



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
UNIRIO**

INSTITUTO BIOMEDICO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DISCIPLINA BIOFÍSICA

CAMILA GROHS MACEDO

**A INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ESTROMAIS DA MEDULA-ÓSSEA**

Rio de Janeiro
2016

CAMILA GROHS MACEDO

**A INFLUÊNCIA DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO
ISOLAMENTO E EXPANSÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS ESTROMAIS DA MEDULA-ÓSSEA**

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Alex Balduino

CAMILA GROHS MACEDO

Monografia aprovada em: ___ de _____ de 2016.

Comissão avaliadora:

Prof.^a Dr.^a Patrícia Cristina dos Santos Costa (UNIRIO)

Prof. Dr. Angelo Telesforo Malaquias (UNIRIO)

Prof. Patricia Ocampo (UNIRIO)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pelo amor incondicional sempre. Agradeço à minha mãe Neyse Grohs e à meu pai Carlos Marcolino, sem o apoio de vocês, tenho certeza que não chegaria a lugar nenhum, obrigada por terem me ensinado a persistir e lutar pelos meus sonhos. À meus irmãos Marcellinho, João Carlos e Pedro Henrique, vocês são a luz da minha vida e é por vocês que sempre tentarei dar meu melhor. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu amigo de infância, parceiro, confidente, Prof. Dr. Helio Kinast Cruz Secco, que hoje, tenho orgulho de ser namorada. Meu amor, não tenho nem palavras para agradecer sua dedicação, pela imensa ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo carinho, amor e paciência durante todo esse processo. Tenho um orgulho imenso de você, admiro demais sua garra e me espelho em você. Obrigada por me guiar nos caminhos da ciência, uma paixão que compartilhamos, e tenha certeza que você foi e é fundamental no meu crescimento profissional.

Agradeço imensamente à mente brilhante que foi minha inspiração desde o início do processo da realização do meu sonho de trabalhar com células-tronco, Prof. Dr. Alex Balduino, muitíssimo obrigada! Agradeço de coração por ter me concedido a oportunidade de entrar nesse mundo fantástico das células-tronco, pelo qual sou extremamente apaixonada, e por todo conhecimento que pude absorver dentro do laboratório. Obrigada por tudo. Agradeço ao Prof. Eric Cordeiro Spinetti, por ter compartilhado seus conhecimentos e experiências.

Aos meus colegas da equipe LaBioTeC, Gustavo Paris, obrigada pela dedicação e ajuda no desenvolvimento dos meus trabalhos, Ney Nogaroli e André Kolker. Sou muito feliz por ter encontrado pessoas tão especiais pra fazer parte da minha história, cada um com seu jeitinho, mas igualmente parceiros. Fazer parte do time LaBioTeC foi fundamental na minha formação acadêmica.

Meus mais sinceros agradecimentos à minha orientadora acadêmica e coordenadora Patrícia da Costa. Professora, muito obrigada pela imensa ajuda sempre carinhosa, pelo incentivo e boa vontade de sempre. Muito obrigada de coração professora, pelos conselhos e pelo apoio cuidadoso em meus momentos de dificuldade.

Ao querido Prof. Angelo Telesforo Malaquias. Muito obrigada prof., você teve uma importância única durante minha jornada acadêmica, sempre muito dedicado, simpático e

atencioso. Saiba que sempre me espelhei na sua paixão pela Biomedicina, o que só me fez crescer, e por isso agradeço enormemente o privilégio de tê-lo como parte de minha banca.

À Prof. Patrícia Ocampo. Professora, você é muito especial, me identifico muito com seu jeitinho doce, e sua paixão pela profissão é o que faz com que o aprendizado dos alunos seja muito mais fácil e natural. Agradeço pela gentileza de ter aceitado fazer parte da minha banca, e me sinto muito honrada de poder contar com sua avaliação. Muitíssimo obrigada Professora!

Às minhas amigas queridas, que me apoiaram demais nesse processo, e mesmo sentindo falta na minha ausência, sempre estiveram por perto me apoiando nessa fase de crescimento pessoal. Camila Menezes, Julianna Jatobá, Karina Aquino, Júlia Brasil, Letícia Meira, Tainá Dalcerro e Bárbara Ribeiro. Amigas, obrigada pelo carinho e pelo apoio e pela torcida favorosa de sempre. Sou muito agradecida por fazer parte dessa família formada pelo amor.

Agradeço também à todos os professores da UNIRIO que fizeram parte da minha formação direta como profissional, e também aos que influenciaram indiretamente, fazendo parte dos bastidores do meu cotidiano acadêmico. À todos meus colegas e funcionários Glauca, Eugênio, Dêlcio, Jorge, que muitas vezes foram verdadeiros psicólogos e sempre me ajudaram muito, cada um à sua maneira.

RESUMO

A medula óssea constitui um dos órgãos mais importantes na vida de pós-natos, pois realiza funções essenciais para a homeostase do organismo humano. Destacamos então duas linhagens que coexistem e interagem no nicho endosteal, são elas as células-tronco hematopoiéticas (HSC) e as células-tronco mesenquimais estromais (do inglês Bone marrow Mesenchymal Stroma Cell –BMSC). As HSC são progenitores hematopoiéticos que vão dar origem a toda linhagem de células sanguíneas, o que inclui progenitores linfóides, mielóides e consequentemente as plaquetas. Já as BMSC são derivadas da camada intermédia germinativa: o mesoderma. Na medula óssea, essas células fazem parte do estroma medular, onde são denominadas de células reticulares do estroma, que por sua vez tem ação direta de suporte à hematopoiese. *In-situ*, são responsáveis pelo processo contínuo de reparo e regeneração de células dos tecidos conjuntivos constituintes da medula, tais quais: osteoblastos (osso), condroblastos (cartilagem), adipócitos (gordura), fibroblastos e estroma medular. Dessa forma, a diferenciação em linhagens mesênquimais é inata às BMSC, contudo elas ainda podem ser induzidas à sofrer transdiferenciação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que caracteriza que as células mesenquimatosas podem ainda dar origem a hepatócitos, células β -pancreáticas, células renais, células da córnea, cardiomiócitos e até mesmo em neurônios mielinizados. Destacamos ainda outras características muito importantes das BMSC como a capacidade de migrar até o site de lesão, e no local de injúria, elas secretam fatores imunomodulatórios, que vão agir regulando a inflamação local e posteriormente a secreção de fatores tróficos promovem a regeneração do tecido. Devido a todas essas vantagens, as células mesênquimais são de extrema relevância para o tratamento de diversas condições patológicas graves, que são potencialmente reversíveis com o uso de terapia celular autóloga. Porém, devido à baixa concentração das células estromais mesenquimais na medula fresca, elas são insuficientes para transplante imediato e por isso, a expansão das mesmas *in vitro* torna-se essencial. Atualmente o protocolo de isolamento e expansão das BMSC, denominadas unidades formadoras de colônias *in vitro* é amplamente reproduzido ao redor do mundo. No entanto a adição do soro fetal bovino (SFB), universalmente utilizado em cultura de células como fonte exógena de fatores de crescimento, apesar de ser influente na atividade proliferativa das BMSC, torna o tratamento xenóforo, ou seja, as células cultivadas sob influência de SFB são rejeitadas pelo organismo humano. Portanto devido as contra-indicações acarretadas com o uso do SFB em cultura, nosso estudo sugere como fonte alternativa de fatores de crescimento exógeno o uso do plasma rico em plaquetas (PRP), afim

de verificar sua influência sobre o potencial de aderência e proliferação das BMSC *in vitro*. O PRP constituí um concentrado de plaquetas, diluídas em uma mínima quantidade de plasma pobre em plaquetas (PPP), constituído basicamente por soro, ambos obtidos à partir do sangue periférico. Ao interagir com as células em cultura, a lise das plaquetas culmina na liberação de vários fatores de crescimento, o que tem papel direto na adesão e na proliferação das BMSC *in vitro*. As amostras de BMSC foram obtidas à partir de raspado medular do acetábulo ilíaco de pacientes adultos (homens e mulheres) com indicação clínica para o implante de prótese de quadril, onde este material que seria descartado após a cirurgia, foi coletado por nossa equipe, para que fosse possível o isolamento (baseado na aderência de UFC-F *in vitro*) e expansão (proliferação) das células mesenquimais estromais *in vitro*. As células foram cultivadas em suas densidades iniciais [4×10^4] e [8×10^4] e então foram suplementares com PRP 1% ; PRP 2,5% e PRP 5%, mantendo o SFB 10% como controle, verificando-se após quatorze dias, a influência dos mesmos sob a aderência e proliferação das BMSC em cultura. Logo foi observado que mesmo em baixas concentrações, o PRP demonstra interferência significativa no número de colônias obtidas, assim como no tamanho das mesmas. Dessa forma o tratamento do grupo controle (SFB 10%) apresentou taxas de adesão e atividade proliferativa próximas as obtidas com o PRP 1%. Conforme aumentamos a concentração de PRP adicionado ao meio de cultura, aumentamos também as taxas obtidas. Assim, os resultados adquiridos com PRP 2,5% e PRP 5% foram consideravelmente superiores ao SFB 10% quanto a influência no isolamento e na expansão das BMSC. Tendo em vista que uma concentração muito menor de PRP já é o suficiente para ativar os pontenciais proliferativos desempenhados pelas BMSC, sendo que com o PRP, além de obtermos mais colônias, essas apresentam áreas maiores quando comparadas com o SFB. As colônias cultivadas sob influência de PRP, apresentam ainda uma morfologia discretamente distinta das células observadas com o soro animal, sendo células maiores do que as obtidas com o soro. Dessa forma o PRP 2,5% demonstrou maior eficiência de formação de colônia, onde as colônias obtidas são maiores e mais densas. Já o PRP 5% apresentou uma amplificação significativa nessas taxas, onde devido a alta concentração de colônias formadas e alta taxa de proliferação das mesmas, ao décimo segundo dia de cultura essas células já se encontravam em subconfluência. Dessa forma nosso estudo propõe que o plasma rico em plaquetas pode ser utilizado em cultura de BMSC, visando substituir a utilização do soro fetal bovino em culturas de células humanas, visto que as plaquetas realizam influência significativa na aderência das UFC-F e ainda na atividade proliferativa das colônias formadas.

Palavras-chave: medula-óssea, células-tronco mesenquimais estromais, plasma rico em plaquetas, isolamento, expansão, modelo *in vitro*.

ABSTRACT

The bone marrow composes one of the most important organs in postnatal life, due to its essential functions in the homeostasis of the human organism. Two lineages coexist and interact in the endosteal niche, they are Hematopoietic Stem Cell (HSC) and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BM-MSC). The HSC are hematopoietic progenitors that will give rise to all blood cell lineages, which includes lymphoid progenitors, myeloid progenitors and consequently platelets. The BMSC are originated from intermediary germ layer, the mesoderm. In the bone marrow, these cells are part of the marrow stroma, where they are denominated reticular stromal cells, thus acting directly to support the hematopoiesis. *In situ*, they are responsible for the continuous process of repairing and regenerating the cells of the connective tissue which forms the marrow, such as osteoblasts (bones), chondrocytes (cartilage), adipocytes (fat), fibroblasts (tendon and ligament), myoblasts (muscle) and marrow stroma. In that way, the differentiation in mesenchymal lineages is innate to BMSC, although they can still be induced to suffer cell transdifferentiation, such *in vitro* as *in vivo*. Therefore, Mesenchymal cells can yet give rise to hepatocytes, B-pancreatic cells, kidney cells, cornea cells, cardiomyocytes and even myelinated neurons. Giving emphasis to other major characteristics of the BMSC, they have the ability to migrate to the site of the lesion, and at the site of injury, they secrete immunomodulatory factors, which will act adjusting the local inflammation and later the secretion of trophic factors will promote the regeneration of the tissue. Due to all these advantages, the mesenchymal cells are extremely relevant to the treatment of many serious pathological conditions that are potentially reversible with the use of autologous cell therapy. But, since the concentration of mesenchymal stromal cells in fresh samples of marrow is very low, they are not enough for immediate transplant, which requires expansion *in-vitro*. Nowadays, the isolation and expansion protocol of BMSC, called Colony Forming Units *in-vitro*, is extensively reproduced around the world. Nevertheless, the addition of Fetal Bovine Serum (SFB), universally used in cell culture as exogenous growth factors, in despite of being influent in the proliferation of the BMSC, it causes the treatment to be xenophobic, as the cells that are cultivated under the influence of SFB are rejected by the human organism. So, because of the cons caused by the use of SFB in cultures, this study suggests as an alternate idea of exogenous growth factors the use of platelets rich plasma (PRP), in order to verify the influence in adherence and proliferation of the BMSC *in-vitro*. The PRP composes pellet of platelets, diluted in a minimum concentration of platelet-poor plasma (PPP), formed basically by serum, both coming from the peripheral blood. When

interacting with the cells in culture, platelet lysis culminates in the liberation of many growth factors, which is directly related to the adherence and proliferation of the BMSC *in-vitro*. The samples were obtained by scraping the medullary acetabulum of adult patients (men and women) with medical indication to the implant of hipbone prosthesis, where the material that would be discarded after the surgery was collected by our group to create the possibility of isolation and expansion (proliferation) of the mesenchymal stromal cells (based on the adherence of UFC-*Fin-vitro*). The cells were plated in their own initial density (4×10^4) and (8×10^4) and then added PRP 1%, PRP 2,5% and PRP 5%, maintaining the SFB 10% as control, verifying after 14 days its influence on adherence and proliferative activity of the BMSC in culture. Therefore, it was observed that even in low concentrations, the PRP shows a significant interference in the number of obtained colonies, also in their size. Thus, the treatment of the “control group” (SFB 10%) resulted in adherence and proliferation rates similar to the ones obtained with the PRP 1%. As we increase the concentration of PRP added to the culture, we also increase the obtained rates. In consequence of that, the results acquired with PRP 2,5% and PRP 5% were considerably higher than SFB 10%, regarding the influence on isolation and on expansion of the BMSC. Therefore, a much smaller concentration of PRP is enough to activate the potentials of the BMSC, and besides obtaining more colonies, these present larger areas when compared to colonies cultured in SFB. The colonies plated under the influence of PRP, display yet a discretely distinct morphology from the cells that were observed with the animal serum, being larger than the cells that were obtained with the serum. In this way, the PRP 2,5% demonstrated a bigger colony forming efficiency, where the colonies obtained are larger and denser. Now, the PRP 5% displayed a significant enlargement of these rates, in which due to the high concentration of the formed colonies and the high rate of their proliferation, in the 12th day of culture these cells had already been in subconfluency. Thus, this study proposes that the platelet-rich plasma can be used in BMSC cultures, intending to substitute the use of SFB in human cell cultures, having that the platelets do accomplish a significant influence in the adherence of the UFC-F and also in the proliferative activity of the formed colonies.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	14
2- CARACTERÍSTICAS DAS BMSC IN-SITU.....	16
2.1- Medula Óssea.....	16
2.2 - Pericitos.....	17
3- CARACTERÍSTICA DAS BMSC <i>IN VITRO</i>	19
3.1 - Cascata de Diferenciação.....	23
4- MEDICINA REGENERATIVA.....	26
4.1 – Engenharia Tecidual.....	27
4.2 - Terapia Celular.....	30
4.2.1 – Características Imunomodulatórias.....	31
4.2.2 – Características Tróficas.....	33
5- SORO FETAL BOVINO.....	35
6- PLAQUETAS: ESTRUTURA E FATORES DE CRESCIMENTO.....	38
6.1 – Biologia das Plaquetas.....	38
6.2 – Plasma Rico em Plaquetas.....	41
7- OBJETIVOS.....	43
8- MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
8.1 – Amostras.....	44
8.2 – Processamento.....	44
8.3 – Contagem.....	45
8.4 – Plaqueio.....	45
8.5 – Isolamento.....	45
8.6 – Expansão.....	46
9- RESULTADOS.....	47
9.1- Eficiência de Formação de Colônias (CFE).....	47
9.2 – Potencial de Expansão das Colônias.....	49
9.3 – Morfologia das Colônias.....	50
10- DISCUSSÃO.....	52
11- CONCLUSÃO.....	58
12- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Nicho Endosteal	17
Figura 2 – Processo Mesengênico	20
Figura 3 - Transdiferenciação das BMSC	21
Figura 4 - Potencial de proliferação das células em cultura	25
Figura 5 – Processo de obtenção do PRP	42
Figura 6 - Plaqueio das BMSC para expansão.....	46
Figura 7 - Número médio de unidades formadoras de colônia (CFE)	48
Figura 8 - Média do diâmetro das colônias obtidas	50
Figura 9 - Morfologia das BMSC cultivadas.....	51
Tabela 1 - Número médio de unidades formadoras de colônia (CFE)	48
Tabela 2 - Média do diâmetro das colônias obtidas.....	51

ÍNDICE DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Alpha-SMA - Alpha Smooth Muscle Actin

APC's – Célula Apresentadora de Antígeno

APG – Ácido Poliglicólico

APL – Ácido Polilático

BMSC – Bone marrow Mesenchymal Stem Cell (Células-tronco Mesenquimais Estromais da medula óssea)

CD – Cluster of Differentiation

CFE – Eficiência de Formação de Colônia

CTA- Células-tronco Adultas

CTM – Células-tronco Mesenquimais

DC cell – Célula Dendrítica

EEB – Encefalopatia Espongiforme Transmissível

EGF – Epidermal Growth Factor

FGF – Fibroblastic Growth Factor

HSC – Hematopoietic Stem Cell (Células-tronco hematopoiéticas)

HCAM - Homing Cell Adhesion Molecule

IDO – Indoleamina 2,3 – dioxigenase

IGF-1 – Insuline Growth Factor

IL's – Interleucinas

INF - gama – Interferón gama

ISCT – International Society for Cellular Therapy

MAPC's – Multipotent Adult Progenitor Cell

MHC – Complexo principal de Histocompatibilidade

MCAM - Melanoma cell Adhesion Molecule

NK- Natural Killer

PBS - Phosphate Buffered Saline (Tampão de Fosfato Salino)

PGE-2 – Prostaglandina 2

PDGF – Platelet Derived Growth Factor

PDGF – R – Platelet Derived Growth Factor Receptor

PPP – Plasma Pobre em Plaquetas

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

SNC – Sistema Nervoso Central

SFB – Soro Fetal Bovino

SDF – 1 - Stromal Cell Derived Factor

STRO1⁺ - Stromal Derived factor-1

TGF-B Transforming Growth Factor Beta

TNF- alpha – Fator de Necrose Tumoral

UFC-F – Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóide

V-CAM - Vascular Cell Adesion protein-1

VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

1. INTRODUÇÃO

As primeiras células-tronco adultas foram descritas em meados de 1900 pelo pesquisador Russo Alexander Maximow, que sugeriu pela primeira vez a existência de um grupo restrito de células na medula óssea responsáveis por dar origem a todas as células sanguíneas circulantes (AFANASYEV et al., 2009). Esses progenitores hematopoiéticos dão origem as células linhagem hematológica, logo podem gerar precursores linfóides e mielóides, e assim esses progenitores recebem o nome de células-tronco hematopoiéticas (HSC). Dessa as HSC, tem a capacidade de se auto-renovar, e originar precursores que seguindo o modelo hierárquico proposto para a diferenciação de cada linhagem, podem dar origem a eritrócitos, leucócitos, linfócitos e plaquetas (OGAWA, 1993). E por isso são de grande importância para o tratamento de pacientes portadores dos diversos tipos de doenças hematológicas (KORBLING et al., 1981; GLUCKMAN et al., 1989; DICK, 1997; RAFF, 2003).

As células-tronco estromais mesênquimais derivadas da medula óssea (em inglês: *Bonemarrow Mesenchymal Stromal Cell - BMSC*) apresentam particularidades que as tornam uma das mais promissoras bases de pesquisa da atualidade. Nas últimas décadas, o uso clínico dessas células em vários ramos da medicina regenerativa tem gerado resultados entusiasmantes no que se trata de regeneração tecidual, por isso são consideradas pela comunidade científica como uma das mais impactantes revoluções científicas desde o desenvolvimento dos antibióticos (GRECO, 2008).

Nos últimos anos, foi descrita outra CTA de grande importância, os pericitos. Os pericitos são derivados da crista neural no desenvolvimento do embrião e os que permanecem na vida adulta são de origem mesodérmica e habitam os diversos tecidos do corpo (DIAZ-FLORES et al., 2009).

Dentre as CTA's adultas, as que mais tem se destacado ultimamente, sendo o foco de inúmeras pesquisas e também a base do nosso estudo, são as células-tronco mesenquimais estromais derivadas da medula óssea (BMSC). As BMSC apresentam uma plasticidade muito grande, sendo capazes de se comprometer com diversas linhagens (WAGERS & WEISSMAN). Os fenótipos inatos assumidos pelas BMSC, são as linhagens clássicas: osteoblastos, condroblastos e adipócitos (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN & LALYKINA, 1970; FRIEDENSTEIN, CHAILAKHYAN & GERASIMOV, 1987). Essas células apresentam a capacidade inata de se diferenciar em células do tecido esquelético,

assim podem originar tecidos conjuntivos como: osso, cartilagem, tendão, ligamento, estroma medular, derme, tecido adiposo e músculo (CAPLAN et al., 1988; OWEN et al., 1988).

Além de todo potencial de diferenciação, alta capacidade proliferativa e potencial de autorenovação, as BMSC contam ainda com algumas características especiais. Elas possuem receptores de superfície para as quimiocinas secretadas pelas células danificadas. Acredita-se que o fator-1 de células derivadas do estroma (SDF-1) e proteínas G se acoplam a molécula de adesão CXCR-4, o que culmina numa migração quimiotática até o site de lesão (BHAKTA, HONG & KOC, 2006; SASAKI et al., 2008; GRANERO-MOLTÓ et al., 2009, KITAORI et al., 2009). E ao interagirem com as células lesadas, as BMSC começam a secretar diversas moléculas bioativas importantes no papel de regeneração dos tecidos lesados (CAPLAN & CORREA, 2011).

Dentre os diversos mecanismos reparadores, damos destaque às: 1- Moléculas imunomodulatórias - que vão atuar impedindo que o sistema imune desenvolva uma resposta inflamatória contra as próprias BMSC. Elas podem também auxiliar o sistema imune ativamente, ajudando a remover as células injuriadas (YOO et al., 2009; NAUTA, 2007); 2 - Moléculas tróficas - responsáveis por recrutar outras células que vão atuar na recuperação do tecido lesionado, além dos fatores de crescimento e citocinas também liberados pelas BMSC, que atuam de forma autócrina ou parácrina nas células saudáveis do tecido, auxiliando na regeneração do mesmo (CAPLAN & DENNIS, 2006; GNECCHI et al., 2008). Devido à essas características determinantes, as BMSC são de grande importância na medicina regenerativa e tem revelado resultados impactantes principalmente na área da terapia celular.

2- CARACTERISTICAS DAS BMSC IN-SITU

2.1 – MEDULA ÓSSEA

A medula óssea é um órgão complexo encontrado ocupando o espaço entre as trabéculas da cavidade esponjosa dos ossos chatos e nos longos, é encontrada nas epífises. Ela pode ser dividida em medula amarela, que se concentram nas diáfises dos ossos longos e são constituídos em sua maioria por células adiposas, sendo um tecido altamente vascularizado. De acordo com a idade do indivíduo, os adipócitos se multiplicam e ocupam cada vez mais espaço na diáfise. Assim estão presentes em baixas concentrações na medula de neonatos e com o passar dos anos, passam a constituir a maior parte da medula óssea nos mais velhos, porém em caso de necessidade, ela pode se converter à medula óssea vermelha, desempenhando função hematopoiética (CAPLAN, 2007).

Logo a medula óssea vermelha se concentra nas epífises dos ossos longos, nos ossos chatos e também no esterno, costelas, vértebras e dentre suas diversas funções, a principal é a hematopoiese. Destaca-se que a medula óssea é um dos principais órgãos do corpo humano, sendo responsável pela produção de mais de 6 bilhões de células por dia, o que é modulada de acordo com a necessidade de cada indivíduo.

Já o estroma medular é extremamente vascularizado, e conta com uma rica matriz extracelular, composta de fibronectina, hemonectina, lâminina, colágeno tipo I e colágeno tipo III e proteoglicanas.(CASTRO-MALASPINA et al., 1980). O estroma da medula óssea vermelha é constituído por uma variedade de células, assim como fibroblastos, osteoblastos, macrófagos, adipócitos (em menor quantidade que na medula amarela), células endoteliais e células reticulares estromais (refere-se também às BMSC).

As BMSC, assim como as outras células mesenquimais são derivadas dos pericitos (potanto possuem origem mesodermal). Na medula óssea especificamente, os pericitos se encontram repousando sobre os sinusóides medulares. No nicho endosteal, os pericitos dão origem às BMSC, por sua vez compõe o estroma medular. Essas células além de participar na regeneração de outros tipos celulares, in situ elas atuam em conjunto com as HSC desempenhando papel direto de suporte à hematopoiese (CAPLAN, 2008).

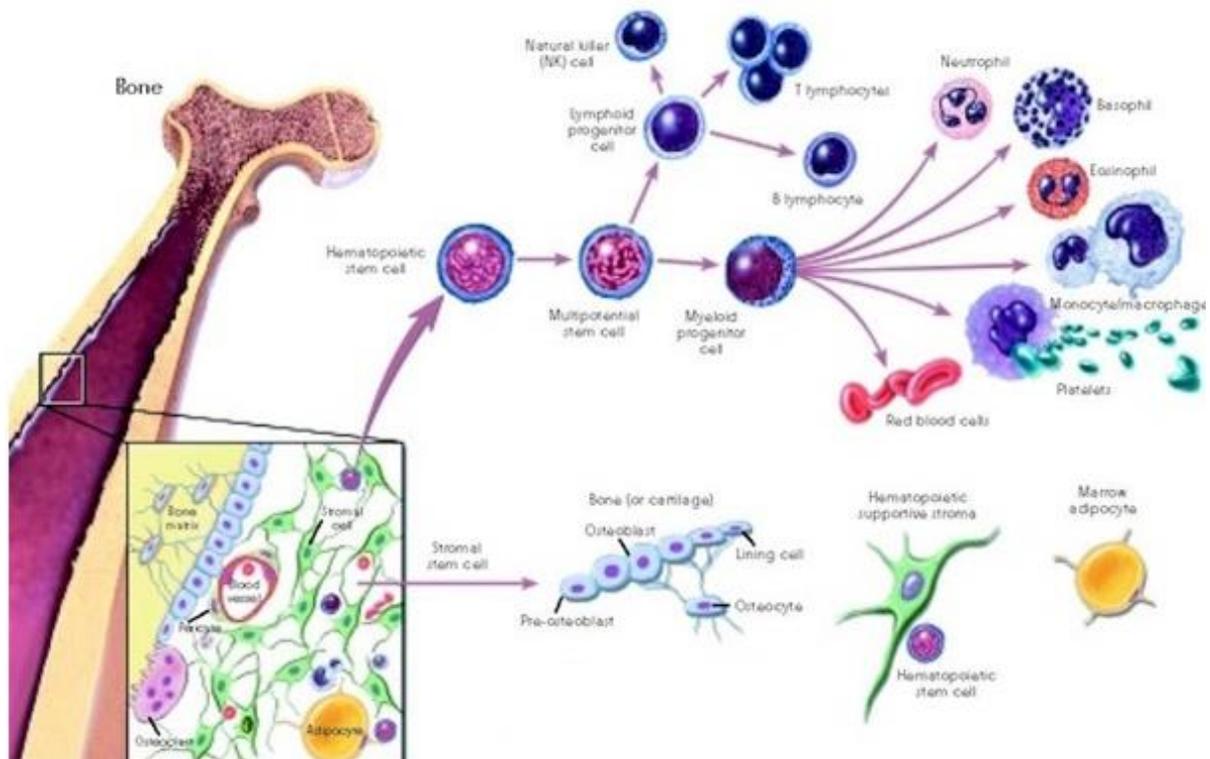


Figura 1 – Nicho endosteal, onde se localizam as linhagens de células-tronco adultas da medula óssea. Destaca-se a organização das BMSC e das HSC pelo estroma medular, assim como os outros componentes celulares da medula, evidenciando as células estromais de suporte à hematopoiese. Disponível em: <http://www.celulastroncobrasil.com.br/Novidades/Novidade/Tipos-de-CelulasTronco-embionarias-x-adultas/1> Acesso em maio de 2016.

2.1.1 – PERICITOS

Nos últimos anos houve a descrição da localização das células-tronco mesenquimais adulta, os pericitos. Os pericitos são células-tronco derivadas da camada germinativa mesodérmica e nos tecidos adultos, os pericitos são encontrados nos diversos tecidos vascularizados do corpo, inclusive na extensa rede de sinusóides da medula óssea.

Além dos marcadores clássicos de pericitos (CD146, α -SMA, NG2, PDGF-R β e fosfatase alcalina), estes expressam também os marcadores de células-tronco mesenquimais (CD73, CD90 e CD105), e Essas células tem a capacidade de se diferenciar em multiplas linhagens mesenquimais in-vivo (TAICHMAN et al., 2010). Devido a essas características, os pericitos são descritos como progenitores direto dos diversos subtipos de células-tronco mesenquimais multipotentes, sendo, por tanto, mais primitivos na cascata de diferenciação mesenquimal (CRISAN et al., 2008; CORSELLI ET al., 2010). E por isso, alguns estudos descrevem que cada tecido do corpo humano apresenta suaprópria sub-população de células-tronco mesenquimais (CTM) (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006).

Com isso, no nicho medular, os pericitos são progenitores das BMSC, onde mantêm o potencial de diferenciação e ainda são células que dão suporte direto a hematopoiese, dessa forma essas células são capazes de reestabelecer o microambiente hematopoiético quando transplantadas em ratos letalmente irradiados (BRIGHTON et al., 1992; ZHANG et al., 2009; BALDUÍNO et al., 2010)

Uma tese desenvolvida por Caplan, sugere que os pericitos enquanto quiescentes, permanecem repousados sobre as células endoteliais na superfície abluminal de todos os vasos do corpo, porém uma vez que o tecido é lesionado, ocorre a disassociação dos pericitos da vasculatura tecidual local. Ao se soltarem dos vasos, os pericitos se transformam em células-tronco mesenquimais, onde essas por sua vez, são atraídas quimiotaticamente para o site de lesão, onde a interação com as células danificadas desencadeia a liberação de uma série moléculas tróficas e imunomodulatórias, responsáveis pelo potencial regenerativo das CTM. Logo assim que elas cumprem seu papel reparador, atingindo a homeostase do tecido, as CTM migram de volta para sua posição perivascular onde permaneceram como pericitos quiescentes até uma próxima convocação (LIN et al., 2014).

Essa teoria explica as inúmeras descrições de células-tronco mesenquimais em outros tecidos que não a medula óssea, como polpa dentária, tecido adiposo - coletadas por lipoaspiração, fígado, pâncreas, rins, etc. Tendo em vista que todos tecidos do corpo possuem uma complexa rede de vascularização, logo, cada tecido apresenta grandes quantidades de pericitos, e uma vez que esses tecidos claramente são lesados durante o processo de coleta, podemos obter também as CTM através dessas inúmeras fontes. (SHI & GRONTHOS, 2003; SATO et al., 2005; TOGEL et al., 2005; DA SILVA MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006)

Sabe-se também que as células mesenquimais sofrem influência autócrina, mantendo sua auto-renovação, e também parácrina pelas células circunjacentes do tecido em que se encontram in-situ. A interferência desses fatores intrínsecos e extrínsecos vão definir o padrão de desenvolvimento das células mesenquimais in situ, e por isso elas são responsáveis pela regeneração e/ou reparo dos diversos órgãos.

3 - CARACTERÍSTICAS BMSC IN VITRO

As BMSC foram descritas pela primeira vez em meados de 1970 por Alexander Friedenstein, que estimulado pelos estudos prévios de Maximow, sugeriu a existência de uma outra população de células-tronco adultas coexistindo com as HSC na medula óssea.

Em 1970 Friedenstein isolou pela primeira vez essas células à partir de amostras do conteúdo medular de porquinhos-da-índia, e observou que uma fração das células mononucleadas eram capazes de aderir ao substrato, demonstrando alto potencial proliferativo e de autorenovação. Apresentavam inicialmente morfologia fibroblastóide e potencial clonogênico, sendo capazes realizar inúmeras divisões mitóticas e dar origem a colônias à partir de uma única célula-mãe, essas células foram então denominadas de unidades formadoras de colônia fibroblastóides (UFC-F). (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN & LALYKINA, 1970)

As BMSC são células reticulares encontradas no estroma medular, e apresentam potencial intrínseco de se diferenciar em células dos tecidos mesenquimais, como: osso, cartilagem, tendão, ligamento, músculo (liso, estriado esquelético e cardíaco), estroma, e outros tecidos conectivos como o adiposo (CAPLAN, 1991; CAPLAN, 1994). O que por muito tempo deu origem as diversas nomenclaturas como: células-tronco mesenquimais (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN & LALYKINA, 1970; CAPLAN, 1991); células-tronco esqueléticas (BIANCO E ROBEY 2008); células-tronco estromais (OWEN, 1988), e por fim como sugerido pela *International Society of Cellular Therapy* (ISCT), células estromais mesenquimais multipotentes (HORWITZ et al., 2005).

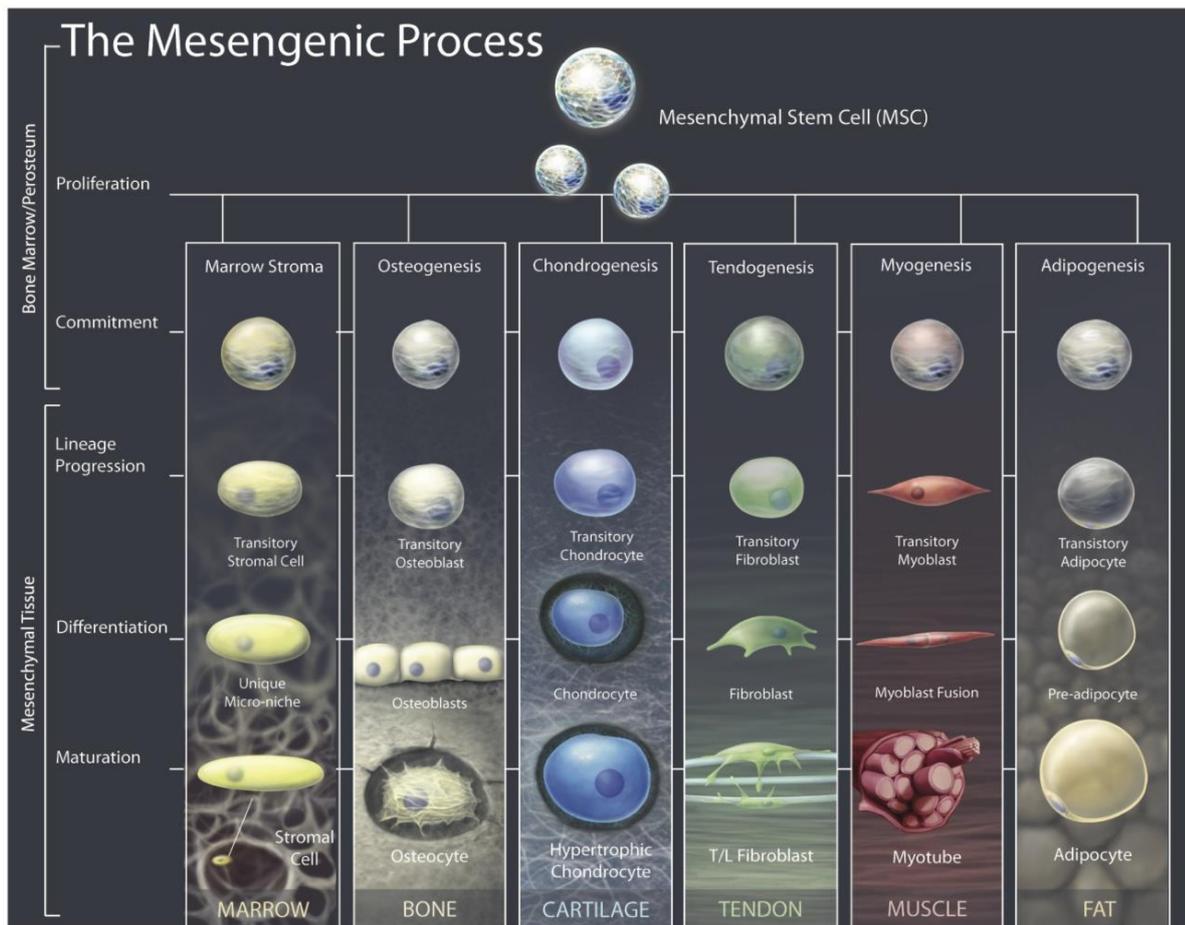


Figura 2 – Esquemática do processo mesengênico. Demonstrando todas as etapas do processo de diferenciação, desde o comprometimento com quaisquer das linhagens celulares derivadas da medula óssea, até adquirirem seu fenótipo final de células diferenciadas em tecidos mesenquimais, tais quais: estroma medular, osso, cartilagem, tendão, músculo e gordura. Disponível em: CAPLAN, 2011.

Contudo hoje sabe-se que as BMSC, quando impostas à um nicho específico *in vivo*, há interação com a matriz extracelular, logo elas sofrem influência parácrina das células teciduais circunjacentes, o que desencadeia uma série de eventos intracelulares e assim podem ser influenciadas a se comprometer com outros tipos teciduais além dos mesenquimais. (MURPHY, MONCIVAIS & CAPLAN, 2013; GRECO et al., 2007). O mesmo é real *in vitro*, onde uma vez que o microambiente *in vivo* seja mimetizado através de meio indutor adicionado a cultura *in vitro*, essas células são capazes ainda de se diferenciar em células das linhagens endodérmicas e ectodérmicas, característica essa que chamamos de transdiferenciação (KEILHOFF et al., 2006).

A transdiferenciação permite que as BMSC sejam induzidas a se diferenciar em diversos tipos celulares, como: hepatócitos, células beta pancreáticas, células renais, células da córnea, enterócitos, células epiteliais, folículos ovarianos e até mesmo neurônios mielinizados, e dessa forma podem ser utilizadas em um espectro muito mais amplo de patologias graves e muitas vezes irreversíveis com a medicina tradicional (SONG & TUAN,

2004; CHEN et al., 2004; KEILHOFF et al., 2006; PHINNEY & PROCKOP, 2007; GRECO et al., 2007; SASAKI et al., 2008; LARONDA et al., 2016). Ao contrário do que se acreditava, essas células demonstram características que vão além do multipotencial, e podem ser consideradas como células pluripotentes *in vitro* (JIANG et al., 2002). Devido a isso, a fim da padronização com a nomenclatura descrita universalmente na atualidade, adotamos o termo BMSC (do inglês *Bone marrow Mesenchymal Stromal Cell*) referindo-se à todas essas nomenclaturas supracitadas, que fazem menção à um mesmo tipo celular.

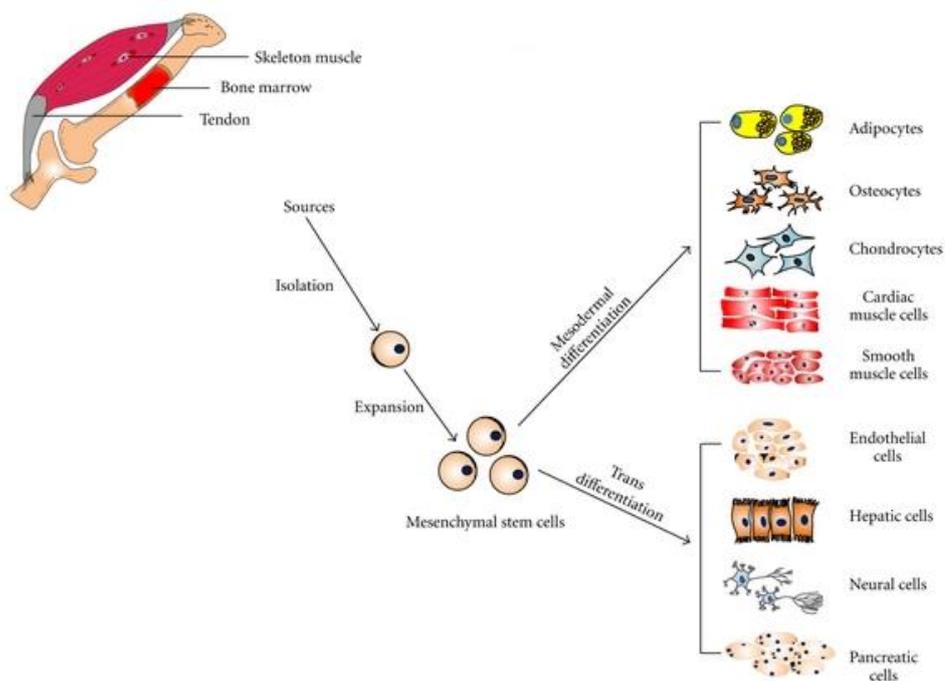


Figura 3 – Esquema da transdiferenciação realizada pelas BMSC. Demonstra-se sua pluripotência e todos os outros fenótipos que podem ser obtidos além do seu potencial natural de diferenciação mesodérmica. Assim as BMSC podem dar origem também a células da linhagem endodérmica e ectodérmica. Disponível em: SAYED, 2014.

Sabe-se também que além dos fatores fornecidos pelo meio indutor *in vitro*, as BMSC também apresentam grande responsividade à rigidez da matriz em que são inseridas *ex-vivo*. Da mesma forma que cada tecido apresenta diferentes níveis de rigidez, a densidade do substrato fornecido à BMSC em cultura, já se demonstrou influente na diferenciação da mesma *in vitro*, de acordo com a intensidade da interação entre a célula e o substrato. Logo foi observado que quando fornecemos as BMSC uma matriz macia, mimetizando a densidade do tecido cerebral, induzimos a diferenciação neurogênica; por outro lado, uma matriz um pouco mais rígida que mimetize o tecido muscular, direcionará as BMSC ao perfil miogênico; e o mesmo é válido quando a matriz é covalente a densidade do colágeno tipo 1, induzindo a diferenciação osteogênica (ENGLER et al., 2006).

In vitro, as BMSC podem ser caracterizadas pela presença de um conjunto de marcadores celular, denominados *cluster of differentiation* (CD). Os CD constituem marcadores de superfície que serão usados para diferenciar os diversos tipos celulares, onde cada linhagem celular apresenta combinações distintas e únicas de marcadores, sendo esse um protocolo clássico de caracterização e distinção das inúmeras linhagens.

As células podem ser caracterizadas de acordo com o perfil de expressão de marcadores celulares, os clusters of differentiation (CD). CD são moléculas de superfície expressas por todos tipos de células presentes no corpo, o conjunto desses marcadores caracterizam um grupo de células específicas. Esses marcadores são frequentemente citados em imunologia, para caracterizar células TCD4 e TCD8, da mesma forma, usamos um conjunto desses marcadores para caracterizar os outros tipos celulares. As BMSC expressam diferentes perfis moleculares quando analisados *in situ* em comparação com a análise *ex-vivo*, dessa forma podemos destacar a presença de alguns marcadores específicos que caracterizam as BMSC *in vitro*, assim como: CD 73⁺; CD 90⁺ e CD 105⁺ CD 29⁺ (integrina-B1 - moléculas de adesão); CD 44⁺ (homing cell adhesion molecule - HCAM); CD146⁺ (melanoma cell adhesion molecule - MCAM); Stromal Cell Molecule-1 (marcador de células-tronco estromais – STRO1⁺) sendo negativos para os marcadores: CD 106⁻ (vascular cell adhesion protein-1 - V-CAM-1); CD 50⁻ e CD 34⁻, assim como não expressam os marcadores hematopoiéticos CD 34⁻ e CD 45⁻ (MATIGIAN et al., 2015).

Podemos citar também que as BMSC apresentam alguns receptores específicos para quimiocina, que podem ser expressos extracelular, na superfície da membrana (CXCR4), ou intracelularmente, dentre eles podemos citar CCR1, CCR3, CXCR3 e CXCR4. (MATIGIAN et al., 2015)

Os marcadores CD podem agir de diferentes maneiras, geralmente como receptores ou ligantes (moléculas que ativam um receptor). A interação dos receptores CD com seus ligantes, desencadeiam uma cascata de sinalização intracelular, e com isso a mudança do fenótipo celular. Assim, a partir do momento que as células antes indiferenciadas se diferenciam, elas mudam sua expressão protéica, o que culmina na mudança no perfil dos marcadores de CD expressos na superfície das células em tecidos especializados, logo a expressão de diferentes perfis de marcadores CD, caracterizam os diferentes tipos celulares.

As UFC-F se proliferam dando origem à colônias de células fusiformes, heterogêneas. As colônias são classificadas como heterogêneas por assumirem um padrão

diversificado quanto ao potencial inato de diferenciação das células filhas formadas. A proliferação das BMSC começam com a proliferação de uma única célula fibroblástóide (UFC-F) chamada informalmente de célula-mãe, que por sua vez dão origem à duas células filhas. Onde parte das células originadas apresentaram perfil tripotente, e outras podem assumir perfil bipotente ou por fim células unipotentes e por isso formam colônias heterogêneas, seguindo o modelo hierárquico descrito pela cascata de diferenciação (MURAGLIA, CANCEDDA & QUARTO, 2000).

Essa heterogeneidade dentre as células de uma mesma colônia, desempenham papel direto no desenvolvimento e no tamanho das colônias obtidas em cultura, uma vez que células tripotentes são mais primitivas, elas apresentam uma maior capacidade mitótica comparado à células bipotentes e unipotentes (CORDEIRO-SPINETTI et al., 2014). E com isso, uma maior concentração do número de células multipotentes nas colônias em cultura, garante a obtenção de mais células disponíveis em cultura.

3.1 - CASCATA DE DIFERENCIAÇÃO

Em 2000, Muraglia e seus colaboradores, desenvolveram um trabalho muito importante à cerca do perfil que as células assumem ao longo do seu processo de diferenciação até atingirem seu estágio final de comprometimento.

Como dito anteriormente, as BMSC se proliferam à partir de uma única célula denominada UFC-F, que podem se multiplicar indeterminadas vezes, alcançado um número superior a 80 ‘doublings’, e assim dão origem a colônias clonogênicas morfologicamente falando, que crescem formando monocamada. (JIANG et al., 2002)

Porém quando se trata do potencial de diferenciação que cada célula, quanto a subunidade de uma colônia, pode admitir individualmente, estabelecemos que a colônia formada é heterogênea. A heterogeneidade da colônia é relacionada ao potencial intrínseco que cada célula nova vai assumir, ou seja, as BMSC quanto a células indiferenciadas, podem dar origem à células comprometidas com outra linhagem específica, e assim são chamadas de precursores primários, ou como descrito em grande parte da literatura, progenitores adultos multipotentes. (MURAGLIA, CANCEDDA & QUARTO, 2000).

As divisões simétricas ocorrem particularmente durante o processo de reparo e regeneração tecidual, que se dá após uma lesão. Contudo, mesmo que a divisão assimétrica não seja indispensável para caracterizar uma célula-tronco, é uma importante ferramenta para

que elas mantenham o número apropriado de progenitores comprometidos com os diversos tecidos. (MORRISON E KIMBLE, 2006).

Os progenitores adultos multipotentes (MAPC's- *multipotent adult progenitor cell*), também são chamadas de células-mãe, a diferenciação dessas células envolve o processo de divisão mitótica. Assim esses progenitores, podem realizar diversas divisões mitóticas, porém essa divisão pode ocorrer de forma simétrica ou assimétrica. Dessa forma, a divisão simétrica ocorre quando a célula- mãe se divide dando origem à duas células filhas de mesmo tamanho e idênticas á célula mãe, e esse mecanismo leva a auto-renovação amplificada de progenitores mesenquimais. Já a divisão assimétrica dá origem a duas células-filhas de tamanhos distintos, onde uma delas manterá o perfil fenotípico da célula mãe, garantindo a autorenovação e a outra célula vai dar origem a células especializadas no tecido proposto. As divisões simétricas ocorrem particularmente durante o processo de reparo e regeneração tecidual, que se dá após uma lesão. Contudo, mesmo que a divisão assimétrica não seja indispensável para caracterizar uma célula-tronco, é uma importante ferramenta para que elas mantenham o número apropriado de progenitores comprometidos com os diversos tecidos. (MORRISON E KIMBLE, 2006).

Sabe-se também que a interação célula-célula exerce papel direto na diferenciação final dos progenitores mesenquimais. Assim, eles respondem à influência parácrina de hormônios específicos liberados localmente pelas células do nicho em que se encontram, para a definição do perfil celular a ser assumido (GUILAK et al., 2009). Contudo, o fato das células filhas apresentam maior similaridade com a célula-mãe, vai influenciar diretamente no seu potencial de diferenciação, assumindo um perfil tripotente, e com isso apresentam potencial para assumir qualquer um dos três perfis clássicos: osteogênico, condrogênico, adipogênico (MURAGLIA, CANCEDDA & QUARTO, 2000).

Dentre os perfis bipotentes, foi descrito apenas o fenótipo osteo-condrogênico, portanto admite-se que o primeiro fenótipo perdido pelo progenitor mesenquimal é o adipogênico. E conforme ocorrem as sucessivas divisões mitóticas, inclusive das células-filhas, as células se tornam cada vez mais limitadas. Assim podem dar origem a apenas um fenótipo final, e desta maneira, são chamadas de progenitores unipotentes ou células comprometidas, sugerindo que essas já estão determinadas a assumir um perfil fenotípico específico, onde foi observado prevalentemente o perfil osteogênico, sugerindo que o perfil

condrogênico é perdido logo em seguida ao adipogênico. (MURAGLIA, CANCEDDA & QUARTO, 2000).

Esse perfil heterogêneo das colônias influencia diretamente na proliferação *in vitro*, uma vez que quanto mais primitiva for a célula, maior será a taxa proliferativa dessas células, logo células tripotentes também apresentam alta proliferatividade. Onde o contrário também é verdadeiro, assim as células bi ou unipotentes podem realizar um número de divisões mitóticas muito mais restrito. Bem como, células que já atingiram seu fenótipo final e portanto já diferenciadas, são células senescentes, e não apresentam capacidade mitótica significativa. Lembrando ainda que essas células só vão terminar seu processo de diferenciação *in vitro* (tornando-se células diferenciadas) se e apenas se forem induzidas, através do uso de meios indutores em cultura, contendo hormônios e vitaminas específicas para cada linhagem. Dessa forma o estudo demonstra que o tamanho da colônia formada está diretamente relacionado ao grau de diferenciação das células presentes na colônia (CORDEIRO-SPINETTI et al., 2013).

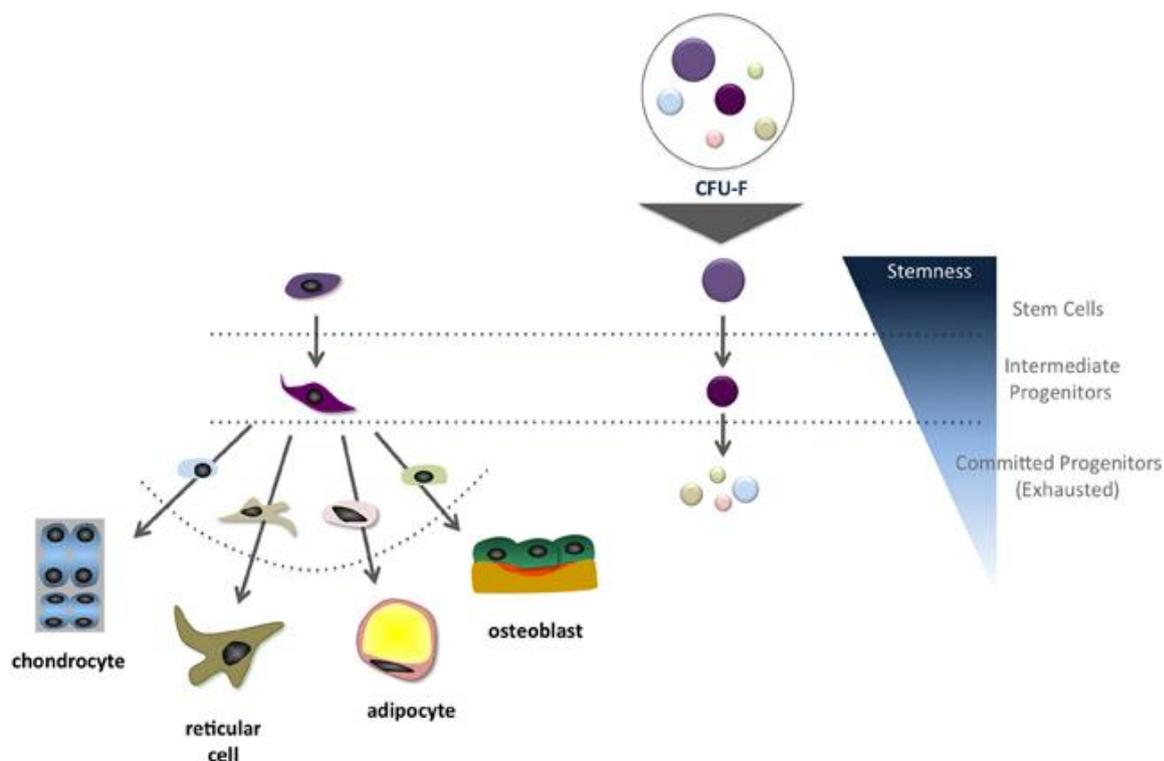


Figura 4 – Demonstra a diferença no potencial de proliferação de células-tronco indiferenciadas, progenitores intermediários e progenitores comprometidos. Onde células indiferenciadas apresentam alta taxa de proliferação, que decresce de acordo com o comprometimento das mesmas, e assim obtemos células comprometidas senescentes. Disponível em: CORDEIRO-SPINETTI, Eric et al., 2013.

Visto isso observamos que quanto maior for o número de progenitores multipotentes ou tripotentes presentes em uma colônia, maior será o tamanho (área) alcançada

pela mesma. Caso contrário, uma maior concentração de progenitores intermediários ou células comprometidas na colônia, favorece a obtenção de colônias menores. Logo, para garantir a obtenção de uma maior quantidade de células in-vitro, é necessário que trabalhemos com o maior número possível de progenitores multipotentes.

Apesar de dar origem a colônias heterogêneas, as BMSC liberam fatores solúveis que vão atuar de forma parácrina nas células adjacentes. Dessa forma, quando as BMSC permanecem em cultura por 14 dias, as UFC-F influenciam ativamente as células circunjacentes a passar a expressar marcadores de células mesenquimais estromais. Ou seja, Pittenger, demonstrou que após 2 semanas, 95% - 99% das células em cultura, apresentam marcadores específicos STRO 1⁺ (marcadores células - tronco estromais mesenquimais). Indicando assim a ação que as BMSC exercem sobre as outras células em cultura, contudo a expressão desse marcador não caracteriza por si só o perfil indiferenciado que as BMSC assumem (PITTENGER et al., 1999).

O uso das BMSC vem crescendo cada vez mais em diversos âmbitos da medicina regenerativa, com isso para o uso dessas células, principalmente na terapia celular, deve-se priorizar o uso de células indiferenciadas, que possam exercer sua função regenerativa in-situ.

A cultura de células indiferenciadas (obtidas por 'sorting' através de citometria de fluxo) possibilita a expansão homogênea, que possa posteriormente ser utilizada em transfusões, alcançando um amplo espectro de indicações clínicas, para as inúmeras patologias que acometem os diversos tipos teciduais.

4 - MEDICINA REGENERATIVA

A medicina regenerativa é um campo de grande interesse para comunidade científica e para a população em geral, visto que ela busca o reparo ou a substituição de células, promovendo um ambiente regenerativo em tecidos e órgãos injuriados. Ao contrário dos medicamentos desenvolvidos pela indústria farmacêutica, que agem reparando ou destruindo células danificadas, a terapia a base de células visa a regeneração e com isso a cura definitiva desses tecidos.

Os medicamentos convencionais, ao atuarem como bloqueadores, inibidores, ativadores, sintetizadores e etc, interferem diretamente em vias biológicas para exercer seu efeito terapêutico, e podem ainda causar efeitos deletérios, que em alguns casos pode sobressair aos efeitos benéficos. Contrariando os efeitos adversos da terapia medicamentosa, a

medicina regenerativa surge como uma base inovadora, propondo o uso de células vivas e funcionais, havendo assim a disponibilização de moléculas bioativas, e fatores de crescimento para o uso em bases terapêuticas.

Portanto o uso das BMSC pode ser útil em uma extensa gama de patologias, sendo considerada por muitos pesquisadores como a mais impactante revolução científica desde o desenvolvimento dos antibióticos (GRECO, 2008). Devido à sua alta plasticidade, grande potencial proliferativo, capacidade de autorenovação e principalmente por suas propriedades tróficas e imunomodulatórias desenvolvidas no tecido afetado *in vivo*. Essas características singulares das BMSC destacam sua supremacia perante o uso de outros tipos celulares, e serão abordadas mais detalhadamente quando tratarmos de terapia celular. Perante todo esse potencial, os estudos entorno da utilização dessas células em testes clínicos com animais e humanos, tem gerado resultados impressionantes, tanto no que diz respeito a engenharia tecidual como na terapia celular, consistem no uso dessas células de maneiras distintas porém igualmente interessantes (ASKARI et al., 2003; HUANG , GRONTHOS & SHI, 2009; LARONDA et al., 2016).

4.1 - ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual se baseia no desenvolvimento de implantes artificiais, utilizando-se de tecidos, células ou moléculas como base terapêutica, que são capazes de substituir ou estimular funcionalmente células de tecidos e órgãos lesados. Dessa forma a engenharia tecidual baseada no uso de células-tronco, utilizam-as para a ‘manufatura’ de um tecido especializado *in vitro*. O que requer a utilização de arcabouços onde as células possam repousar , servindo como um ‘molde’ afim de fornecer uma estrutura tridimensional, mimetizando por exemplo o formato de um órgão. Esses arcabouços são produzidos à partir de biomaterial, e servem para a ancoragem das células-tronco, que são previamente tratadas em laboratório e induzidas a se diferenciar na linhagem do tecido proposto como: osso, cartilagem, hepatócitos, cardiomiócitos, células renais, folículos ovarianos, células da córnea, células pancreáticas, endoteliais, etc (MURPHY & ATALA, 2014; KOCH et al, 2009; GAEBEL et al, 2011; LARONDA et al., 2016).

Na engenharia tecidual, as BMSC utilizadas, são isoladas, expandidas e diferenciadas *in vitro*, ou seja, essas células são previamente induzidas *in vitro*, a se proliferar e diferenciar em um tecido específico complexo e funcional, para em seguida serem imprimidas sobre o arcabouço e para que possam ser implantadas no paciente (BOLAND et

al., 2006). Uma vez que as células foram introduzidas no ‘molde’, essa estrutura tridimensional é submergida em meio de cultura para que ocorra a maturação das células e conseqüente deposição e matriz, dando assim origem à tecidos e até mesmo órgãos funcionais, onde já foi descrito a implantação de órgão viáveis em murinos (LARONDA et al., 2016)

Podemos obter os biomateriais de diversas fontes, eles podem ser derivados de materiais sintéticos ou naturais, que em contato com tecidos vivos tem finalidade de dar suporte estrutural aos tecidos e ao órgão em formação (PLACE, EVANS & STEVENS, 2009). Os biomateriais podem ser bioativos inertes ou materiais absorvíveis, sendo classificados de acordo com sua composição e comportamento no organismo, assim eles podem ser metálicos, cerâmicos ou polímeros. Os materiais metálicos vão atuar na sustentação sem desencadear resposta inflamatória porém, também não desempenham nenhuma função biológica (BATISTA, 2013)

Ao contrário, os biomateriais cerâmicos, dentre os quais está descrita a hidróxiapatita, sintética é biocompatível e desenvolve uma função bioativa. As biocerâmicas de hidróxiapatita, tem sido amplamente utilizadas pela sua compatibilidade estrutural, física e química com a matriz óssea, uma vez que esse mineral é constituinte natural da massa óssea. Sendo assim a implantação de BMSC nessas próteses favorecem a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, apresentando assim uma função osteointegradora, que torna possível a regeneração de ossos e dentes, não induzindo a nenhum tipo de reação imunológica ou tóxica (BATISTA, 2013).

Já os polímeros são classificados como materiais absorvíveis quando são compostos de ácido polilático (APL) ou ácido poliglicólico (APG), ou não absorvíveis quando são feitos de politetrafluoretileno. O APL é um derivado do ácido lático e por isso biocompatível, possuem alta resistência e comportamento termoplástico, apresentam sensibilidade a água, e degradam-se lentamente na presença da mesma. O APG por sua vez, apresenta importantes características mecânicas, onde seu papel principal é de suporte, apresentam também função de contratilidade, o que possibilita a regulação no tamanho dos poros encontrados no arcabouço, permitindo assim que os moldes possam ser adaptados aos diâmetros dos diferentes tipos celulares à serem utilizados na engenharia tecidual (BATISTA, 2013).

Dito isso não podemos deixar de mencionar a renovadora tecnologia das impressoras 3D (três dimensões), que tem tido um papel revolucionário na engenharia tecidual. Essas impressoras podem imprimir o arcabouço biológicos em 3 dimensões, imitando a morfologia dos órgãos. Sendo ainda capazes de ‘imprimir’ as células já especializadas nesse arcabouço, e ao introduzir essas células em cultura, elas amadurecem e realizam a deposição de matriz e neovascularização do tecido. Podemos ainda ressaltar alguns trabalhos que já realizam a impressão de células em 3D sem a necessidade de um arcabouço (NOROTTE et al., 2009; GRUENE et al., 2010). e assim os cientistas já são capazes de gerar órgãos complexos inteiros e funcionais *in vitro*, o que possibilita a substituição de órgãos injuriados ou que entraram em falência.

Portanto é muito importante para o tratamento por exemplo de pacientes com grandes extensões de queimaduras; pacientes que realizam dialize, necessitando da reposição dos rins; infarto do miocárdio, possibilitando a impressão de um coração formado de cardiomiócitos contráteis. Assim como também é possível a impressão de grandes e pequenos vaso. Pode ser relevante também para pacientes com cirroses hepáticas, pacientes diabéticos, que podem ter sua ilhota pancreáticas impressas com células beta funcionais, ou até mesmo para pacientes com disfunção congênita como mulheres com dificuldade de engravidar. (BOLAND et al., 2016; GRUENE et al., 2010, MURPHY & ATALA, 2014, KOCH et al, 2009, GAEBEL et al, 2011, NOROTTE et al., 2009, LARONDA et al., 2016)

Um dos experimentos mais atuais realizados por cientistas da Universidade de Northern nos EUA, teve resultados incríveis. Eles reproduziram através de uma impressora 3D um arcabouço gelatinoso, com densidade ideal e depois implantaram folículos ovarianos nesse arcabouço, tratadas em meio com células hormonais. Esse processo possibilitou o desenvolvimento dessas células, e após a implantação em ratas estéreis que tiveram seu útero previamente removido. A implantação do novo útero funcional permitiu além de reestabelecer a angiogenese e a homeostase hormonal, as ratas puderam ainda voltar a engravidar e dar a luz, o que traz grandes possibilidades no tratamento de mulheres inférteis (LARONDA et al., 2016).

É possível também a impressão de células-tronco embrionárias para fins de pesquisa farmacêutica, assim como a impressão de células neoplásicas, para estudos *in vitro* do comportamento e desenvolvimento de células cancerígenas, gerando a capacidade de aprofundar os estudos ao redor dos diversos tipos de câncer (XU et al., 2011).

4.2 - TERAPIA CELULAR

A terapia celular é uma outra área instigante da medicina regenerativa, onde a base da terapia celular é o uso de células vivas, que podem ser administradas tanto localmente, ou seja, injetadas diretamente no site de injúria, ou também podem ser infundidas endovenosamente, pois as BMSC possuem receptores para as quimiocinas secretadas no local da lesão, o que faz com que elas migrem até o tecido lesionado para desempenhar seu papel regenerativo.

As BMSC são as células de maior destaque para a terapia celular, devido ao seu alto potencial proliferativo, autorenovador, o que retarda a senescência das células (ação autócrina e parácrina), e principalmente devido à sua ampla plasticidade e secreção de altas concentrações de moléculas tróficas e imunomodulatórias. As BMSC ao contrário das células tronco embrionárias e das células-tronco pluripotentes induzidas (IPS's) não apresentam risco eminente de dar origem à teratomas, sendo assim o melhor protocolo para o uso clínico (LENSCH et al., 2007; OKITA, ICHISAKA & YAMANAKA, 2007).

Estudos realizados mostraram que ao irradiar o fêmur esquerdo de camundongos, tendo o direito como controle, a administração de BMSC diretamente na cavidade ventricular esquerda, demonstrou que 1 hora após a infusão, as BMSC se encontravam distribuídas homogeneamente em todos os tecidos do corpo. Porém essas células são atraídas por quimiocinas secretadas no pelas células lesionadas, que ao se ligarem nos receptores das BMSC, induzem sua migração em direção ao tecido injuriado, e assim, 24 horas depois da infusão, todas as BMSC se encontram concentradas no local da lesão, atuando de forma reparadora, assumindo posição perivascular (pericitos) onde permanecem quiescentes (LIN et al., 2014).

Uma observação muito importante levantada por esse mesmo estudo, é que quando as células são administradas endovenosamente, elas devem ser infundidas diretamente no ventrículo esquerdo, pois esse mecanismo evita que ocorra o que chamamos de perda de primeira passagem. A perda de primeira passagem se dá quando ocorre a circulação das BMSC pelos pulmões e pelo fígado, onde uma fração significativa dessas células ficam retidas nesses órgãos, por serem tecidos que sofrem agressões frequentes, e com isso apresentam necessidade constante de regeneração, sendo assim um alvo muito atraente para as BMSC (LIN et al., 2014)

4.2.1 – CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA

Uma característica muito importante das BMSC é sua capacidade de modular o sistema imunológico, evitando assim que haja uma reação inflamatória exacerbada. Contando que a resposta imune local envolve a migração de grandes concentrações de células do sistema imunológico e a liberação de citocinas, o desenvolvimento de um processo inflamatório poderia gerar uma resposta imune contra às próprias BMSC, causando a rejeição das células implantadas no paciente.

Porém o processo de imunoregulação pode ocorrer por diversos processos, onde podemos começar citando a liberação de moléculas que inibem as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e INF- γ , aumentando os níveis de IL-10, o que impede o reconhecimento das MSC pela imunidade inata e pelas células T, e assim evita a inflamação local e principalmente evita o risco de rejeição à essas células (CAPLAN, 2007).

Outra ação imunoregulatória é que as BMSC podem inibir fortemente a ação da IL-2, que são responsáveis por induzir a proliferação das células ‘natural killer’ (NK). Sendo assim além de inibir a proliferação das NK, as BMSC também atuam inibindo seus mecanismos efetores, logo impedem a produção de citocinas e a atividade citotóxica das mesmas (SPAGGIARI et al., 2008).

As BMSC ainda são capazes de modular as células dendríticas, que são APC's profissionais e são as primeiras células de defesa a se apresentarem no local da infecção. As BMSC podem agir via contato direto ou via secreção de citocinas, para impedir a maturação das DC cells (JIANG et al., 2005). Além do potencial de induzir diretamente por secreção de prostaglandina – 2 (PGE₂), indoleamina 2,3- dioxigenase (IDO) e TGF- β 1, o estímulo das células Treg, que são responsáveis por modular a ativação das células T, sendo assim, quanto mais Treg for ativada, menor será a resposta das células T. (GRIFFIN, RITTER & MAHON, 2010)

Exercem influência também sobre as células B, logo as BMSC são capazes de inibir a ativação das células B, através de um mecanismo solúvel anti- CD40 e anti-IL4. Esse mecanismo interrompe a proliferação das células B durante os períodos G₀/G₁ do seu ciclo celular, sem favorecer a apoptose, preservando assim a integridade das células B. (LE BLANC & RINGDEN, 2007)

Tendo efeitos inclusive nas células TCD - helper e T - citotóxicas (TCD8), as BMSC exercem efeito supressor nas células TCD8, inibindo a lise mediada por essas células, porém as BMSC só tem ação efetiva quando administrada no início da cultura, enquanto as TCD8 ainda não produziram seu fatores citotóxicos, pois não demonstram ação direta contra essas moléculas após a instauração da fase citotóxica. Enquanto as T- helper, na presença de BMSC, as células T naive diminuem a secreção de INF- γ , o que inibine a diferenciação no perfil Th-1, por outro lado a presença dessas células em cultura induz a diferenciação no perfil Th-2, lembrando que o perfil Th-1 está relacionado com a defesa mediada por fagocitose, e o perfil Th-2 culmina na produção de plasmócitos, responsáveis pela síntese e secreção de anticorpos, e de células B de memória. Sendo assim, as BMSC se mostram efetivas tanto na modulação de células do sistema imune inato, assim como na imunidade humoral (LE BLANC & RINGDEN, 2007).

Outro processo descrito muito recentemente é que quando as BMSC são expostas ao contato com citocinas pró-inflamatórias *in vitro* (TNF-alpha, IFN-gama e IL-1beta) elas deixam de expressar marcadores mesenquimais e passam a agir como células apresentadoras de antígeno (APC), atuando ativamente de forma integrada com o sistema imune. Elas ajudam a 'limpar' as células mortas durante o processo de lesão, sendo assim, elas são capazes de fagocitar os antígenos e apresentar via MHC de classe II para as células TCD4, que por sua vez vão estimular os fagócitos a desempenhar esse papel. Posteriormente as BMSC voltam a atuar liberando as citocinas tróficas que agem na regeneração das células teciduais saudáveis, dando origem a um tecido com células saudáveis e funcionais, sem permitir que haja reação inflamatória exacerbada (WILFONG et al., 2016).

Foi demonstrado que as BMSC indiferenciadas possuem HLA de classe I porém não expressam extracelularmente HLA de classe II, inibindo a ação dos linfócitos em cultura, assim podem atuar sem que sejam percebidas como estranhas pelo sistema imune, nesse tecido em que se encontram transitoriamente. Demonstrando a ação imunomodulatória dessas células, alcançamos a possibilidade de se trabalhar com células heterólogas, uma vez que as células mesenquimais podem ainda modular a resposta imune contra células heterólogas. (LE BLANC et al, 2003; AGGARWAL & PITTENGER, 2005).

Logo a possibilidade de um tratamento alogênico propicia a criação de bancos de células-tronco, onde essas são previamente tratadas e expandidas para a necessidade de uso emergencial das mesmas, por exemplo em caso de falência renal, infarto do miocárdio

(SHAKE et al, 2002; KAWADA et al., 2004). Uma vez que as BMSC realizam a função direta de dar suporte às HSC no processo hematopoiético, os pacientes em tratamentos quimio e radioterápicos, também são importantes candidatos para o uso de BMSC, devido a grande danificação das células medulares durante esses tratamentos, diminuindo profundamente o potencial imunológico e hematológico desses pacientes (LAZARUS et al., 1995; KOC et al., 2000).

Temos ainda resultados bem sucedidos na regeneração de menisco (MURPHY et al., 2003), tendões, no caso de tendinite (HARMAN et al, 2006). Possibilita ainda a reabilitação de pacientes com lesões na medula espinhal, seja por contusão ou fissão (PARK et al., 2005; KEILHOFF et al., 2006) além da regeneração de estruturas neuronais, como oligodendrócitos e neurônios mielinizados, podendo ainda migrar até o córtex frontal e para o cerebelo, se diferenciando em astrócitos (KOPEN, PROCKOP & PHINNEY, 1999; VAN VELTHOVEN et al., 2010; CRISTOFANILLI et al., 2011).

4.2.2 – MOLÉCULAS TRÓFICAS

Uma vez que o tecido é lesionado, as células danificadas começam a liberar quimiocinas como o SDF-1 (stromal cell-derived factor), que se ligam aos receptores das BMSC e faz com que elas migrem até o local da injúria, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (CAPLAN et al., 2006; TAICHMAN et al., 2010). O SDF-1 também é responsável pela revascularização, devido a recrutação de hemangiócitos CXCR4⁺ (JIN et al., 2006). Onde além de recrutar ainda mais BMSC, quando essas são ativadas pela interação com a célula danificada, passam a secretar outras moléculas tróficas, que estão envolvidas diretamente com o potencial regenerativo das BMSC (CAPLAN & DENNIS., 2006). Dentre essas moléculas destacam-se:

(1) Moléculas anti-apoptóticas – essas moléculas agem de forma autócrina, inibindo a síntese de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e ácidos graxos, pelas próprias BMSC's. Ao inibir a formação desses produtos tóxicos, as BMSC deixam de expressar os marcadores de dano oxidativo, impedindo assim de forma autócrina e parácrina, que elas e outras células sejam marcadas para apoptose, escapando da morte celular (HE et al., 2009).

(2) Moléculas anti-fibróticas – essas moléculas atuam inibindo a síntese de colágeno tipo I na lesão. O colágeno tipo I é secretado naturalmente pelos fibroblastos durante

o processo de cicatrização, formando um tecido fibrocartilaginoso que vai substituir o tecido danificado, formando cicatrizes que perdem gradualmente sua vascularização. Visando impedir a formação desse tecido cicatricial, as BMSC liberam moléculas que vão inibir o mecanismo de síntese do colágeno I pelos fibroblastos, permitindo assim, ao invés da formação de um tecido fibroso, a recuperação ativa de células viáveis ou a reposição por novas células (CAPLAN & DENNIS, 2006, KEAN et al., 2013)

(3) Moléculas angiogênicas – na angiogênese *in vivo*, as BMSC atuam de modo peculiar. Elas são capazes de secretar grandes concentrações de VEGF (vascular endothelial growth factor), com isso elas estimulam fortemente a angiogênese do tecido neoformado (HOEBEN et al., 2004). Além de favorecer a irrigação tecidual, as BMSC apresentam um papel muito importante na estabilização dos capilares formados. Diante da formação de novos vasos, os capilares ainda frágeis ativam as BMSC, que por sua vez migram em direção a eles e se acoplam ao seu redor, dando assim suporte físico, além de continuar secretando VEGF, e assim influência diretamente na maturação desses sinusóides imaturos. Logo as influenciam na formação, maturação e estabilidade estrutural da vasculatura (CAPLAN & DENNIS, 2006).

(4) mitótica – essas moléculas estimulam a proliferação autócrina e parácrina das células, induzindo a mitose tanto das próprias BMSC presentes temporariamente no local, quanto das células funcionais e portanto saudáveis do tecido em recuperação. Dessa maneira as BMSC promovem quadros de reparo tecidual *in vivo*, influenciando as células do próprio hospedeiro a se proliferar e diferenciar em unidades regeneradas e funcionais, assim como também dão origem a novas células à partir do seu próprio potencial clonogênico. (CAPLAN & DENNIS, 2006)

Devemos ressaltar que devido ao seu potencial auto-regenerativo, as BMSC são capazes de se proliferar, e os progenitores gerados por elas, que à princípio são multipotentes, podem assumir um fenótipo final diferente e independente da diferenciação da célula mãe. Como discutido anteriormente, a plasticidade das BMSC tem se mostrado muito mais abrangente do que se acreditava há poquíssimo tempo. Sendo assim, ao que se demonstra, essas células apresentam uma enorme capacidade de se adaptar e responder ao micro ambiente em que são inseridas *in vitro* ou *in vivo*, com assim podem ser induzidas in-situ a direcionar seu padrão de diferenciação naquele tecido específico, com a capacidade de se diferenciar na maioria, se não em todos, os tecidos do corpo humano.

Diante das extraordinárias habilidades e inúmeras possibilidades que o tratamento regenerativo com o uso das BMSC propicia, um dos fatores potencialmente limitantes no uso dessas células na terapia celular, é a baixa concentração das mesmas na medula óssea. E além de ser naturalmente uma população rara da medula, o número de BMSC ainda decresce de acordo com a idade do paciente, sendo muito abundantes em recém nascido; encontradas em concentração homeostática na medula adulta e decrescendo à partir dos 65 anos, sendo muito escassas na população acima de 80 anos. (CAPLAN, 2007)

Na medula adulta fresca as BMSC constituem cerca de 0,01% à 0,001% das células mononucleadas. (BYDLOWSKI 2009 - M). E por serem uma fração de células super reduzida, o número de células que são adquiridas com o isolamento das BMSC é insuficiente para a realização imediata de um tratamento terapêutico, uma vez que para intervenções clínicas, utiliza-se geralmente a partir de 2×10^6 cels/kg de massa corporal (KOC et al., 2002; ZHAO, REN & HAN, 2016). Portanto o tratamento só é possível desde que haja uma mínima manipulação laboratorial, uma vez que faz-se necessária a expansão *in vitro* das BMSC afim de obter do número suficiente de células a ser transplantada em cada tratamento específico.

Para a expansão das BMSC *in vitro*, é necessário que o meio de cultura seja suplementado com fatores de crescimento exógenos, responsáveis por induzir a proliferação celular. O protocolo padrão de expansão celular utilizado universalmente é obtido através da adição do soro fetal bovino (SFB) ao meio de cultura.

5 - SORO FETAL BOVINO

Para que seja viável a cultura de células *in vitro*, elas precisam ser inseridas em um meio que forneça uma mistura especial de nutrientes necessária para que essas células possam se manter vivas, esse meio é chamado de meio de cultura. O meio de cultura basal, pode apresentar diferentes densidades, podendo então ser líquido, gel fluido ou um gel mais denso, e vão variar de acordo com a exigência da célula cultivada.

O meio de cultura utilizado no cultivo das BMSC humanas, é um meio líquido chamado Iscoves's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), que fornece todos os nutrientes necessários para a manutenção da célula *in vitro*, fazendo com que elas permaneçam vivas e funcionais. Porém, enquanto não forem ativadas, elas permanecem quiescentes, e a composição do meio de cultura por si só, não é suficiente para ativar a proliferação celular, e

então, para que isso ocorra é necessário a adição de um suplemento exógeno de fatores de crescimento e outras citocinas que desencadeiem esse processo na célula.

Desde o protocolo desenvolvido por Friedenstein, o suplemento utilizado universalmente para induzir a proliferação das BMSC *in vitro*, é o soro fetal bovino (SFB). Em comparação aos outros soros animais, o SFB é o que disponibiliza a maior concentração de fatores de crescimento e apresenta baixa concentração de gamaglobulinas, e por isso, o SFB foi adotado como suplemento padrão para a cultura de células (ISAAC et al., 2011).

O SFB constitui o soro coletado da placenta de bezerros recém-nascidos, e apresenta em sua composição mais de mil componentes diferentes, dentre os quais podemos citar: hormônios, vitaminas, lipídios, aminoácidos, proteínas de transporte (como albumina, globina, transferrina), nucleosídeos, fatores desintoxicantes, fatores de estabilização e proliferação, fatores de adesão (fibronectina e laminina) e fatores de crescimento (STAINES & PRICE, 2003).

Normalmente o meio de cultura é suplementado numa concentração que varia de 5% - 20% de SFB, desempenhando grande importância na proliferação das BMSC *in vitro*. Contudo, reúne várias implicações éticas quanto à forma de coleta do soro, onde ainda levanta-se a questão de que alguns fornecedores não esperam o desenvolvimento completo do feto para a coleta do soro, o que culmina assim na morte do bezerro. Abordamos também a extrema necessidade de que essa coleta seja feita e manipulada em ambiente totalmente estéril, assim como, de acordo com as normas do comércio internacional, o SFB só deve ser coletado de vacas que se encontram em áreas livres de doença de gado, afim de evitar a contaminação do soro, o que requer um laboratório de segurança para o seu fornecimento. (ISAAC et al., 2011)

Adicionalmente, existe no SFB grande inconstância na concentração dos fatores de crescimento, pois apresentam considerável variação entre lotes, o que influencia diretamente na proliferação das células em cultura. Assim, poderia ocorrer uma variação significativa no tamanho das colônias cultivadas com a mesma concentração de SFB de diferentes lotes, o que consequentemente interfere na geração de dados, levando a resultados não padronizados e por isso questionáveis. (CORDEIRO-SPINETTI et al., 2014)

Contudo, o aspecto mais relevante é que o SFB pode ser fonte natural de transmissão de patógenos como vírus e príons, que podem ser transmissíveis para as células

em cultura. Logo, ao implantar células cultivadas com SFB em humanos, elas podem desencadear reações imunológicas intensas, bem como desenvolver uma série de patologias graves.

Estudos clínicos demonstraram que BMSC tratadas com SFB, ao serem transfundidas, leva a formação de placas de células B no baço, e conseqüentemente a síntese de IgM, ou seja, o material derivado dessa cultura pode gerar uma reação imunológica, o que pode culminar em rejeição do enxerto. Essas células também podem desencadear alterações antigênicas na membrana de células tumorais humanas, ativando uma resposta citotóxica inespecífica dos linfócitos TCD8. Sendo que o SFB é uma possível fonte transmissora de vírus, onde alguns tipos já relatados podem atravessar a barreira placentária e causar microcefalia em fetos (KNIAZEFF et al., 1975; ERICKSON, BOLIN & LANDGRAF, 1990).

Além disso, os príons são moléculas protéicas com propriedades infecciosas, que apresentam tropismo ao sistema nervoso central (SNC). Sendo assim uma vez que entram em contato com o organismo humano, são responsáveis por doenças como encefalopatia espongiforme transmissível (EEB), conhecida popularmente como doença da vaca louca, cuja a toxicidade gerada pelos príons pode causar doenças neurodegenerativa no homem. (PRUSINER, 2001; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008)

Pacientes submetidos à cardiomioplastia, demonstraram que quando esses miofibroblastos infundidos são cultivados com soro bovino, os pacientes desenvolvem arritmias ventriculares e morte súbita. E ainda, foi descrita o desenvolvimento de resposta inflamatória exacerbada, em pacientes queimados que receberam o transplante de queratinócitos cultivados com SFB, levando à rejeição desse enxerto. (ALTRAN, 2011). Devido a essas inúmeras implicações, o uso de células cultivadas com o soro bovino é extremamente contra-índicado para fins clínicos, e por isso deve ser evitado o uso de elementos xenobióticos em cultura.

Visto que, atualmente há uma busca intensa por uma alternativa à suplementação com SFB, que permita a viabilidade das células para fins terapêuticos em humanos, nosso estudo sugere o uso do plasma rico em plaquetas como alternativa ao uso do soro bovino. Uma vez que trata-se de um material biológico humano, e pode ser coletado de fonte autóloga, o PRP não induz reações imunogênicas, e com isso traz grandes perspectivas para

seu uso em cultura de células, posto que o PRP demonstrou também grande eficácia na proliferação dos fibroblastos em cultura.

6 - PLAQUETAS: ESTRUTURA E FATORES DE CRESCIMENTO

6.1 – BIIOLOGIA DAS PLAQUETAS

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados derivados de megacariócitos, que por sua vez são originados na medula óssea pelas HSC. Elas possuem glicoproteínas em sua membrana que são responsáveis por mediar a interação plaquetas - células. No seu interior encontramos estruturas como mitocôndria, grânulos lisossomais, metabólitos, ADP, epinefrina, serotonina, etc. As plaquetas humanas estimuladas quando por ADP, liberam o conteúdo dos seus grânulos (CASTRO et al., 2006).

As estruturas de maior relevância para nosso estudo são os grânulos presentes nas plaquetas, os quais contém uma série de fatores de crescimento e citocinas, que serão liberadas durante o processo restaurador. Os grânulos denso e principalmente os grânulos alpha, que contém moléculas essenciais para a realização do seu potencial reparador. No grânulo denso, encontramos moléculas de ADP/ATP, Ca⁺ e alguns hormônios como serotonina, histamina, dopamina e catecolaminas, esses fatores desempenham papel na hemóstase (MCNICOL & ISRAELS, 1999).

Já no grânulos alpha encontramos uma gama de moléculas e principalmente os fatores de crescimento que exercem grande influência sobre as BMSC. Dentre as moléculas liberadas são encontradas, proteínas adesivas, fatores de coagulação, fatores fibrinolíticos, antiproteases, reguladores de angiogênese e proteínas bactericidas. Além de secretarem citocinas, quimiocinas, fatores mitóticos e uma série de outros fatores de crescimento que podem influenciar em outras funções importantes das BMSC tanto *in vivo* como *in vitro* (SÁNCHEZ, SHERIDAN & KUPP, 2003)

PDGF (*platelet derived growth factor*); TGF- β (*transforming growth factor- β*); EGF (*epidermal growth factor*); bFGF (*basic fibroblast growth factor*); e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*); VEGF (*vascular endothelial growth factor*) são outros fatores de crescimento que se encontram concentrados no PRP (KING & REED, 2002). Esses fatores desempenham diversas funções, estimulando a proliferação celular, a angiogênese tecidual, e a deposição de matriz das células recém formadas, assim como podem apresenta papel

ativador ou inibitório do sistema imune. Essas características ampliam o potencial imunomodulatório das BMSC.

In vivo, as plaquetas agem de forma reparadora, onde perante a ruptura vascular, em resposta ao extravasamento sanguíneo e às quimiocinas liberadas localmente pelo tecido, as plaquetas assim como as CTM, são imediatamente recrutadas em quantidades suficientes para a produção dos progenitores necessários no local de reparação. Elas aderem à rede de fibrina formada no local da lesão, onde são ativadas e começam a secretar o conteúdo de seus grânulos, desencadeando a ativação da cascata de coagulação, permitindo através da formação de coágulo a hemostase. Após a estabilização do tecido, o coágulo é dissolvido por enzimas fibrinolíticas, e as plaquetas não ativadas tem tempo de vida média de 8 à 10 dias, quando então são degradadas no baço.

Já *in vitro*, as plaquetas quando entram em contato com as BMSC, liberam seus conteúdos granulares, influenciando diretamente na proliferação celular, sendo ainda capazes de manter o fenótipo indiferenciado da célula e mantendo também seu multipotencial de diferenciação. Desta forma, podemos destacar a influência de alguns fatores de crescimento derivado das plaquetas sobre as BMSC, que acabam por desencadear inúmeros processos, tais quais:

PDGF – é um dos principais fatores de crescimento contido nos grânulos alpha (KAPLAN et al., 1979), agem como quimiotáticos para fibroblastos e macrófagos (HELDIN et al., 1988), sendo assim responsável pela inicialização do processo de reparação dos tecidos conectivos. Para isso, elas promovem aumento nas taxas de mitose dos fibroblastos (ROSS 1974), influenciando também na ativação de macrófagos (KOHLE & LIPTON, 1974). Quando os fibroblastos são expostos ao PDGF *in vivo*, ocorre uma cascata de eventos intracelulares que resultam em 4 eventos: migração, proliferação, diferenciação e síntese/deposição de matriz (HELDIN & WESTERMARK, 1999), exercendo papel fundamental na regeneração do tecido. Tem função ainda na regulação da angiogênese (CAPLAN & CORREA, 2011)

TGF-B – Diferente dos outros fatores, o ele é secretado na forma ativa pelos grânulos alpa. (BLAKYTNY et al., 2004; BRUNNER et al., 2004). Atua aumentando a secreção de quimiotaxinas locais, e assim auxiliam no recrutamento de fibroblastos, neutrófilos e macrófagos, (BARRIENTOS et al., 2008; MONTESANO & ORCI, 1988; PIERCE et al., 1991) Além de intensificar a mitose, é um dos principais fatores responsáveis pela síntese de colágeno e posterior deposição de matriz extracelular pelas BMSC

(LUTTENBERGER et al., 2000). O TGF-B apresenta grande afinidade pela glicoproteína CD105, presente na membrana das BMSC, onde a interação desses, favorece a angiogênese. Logo o TGF-B influencia o crescimento, ou seja, o desenvolvimento de células endoteliais, também exercendo efeitos antiinflamatórios e supressor das reações imunológicas, dessa forma promove o desenvolvimento de tecidos mesenquimais, e por conseguinte, a regeneração tecidual. Sendo também descrito como um fator supressor de neoplasias em estágios iniciais. (MOUSTAKAS et al., 2002) .

VEGF – as BMSC são altamente dependentes do VEGF para a neovascularização *in vivo*. Possuem propriedades angiogênicas, e assim, além de desenvolverem a neovascularização, esse fator também atua na maturação dos capilares ainda frágeis, aumentando também a permeabilidade vascular. (AL-KHALDI et al., 2003). Essa angiogênese está atrelada à regeneração e remodelamento do enxerto ósseo e a proliferação das BMSC (LUCARELLI et al., 2003; LUCARELLI et al., 2005), assim como de outros tecidos (HOEBEN et al., 2004).

FGF – 17% dos genes expressados pelo FGF estão envolvidos na proliferação celular (SOLCHAGA et al., 2005), assim como o está atrelado ao potencial de autorenovação celular, e também no desenvolvimento da própria célula (TSUTSUMI et al., 2001). Influenciando também a síntese de colágeno e ácido hialurônico. Assim o FGF desempenha papel fundamental na expansão das BMSC *in-vitro*

IGF-1 – As BMSC apresentam receptores de IGF-1 (IGFR) e estes receptores estão relacionados a mobilização via parácrina de outras BMSC, acelerando assim a velocidade e eficácia do reparo tecidual. Alguns estudos destacam a importância dessa interação, que se mostrou capaz por exemplo, de promover o reparo do miocárdio (HAIDER et al., 2008). Outros estudos demonstram que o IGF-1 combinado com TGF-B atuam aumentando a proliferação das BMSC, influenciando na diferenciação condrogênica. (LONGOBARDI et al., 2006);

EGF – Quando ministrado isoladamente, o EGF induz a expansão das BMSC, atuando principalmente na migração dessas células *in vivo*, não apresentando interferência no seu multipotencial (SATO et al., 2005; TAMAMA et al., 2006). Essa fator também favorece a angiogênese ao induzir o desenvolvimento células epiteliais e endoteliais. Atuando em

conjunto, o PDGF e o EGF, se ligam à receptores constitutivos de membrana, presentes em mais de 90% das hMSC STRO1+, desempenhando papel chave na proliferação das CFU-F (GRONTHOS & SIMMONS, 1995). Esses fatores são liberados *in vivo*, durante a cicatrização, e promovem a regeneração do tecido (HELDIN et al., 1988).

6.2 - PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

O plasma rico plaquetas constitui um concentrado de plaquetas, que é feito à partir da centrifugação do sangue periférico, e então coleta-se o plasma pobre em plaquetas (PPP), sendo esse basicamente soro, e o concentrado de plaquetas que após a centrifugação se aglutinam em um pellet que repousa entre as células vermelhas e o plasma. Após a coleta, conjuga-se o pellet de plaquetas com uma mínima concentração de plasma, onde obtemos uma concentração de 3 a 5 vezes superior ao número de plaquetas circulantes no corpo, o que potencializa sua atividade reparadora (MARX, 2004).

Uma interessante perspectiva para o uso de PRP é que a contagem de plaquetas e a concentração de fatores de crescimento liberados pelas plaquetas, não são influenciados pela idade ou pelo sexo (WEIBRICH et al., 2002), aumentando a acessibilidade ao material em diversas condições. O fácil acesso a essas células, possibilita o tratamento autólogo, onde o PRP pode ser rapidamente coletado, para o uso na suplementação da cultura das BMSC coletadas do próprio paciente doador de PRP. A ação concomitante desses dois tipos celulares, implica na aceleração do processo de reparo tecidual, evitando ainda reações imunoinflamatórias contra esses enxertos, o que aumenta ainda mais a segurança, rapidez e eficiência das BMSC.

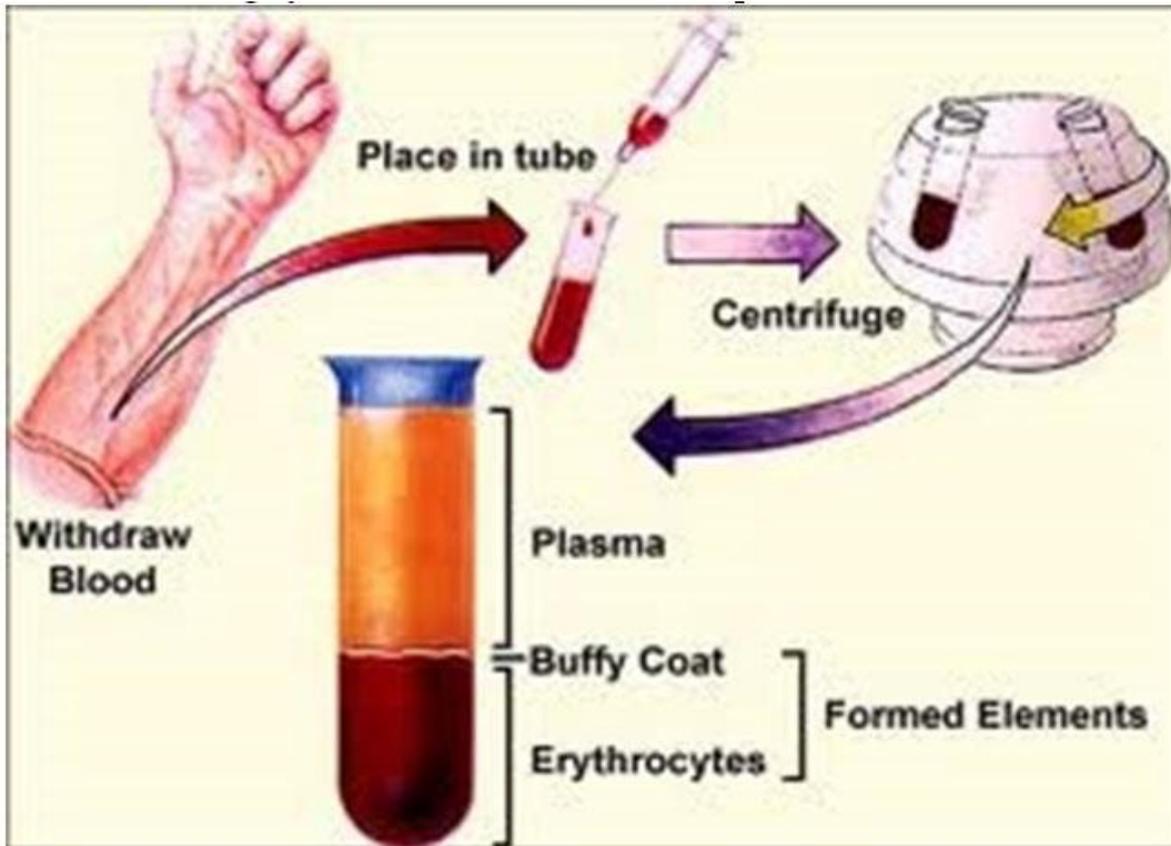


Figura 5 – Processo de obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), através da coleta e processamento do sangue periférico. O PRP é constituído pelo pellet de plaquetas concentradas entre as células vermelhas (que serão descartadas) e o plasma. E assim o concentrado de plaquetas é diluído em uma mínima concentração de plasma pobre em plaquetas (PPP), formando o PRP. Disponível em: <http://gymkata.blogspot.com.br/2012/12/tratamientos-con-concentrado-de.html> Acesso maio 2016.

7 - OBJETIVO:

Objetivo geral

- Avaliar a influência do plasma rico em plaquetas (PRP) no isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais estromais derivadas da medula óssea humana (BMSC), *in vitro*.

Objetivos específicos

- Analisar a influência do PRP sob a aderência das unidades formadoras de colônia (UFC-F) ao substrato de cultura.
- Analisar a atividade proliferativa das BMSC sob a influência do PRP em cultura.

8 - MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 - AMOSTRAS

As amostras de 6 pacientes foram obtidas no centro ortopédico Hospitalys, localizado na Rua Jardim Botânico – RJ- Brasil. As amostras foram coletadas de pacientes com indicações cirúrgicas para implantação de prótese no quadril. À partir da cirurgia, é coletado um raspado ósseo do acetábulo fêmural, contendo grande quantidade de medula óssea. Esse raspado, que seria inicialmente descartado é doado para a nossa equipe através de um Termo de Consentimento e Livre Esclarecimento, assinado pelo paciente, que permanece com uma cópia dos intuitos de nossa pesquisa, e outra cópia fica retida no laboratório. O presente estudo é devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos.

Logo que coletadas as amostras são transferidas para um tubo falcon estéril contendo 25 mL de Iscoves Modified Dulbecco's médium (IMDM) contendo 10% de SFB para manter um estímulo nas células. Ressaltando que o tempo de contato entre as células da medula e o soro fetal bovino é muito curto, e por isso, não há perigo de contaminação dessas células.

Assim que coletadas as amostras são encaminhadas em um isopor contendo placas de gelo, ao laboratório LabioTeC localizado na Praça da Bandeira- Tijuca- RJ.

8.2 – PROCESSAMENTO

No laboratório foram processadas em fluxo laminar esterelizado com álcool 70% e radiação ultravioleta, com todos materiais devidamente esterelizados na autoclave.

É adicionado à amostra do conteúdo medular solução salina de PBS suplementado com 2,5% de SFB e 10 % EDTA. A solução salina age na dissociação das células do osso, já o EDTA evita a formação de coágulo, uma vez que nessa fase as células sanguíneas ainda estão presentes; já o SFB é utilizado nessa fase para manter um estímulo mínimo na célula, e uma vez que o contato com o SFB é rápido, não há perigo de infectar ou exercer alguma função sobre as BMSC.

E então realiza-se a lavagem exaustiva desse raspado, que resulta aproximadamente 200 mL de solução (quatro tubos falcon de 50 mL). Essa solução é centrifugada por 5 minutos à 2000 xg, o precipitado obtido em cada tubo, é recolhido e

concentrado em um (1) tubo falcon que é novamente centrifugado para a obtenção de um concentrado de BMSC. O PBS do tubo é descartado e o pellet de BMSC é resuspendido em 5 mL de meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM – pH 7,2 – 37°) para a contagem utilizando-se a câmara de Neubauer.

Todos os meios e soluções utilizadas na cultura de BMSC foram devidamente filtrados por sistema de filtração à vácuo em membranas de 0.22 micrometros, a fim de eliminar microorganismos presentes nos mesmos.

8.3 - CONTAGEM

O número de células viáveis foi estabelecido através do método de exclusão de hemácias, que é feito pelo uso do líquido de Turk, responsável pela lise dos eritrócitos. Para a contagem das células foi utilizado de 10 microlitros da amostra, que é diluída na proporção de 1 : 10 em líquido de Turk. Esta solução é transportada para a câmara de Neubauer com o auxílio de pipetas calibradas, e então as células mononucleadas são contadas.

Para o cálculo do número de células foi utilizada a equação: N° médio de células viáveis \times Grau de Diluição da amostra $\times 10^4 =$ [células] / mL. Dessa forma determinamos a concentração total de células mononucleadas encontradas em amostras de cada paciente.

8.4 - PLAQUEIO

Após a contagem, essas células foram plaqueadas em duas densidades iniciais [4 $\times 10^4$] e [8 $\times 10^4$]. Essas duas densidades foram testadas em triplicata em placas de 6 poços.

8.5 - ISOLAMENTO

O isolamento dessas células foi realizado à partir de células frescas da medula óssea humana, de acordo com o protocolo padrão estabelecido por Friedenstein, que se baseia no isolamento das BMSC à partir de sua aderência ao substrato de cultura.

Partindo desse princípio, as culturas são mantidas na estufa em temperatura e condições atmosféricas ideais (37°C e 5% de CO₂), por 72 horas (tempo necessário para adesão das BMSC). Após 72 horas de cultivo, o meio foi trocado, permitindo o descarte das células não aderentes. Dessa forma trata-se de culturas primárias, onde não foi realizada nenhuma passagem.

8.6 - EXPANSÃO

Para a expansão das BMSC *in vitro*, as células receberam diferentes tipos de suplementação, logo as células foram distribuídas em 4 placas. Desse modo, o meio de cultura IMDM (comum à todos os tratamentos), foi enriquecido com PRP ou SFB nas respectivas concentrações: 1) PRP 1% ; 2) PRP 2,5% ; 3) PRP 5% ; 4) SFB 10%

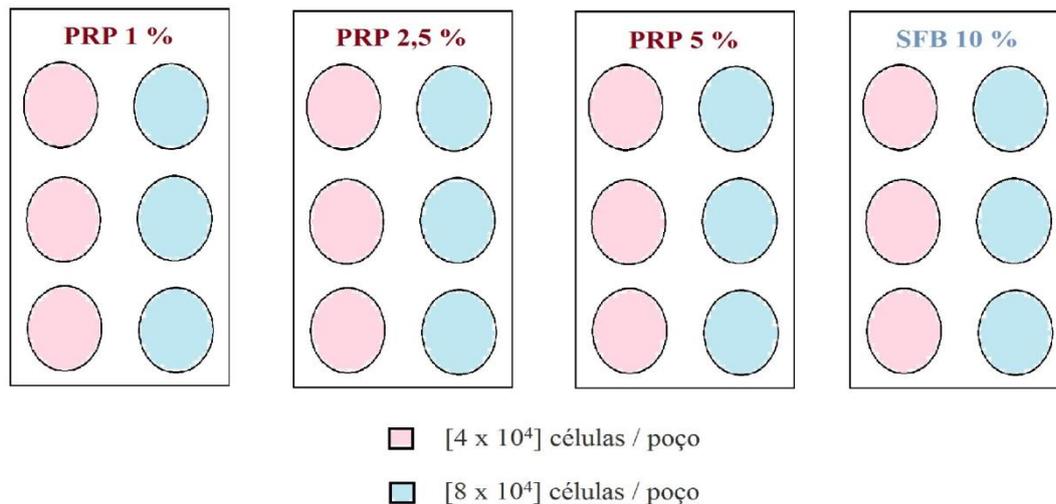


Figura 6 – Esquemática do plaqueio para a expansão das BMSC. As células foram plaqueadas em duas densidades iniciais: [4x10⁴] e [8x10⁴] respectivamente em triplicata. Testamos o tratamento dessas células com PRP 1% ; 2.5% e 5%, mantendo o SFB 10% como controle. Fonte: Elaborado pelo autor.

As BMSC permanecem na estufa em condições ideais de cultura, e a troca do meio de cultura com seus respectivos suplementos é realizada à cada 3 dias, até completarem o ciclo de 14 dias de cultura, ou em caso de alta taxa proliferativa, o cultivo é interrompido quando as células atingem subconfluência de aproximadamente 80%, para que seja possível a contagem e a mensuração da área das colônias formadas. As células foram fixadas com formolaldeído 4% por 5 minutos e coradas também por 5 minutos com cristal violeta. Em seguida realizou-se a contagem das colônias obtidas e a mensuração da área das mesmas.

Nossa equipe buscou avaliar a influência do PRP sobre a proliferação das BMSC *in vitro*, utilizando-se do SFB como controle. Ressaltamos que em todos os testes utilizou-se o mesmo lote de SFB, afim de padronizar os resultados obtidos.

9 - RESULTADOS

9.1 - EFICIÊNCIA DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA – (CFE)

Para a análise da eficiência de formação de colônias, utilizamos o método de isolamento por aderência de UFC-F, denominado eficiência de formação de colônia (CFE). As células plaqueadas em duas densidades iniciais: $[4 \times 10^4]$ e $[8 \times 10^4]$; são condicionadas com os diferentes tipos de suplemento ao meio de cultura: PRP ou SFB, usado como controle (Figura 6)

Logo, observamos que assim como o SFB, o PRP é capaz de induzir a aderência das BMSC ao substrato de cultura. O PRP se mostrou significativamente mais eficaz que o SFB, uma vez que observamos uma média bem próxima na capacidade de aderência obtida no tratamento com o SFB 10% comparado ao PRP 1% (Tabela 1, Figura 7).

Dessa forma, conforme aumentamos a concentração do PRP (1% e 2,5% e 5%), aumentamos também a concentração de unidades formadoras de colônia (UFC-F) aderidas, que foram posteriormente fixadas na placa e contadas. Com isso obtivemos um acréscimo significativo na média de colônias encontradas respectivamente nesses tratamentos. Porém devido à alta taxa de proliferação alcançada com o PRP 5%, devemos desconsiderar a baixa CFE obtida nesse tratamento, uma vez que com a alta proliferação, os bordos das colônias se confluem, e conseqüentemente a distinção de colônias isoladas fica impraticável (Tabela 1, Figura 7)

Ressaltamos ainda, que o baixo número de colônias distinguíveis, ou seja baixa CFE no PRP 5%, é compensado pelo tamanho da área alcançada com a confluência dessas colônias (Tabela 2, Figura 8). Destacando também que a cultura com o PRP 5% já se encontrava em subconfluência no décimo segundo (12^o), e por isso esse tratamento foi interrompido afim de evitar que essas células entrassem em confluência.

Portanto, para a verificação adequada da influência do PRP sob a aderência das BMSC, a comparação entre o SFB 10% com o PRP 1% e PRP 2,5% respectivamente, já é suficiente para validar o potencial do PRP. Demonstrando a vantagem no uso de PRP comparado ao SFB para o isolamento das BMSC, uma vez que obtemos a mesma aderência com concentrações muito inferiores de PRP (Tabela 1, Figura 7)

Tabela 1. - Número médio de unidades formadoras de colônia (CFE), valor mínimo e valor máximo de colônias encontradas e desvio padrão. Plaqueadas nas densidades iniciais: $[4 \times 10^4]$ e $[8 \times 10^4]$, induzidas com diferentes tipos de tratamentos nas respectivas concentrações: SFB 10%, PRP 1%, PRP 2,5%, PRP 5%.

Densidade Tipos tratamento	Frequência Média		Valor Mínimo Frequência		Valor Máximo Frequência		Desvio Padrão	
	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$
SFB 10%	12,9	19,8	5	11	25	33	7,80	9,30
PRP 1 %	11,4	19,2	3	8	21	31	5,85	7,97
PRP 2,5%	18,7	24,1	8	7	28	36	7,81	10,93
PRP 5%	14,9	15,8	6	6	24	28	6,17	9,55

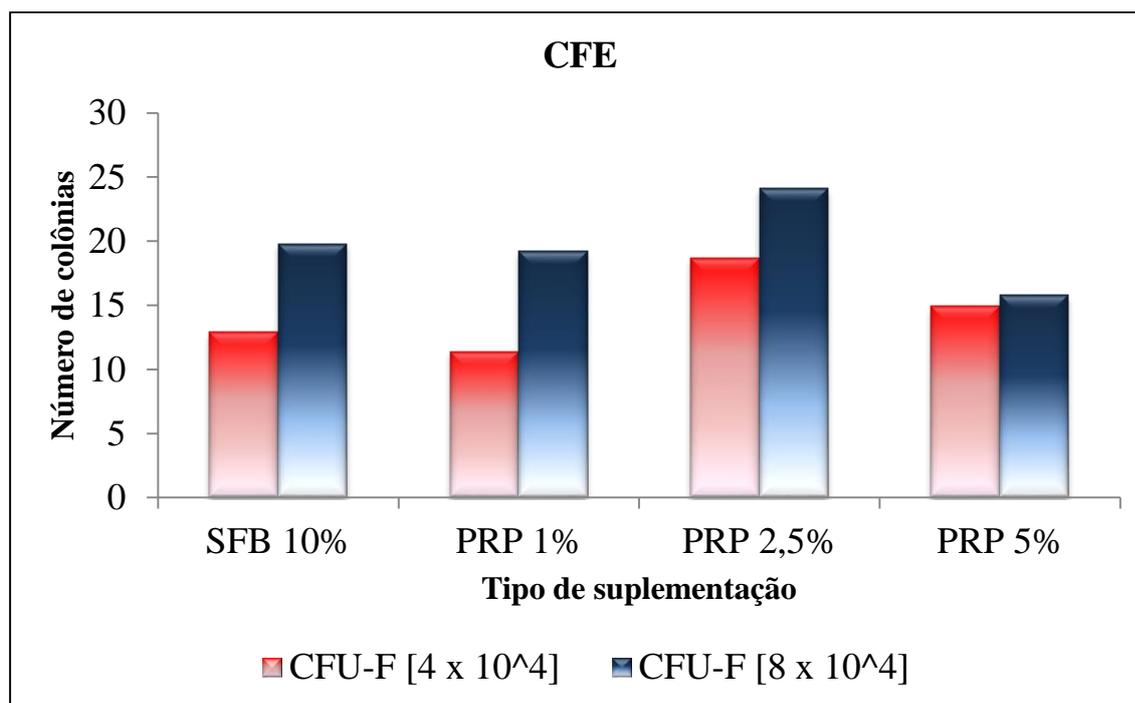


Figura 7 - Número médio de unidades formadoras de colônia (CFE) . Plaqueadas nas densidades iniciais: $[4 \times 10^4]$ e $[8 \times 10^4]$, induzidas com diferentes tipos de tratamentos nas respectivas concentrações: SFB 10%, PRP 1%, PRP 2,5%, PRP 5%.

9.2 - POTENCIAL DE EXPANSÃO DAS COLÔNIAS

Para a análise da influência do PRP na atividade proliferativa das UFC-F, foi determinado o diâmetro de cada colônia presente nos poços, e então calculamos a média do diâmetro das colônias obtidas.

Assim observamos que quanto à proliferação, o SFB10% obteve uma média um pouco maior do que o PRP1%. Porém essa taxa foi facilmente superada já pelo PRP 2,5% onde obtivemos colônias maiores e mais densas quando comparado ao controle. E sucessivamente, quanto maior a concentração de PRP adicionado ao meio de cultura basal, maior será o tamanho das colônias obtidas (Tabela 2, Figura 8).

Logo com o PRP 5% a indução na proliferatividade das BMSC superou significativamente o tratamento com o SFB10%, atingindo a subconfluência no décimo segundo dia, quando este tratamento foi interrompido para que fosse possível a mensuração do diâmetro das colônias (Tabela 2, Figura 8).

Devido a alta atividade proliferativa obtida com PRP 5%, quando as colônias presentes na placa encontram seus bordos, as células de diferentes colônias se sobrepõem, e conseqüentemente, a fusão de várias colônias forma uma única grande colônia. Com isso, o tratamento com concentrações muito inferiores de PRP, obtemos colônias muito maiores, quando comparadas com a concentração de 10% SFB. O que garante um resultado muito mais significativo na expansão das UFC-F quando utilizamos o PRP alternativamente ao método convencional de cultivo com SFB (Tabela 2, Figura 8).

Tabela 2. Média do diâmetro das colônias obtidas, valor mínimo e valor máximo dos diâmetros encontrados em (cm); e desvio padrão. . Plaqueadas nas densidades iniciais: $[4 \times 10^4]$ e $[8 \times 10^4]$, induzidas com diferentes tipos de tratamentos nas respectivas concentrações: SFB 10%, PRP 1%, PRP 2,5%, PRP 5%.

Densidade Tipos tratamento	Média Diâmetro (cm)		Valor Mínimo (cm)		Valor Máximo (cm)		Desvio Padrão	
	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$	$[4 \times 10^4]$	$[8 \times 10^4]$
SFB 10%	0,25	0,28	0,20	0,18	0,32	0,40	0,06	0,06
PRP 1 %	0,21	0,26	0,15	0,20	0,25	0,35	0,04	0,05
PRP 2,5%	0,32	0,38	0,22	0,21	0,50	0,60	0,10	0,13
PRP 5%	0,39	0,49	0,23	0,31	0,70	0,90	0,17	0,21

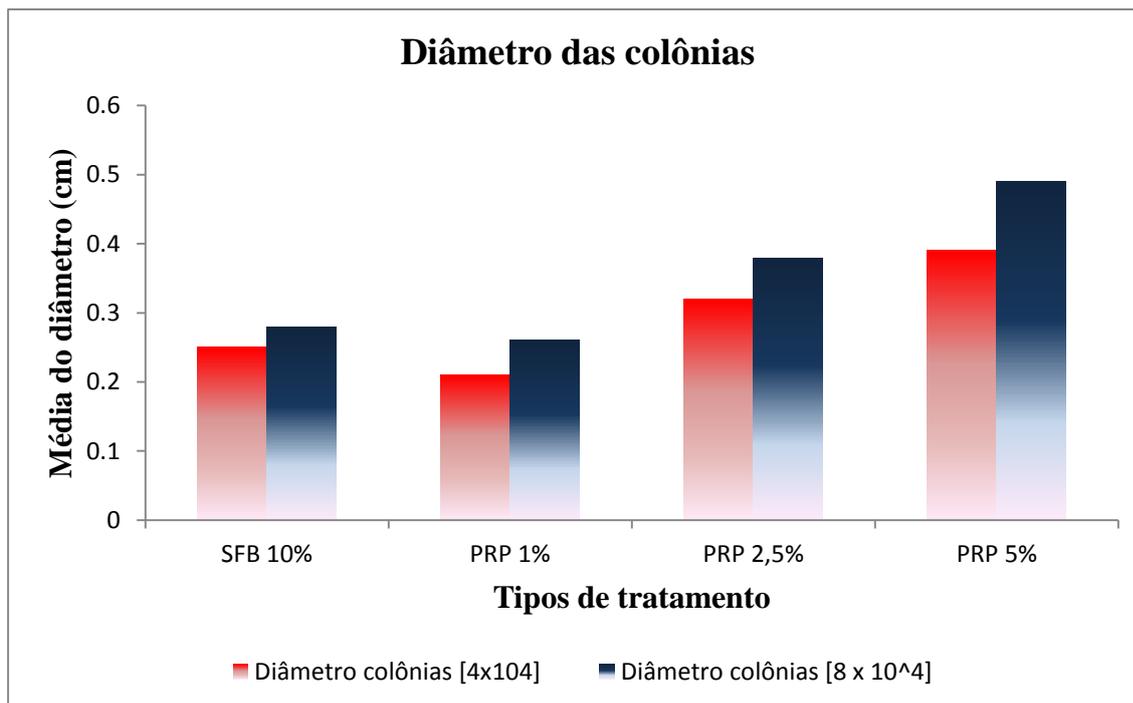


Figura 8 - Média do diâmetro das colônias obtidas. Plaqueadas nas densidades iniciais: $[4 \times 10^4]$ e $[8 \times 10^4]$, induzidas com diferentes tipos de tratamentos nas respectivas concentrações: SFB 10%, PRP 1%, PRP 2,5%, PRP 5%.

9.3 - MORFOLOGIA

Quanto à morfologia das células, podemos observar que quando cultivadas com o SFB apresentam uma morfologia discretamente distinta das células tratadas com PRP (Figura 9).

Podemos então observar que mesmo todas mantendo seu formato fusiforme, comum ao ‘espalhamento’ das células sobre o substrato, as células cultivadas com SFB são menores e menos esticadas. Enquanto as células cultivadas sob influência do PRP apresentam uma maior superfície de aderência, o que corrobora a alta atividade proliferativa dessas células, uma vez que para se dividir elas se soltam parcialmente do substrato, realizam a divisão mitótica e posteriormente todas voltam a aderir novamente ao plástico e por isso encontram-se mais esticadas sobre o plástico (Figura 9).

Observamos também que quanto maior for a concentração do PRP, mais robustas serão as células em cultura, sendo assim no tratamento com PRP 5% obtemos células esticadas e ainda assim mais robustas, ou seja o PRP leva a uma maior área das colônias formadas, abrangendo assim uma superfície maior do que as células cultivadas com SFB. O que indica que o PRP assume também influência no crescimento das BMSC.

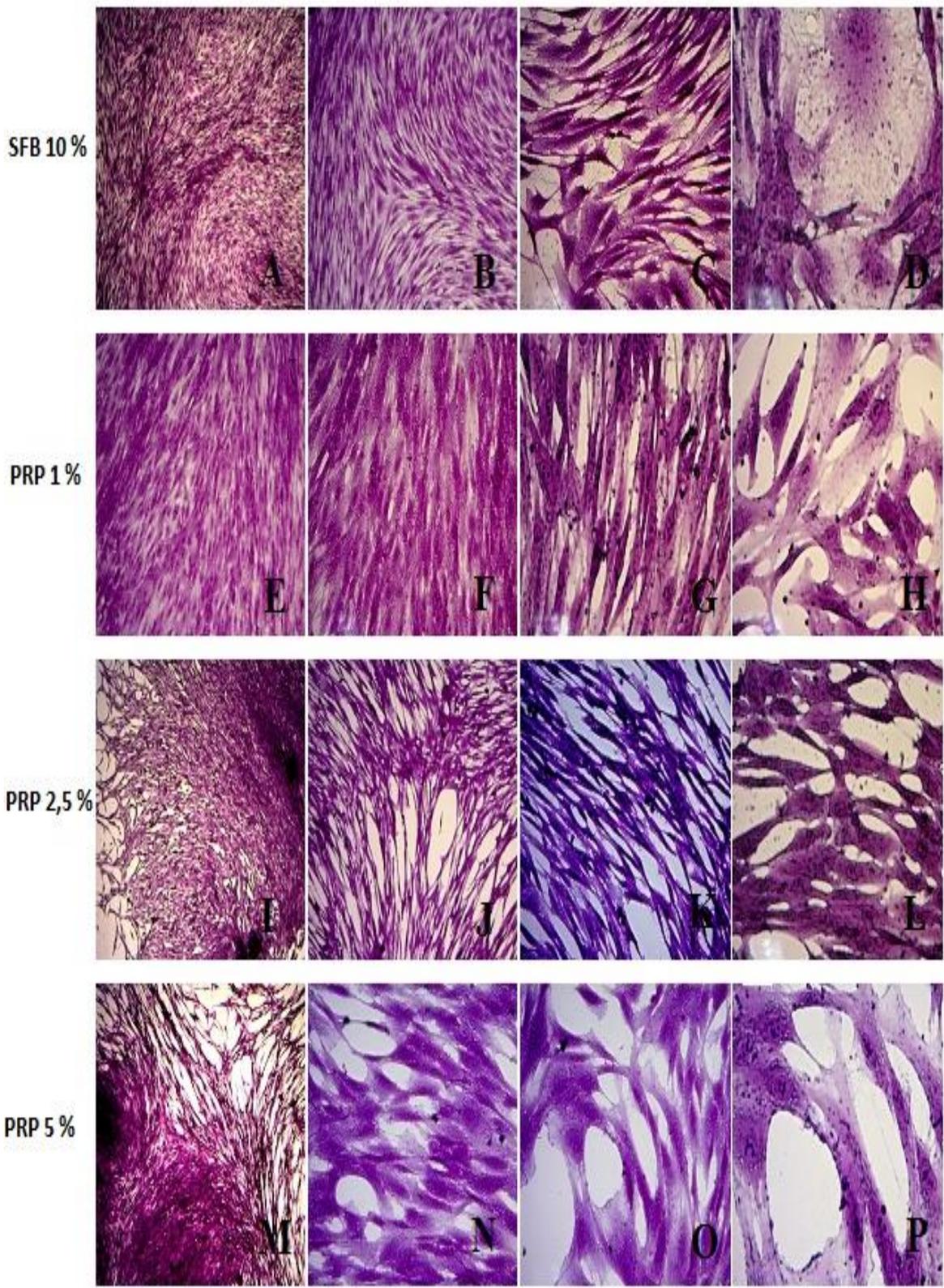


Figura 9: Morfologia das BMSC observadas em microscópio invertido nas objetivas de: 4x (A, E, I, M); 10x (B, F, J, N); 40x (C, G, K, O); e 100 x (D, H, L, P), após o final da cultura, no 14º dia. As linhas referem-se respectivamente aos tipos de tratamento recebido: SFB 10% (A, B, C, D); PRP 1% (E, F, G, H); PRP 2,5 % (I, J, K, L) ; PRP 5% (M, N, O, P).

DISCUSSÃO

Diante de tantos potenciais terapêuticos alcançado com o uso das BMSC, a baixa concentração dessas células na medula, faz com que seja necessária sua expansão *in vitro*, antes do tratamento clínico. As BMSC, representam cerca de 0,01% a 0,0001% (representa em média $[10^7]$ total) das células mononucleadas da medula adulta fresca., observando que esse número decresce significativamente de acordo com a idade do paciente (BYDLOWSKI et al., 2009).

São utilizadas á partir de 2×10^6 células/Kg de massa corpórea para transplantes. Por isso torna-se indispensável a proliferação dessas células *in vitro*, onde o tempo de cultura vai variar de acordo com o proposta clínica e conseqüentemente com a concentração de células necessárias para realizar a transfusão (KOC et al., 2002; VALIM, 2012; ZHAO, REN & HAN, 2016).

Contudo, o protocolo reproduzido universalmente, utiliza-se do soro fetal bovino como fonte exógena de fatores de crescimento. Porém, quando esse material xenóforo (SFB) é adicionado ao meio de cultura basal, o produto gerado não é ideal para infusão no organismo humano (xenoenxerto) e pode causar reações de inflamatórias severas culminando na rejeição das células transplantadas.

Outro fator de grande relevância na utilização do soro animal em cultura, é a inconstância na concentração de fatores de crescimento obtidos em diferentes lotes, uma vez que a variabilidade na quantidade desses fatores, está diretamente relacionada com a taxa proliferativa que o soro induz nas BMSC (CORDEIRO-SPINETTI, 2013 - 13).

Portanto nosso estudo propõe a utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) como alternativa à suplementação com SFB. Além das características explicitas que fazem o PRP prevalecer ao uso de soro animal, como o fato do fácil acesso por ser obtido através do sangue periférico, o PRP demonstrou uma influência considerável na otimização da cultura de BMSC, propiciando assim a terapia autóloga.

Dessa forma á partir da técnica de isolamento baseada na aderência das BMSC ao substrato, analisamos a sua capacidade de aderir ao plástico, e ainda sua proliferação mediante diferentes tratamentos. Foi adotado o SFB 10% como controle de nosso estudo, que visa verificar a influência do PRP sobre as BMSC cultivadas *in vitro*. Para tal enriquecemos o meio de cultura com PRP 1% ; PRP 2,5 % e PRP 5%.

Com o método de eficiência de formação de colônia (CFE- *colony forming efficiency*), observamos que o PRP influencia positivamente na aderência das UFC-F em cultura. Uma vez que à partir das mesmas densidades iniciais plaqueadas, conforme aumentamos a concentração de PRP (1% , 2,5% e 5% respectivamente) aumentamos também a capacidade de aderência das BMSC, o que pode ser observado em contraste com o SFB, na Tabela 1, Figura 7. Portanto, a maior concentração de PRP favorece a formação de um maior número de colônias, estando diretamente relacionado a um aumento na capacidade de aderência das UFC-F.

Destacamos que devido ao grande potencial proliferativo atingido com o PRP 5%, no décimo segundo (12º) dia de tratamento, as células já se apresentavam em monocamada subconfluente (aproximadamente 80%-90%), o que nos forçou a interromper o tratamento. Uma vez que se as células em subconfluência confundem seus bordos, a contagem de colônias separadas é prejudicada, o que explica o menor número de colônias descritas no tratamento com PRP 5%. Portanto a comparação ideal para a constatação da influência do PRP na aderência das UFC-F (CFE), seria entre o SFB 10% e o PRP 2,5%, mostrando que essa baixa concentração de PRP já é o suficiente para prevalecer ao soro animal (Tabela 1, Figura 7).

Quanto ao potencial de expansão das colônias, ao analisarmos a área das colônias formadas, observamos que o PRP além de influenciar a aderência e com isso a maior quantidade de progenitores multipotentes em cultura, verificamos também a influência do PRP na proliferação das BMSC.

Foi constatado que o tratamento com PRP, mesmo em concentrações muito inferiores ao SFB, dá origem a colônias significativamente maiores. O que se refere diretamente a ação que o PRP exerce sobre as BMSC em cultura, que interfere diretamente no seu potencial proliferativo, tendo a capacidade de amplificar consideravelmente o mesmo (Tabela 2, Figura 8).

Assim, atingimos o mesmo potencial proliferativo do SFB 10% com o PRP1% e conseqüentemente, quanto maior for a concentração de PRP em cultura, maiores são as colônias obtidas. Dessa forma o tratamento com PRP 5%, apresentou a maior influência na área das colônias obtidas, logo, no 12º dia de cultura essas células já se encontravam em monocamada subconfluente (Tabela 2, Figura 8).

A morfologia fusiforme das células observadas também difere de acordo com o tratamento recebido. Aonde observamos que as células tratadas com o SFB, apresentam-se

menos esticadas sobre o substrato, quando comparada com as BMSC tratadas com PRP, que por sua vez apresenta células mais robustas e mais esticadas (Figura 9).

Mostramos que o PRP demonstra uma maior atuação sobre a adesão celular, dos progenitores mesenquimais em cultura, atuando na ainda na proliferação dos mesmos, o que culmina em uma maior superfície de aderência obtida com o uso de PRP quando comparadas ao SFB, formando assim colônias maiores (Figura 9).

Ainda, no tratamento com PRP encontramos muitas células apinhadas no centro da colônia (principalmente no PRP 2,5% e PRP 5%), dando uma coloração roxo escuro no centro das colônias. O que indica que ali existe um concentrado de células em alta atividade proliferativa, onde a sobreposição das células favorece essa coloração mais forte no centro da colônia. Podemos ainda observar no bordo das colônias, células com maior área de adesão, o que ratifica a proliferação celular constatada, uma vez que ao se proliferar essas células pertencentes ao final da cascata de divisão celular, se espalham pelo substrato (Figura 9).

A capacidade de realizar divisões simétricas ou assimétrica pode ser a chave para o reparo do tecido. Com isso as células-tronco equilibram essa divisão ao originar algumas células idênticas (autorenovação) garantem a manutenção de células indiferenciadas na colônia e essas podem se proliferar por inúmeras vezes. Por outro lado as células comprometidas vão ser induzidas a se diferenciar de acordo com o tecido proposto, e isso ocorre tanto *in vitro* (sob condições ideais de cultura) ou *in vivo* (quando introduzidos localmente) e desta forma assumem papel chave na regeneração tecidual (MORRISON E KIMBLE, 2006).

Essa via de comprometimento das BMSC *in vitro* desencadeada pela divisão assimétrica, ocorre de acordo com um modelo hierárquico descrito pela cascata de diferenciação. A cascata de diferenciação, se refere as etapas que as células percorrem até adquirir seu fenótipo final. Dessa maneira as BMSC são células primitivas da cascata de diferenciação assim elas podem dar origem a progenitores, tripotentes (com o fenótipo osteo-condro-adipogênico), bitopotes (fenótipo osteo-condrogênico) ou unipotentes (osteogênicas) (MURAGLIA, 2000).

. A capacidade de proliferação dos clones multipotentes (osteo-condro-adipo) é por volta de 22- 23 *doublings* (duplicação das células). Já os clones bipotentes (osteo-condro) apresentam uma atividade proliferativa um pouco menor, e apresentam capacidade de realizar em torno de 20-22 *doublings*, e o ultimo fenótipo mantido é o osteogênico, que pode realizar em média 19 *doublings*. Observou-se ainda que com aproximadamente 23 *doublings*, 99%

das células em cultura expressam marcadores de comprometimento com a linhagem osteogênica (MURAGLIA, 2000). E por isso, quanto mais primitiva forem as células em cultura (indiferenciadas ou muitipotentes), maior será o potencial proliferativo e portanto maiores serão as colônias obtidas.

Admite-se que são vários os fenótipos mesenquimais finais inatos alcançados pelas BMSC, assim como: osso, cartilagem, tendão, ligamento, gordura, músculo, derme, estroma medular de suporte a hematopoiese, e outros tecidos conectivos (DEXTER, ALLEN & LAJTHA, 1977; TAVASSOLI & FRIEDENSTEIN, 1983; CAPLAN, 1991).

Sabe-se também que as BMSC estão predispostas a sofrer influência do nicho em que se encontram, devido aos fatores liberados localmente *in-situ*, logo podem ser induzidas a se diferenciar em diversos tecidos *in vivo*. Dessa forma, quando as células mesenquimais estão no site de lesão, as moléculas bioativas secretadas pelas mesmas, vão agir de forma autócrina, induzindo a autorenovação celular, ou de forma parácrina, induzindo assim a proliferação das células saudáveis do tecido em questão (MORRISON & SPRADLING, 2008). Hoje já é bem elucidado na literatura a pluripotência dos progenitores mesenquimais. Dessa forma fatores intrínsecos determinam o padrão de diferenciação mesenquimal, enquanto os fatores extrínsecos (microambiente *in vivo* / meio indutor; densidade do tecido / substrato de cultura; interação célula-célula) permitem a transdiferenciação. (WATT & HOGAN, 2000)

Devemos também ressaltar a influência do PRP quando ministrados juntamente com as BMSC. Na literatura encontra-se diversas descrições da função realizada pelos diferentes fatores de crescimento contido nas plaquetas.

As plaquetas contém moléculas especiais que ficam retidas em seus grânulos, e só serão liberados mediante uma lesão *in vivo*. Porém *in vitro*, a interação das plaquetas com as BMSC, desencadeia a liberação do conteúdo de seus grânulos, e estes iram exercer ações diretas na proliferação das BMSC. Como exemplo podemos citar alguns fatores de crescimento essenciais para que ocorra a proliferação (*vitro*) / regeneração (*vivo*) das células: PDGF (*platelet derived growth factor*); TGF- β (*transforming growth factor- β*); EGF (*epidermal growth factor*); bFGF (*basic fibroblast growth factor*); e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*); EVGF (*endothelial vascular growth factor*). Todos esses fatores atuam ativamente em várias funções regeneradoras exercidas pelas BMSC, que serão ainda mais amplificadas pela ação também reparadora inata das plaquetas.

Assim o PDGF- AB e o IGF- 1 s são fatores que influenciam tanto na proliferação celular, *in vitro*. *In situ* o PDGF responsável pela inicialização do reparo nos tecidos, aumentando as taxas de mitose celular, promove a angiogênese, a ativação de macrófagos e diferenciação das BMSC (PONTE et al., 2007).

Outros estudos demonstram que o IGF-1 combinado com TGF-B agem amplificando a proliferação das BMSC, influenciando também na diferenciação condrogênica. (LONGOBARDI et al., 2006). Já o TGF-B aumenta a quimiotaxia e a mitose *in vitro*, assim como *in vivo* estimula ainda a deposição de colágeno. Por sua vez o IGF está relacionado com a mobilização parácrina das outras BMSC, aumentando a velocidade e a eficácia do reparo tecidual (HAIDER et al., 2008).

O FGF-2 desempenha um papel crucial na autorenovação e na manutenção do multipotencial das BMSC humanas *in vitro* (TSUTSUMI et al., 2001). *In situ* induz também a produção de colágeno e ácido hialurônico.

O EGF, além de também aumentar a atividade proliferativa das BMSC *ex vivo*, durante o processo de regeneração, induzem o desenvolvimento epitelial e a angiogênese. Sendo o VEGF o fator mais importante na promoção da angiogênese, e maturação dos vasos recém formados, aumentando também a permeabilidade vascular.

Destacamos ainda estudos que demonstram que o PRP promove a migração das células mesenquimais até o site de lesão (ROUBELAKIS et al., 2004).

Nossos resultados demonstram que o plasma rico em plaquetas aumenta as taxas de aderência e proliferação das BMSC em cultura, o que nos oferece a possibilidade de otimizar o tratamento dessas células, além de tornar o seu uso para fins terapêuticos muito mais seguro, devido a compatibilidade das plaquetas com o organismo humano.

Devido ao potencial encontrado *in vitro* e *in vivo* quando usamos a terapia combinada de BMSC + PRP. Nosso estudo demonstrou que além de superar o potencial proliferativo alcançado com o SFB *in vitro*, o PRP implica na disponibilização mais rápida e segura das BMSC, assim são inúmeros os possíveis benefícios do tratamento clínico oferecido por essa combinação. Dessa forma, verificamos a possibilidade do tratamento terapêutico que somente o uso das BMSC cultivadas sobre influência do PRP oferecem. Logo podemos promover a otimização da cultura e com isso as células obtidas conferem segurança e eficiência ao enxerto. Assim oferecemos a real possibilidade de cura para uma gama de patologias consideradas irreversíveis pelos métodos tradicionais. Ressaltamos ainda, a grande expectativa despertada não só na comunidade científica, mas principalmente na população em

geral, que muitas vezes conta com a terapia de células-tronco, como única esperança para familiares e pacientes, antes desamparados pela impossibilidade de tratamento através da medicina convencional.

11 - CONCLUSÃO

Nosso trabalho sugere o uso plasma rico em plaquetas como alternativa de suplementação ao soro animal para a cultura de células mesênquimais estromais da medula óssea humana (BMSC). Tendo em vista que o PRP apresenta inúmeras vantagens para o cultivo de células humanas, nosso estudo procurou verificar a influência do mesmo sobre as BMSC.

Deste modo, além de o PRP ter se demonstrado altamente eficaz para o isolamento, auxiliando na aderência das células, atua também amplificando significativamente a taxa de proliferação das mesmas. Desta forma, nosso estudo demonstra que concentrações muito inferiores de PRP (2,5% e 5%) já são suficientes para aumentar a taxa de aderência das BMSC, assim como para superar a atividade proliferativa obtida com uso do SFB 10%.

Logo, nosso estudo visa otimizar o tempo de cultura *in vitro*, para a disponibilização mais rápida dessas células para o tratamento clínico. Além de propiciarmos o tratamento autólogo com o uso do PRP e BMSC do próprio paciente a ser tratado, garantindo a segurança do enxerto. O tratamento alogênico também tem se demonstrado eficaz e seguro no uso de aloenxertos, ampliando ainda mais o potencial terapêutico obtido no tratamento concomitante desses dois tipos celulares. Contamos ainda com a significativa amplificação dos potenciais exercidos pelas BMSC quando tratadas com PRP, que devido aos seus fatores de crescimento secretados pelas plaquetas, aumentam a eficiência das BMSC tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Concluimos ressaltando a relevância de nosso estudo, diante das inúmeras patologias potencialmente curáveis através do uso de BMSC na terapia celular, e dessa forma o PRP viabiliza o uso clínico em humanos, sem comprometer, e ainda amplificando as funções e o caráter antiimunogênico exercido pelas BMSC *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANASYEV, B. V. et al. AJ Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cell Ther Transplant**, v. 1, p. 35-38, 2009.

AGGARWAL, Sudepta; PITTENGER, Mark F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.

AL-KHALDI, A. et al. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response *in vivo*. **Gene therapy**, v. 10, n. 8, p. 621-629, 2003.

ALTRAN, Silvana Cereijido. **Substituição dos componentes xenobióticos empregados no meio de cultura para manutenção de queratinócitos humanos, por similares de origem humana**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ASKARI, Arman T. et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. **The Lancet**, v. 362, n. 9385, p. 697-703, 2003.

BALDUINO, Alex et al. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. **Cell and tissue research**, v. 319, n. 2, p. 255-266, 2005.

BARRIENTOS, Stephan et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601, 2008.

BATISTA, Patrícia Sofia Pinhanços. **Nova abordagem terapêutica para a regeneração do Osso**. 2013. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR.

BHAKTA, Shyam; HONG, Ping; KOC, Omer. The surface adhesion molecule CXCR4 stimulates mesenchymal stem cell migration to stromal cell-derived factor-1 in vitro but does not decrease apoptosis under serum deprivation. **Cardiovascular Revascularization**

Medicine, v. 7, n. 1, p. 19-24, 2006.

BLAKYTTY, Robert et al. Latent TGF- β 1 activation by platelets. **Journal of cellular physiology**, v. 199, n. 1, p. 67-76, 2004.

BOLAND, Thomas et al. Application of inkjet printing to tissue engineering. **Biotechnology journal**, v. 1, n. 9, p. 910-917, 2006.

BRIGHTON, Carl T. et al. The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 275, p. 287-299, 1992.

BRUNNER, Georg et al. Extracellular regulation of TGF-beta activity in wound repair: growth factor latency as a sensor mechanism for injury. **THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART-**, v. 92, p. 253-261, 2004.

ROUBELAKIS, Maria G. et al. Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 10, n. 3, p. 417-428, 2014.

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of pathology**, v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009

CAPLAN, Arnold I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of cellular physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CAPLAN, Arnold I. All MSCs are pericytes?. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 229-230, 2008.

CAPLAN, Arnold I. Bone development. **Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues**, n. 136, p. 3-21, 1988.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, Arnold I. The mesengenic process. **Clinics in plastic surgery**, v. 21, n. 3, p. 429-435, 1994.

CAPLAN, Arnold I.; CORREA, Diego. The MSC: an injury drugstore. **Cell stem cell**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2011.

CAPLAN, Arnold I.; DENNIS, James E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.

CASTRO, Helena Carla et al. Platelets: still a therapeutical target. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 5, p. 321-332, 2006.

CASTRO-MALASPINA, Hugo et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v. 56, n. 2, p. 289-301, 1980.

CHEN, Li-Bo et al. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 20, p. 3016-3020, 2004.

CORDEIRO-SPINETTI, Eric et al. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 2, 2013.

CORSELLI, Mirko et al. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 6, p. 1104-1109, 2010.

CRISAN, Mihaela et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 301-313, 2008.

CRISTOFANILLI, Massimiliano et al. Mesenchymal stem cells enhance the engraftment and

myelinating ability of allogeneic oligodendrocyte progenitors in dysmyelinated mice. **Stem cells and development**, v. 20, n. 12, p. 2065-2076, 2011.

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

DEXTER, T. Michael; ALLEN, Terence D.; LAJTHA, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **Journal of cellular physiology**, v. 91, n. 3, p. 335-344, 1977.

DÍAZ-FLORES, Lucio et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. 2009.

DICK, D. B. J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Med**, v. 3, p. 730-737, 1997.

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

ENGLER, Adam J. et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677-689, 2006.

ERICKSON, G. A.; BOLIN, S. R.; LANDGRAF, J. G. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. **Developments in biological standardization**, v. 75, p. 173-175, 1990.

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

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; GERASIMOV, U. V. Bone marrow osteogenic

stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell proliferation**, v. 20, n. 3, p. 263-272, 1987.

FRIEDENSTEIN, Alexander Jakovlevich et al. Heterotopic Transplants of Bone Marrow. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

GAEBEL, Ralf et al. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 35, p. 9218-9230, 2011.

GLUCKMAN, Eliane et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **N Engl J Med**, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.

GNECCHI, Massimiliano et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GRANERO-MOLTÓ, Froilán et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. **Stem cells**, v. 27, n. 8, p. 1887-1898, 2009.

GRECO, A. Células-Tronco, Uma Revolução Científica. **São Paulo: Oirã**, 2008.

GRECO, Steven J. et al. An interdisciplinary approach and characterization of neuronal cells transdifferentiated from human mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 16, n. 5, p. 811-826, 2007.

GRIFFIN, Matthew D.; RITTER, Thomas; MAHON, Bernard P. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. **Human gene therapy**, v. 21, n. 12, p. 1641-1655, 2010.

GRONTHOS, Stan et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of cell science**, v. 116, n. 9, p. 1827-1835, 2003.

GRONTHOS, Stan; SIMMONS, Paul J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. **Blood**, v. 85, n. 4, p. 929-940, 1995.

GRUENE, Martin et al. Laser printing of stem cells for biofabrication of scaffold-free autologous grafts. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2010.

GUILAK, Farshid et al. Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. **Cell stem cell**, v. 5, n. 1, p. 17-26, 2009.

HAIDER, Husnain Kh et al. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1 α /CXCR4 signaling to promote myocardial repair. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1300-1308, 2008.

HARMAN, R. et al. A retrospective review of 66 cases of tendon injury in the equine treated with adipose derived stem and regenerative cell therapy. **Vet. Stem internal data**, 2006.

HAVENS, Aaron M. et al. Human very small embryonic-like cells generate skeletal structures, *in vivo*. **Stem cells and development**, v. 22, n. 4, p. 622-630, 2012.

HE, Aina et al. The antiapoptotic effect of mesenchymal stem cell transplantation on ischemic myocardium is enhanced by anoxic preconditioning. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 25, n. 6, p. 353-358, 2009.

HELDIN, Carl-Henrik et al. Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. **The EMBO journal**, v. 7, n. 5, p. 1387, 1988.

HELDIN, Carl-Henrik; WESTERMARK, Bengt. Mechanism of action and *in vivo* role of platelet-derived growth factor. **Physiological reviews**, v. 79, n. 4, p. 1283-1316, 1999.

HOEBEN, Ann et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacological reviews**, v. 56, n. 4, p. 549-580, 2004.

HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395,

2005.

HUANG, GT-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

ISAAC, César et al. Replacement of fetal calf serum by human serum as supplementation for human fibroblast culture. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 3, p. 379-384, 2011.

JIANG, Yuehua et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41-49, 2002

JIANG, Xiao-Xia et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4120-4126, 2005.

JIN, David K. et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. **Nature medicine**, v. 12, n. 5, p. 557-567, 2006.

KAPLAN, Karen L. et al. Platelet alpha-granule proteins: studies on release and subcellular localization. **Blood**, v. 53, n. 4, p. 604-618, 1979.

KAWADA, Hiroshi et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3581-3587, 2004.

KEAN, Thomas J. et al. MSCs: delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. **Stem Cells International**, v. 2013, 2013.

KEILHOFF, Gerburg et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. **European journal of cell biology**, v. 85, n. 1, p. 11-24, 2006.

KING, Sarah M.; REED, Guy L. Development of platelet secretory granules. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2002. p. 293-302.

KITAORI, Toshiyuki et al. Stromal cell–derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 3, p. 813-823, 2009.

KNIAZEFF, A. J. et al. Detection of bovine viruses in fetal bovine serum used in cell culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 11, n. 6, p. 400-403, 1975.

KOC, O. N. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone marrow transplantation**, v. 30, n. 4, p. 215-222, 2002.

KOCH, Lothar et al. Laser printing of skin cells and human stem cells. **Tissue Engineering Part C: Methods**, v. 16, n. 5, p. 847-854, 2009.

KOHLER, Nancy; LIPTON, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. **Experimental cell research**, v. 87, n. 2, p. 297-301, 1974.

KOPEN, Gene C.; PROCKOP, Darwin J.; PHINNEY, Donald G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 19, p. 10711-10716, 1999.

KÖRBLING, M. et al. Successful engraftment of blood derived normal hemopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. **Experimental hematology**, v. 9, n. 6, p. 684-690, 1981.

LARONDA, Monica M. et al. LB-OR01-1: A 3D Printed Ovarian Bioprosthesis Restores Estrous Cyclicity and Supports Natural Ovulation, Live Birth and Lactation, 2016.

LAZARUS, HillardM et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic

use. *Bone marrow transplantation*, v. 16, n. 4, p. 557-564, 1995.

LE BLANC, Katarina et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. ***Experimental hematology***, v. 31, n. 10, p. 890-896, 2003.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. ***Journal of internal medicine***, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

LENSCH, M. William et al. Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera. ***Cell stem cell***, v. 1, n. 3, p. 253-258, 2007

LIN, Paul et al. Serial transplantation and long-term engraftment of intra-arterially delivered clonally derived mesenchymal stem cells to injured bone marrow. ***Molecular Therapy***, v. 22, n. 1, p. 160-168, 2014.

LONGOBARDI, Lara et al. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling. ***Journal of Bone and Mineral Research***, v. 21, n. 4, p. 626-636, 2006.

LUCARELLI, Enrico et al. Stromal stem cells and platelet-rich plasma improve bone allograft integration. ***Clinical orthopaedics and related research***, v. 435, p. 62-68, 2005.

LUCARELLI, Enrico et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. ***Biomaterials***, v. 24, n. 18, p. 3095-3100, 2003.

LUTTENBERGER, Thomas et al. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. ***Laboratory investigation***, v. 80, n. 1, p. 47-55, 2000.

MARX, Robert E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. ***Journal of oral and maxillofacial surgery***, v. 62, n. 4, p. 489-496, 2004.

MATIGIAN, Nicholas et al. Multipotent human stromal cells isolated from cord blood, term placenta and adult bone marrow show distinct differences in gene expression pattern. ***Genomics data***, v. 3, p. 70-74, 2015.

MCNICOL, A.; ISRAELS, S. J. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. **Thrombosis research**, v. 95, n. 1, p. 1-18, 1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, 2008. Acessado em : 2016.

MONTESANO, Roberto; ORCI, Lelio. Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 13, p. 4894-4897, 1988.

MORRISON, Sean J.; KIMBLE, Judith. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-1074, 2006.

MORRISON, Sean J.; SPRADLING, Allan C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 598-611, 2008.

MOUSTAKAS, Aristidis et al. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. **Immunology letters**, v. 82, n. 1, p. 85-91, 2002.

MURAGLIA, Anita; CANCEDDA, Ranieri; QUARTO, Rodolfo. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of cell science**, v. 113, n. 7, p. 1161-1166, 2000.

MURPHY, J. Mary et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 12, p. 3464-3474, 2003.

MURPHY, Matthew B.; MONCIVAIS, Kathryn; CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 11, p. e54, 2013.

MURPHY, Sean V.; ATALA, Anthony. 3D bioprinting of tissues and organs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 773-785, 2014.

NAUTA, Alma J.; FIBBE, Willem E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NOROTTE, Cyrille et al. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5910-5917, 2009.

OGAWA, Makio. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 2844-2853, 1993.

OKITA, Keisuke; ICHISAKA, Tomoko; YAMANAKA, Shinya. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **nature**, v. 448, n. 7151, p. 313-317, 2007.

OWEN, Maureen; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues**, v. 136, p. 42-60, 1988.

PARK, Hyung Chun et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 5-6, p. 913-922, 2005.

PHINNEY, Donald G.; PROCKOP, Darwin J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.

PIERCE, G. F. et al. PDGF and TGF- β 1 selectively modulate GAG, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds. **Am. J. Pathol**, v. 138, p. 629-646, 1991.

PITTENGER, Mark F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PLACE, Elsie S.; EVANS, Nicholas D.; STEVENS, Molly M. Complexity in biomaterials for tissue engineering. **Nature materials**, v. 8, n. 6, p. 457-470, 2009.

PONTE, Adriana López et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. **Stem cells**, v. 25, n. 7, p. 1737-1745, 2007.

PRUSINER, Stanley B. Neurodegenerative diseases and prions. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 20, p. 1516-1526, 2001.

RAFF, Martin. Adult stem cell plasticity: fact or artifact?. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2003.

SÁNCHEZ, Andrés R.; SHERIDAN, Phillip J.; KUPP, Leo I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, n. 1, 2003.

SASAKI, Mikako et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **the Journal of immunology**, v. 180, n. 4, p. 2581-2587, 2008.

SATO, Hidemitsu et al. Epidermal growth factor receptor-transfected bone marrow stromal cells exhibit enhanced migratory response and therapeutic potential against murine brain tumors. **Cancer gene therapy**, v. 12, n. 9, p. 757-768, 2005.

SATO, Yasushi et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 756-763, 2005.

SAYED, Moustafa. Effects of Na/K-ATPase and its ligands on bone marrow mesenchymal stem cell differentiation. 2014.

SHAKE, Jay G. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. **The Annals of thoracic surgery**, v. 73, n. 6, p. 1919-1926, 2002.

SHI, Songtao; GRONTHOS, Stan. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of bone and mineral research**, v. 18, n. 4, p. 696-704, 2003.

SOLCHAGA, Luis A. et al. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 203, n. 2, p. 398-409, 2005.

SONG, Lin; TUAN, Rocky S. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. **The FASEB Journal**, v. 18, n. 9, p. 980-982, 2004.

SPAGGIARI, Grazia Maria et al. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1327-1333, 2008.

TAICHMAN, Russell S. et al. Prospective identification and skeletal localization of cells capable of multilineage differentiation *in vivo*. **Stem cells and development**, v. 19, n. 10, p. 1557-1570, 2010.

TAMAMA, Kenichi et al. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow–derived mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 24, n. 3, p. 686-695, 2006.

TAVASSOLI, Mehdi; FRIEDENSTEIN, Alexander. Hemopoietic stromal microenvironment. **American journal of hematology**, v. 15, n. 2, p. 195-203, 1983.

TÖGEL, Florian et al. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 289, n. 1, p. F31-F42, 2005.

TSUTSUMI, Shinichi et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 288, n. 2, p. 413-419, 2001.

VALIM, Vanessa de Souza. Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para aplicações clínicas. 2012.

VAN VELTHOVEN, Cindy TJ et al. Mesenchymal stem cell treatment after neonatal hypoxic-ischemic brain injury improves behavioral outcome and induces neuronal and oligodendrocyte regeneration. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 3, p. 387-393, 2010.

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

WATT, Fiona M.; HOGAN, Brigid LM. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WEIBRICH, Gernot et al. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 30, n. 2, p. 97-102, 2002.

WILFONG, Erin M. et al. Bone Marrow Derived Human Mesenchymal Stem Cells Exposed To Pro-Inflammatory Cytokines Lose Their Mesenchymal Marker Expression And Transform Into Cells With Antigen Presenting Cell Gene Expression Patterns. In: **B28. Advances in Stem Cells in Injury And Repair FOR 2016**. American Thoracic Society, 2016. p. A3075-A3075..

XU, Feng et al. A three-dimensional in vitro ovarian cancer coculture model using a high-throughput cell patterning platform. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 2, p. 204-212, 2011.

YE, J.; YAO, K.; KIM, J. C. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. **Eye**, v. 20, n. 4, p. 482-490, 2006.

YOO, Keon Hee et al. Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues. **Cellular immunology**, v. 259, n. 2, p. 150-156, 2009.

ZHANG, Z. L. et al. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. **Bone marrow transplantation**, v. 43, n. 1, p. 69-81, 2009.

ZHAO, Q., REN, H., & HAN, Z. ScienceDirect Mesenchymal stem cells : Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 2(1), 3–20. 2016

