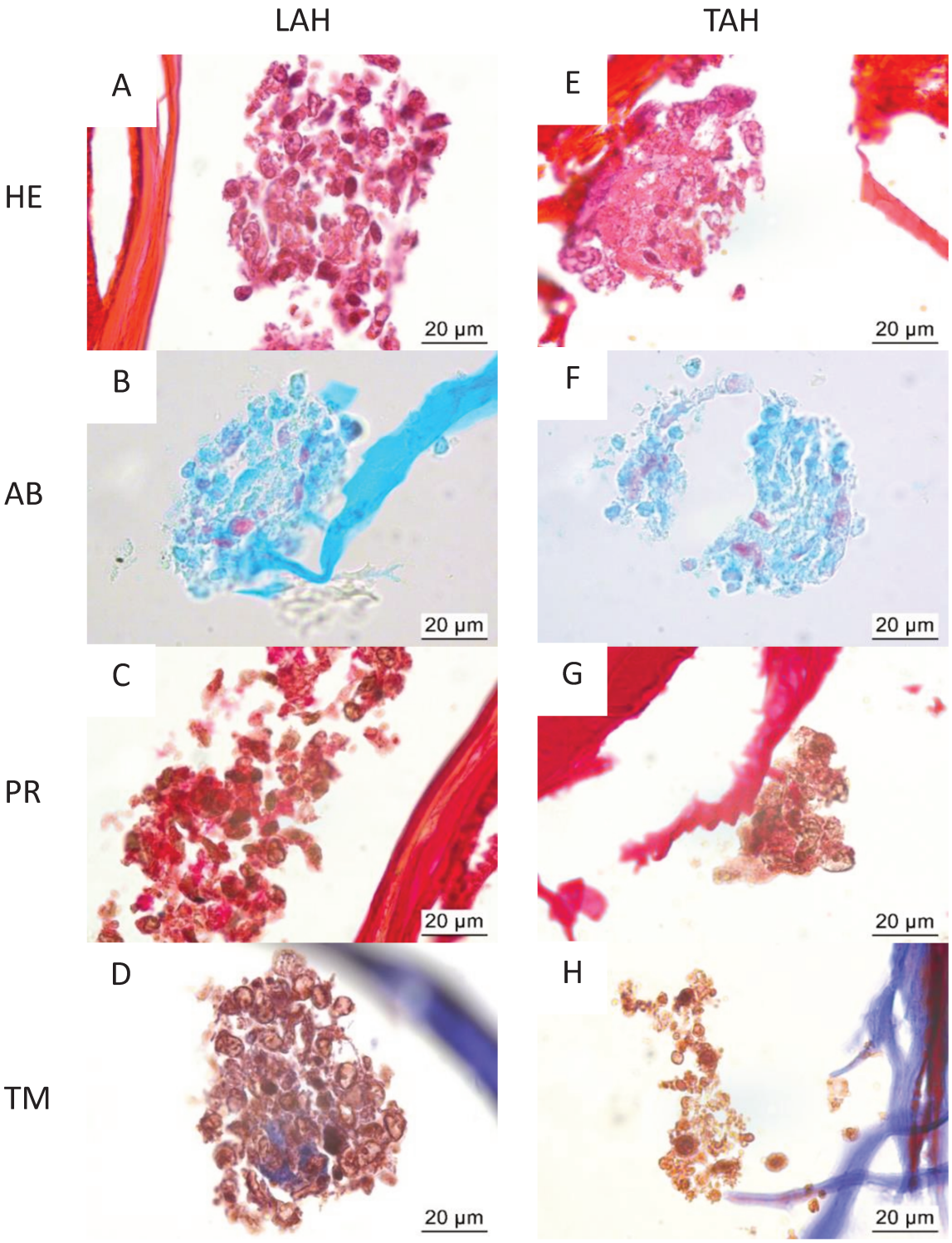

Figura 14 Condrogênese de CT de LAh e TAh após 21 dias sem estímulo de TGF-β3, em aumento de 100x. Observa-se nas imagens o início de uma condensação celular rente ao scaffold e uma discreta produção de matriz, comprovada por HE em A e E que cora em roxo p núcleo celular e rosa a mztriz; AB em B e F com pouca produção de GAGs corados em azul e em rosa o núcleo celular, PR e TM de LAh (C e D) mostram uma pequena produção de colágeno em vermelho e azul, respectivamente, enquanto PR e TM de TAh (G e H) mostram apenas o início da condensação celular, sem produção de matriz.

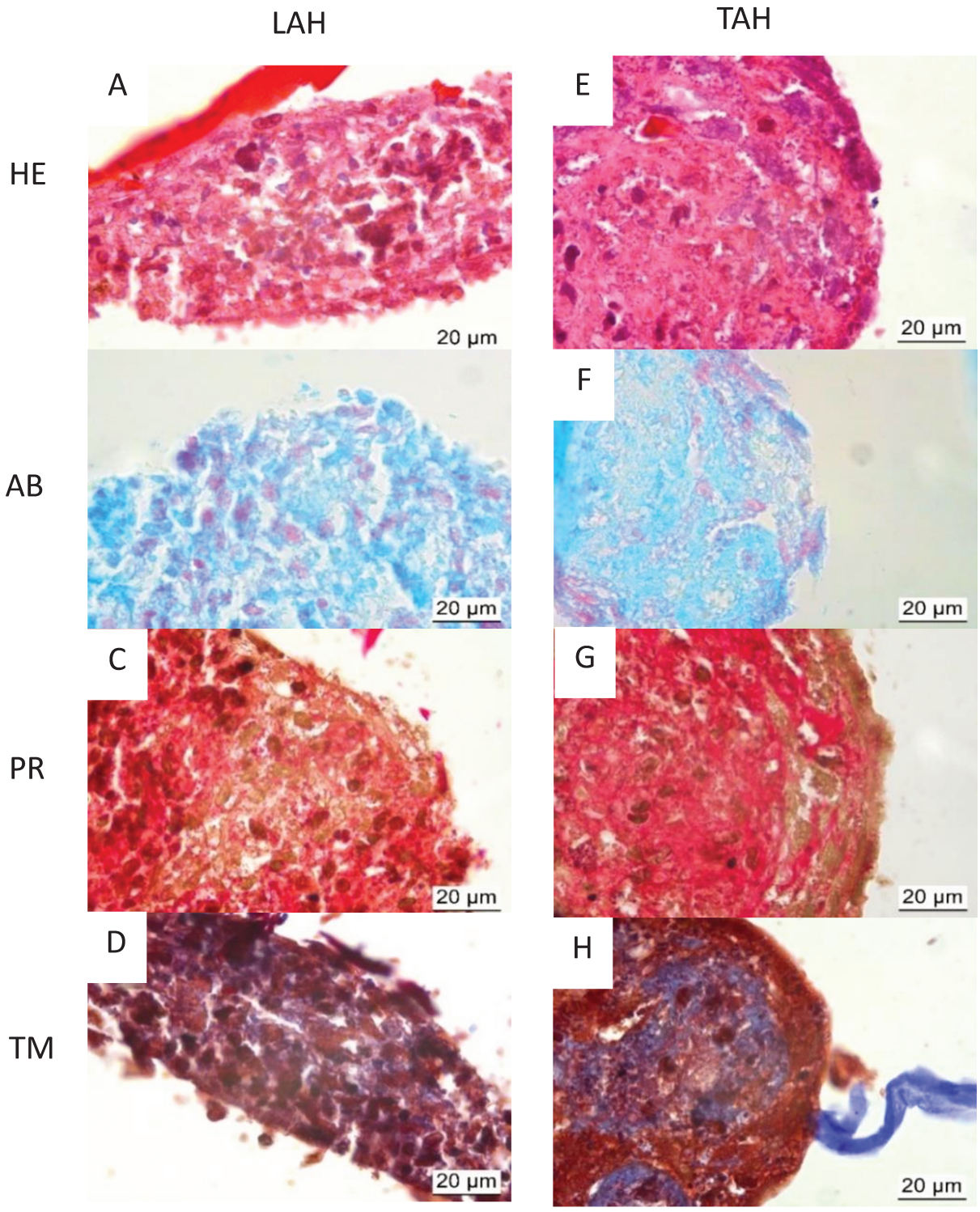

Figura 15 Condrogênese de CT de LAh e TAh após 21 dias de cultura sob estímulo de TGF-β3, em aumento de 100x. Em HE (A e E) observa-se uma condensação celular bem estruturada com núcleos corados de roxo e intensa produção de matriz corada em rosa; AB (B e F) matriz rica em GAGs corada em azul e núcleo celular em rosa; PR (C e e G) e TM (D e H) indicando a presença de colágeno variando a cor da matriz entre amarelo pálido e vermelho intenso e azul, respectivamente.

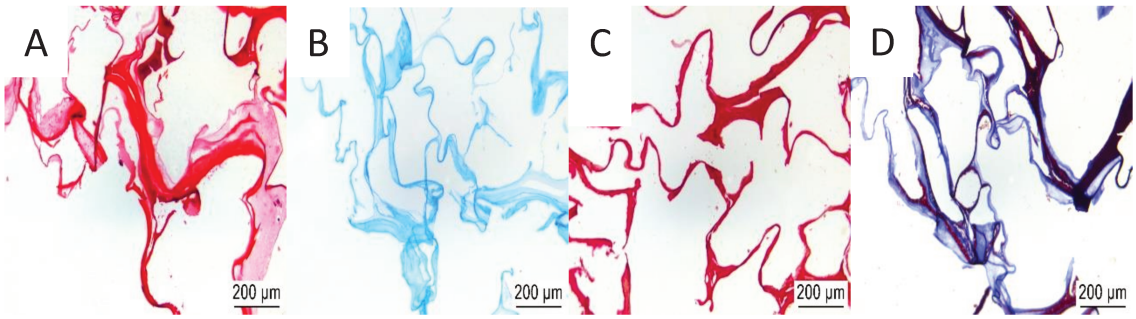

Figura 16 Cortes histológicos do *scaffold* sem células após 21 dias em cultura em aumento de 20x, corados com HE (A), AB (B), PR (C) e TM (D).

4.5.4. Imunohistoquímica

Nas lâminas com cortes histológicos de CTs de LAh (**Figura 17**) diferenciadas em condrócitos em scaffold QX após 21 sob estímulo de TGF-β3, incubadas com o anticorpo para Colageno tipo II (**A**) e Agrecano (**B**) observando-se marcação positiva para ambos pela coloração acastanhada do DAPI, indicando a diferenciação condrogênica com grande produção de matriz extracelualr. Os cortes histológicos da diferenciação condrogênica das CTs de TAh (**Figura 18**) sob as mesmas condições de cultivo no QX, sob estímulo de TGF-β3, também demonstrou marcação positiva para colágeno II (**A**) e agrecano (**B**), no entanto, evidentemente com produção de matriz extracelular em menor quantidade. Importante salientar a dificuldade de fixação das CTs de TAh nas lâminas histológicas e menor resistência às etapas do processo da técnica, ocorrendo a perda de material. No controle negativo (**Figura 19**) para cada reação sem anticorpo, todas as estruturas foram contracoradas pela hematoxilina, resultando em núcleos celulares destacados em roxo.

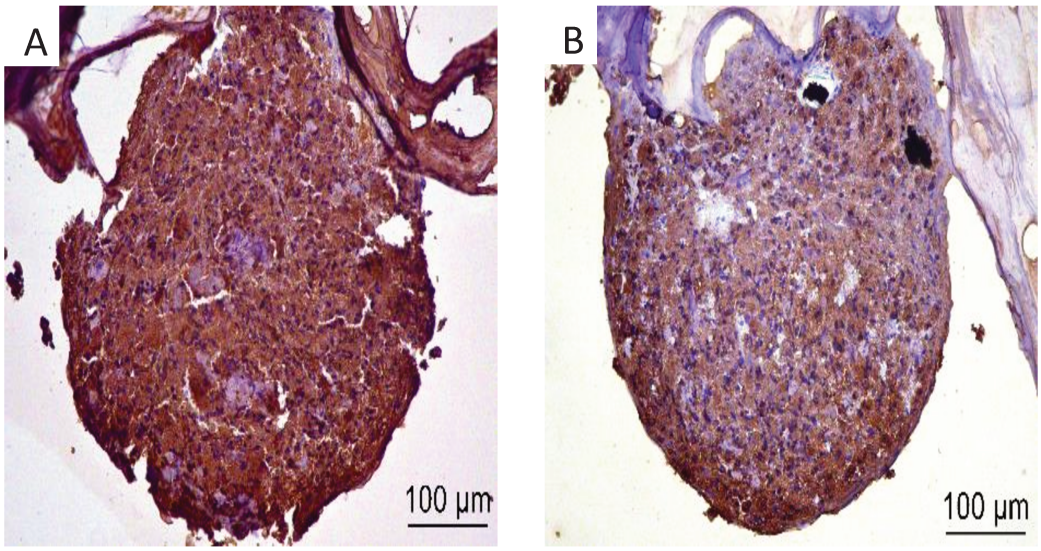

Figura 17 Imunohistoquímica da condrogênese de CTs de LAh em matriz de QX sob estímulo de TGF-β3, com marcação positiva para colágeno II (A) e agrecano (B), evidenciadas pela coloração acastanhada do DAPI por toda matriz extracelular formada.

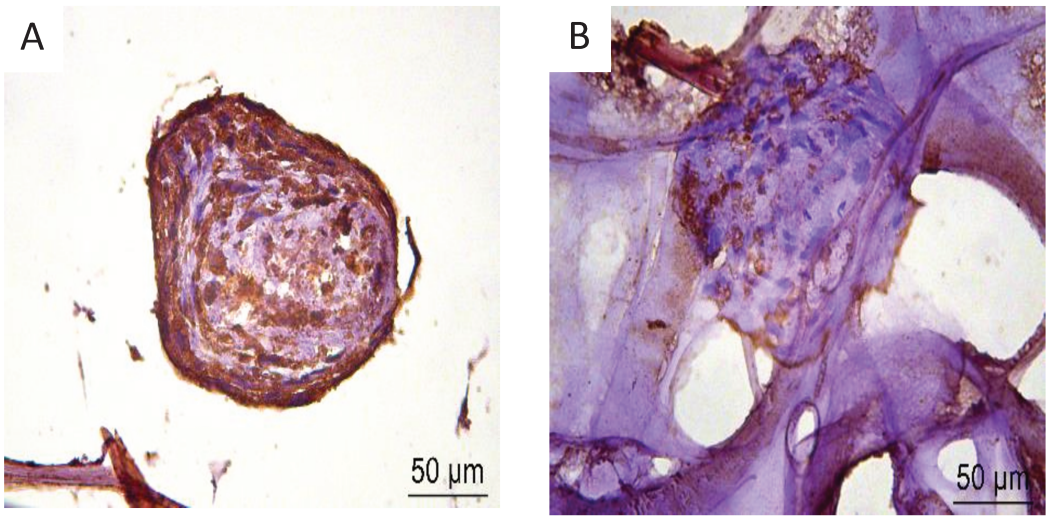

Figura 18 Imunuhistoquímica da diferenciação condrogênica das CTs de TAh em scaffold QX, sob estímulo de TGF-β3, com marcação positiva para colágeno II (A) e agrecano (II) pela coloração acastanhada do DAPI na pouca matriz extracelular formada.

Figura 19 Controle negativo da reação sem anticorpo, contracorados com hematoxilina.

4.5.5. Imunofluorescência

Os resultados de imunofluorescência expressaram positividade para marcação de colágeno II, evidenciando a diferenciação condrogênica das células-tronco de ambas as fontes de obtenção, LAh (**Figura 20. A-D**) e Tah (**Figura 20. E-H**), cultivadas matriz de quitosana e xantana. Pela marcação dos núcleos celulares, observa-se células íntegras, além de significativa produção de matriz extra-celular

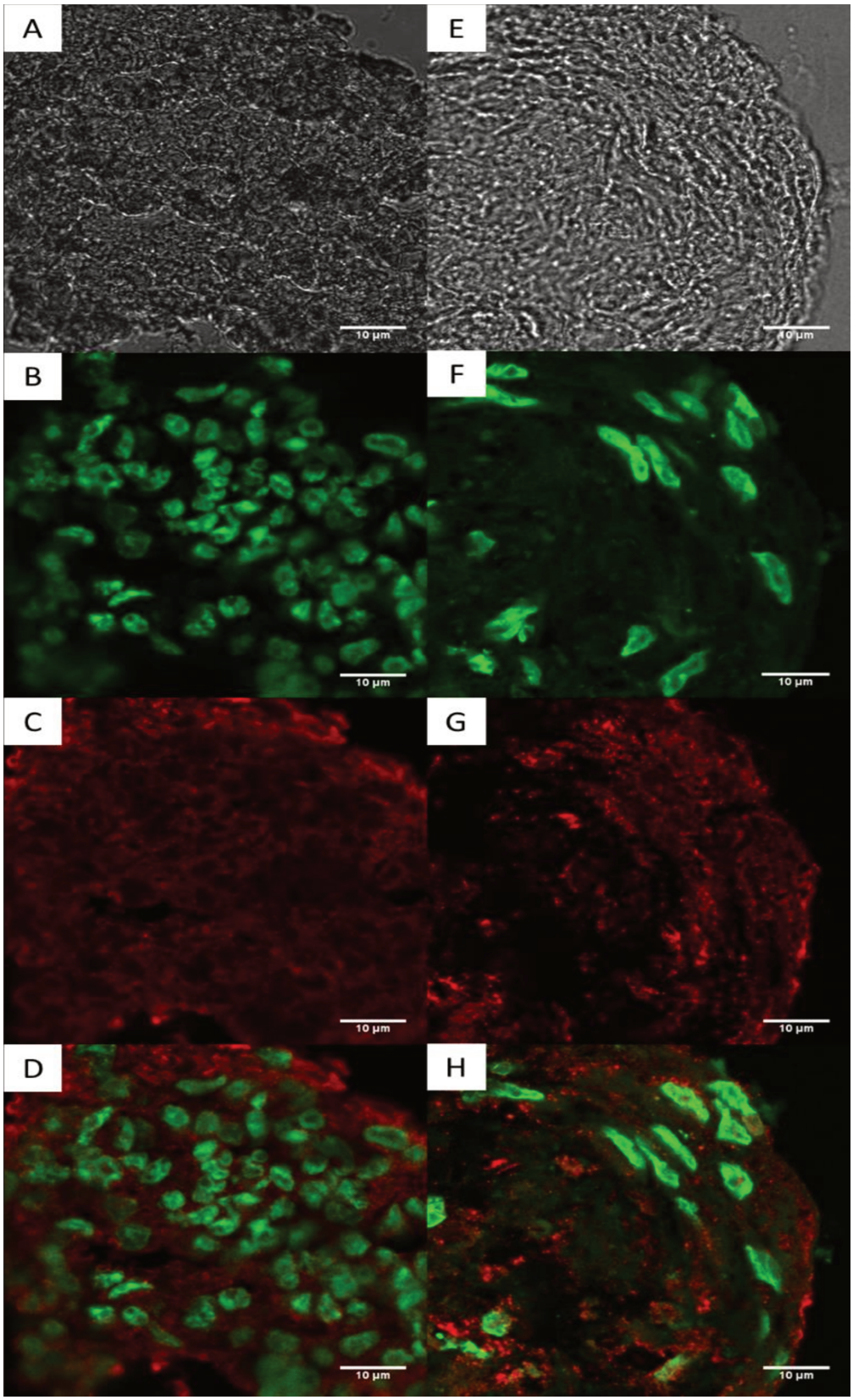

Figura 20 Imunofluorescência de CTs de LAh (A-D) e TAh (E-H) diferenciadas em condrócitos, visualizadas em microscopia confocal, com marcação positiva para colágeno II presente na matriz extra-celular formada evidenciada em vermelho.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, os danos na cartilagem articular tornaram-se mais comuns e frequentes, afetando em grande escala principalmente jovens que praticam atividades físicas intensas e repetitivas, bem como indivíduos idosos por razões associadas às próprias alterações naturais do envelhecimento e a diferentes fatores de risco, como a obesidade, a presença de doenças metabólicas, alterações anatômicas, e predisposição genética (4, 5, 40).

A baixa capacidade proliferativa e o reduzido potencial de reparação característico das células que compõem o tecido cartilaginoso facilitam e induzem o desenvolvimento de doenças articulares sérias, como a osteoartrite. Não existem tratamentos efetivos para tais condições, apenas meios paliativos, pelos quais os pacientes se tornam dependentes de medicamentos e perdem qualidade de vida. Existem poucos procedimentos destinados a recuperação dos locais lesionados e além de escassos, podem ser invasivos e não garantem resultados duradouros e sem complicações, comumente evoluindo para necroses e, em casos mais graves, grande perda tecidual ao redor (9, 41).

Na busca de tratamentos que contribuam para a recuperação das lesões condrais, despontaram aqueles envolvendo células-tronco, em razão de sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares (41, 42), que aliada a um suporte poderia ser utilizado como biocurativo a ser implantado cirurgicamente no local lesionado (43), razão pela qual nosso laboratório busca viabilizar esses procedimentos encontrando a melhor fonte de obtenção celular e um material biocompatível que não induza resposta inflamatória, produzido nacionalmente e mais acessível economicamente (36, 38).

No presente estudo foi utilizado o líquido amniótico humano e tecido adiposo humano para obtenção de células-tronco e diferenciação condrogênica em *scaffold* de quitosana e xantana, comparando-se vários aspectos para estabelecer qual a fonte de obtenção mais adequada a ser aplicada em um possível tratamento para lesões condrais, considerando que as CTs de LAh são células mais jovens e semelhantes às CTs embrionárias, enquanto as CTs de TAh são células-tronco adultas. O LAh nos últimos anos tem sido considerado uma opção promissora na obtenção desse tipo celular. Existem aspectos positivos que estimulam sua aplicação na medicina regenerativa, tais como o aspecto ético (44), pois

diferentemente do uso controverso de células-tronco embrionárias, são de fácil obtenção por meio da amniocentese, uma vez que são células fetais liberadas no LAh. Além disso, a amniocentese somente é indicada quando há necessidade para diagnóstico pré-natal (45, 46). Essas células são de cultivo fácil e baixa tumorigenicidade, sendo essa última caraterística um dos diferenciais quando comparado com células-tronco adultas (22).

Após pouco tempo da obtenção do material e colocação em cultura, observou-se, em CTs de ambas as fontes, rápida aderência e proliferação celular com formações fibroblastóides. A partir de um pequeno volume de amostra foi possível obter um grande número de células, evidenciando a confirmação dos primeiros critérios de caracterização de células tronco determinados pela *International Society for Cellular Therapy (25)*. No decorrer dos experimentos, por meio da análise de citometria de fluxo para confirmação da pluripotência das células-tronco de LAh houve resultados divergentes do esperado. Marcadores de linhagem hematopoiética como o CD34, CD45, CD14 e CD19 estavam presentes em níveis superiores aos 2%, diferentemente do que o consenso pré-estabelece . Entretanto os nossos achados foram semelhantes aos encontrados por outros trabalhos com CTs de líquido amniótico bovino (LAB) onde também se verificou positividade para a expressão de CD34 em até 50% das células após sétima passagem do LAB (47). O LAh contém diversos tipos celulares derivados do desenvolvimento do feto e por essas células expressarem diferentes marcadores de acordo com sua linhagem e tempo de gestação, acredita-se que essa peculiaridade seja responsável pelos achados na citometria. Com isso, é possível supor que o critério mínimo proposto pela *International Society for Cellular Therapy* (25) seja válido apenas para fontes de células exclusivas de linhagem mesenquimal, com células em estágios mais avançados de maturação, como encontrados nas CT de TAh, cuja a expressão de marcadores se assemelhou com os encontrados na literatura, apresentando negatidade para a linhagem hematopoiética com expressão desses marcadores menor que 2%.

No LAh, cujas células presentes são mais imaturas, considerando que essa variabilidade celular e níveis de maturação poderia interferir de forma negativa na diferenciação celular, optou-se pela separação imunomagnética após a segunda passagem da expansão celular, selecionando-se uma subpopulação de células

positivas para CD117. Estas células expressam em suas superfícies o antígeno c-kit, marcador referência para células tronco pluripotentes, indiferenciadas e alta capacidade de expansão (48) e esse está presente em aproximadamente 1% das células cultivadas a partir de líquido amniótico humano obtido para diagnóstico pré-natal (22). A seleção das células c-Kit refletiu diretamente na expressão elevada de importantes marcadores de pluripotencialidade (48). Com uma nova análise de citometria de fluxo após essa seleção foi possível observar elevados níveis de SSEA-4 indicando pluripotência e marcadores que indicam potencial condrogênico, pois são responsáveis pela agregação celular, diminuição significativa de células pertencentes a outras linhagens e de diferentes estágios de maturação. Após o processo de separação, dando continuidade aos experimentos, as passagens realizadas permitidas pela alta capacidade de expansão celular não alterou a morfologia das CT de LAh e de TAh, semelhante aos dados citados por Kolambkar (49). Mesmo após a 4ª passagem, período estabelecido nesse trabalho para o cultivo das CT, as células se mantiveram estáveis, com ramificações, apresentando a formação de colônias semelhantes a fibroblastos, o que demonstra pluripotência, sendo uma agregação que antecede a diferenciação. Essa estabilidade permite manter uma cultura por longos períodos sem que se diferencie em outros tipos celulares, sem risco de desenvolvimento tumoral, sendo possível alcançar um número celular de alta significância para os experimentos de condrogênese.

Após a 4ª passagem em cultura das CTs de ambas as fontes, foi possível comprovar o potencial de diferenciação nas três linhagens mesenquimais: adipogênica, condrogênica e osteogênica, atendendo ao segundo critério do consenso (25), o qual propõe que para se caracterizar células tronco como pluripotentes é necessário demonstrar o potencial de diferenciação nessas três linhagens. As CT de LAh, assim como as de TAh apresentaram produção de matriz em grande quatidade na diferenciação das três linhagens, que pôde ser observada pelas colorações específicas aplicadas, sendo vistas em diferentes tons de laranja as vesículas de gordura no interior das células diferenciadas em adipócitos e coradas por *Oil Red O*. Na diferenciação condrogênica a intensa produção de matriz foi corada em azul pela coloração de *Alcian Blue* comprovando a presença de proteoglicanos. Na osteogênese a matriz formada foi corada em vermelho pela

coloração de Vermelho de Alizarina evidenciando presença de cálcio em quantidades significativas.

Após os resultados significativamente positivos de caracterização e seguindo para a aplicação das CTs no *scaffold* QX, baseado nos resultados de MTT obtidos por Zuliani (38) observou-se uma maior sensibildiade das CT de TAh em relação ao suporte e mesmo após os 7 dias de lavagem estabelecidos houve uma perda celular, diferente das CT de LAh, que apresentaram uma redução de 100% de morte celular. Partindo dessa informação, soube-se que mesmo padronizando a quantidade celular inserida nos *scaffolds* para diferenciação condrogênica, a maior porcentagem de morte celular das CT de TAh diminuiria quali e quantitativamente a condrogênse.

Acredita-se que ao inserir as CTs nos suporte por meio de seringas de 1ml simultaneamente formando microporos no suporte, potencializou a interação celular no suporte consequentemente auxiliou na condrogênese. Sabe-se que no processo natural de condrogênese na embriogênese, as células se proliferam e condensam-se para dar início a diferenciação celular (10, 50). Acredita-se que os poros do suporte permitiram a interação celular e aumento de passagem de nutrientes facilitando essa proliferação celular como visto após os 21 dias de cultivo, observando-se a olho nu agregado celular, além de proliferarem, as CTs de ambas as fontes sofreram condensação celular.

Os resultados obtidos na MEV assemelharam-se aos de Westin (36), apresentando adesão e crescimento celular, assim como produção de fibras colágenas, indicando a diferenciação em condrócitos das CTs de ambas as fontes. As imagens confirmaram a menor afinidade das CTs de TAh com o suporte, observando-se uma população celular dispersa pelo suporte e uma formação de fibras mais frouxas, comparada a uma maior condensação celular e fibras mais definidas observadas na MEV de LAh. Da mesma forma ocorreu com o grupo sem estímulo de TGF-β3, apresentando pouca celularidade e pouca ou nenhuma formação das fibras, observadas no grupo estimulado. Acredita-se que as fibras observadas seriam fibras de colágeno. Em relação à diferenciação celular, a técnica de histologia apresentou resultados muito semelhantes confirmando a condrogênese de CTs de ambas as fontes, como observadas em todas as colorações utilizadas, indicando a presença de proteoglicanos e colágeno. A maior diferença que pôde ser

observada nos resultados dessa técnica foi em relação ao grupo estimulado com TGF-β3 e o grupo sem estímulo. Na condrogênese sob estímulo de TGF- β3 foi possível observar alta condensação celular e abundante produção de matriz extracelular, enquanto o grupo sem estímulo apresentou apenas o início de uma condensação celular e escassez ou ausência de matriz extracelular. O TGF- β3 está presente na condrogênese in vivo e é um fator de crescimento determinante para que o processo ocorra de forma eficiente (51, 52). Além de promover a condensação das células-tronco mesenquimais, está presente após a diferenciação, impedindo a hipertrofia dos condrócitos formados. Esse dado permite comprovar a influência do estímulo utilizado e inferir que a ausência do mesmo não impede a diferenciação celular, mas essa ocorre de forma tardia sendo necessário mais dias de cultura para ocorrer uma produção significativa de matriz condrogênica. A diferenciação mesmo sem estímulo pode ser explicada pela alta concentração de células injetadas conjuntamente, mimetizando no *scaffold* a condensação da condrogênese que ocorre no desenvolvimento embriogênico (53, 54).

Na imunohistoquímica, a condrogênese de CTs de ambas as fontes foi confirmada pela positividade para colágeno II e agrecano. Os resultados observados com as CTs de LAh mostraram uma maior condensação celular e maior produção de matriz quando comparados com os de CTs do TAh. No entanto não é possível ignorar que durante a realização da técnica observou-se uma menor resistência das amostras provindas do TAh às etapas do processo, de modo que no final da técnica todo o material presente na lâmina, em alguns experimentos, havia se perdido, dificultando a obtenção dos resultados e uma comparação mais fidedigna.

Pela imunofluorescência foi confirmada a diferenciação condrogênica das CTs de ambas as fontes com marcação positiva de colágeno II, sendo visualizada intensa produção de matriz espalhada ao redor de aglomerados celulares. A condrogênese a partir de LAh apresentou maior condensação celular quando comparadas a de TAh, células menores acreditando-se ser devido a atrofia celular semelhantemente como ocorre na maturação dos condrócitos *in vivo* para a formação da cartilagem hialina (55). A matriz formada também se mostrou mais condensada e em maior quantidade.

Importante salientar a dificuldade das técnicas histológicas em relação a sensibilidade do material células/*scafffold* ao manuseio, ocasionando perda dos cortes histológicos durante o processamento. Dificuldade essa também citada em trabalho de diferenciação de CTs de polpa dentária utilizando também o suporte de quitosana e xantana (36), descrevendo os procedimentos de caracterização utilizados como relativamente grosseiros para a estrutra do *scaffold*.Destaca-se a escassez na literatura de trabalhos com células-tronco de líquido amniótico humano que possam ser utilizados na comparação com os achados do corrente estudo. No entanto, com os resultados obtidos até o momento pode-se afirmar que foi possível o manuseio dessas células sem a perda de suas propriedades. Houve diferenciação condrogênica das CTs de LAh que mantiveram-se estáveis tanto em cultura quanto no *scaffold*. Da mesma forma as CT de TAh apresentaram estabilidade em cultura e foram capazes de promover a condrogênese, mesmo se tratando de células-tronco adultas e, pelo menos nos estudos morfológicos aqui realizados, houve uma menor interação com o *scaffold*. Inicialmente acreditou-se que este seria o aspecto negativo mais relevante, entretanto não se pode desprezar o fato de que a fonte de CT do TAh foi de gordura obtida de lipoaspirados de pacientes obesos e é sabido que a obesidade é um estado de inflamação crônica de baixo grau (56, 57) e que o tecido adiposo secreta adipocinas, tais como leptina, adiponectina, resistina e outras, que podem mimetizar molecularmente citocinas inflamatórias que eventualmente interfeririam na capacidade de adesão ao *scaffold*, uma vez que as CT de TAh ficaram expostas a esses estímulos por um tempo desconhecido o que poderia tê-las modificado, entretanto esta hipótese não foi aqui estudada e para melhor esclarecer essa possibilidade, mais estudos são necessários para comprovar a hipótese.

Assim neste estudo observamos que tanto as CTs de LAh, quanto as do TAh foram eficazes na condrogênese quando colocadas em scaffolds de quitosana e xantana quando estimuladas com TGF-β3.

6. CONCLUSÃO

Os estudos aqui realizados resultaram na caracterização bem-sucedida das células-tronco de LAh e TAh diferenciadas no *scaffold* de quitosana e xantana. Pode-se concluir assim que:

1) Houve diferenciação condrogênica das CTs de ambas as fontes de obtenção utilizadas;
2) O estímulo TGF-β3 mostrou-se eficaz, potencializando a diferenciação celular;
3) O *scaffold* QX foi capaz de mediar a condrogênese das CTs de ambas as fontes;
4) As CTs de LAh apresentaram maior afinidade ao *scaffold* e, consequentemente, resultados mais promissores, visando uma aplicação *in vivo*;
5) O *scaffold* pode ter sido um interferente para obtenção de resultados quantitativos significativos por meio das técnicas de análises escolhidas, devido sua composição.

7. PLANEJAMENTOS FUTUROS

Para reforçar os resultados da diferenciação condrogênica formada pelas células-tronco de ambas as fontes sugere-se:

- Quantificação por softwares de imagem
- A quantificação gênica de genes específicos da cartilagem articular hialina, como SOX-9, COL-2 e Agrecano (ACAN)
- Aplicação dos condrócitos diferenciados nos scaffolds *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS

1. Zhang Y, Niu J, Kelly-Hayes M, Chaisson CE, Aliabadi P, Felson DT. Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The Framingham Study. Am J Epidemiol. 2002;156(11):1021-7.

2. Hawker GA. Osteoarthritis is a serious disease. Clin Exp Rheumatol. 2019;37 Suppl 120(5):3-6.

3. Castiello E, Affatato S. Progression of osteoarthritis and reoperation in unicompartmental knee arthroplasty: A comparison of national joint registries. Int J Artif Organs. 2019:391398819879697.

4. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. Arthroscopy. 2003;19(5):477-84.

5. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheum. 2001;44(6):1237-47.

6. Doherty M, Watt I, Dieppe P. Influence of primary generalised osteoarthritis on development of secondary osteoarthritis. Lancet. 1983;2(8340):8-11.

7. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2012;4(4):269-85.

8. Zhang W, Nuki G, Moskowitz RW, Abramson S, Altman RD, Arden NK, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis: part III: Changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18(4):476-99.

9. Breedveld FC. Osteoarthritis--the impact of a serious disease. Rheumatology (Oxford). 2004;43 Suppl 1:i4-8.

10. Sarem M, Otto O, Tanaka S, Shastri VP. Cell number in mesenchymal stem cell aggregates dictates cell stiffness and chondrogenesis. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):10.

11. Helito CP, Pozzobon L, Gobbi RG, Pecora JR, Camanho GL. Complications after total knee arthroplasty: periprosthetic fracture after extensor mechanism transplantation. Rev Bras Ortop. 2013;48(5):460-4.

12. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. Clin Orthop Relat Res. 2001(391 Suppl):S108-15.

13. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A(2):185-92.

14. Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. Clin Orthop Relat Res. 2001(391 Suppl):S349-61.

15. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, et al. The use of chondrogide membrane in autologous chondrocyte implantation. Knee. 2004;11(1):51-5.

16. McLaren A. Human embryonic stem cell lines: socio-legal concerns and therapeutic promise. C R Biol. 2002;325(10):1009-12.

17. Hassan HT, El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. J R Soc Med. 2004;97(10):465-71.

18. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. Arch Med Sci. 2013;9(2):191-200.

19. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-76.

20. Duarte SA. Estudo das células mesenquimais do líquido amniótico em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano: Universidade de São Paulo; 2009.

21. Mara CS, Duarte AS, Sartori A, Luzo AC, Saad ST, Coimbra IB. Regulation of chondrogenesis by transforming growth factor-beta 3 and insulin-like growth factor-1 from human mesenchymal umbilical cord blood cells. J Rheumatol. 2010;37(7):1519-26.

22. De Coppi P, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 2007;25(1):100-6.

23. Ramasamy TS, Velaithan V, Yeow Y, Sarkar FH. Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: A Potential Pluripotent-Like Cell Source for Cellular Therapy? Curr Stem Cell Res Ther. 2018;13(4):252-64.

24. Zago MA. Pesquisa com células-tronco: Aspectos científicos, éticos e sociais. In: Covas DT, editor. 2004. p. 20.

25. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.

26. Mara CS, Sartori AR, Duarte AS, Andrade AL, Pedro MA, Coimbra IB. Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF-β3 on chondrogenesis. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(3):487-92.

27. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2009;17(11):1289-97.

28. Yang Y, Lin H, Shen H, Wang B, Lei G, Tuan RS. Mesenchymal stem cell-derived extracellular matrix enhances chondrogenic phenotype of and cartilage formation by encapsulated chondrocytes in vitro and in vivo. Acta Biomater. 2018;69:71-82.

29. Huang CL, Lee WL, Loo JS. Drug-eluting scaffolds for bone and cartilage regeneration. Drug Discov Today. 2014;19(6):714-24.

30. Ribeiro JCV, Vieira RS, Melo IM, Araújo VMA, Lima V. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. ScientificWorldJournal. 2017;2017:8639898.

31. Kang Y, Li P, Zeng X, Chen X, Xie Y, Zeng Y, et al. Biosynthesis, structure and antioxidant activities of xanthan gum from Xanthomonas campestris with additional furfural. Carbohydr Polym. 2019;216:369-75.

32. Chen Q, Shao X, Ling P, Liu F, Shao H, Ma A, et al. Low molecular weight xanthan gum suppresses oxidative stress-induced apoptosis in rabbit chondrocytes. Carbohydr Polym. 2017;169:255-63.

33. Han G, Chen Q, Liu F, Cui Z, Shao H, Ma A, et al. Low molecular weight xanthan gum for treating osteoarthritis. Carbohydr Polym. 2017;164:386-95.

34. Bellini MZ, Resende Pires AL, Vasconcelos MO, Moraes AM. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan–xanthan membranes as dressings and scaffolds for the treatment of skin lesions. Journal of Applied Polymer Science [Internet]. 2012; 125:[E421-E31 pp.].

35. Bombaldi de Souza RF, Bombaldi de Souza FC, Rodrigues C, Drouin B, Popat KC, Mantovani D, et al. Mechanically-enhanced polysaccharide-based scaffolds for tissue engineering of soft tissues. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2019;94:364-75.

36. Westin CB, Trinca RB, Zuliani C, Coimbra IB, Moraes Â. Differentiation of dental pulp stem cells into chondrocytes upon culture on porous chitosan-xanthan scaffolds in the presence of kartogenin. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;80:594-602.

37. Zhu M, Heydarkhan-Hagvall S, Hedrick M, Benhaim P, Zuk P. Manual isolation of adipose-derived stem cells from human lipoaspirates. J Vis Exp. 2013(79):e50585.

38. Zuliani CC, Bombini MF, Andrade KC, Mamoni R, Pereira AH, Coimbra IB. Micromass cultures are effective for differentiation of human amniotic fluid stem cells into chondrocytes. Clinics (Sao Paulo). 2018;73:e268.

39. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. Osteoarthritis Cartilage. 2010;18 Suppl 3:S113-6.

40. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL. Etiopathogenesis of osteoarthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2008;34(3):531-59.

41. Pleumeekers MM, Nimeskern L, Koevoet JLM, Karperien M, Stok KS, van Osch GJVM. Trophic effects of adipose-tissue-derived and bone-marrow-derived mesenchymal stem cells enhance cartilage generation by chondrocytes in co-culture. PLoS One. 2018;13(2):e0190744.

42. Zhang X, Qi L, Chen Y, Xiong Z, Li J, Xu P, et al. The in vivo chondrogenesis of cartilage stem/progenitor cells from auricular cartilage and the perichondrium. Am J Transl Res. 2019;11(5):2855-65.

43. Khan F, Tanaka M. Designing Smart Biomaterials for Tissue Engineering. Int J Mol Sci. 2017;19(1).

44. Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Stem cells from amniotic fluid--Potential for regenerative medicine. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2016;31:45-57.

45. Shulman LP, Elias S. Amniocentesis and chorionic villus sampling. West J Med. 1993;159(3):260-8.

46. Evans MI, Andriole S, Evans SM. Genetics: update on prenatal screening and diagnosis. Obstet Gynecol Clin North Am. 2015;42(2):193-208.

47. Rossi B, Merlo B, Colleoni S, Iacono E, Tazzari PL, Ricci F, et al. Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. Stem Cell Rev. 2014;10(5):712-24.

48. Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Concise Review: Amniotic Fluid Stem Cells: The Known, the Unknown, and Potential Regenerative Medicine Applications. Stem Cells. 2017;35(7):1663-73.

49. Kolambkar YM, Peister A, Soker S, Atala A, Guldberg RE. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. J Mol Histol. 2007;38(5):405-13.

50. Grogan SP, Barbero A, Diaz-Romero J, Cleton-Jansen AM, Soeder S, Whiteside R, et al. Identification of markers to characterize and sort human articular chondrocytes with enhanced in vitro chondrogenic capacity. Arthritis Rheum. 2007;56(2):586-95.

51. Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes. Connect Tissue Res. 1989;20(1-4):295-301.

52. Bader DL, Salter DM, Chowdhury TT. Biomechanical influence of cartilage homeostasis in health and disease. Arthritis. 2011;2011:979032.

53. Mello MA, Tuan RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 1999;35(5):262-9.

54. DeLise AM, Stringa E, Woodward WA, Mello MA, Tuan RS. Embryonic limb mesenchyme micromass culture as an in vitro model for chondrogenesis and cartilage maturation. Methods Mol Biol. 2000;137:359-75.

55. Park JS, Shim MS, Shim SH, Yang HN, Jeon SY, Woo DG, et al. Chondrogenic potential of stem cells derived from amniotic fluid, adipose tissue, or bone marrow encapsulated in fibrin gels containing TGF-β3. Biomaterials. 2011;32(32):8139-49.

56. Corona LP, Alexandre TD, Duarte YA, Lebrão ML. Abdominal obesity as a risk factor for disability in Brazilian older adults. Public Health Nutr. 2017;20(6):1046-53.

57. Berenbaum F, Eymard F, Houard X. Osteoarthritis, inflammation and obesity. Curr Opin Rheumatol. 2013;25(1):114-8.

9. ANEXO

UNICAMP - FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNIVERSIDADE DE CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Condrogênese de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo sobre matrizes tridimensionais composta de quitosana, complexada com outros polissacarídeos para recobrimento e regeneração de lesões condrais.

Pesquisador: Ibsen Bellini Coimbra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41685315.5.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Medicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.933.335

Apresentação do Projeto:

Esta emenda visa alterar o prazo de conclusão da pesquisa para 31/12/2018 e incluir um novo membro na equipe de pesquisa a aluna de mestrado INGRID IARA DAMAS.

Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo informações do pesquisador contempladas no documento anexado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_860994_E1.pdf 08/02/2017 10:31:44": "A razão dessa emenda foi alterar o prazo de conclusão, que se tornou necessário visto que desde a primeira etapa, de coleta de tecido adiposo, houve atrasos em razão da diminuição das cirurgias de lipoaspiração no último ano em decorrência das dificuldades financeiras do hospital, uma vez que estas cirurgias tem caráter eletivo e, em razão da crise, estavam entre as primeiras a serem suspensas.Além disso, para a continuidade do estudo foi incorporada à equipe uma nova aluna de mestrado que

dará continuidade aos experimentos".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação deste emenda foi analisado o documento anexado:

1-PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_860994_E1.pdf 08/02/2017 10:31:44

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, mas solicitamos que seja retirado do TCLE a opção para armazenamento de material biológico "concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento por até 3 anos do meu material biológico, dispensando meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.".

Segundo a Resolução 441, referente ao armazenamento de material biológico, o TCLE deve informar ao participante a possibilidade de utilização futura da amostra armazenada. Ressalta-se que o uso da mesma estará condicionado à : apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo sistema CEP/CONEP e obrigatoriamente, ao reconsentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa. Portanto, esta resolução não contempla a opção de não reconsentimento como consta no TCLE anteriormente aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

-Lembramos que segundo a Resolução 466/2012 , item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_860994_E1.pdf	08/02/2017 10:31:44		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	10/02/2015 15:21:00		Aceito
Outros	Regulamento Biorrepositório Tec Adiposo.pdf	10/02/2015 10:25:34		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Tec Adiposo.pdf	09/02/2015 16:59:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de pesquisa para CEP.pdf	09/02/2015 16:58:54		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 20 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)